

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА  
Факултет медицина  
Катедра „Инфекциозни болести, паразитология и дерматовенерология“**

---

**Д-Р ИЛИЯН ТОДОРОВ ТОДОРОВ**

**ПРОМЕНИ В СЕРУМНИЯ АМИЛОИД А ПРОТЕИН ПРИ НЯКОИ  
ИНФЕКЦИОЗНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ С ВИРУСНА ЕТИОЛОГИЯ**

**Дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“**

**област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт,  
професионално направление: 7.1. медицина, научна специалност  
„инфекциозни болести“**

**Научни ръководители  
Проф. д-р Маргарита Господинова, дм  
Доц. д-р Яна Бочева, дм**

**Варна, 2020**

# Съдържание

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	3
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	7
1. Острофазов отговор.....	7
2. Серумен амилоид А протеин.....	12
2.1. Структура на SAA.....	14
2.2. Експресия на SAA.....	16
2.3. Функционална характеристика на SAA.....	19
2.3.1. Проинфламаторни ефекти на SAA.....	24
2.4. Амилоидоза.....	27
2.5. Клинична стойност на SAA.....	28
2.5.1. SAA при бактериални инфекции.....	33
2.5.2. SAA при вирусни инфекции.....	35
2.5.3. SAA и други маркери за остро възпаление.....	37
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	41
IV. МАТЕРИАЛ.....	42
V. МЕТОДИ.....	44
VI. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	47
1. Разпределение на пациентите включени в проучването според нозологични единици и тежест на протичане.....	47
1.1. Разпределение по нозологични единици.....	47
1.2. Разпределение по тежест.....	47
1.2.1. Подгрупа А.....	48
1.2.2. Подгрупа Б.....	49
2. Контролна група.....	52
3. Промени в серумните нива на SAA при пациенти от подгрупа А.....	54
4. Промени в серумните нива на SAA при пациенти от подгрупа Б.....	59
5. Сравнителен анализ между SAA и други лабораторни маркери за остро възпаление – левкоцитен брой, СУЕ, CRP сред пациенти от подгрупа А и подгрупа Б.....	67
VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
VIII. ИЗВОДИ.....	89
IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	90
X. ПУБЛИКАЦИИ, ДОКЛАДИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	91
ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ.....	92
ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА.....	93

# ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ОФП	острофазови протеини
СПИН	синдром на придобита имунна недостатъчност
СУЕ	скорост на утаяване на еритроцитите
ABCA-1	ATP Binding Cassette A Member 1
CLA-1	conjugated linoleic acid-1
CRP	C-reactive protein
ESR	erythrocyte sedimentation rate
FPR	formyl peptide receptor
FPRL1	formyl peptide receptor-like 1
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
HDL	high-density lipoprotein
IF- $\gamma$	interferon-gamma
IL	interleukin
LDL	low-density lipoprotein
LENI	latex-enhanced nephelometric immunoassay
LIMP	lysosomal integral membrane protein
LXA4R	lipoxin A4 receptor
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MMPs	matrix metalloproteinases
mRNA	Messenger RNA
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NK	natural killer
NLRs	NOD-like receptors
NO	nitrogen oxide
Omp	outer membrane protein
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PRRs	pattern recognition receptors

RAGE	receptor for advanced glycation end-products
ROC	Receiver operating characteristic
rSAA	recombinant SAA
SAA	serum amyloid A
SRs	scavenger receptors
sTNFR-II	soluble receptor for tumor necrosis factor type II
Th	T-helpers
TLRs	toll-like receptors
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha

# I. Въведение

Човешкият организъм е заобиколен и постоянно изложен на микробни атаки, с които трябва да се бори ефективно.<sup>33,34</sup> Понастоящем са известни над 5000 причинителя на различни инфекциозни заболявания – вируси, бактерии, рикетсии, гъби и др.<sup>5,11</sup> Попадайки в човешкото тяло, те биват посрещнати от имунната система, която реализира своя ефект чрез действието на вродения и придобит имунитет.<sup>51</sup>

През последните години, все повече автори изследват и анализират промените, които настъпват именно във вродения имунитет и защитата, която той осигурява срещу съответна микробна инвазия.<sup>48,56,92,136</sup> Попадналите в макроорганизма патогени, преодолели действието на анатоמו-физиологичните бариери, активират протичането на редица биологични реакции. Развива се процес наречен възпаление (лат. *inflammatio-goria, изгарям*), чиято основна цел е локализиране и елиминиране на вредния агент от тялото, както и възстановяване на инфектираният тъкан и възвръщането и до нормалното или близко до нормалното състояние. В този смисъл възпалението има защитна функция.<sup>3</sup>

В протичането на възпалителната реакция са въввлечени клетъчните и хуморални фактори на вродения имунитет. Белтъците от системата на комплемента обгръщат патогена и го подлагат на бактерицидното действие на неутрофилните левкоцити.<sup>33</sup> Последните продуцират т.нар. медиатори на възпалението (проинфламаторни цитокини) - интерлевкини (*IL*), тумор некротизиращ фактор алфа (*TNF-α*), интерферон гама (*IFN-γ*) и др.<sup>3,109</sup>, обуславящи местните – *rubor* (зачервяване), *calor* (затопляне), *tumor* (подуване), *dolor* (болка) и *function laesa* (увредена функция) прояви на възпалението.<sup>3,94</sup>

Попадането на проинфламаторните цитокини в общата циркулация е свързано с развитие на системен отговор срещу инфекцията. Той включва общи прояви на възпаление (треска, отпадналост, безапетитие, сънливост) и промяна в серумната концентрация на определени белтъчни вещества, наречени острофазови протеини (ОФП). Към тях се отнасят С-реактивният протеин (*CRP*), серумният амилоид А протеин (*SAA*), церулоплазмин, фибриноген и др.<sup>176</sup> Количество им в серума може да бъде измерено, а отклоненията от базалните им стойности корелират с етиологията на възпалителния процес, тежестта на заболяването и ефекта от проведеното лечение.<sup>4</sup>

Към момента, в клиничната практика най-често се прилага количественото или качествено изследване на *CRP*.<sup>2,4</sup> Редица съвременни проучвания се фокусират върху анализиране ролята във възпалителния процес и на други ОФП<sup>34,58,160,174</sup>, какъвто е SAA. Нови данни сочат, че този показател превъзхожда *CRP*<sup>160,174</sup> в ранната диагностика на острите инфекциозни заболявания, особено онези от тях, с вирусна етиология. Динамиката в стойностите му позволява своевременна и прецизна оценка по отношение тежестта на протичане, ефект от проведеното лечение и прогноза за изхода от болестта.<sup>58,87,94,108</sup> През последните години, все повече автори<sup>34,62,94,95</sup> проучват ролята на SAA за избора на оптимална етиологична терапия и нейната продължителност. Анализира се още клиничната му стойност в оптимизирането на болничния престой и профилактиката на вътреболничните инфекции.<sup>96</sup>

Представените по-горе положителни страни от изследването на SAA, паралелно с факта, че у нас, при пациенти с инфекциозни заболявания, показателят не е проучван до момента, обосновават ***актуалността на настоящия дисертационен труд***. Изведена е идеята за включването му като част от задължителния лабораторен минимум, предоставяйки своевременна, обективна и мащабна информация, както за диагностичния, така и за терапевтичния процес при всеки конкретен болен.

## II. Литературен обзор

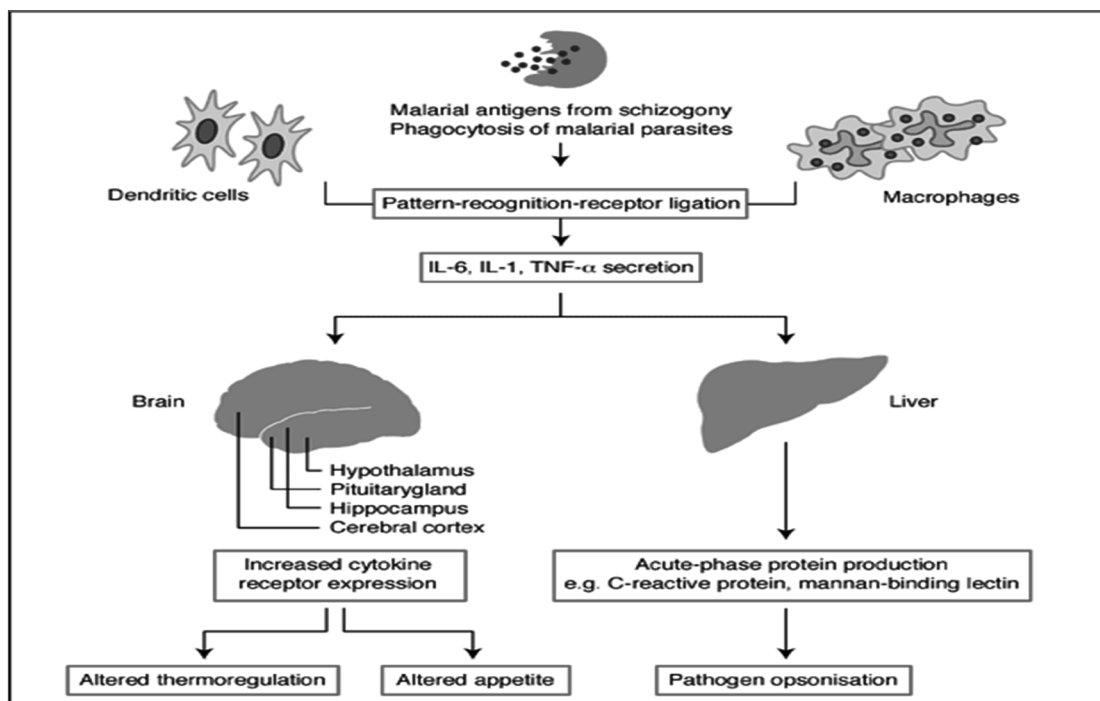
### 1. Острофазов отговор

Естественият имунитет представлява първа линия на защита срещу патогенни агенти.<sup>51,184</sup> Действието му е насочено към различни, неспецифични увреждащи нокси<sup>41,55</sup>, а функцията му се реализира с помощта на макрофаги, дендритни клетки, мастоцити, неутрофили, базофили, еозинофили и клетките естествени убийци (*natural killers, NK*).<sup>136,188</sup> При среща на макроорганизма с патогените, последните продуцират т.нар. проинфламаторни цитокини (медиатори на възпалението), представляващи молекулярно-биологичен субстрат на развиващата се възпалителна реакция. Такива са *IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6* и др.<sup>48,65</sup> На местно ниво, те обуславят локалните белези на възпаление, а попадайки в системната циркулация, водят до редица поведенчески, физиологични, биохимични и нутритивни промени<sup>3</sup>. Повлиява се метаболизма в различни органи, от които централно място заема черния дроб<sup>84,189</sup> (табл. 1).

<b>Невроендокринни промени</b>	фебрилитет; сомнолентност; анорексия; повишена секреция на: кортикотропин, кортизол, аргинин-вазопресин, катехоламини; намалена продукция на инсулиноподобен растежен фактор I;
<b>Хематопоеични промени</b>	анемия; левкоцитоза; тромбоцитоза;
<b>Метаболитни промени</b>	мускулна хипотония и негативен азотен баланс; намалена глюконеогенеза; повишени: чернодробна липогенеза и липолиза в мастната тъкан; намалена активност на липопротеин липазите в мускулната и мастна тъкан; кахексия;
<b>Чернодробни промени</b>	стимулиране на азотен оксид синтетази, хем оксигенази, супероксид дисмутаза; намаляване на фосфоенолпируват карбоксикиназната активност;
<b>Други</b>	понижаване на серумните цинк и желязо, хиперкупримия, нарастване на плазмения ретинол и глутатион;

Табл. 1. Системни промени по време на острофазов отговор<sup>65</sup>

Влиянието на проинфламаторните цитокини върху чернодробната тъкан представлява основна проява на острофазовия отговор (фиг. 1). Хепатоцитите реагират със засилена продукция на т.нар. острофазови протеини (ОФП)<sup>136</sup>.



Фиг. 1. Етапи на острофазов отговор<sup>58</sup>

Острофазовите протеини са белтъчни вещества, чиято плазмена концентрация по време на възпаление се изменя с поне 25% от изходната.<sup>65</sup> Те функционират едновременно като медиатори и инхибитори на възпалителния процес.<sup>65,136</sup> Според това, дали концентрацията им в серума нараства или намалява, различаваме две основни групи – позитивни и негативни.<sup>48,65,176</sup> (табл. 2)

Основният негативен ОФП е албуминът, чиято серумна концентрация по време на острофазов отговор намалява драстично, вероятно в следствие на албуминурия, повишена загуба от гастроинтестиналния тракт или понижен синтез от чернодробните клетки.<sup>48</sup> Това позволява на човешкия организъм да усвои неизползвания пул от аминокиселини и да го насочи към изграждането на позитивни ОФП и други важни медиатори на възпалението.



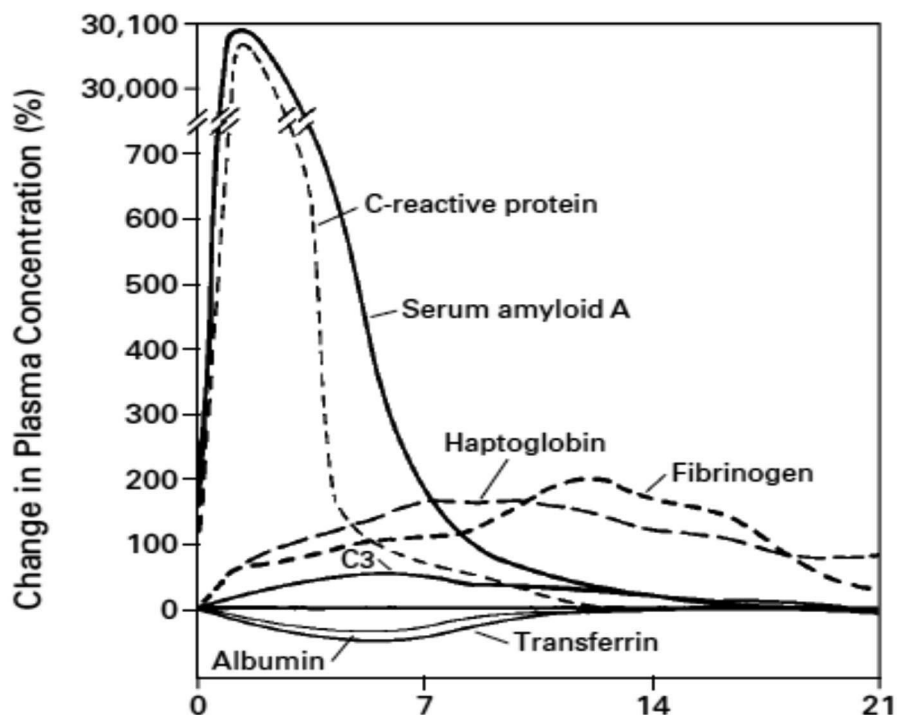
<p><b>Позитивни ОФП</b></p>	<p><b>Система на комплемента:</b> С<sub>3</sub>, С<sub>4</sub>, С<sub>9</sub>, фактор В, С1 инхибитор, С4b-свързващ протеин, маноза-свързващ лектин</p> <p><b>Коагулационна и фибринолитична система:</b> фибриноген, плазминоген, тъканен плазминогенен активатор, урокиназа, витронектин, инхибитор на плазминогенния активатор, протеин S</p> <p><b>Антипротеази:</b> Алфа-1 протеазен инхибитор, алфа-1 антихимотрипсин, панкреатичен секреторен трипсинов инхибитор, интер-алфа трипсинови инхибитори</p> <p><b>Транспортни протеини:</b> Церулоплазмин, хаптоглобин, хемопексин</p> <p><b>Участници във възпалителния отговор:</b> Фосфолипаза А2, Липополизахарид-свързващ протеин, IL-1 рецепторен антагонист, гранулоцитен-колония-стимулиращ фактор</p> <p><b>Други:</b> С-реактивен протеин, <i>серумен амилоид А протеин</i>, алфа 1 ациден гликопротеин, фибронектин, феритин, ангиотензиноген</p>
<p><b>Негативни ОФП</b></p>	<p>Албумин, трансферин, транстиретин, алфа 2 хидрогенсулфатен гликопротеин, алфа-фетопротеин, тироксин-свързващ глобулин, инсулиноподобен растежен фактор 1, фактор XII</p>

**Табл. 2. Острофазови протеини<sup>65</sup>**

От своя страна, позитивните ОФП се обединяват в 3 подгрупи: а) *слабо повишаващи се*, в стойности до 1 път над изходните – **церулоплазмин, фракции на комплемента**; б) *интермедиерни* – нарастващи 2 до 4 пъти – **алфа 1 ациден**

гликопротеин, алфа 1 антитрипсин, хаптоглобин, фибриноген; в) *значително повишаващи се*, до над 1000 пъти – CRP, SAA.<sup>48,176</sup> В отделните публикации посочените граници, в които ОФП се изменят по време на острофазов отговор варират значително, но въпреки това, разделението на посочените 3 подгрупи е запазено в същия вид.<sup>15,54,85</sup>

Всеки един от изброените позитивни ОФП се характеризира със специфичен кинетичен отговор при наличие на възпалителен стимул.<sup>113</sup> Тази особеност следва да се познава в детайли, тъй като предоставя важна за клиничната практика информация. Слабо повишаващите се и интермедиерни ОФП се изследват предимно в случаи на хронично възпаление, тъй като имат дълъг плазмен полуживот, а серумните им нива нарастват на по-късен етап от действието на възпалителната нокса. За разлика от тях, значително повишаващите се ОФП достигат максимални стойности още през първите 48 часа от инфекцията, оформят плато в следващите 2-3 дни, а около 96-ия час, паралелно с ограничаване на възпалителната активност, показват тенденция към нормализиране.<sup>114,115</sup> (фиг. 2)



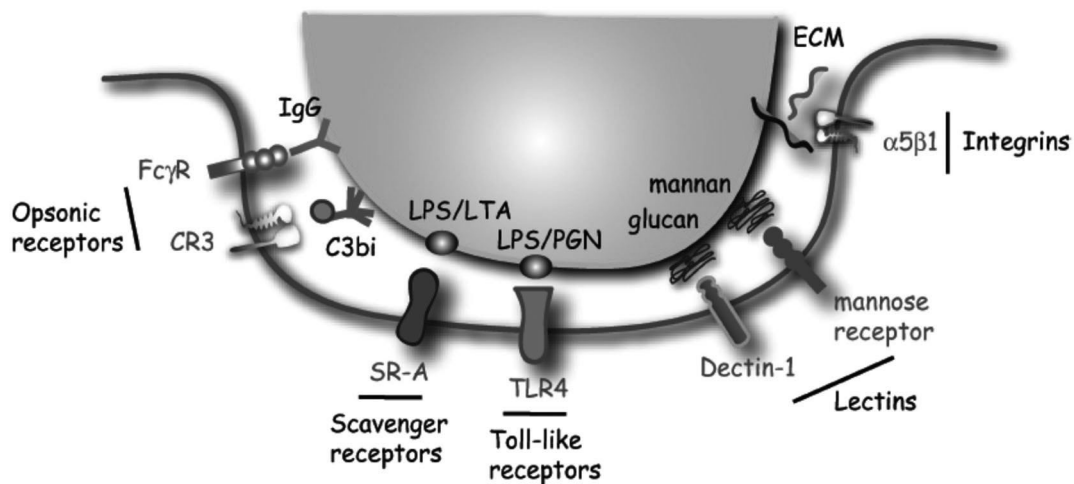
**Фиг. 2** Кинетика на острофазовите протеини по време на възпалителен отговор<sup>65</sup>

За всички ОФП са валидни следните характеристики: бързо и значимо нарастване в серумните им концентрации по време на остро възпаление; кратък плазмен полуживот; бърза обратна динамика в стойностите им, след преустановяване активността на възпалителния процес.<sup>36</sup>

Главните ОФП при човека са CRP и SAA.<sup>136</sup> С-реактивния протеин е открит още през 1930 година от *Tillet* и *Francis*.<sup>2</sup> Днес този маркер продължава да бъде рутинно изследван, независимо от факта, че при редица състояния, SAA се оказва значително по-полезен.<sup>136</sup> Предвид това, все повече автори мобилизират усилия си в посока отчитане диагностичната стойност на SAA при различни заболявания.<sup>3,48,136</sup>

Острофазовият отговор продължава само няколко дни.<sup>126</sup> Тъканните неутрофили постепенно претърпяват процес на апоптоза и биват фагоцитирани от макрофаги.<sup>136</sup> Понякога, главно в случаи на имунен дефицит или продължително действащ възпалителен стимул, възникват процеси на вторична клетъчна некроза. Това задвижва повторно цикъла и отново се синтезират ОФП, като SAA в този случай участва в изграждането на амилоидни фибрили и в последващото развитие на амилоидоза – състояние, характерно за случаите на хронично възпаление (вж. по – долу).<sup>183</sup>

Преди протичането на фагоцитозата, имунните клетки разпознават патогена, предотвратявайки по този начин евентуална автодеструкция. Това се постига с участието на т.нар. рецептори, разпознаващи молекулни модели на патогени (*pattern recognition receptors, PRR*). Същите се експресират в големи количества от клетъчните фактори на естествената резистентност. Според функционалната си активност биват (1) *Toll-like рецептори (TLRs)*; (2) *receptors with nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats (NLRs)*; (3) *retinoic acid inducible gene I-like receptors*; (4) *C-type lectin receptors*<sup>147</sup>. Те се свързват със специфични структури от микробната клетка – *патоген-асоциирани молекулни модели (pathogen associated molecular patterns, PAMPs)*. Ролята на *PAMPs* играят различни протеини и молекули от клетъчната стена, ДНК и РНК на патогена.<sup>19</sup> (фиг. 3)



**Фиг. 3 Схематично представяне на процеса на разпознаване на патогена, инициращ фагоцитозата<sup>134</sup>**

*LPS* – липополизахарид, *LTA* – липотейхоеви киселини, *PGN* – пептидогликан, *ECM* – екстрацелуларен матрикс – фибронектин, витронектин

Кооперацията между PRR и PAMPs има основно значение за ефективно осъществяваната от естествения имунитет защита на макроорганизма. Процесът контролира последващия синтез на проинфламаторни цитокини и медиатори на възпалението. В хода на различни проучвания<sup>19,29</sup> е установено, че в отделните етапи на подобен тип междуклетъчни взаимодействия, главна роля изпълнява серумният амилоид А протеин (вж по-долу).

## 2. Серумен амилоид А протеин

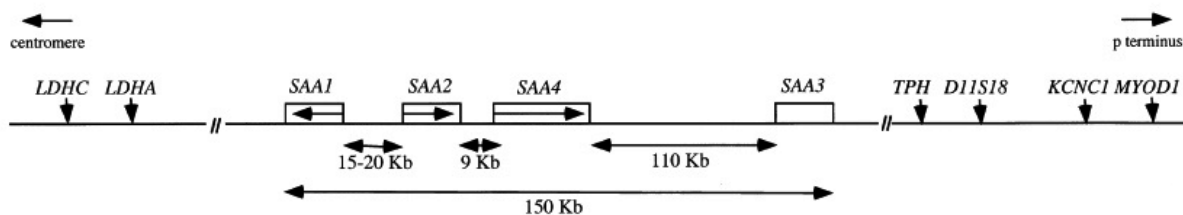
Още през 1942 година, Nass и колектив проучват в детайли характеристиката на патоморфологичния процес амилоидоза, установявайки, че амилоидните депозити са изградени от видоизменени, водонерастворими протеини. По-късно, през 1959 година, *Cohen* и *Kalkins* доказват тяхното натрупване в интестициума на тъканите във вид на микрофибрили, а през 1972 година, *Levin* и колектив описват за първи път пълната 76 аминокиселинна последователност на белтъка - АА-амилоид (амилоид А), който ги изгражда. В последствие е установено, че техен прекурсор е неимуноглобулин-произхождащ серумен белтък, състоящ се от 104 аминокиселини, наречен серумен амилоид А протеин.

Серумният амилоид А протеин представлява плазмен белтък, функциониращ като аполипопротеин на високоплътностните липопротеини (high density lipoproteins, HDL), чиято концентрация в серума нараства приблизително 1000 пъти, в отговор на

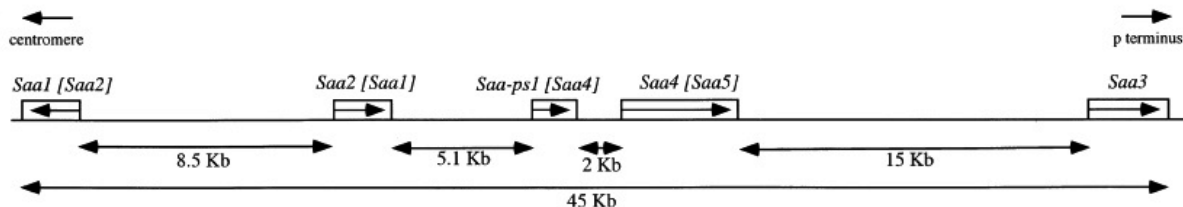
възпалителен стимул.<sup>48,83,132</sup> Счита се, че може да се транспортира и свързан с нископлътностните липопротеини (low density lipoproteins, LDL), особено в случаи, когато нивата му са значително завишени.<sup>33,34</sup> Открива се в серума на всички животински видове като е налице подчертано сходство в структурно и функционално отношение между отделните изоформи.<sup>25,167</sup>

В човешкия геном присъстват четири типа гени, кодиращи продукцията на SAA.<sup>34,84,121</sup> Локализирани са върху късото рамо на 11 хромозома – 11p15.1 и се бележат по следния начин: *SAA1-4* (фиг. 4). Два от тях (*SAA1* и *SAA2*) са отговорни за продукцията на т.нар. острофазови (acute phase) SAA форми (A-SAA1 и A-SAA2), синтезирани в хода на остро възпаление.<sup>33,34,136</sup> Последните са установени не само в човешкия организъм, но и в серума на други бозайници, птици и риби. Генът *SAA-4* кодира продукцията на т.нар. C-SAA форма (конститутивни SAA, constitutive), експресирани единствено при човека и мишките.<sup>189</sup> Счита се, че *SAA3* функционира като псевдоген, без кореспондираща белтъчна молекула. През 2010 година, група автори проучват в детайли функционалната му характеристика, достигайки до извода, че този ген е отговорен за продукцията на някои биологично активни вещества, секретирани от мастната тъкан и млечните жлези.<sup>27,34,95</sup>

**Human SAA gene family**  
Chromosome 11p15.1



**Mouse Saa gene family** (adapted from [42])  
Chromosome 7p



**Фиг. 4. Човешки и миши SAA генна фамилия – сравнителна характеристика<sup>190</sup>**

## 2.1. Структура на SAA

Човешкият SAA е изграден съответно от 104 (SAA1, SAA2) и 112 (SAA4) аминокиселини.<sup>60,189</sup> Молекулното му тегло възлиза на 12-14 kD. Амилоидните депозити, възникващи при хронично възпаление се състоят от АА-фрагменти, чиято аминокиселинна последователност повтаря първите 76 аминокиселини на SAA.<sup>136</sup> Все още детайлно структурно описание на SAA липсва в научната литература, вероятно поради слабата разтворимост на отделните му изоформи. До момента е известно, че А-SAA представлява типичен глобуларен белтък, съдържащ едновременно  $\alpha$ -спирала и  $\beta$ -лист. В молекулата му се откриват 3 хидрофобни участъка, локализирани между аминокиселините 1-27, 40-63 и 79-94, както и няколко региона, функциониращи като адхезионни домени<sup>105,173,181</sup> :

- **хидрофобен липид-свързващ регион**, обхващащ зоната в N-края между aa1-11, поддържащ холестероловия транспорт и метаболизъм;
- **амилоидогенен детерминант** в зоната между aa10-15, вземащ основно участие във формирането на амилоидните фибрили;
- **YIGSR** (пентапептид Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp)- и **RGD** (трипептид Arg-Gly-Asn)-подобни региони, в зоната между aa29-42, опосредстващи клетъчна адхезия (предимно тромбоцити) към SAA;<sup>192</sup>
- **Ацил-коензим А холестерол ацилтрансферазен инхибиторен домен (ACAT)**, образуван от aa1-20, отговорен за холестеролния клетъчен ефлукс;
- **Хепаран сулфат/хепарин-свързващ домен** в зоната aa17-49, отговорен за отцепването на HDL (high density lipoproteins) от SAA и за формирането на амилоидни депозити;<sup>59,137</sup>
- **Ламинин-свързващ домен**, простиращ се между aa24-76; функцията му е свързана с образуването на амилоид;
- **Холестерол-естер хидролаза активиращ регион** – aa74-103 – поддържащ холестеролов ефлукс;

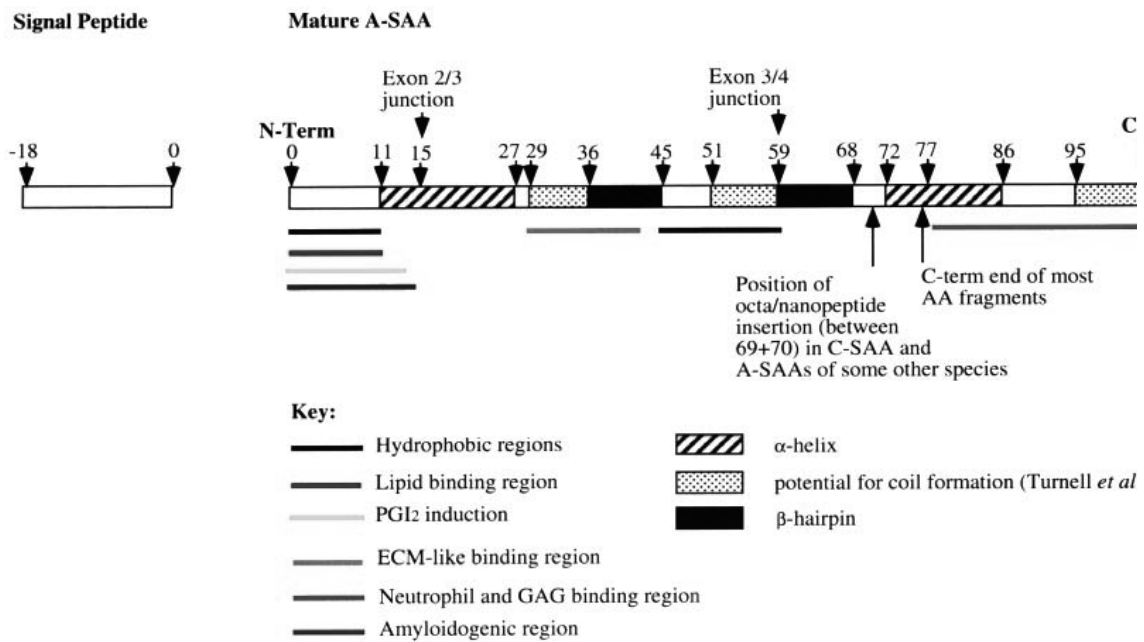
- Домен, свързващ неутрофили и хепарансулфат/хепаринови молекули, образуван от aa77-103, проявяващ антиинфламаторна активност и участващ в образуването на амилоидните фибрили;

Функционалните домени на SAA са представени на табл. 3 и фиг. 5.

Аминокиселинна последователност	Свързващ участък	Функция	Литературен източник
1-11/18	Участък, свързващ HDL/липиди/холестерол	Холестеролов транспорт и метаболизъм; формиране на „пенести“ клетки	Turnell et al. 1986, Kisilevsky & Subrahmanyam 1992, Liang et al. 1995
1-15	Амилоидогенен детерминант	Формиране на амилоид	Westermarck et al. 1992
1-20 <sup>1</sup>	АСАТ-инхибиращ регион	Холестеролов ефлукс	Kisilevsky & Tam et al. 2003
17-49	Хепаран сулфат/хепарин-свързващ домен	HDL-SAA ремоделиране; амилоидни формации	Elimova et al. 2009
24-76	Ламинин-свързващ домен	Амилоидни формации	Ancsin & Kisilevsky 1997
29-42	YIGSR и RGD-подобни региони	Клетъчна адхезия	Linke et al. 1991, Preciado-Patt et al. 1994
48-51	Калций-свързващ участък	Амилоидни формации	Turnell et al. 1986
74-103 <sup>1</sup>	Холестерол-естер хидролаза активиращ регион	Холестеролов ефлукс	Kisilevsky & Tam et al. 2003
77-103/4	Домен, свързващ неутрофили и хепарансулфат/хепаринови молекули	Анти-инфламаторна активност; амилоидни формации	Preciado-Patt et al. 1996a, Ancsin & Kisilevsky 1999

**Табл. 3. Функционални домени на човешкия SAA<sup>136</sup>**

<sup>1</sup>проучването е осъществено върху миши SAA2.1



Фиг. 5. Структура на човешки A-SAA протеин<sup>190</sup>

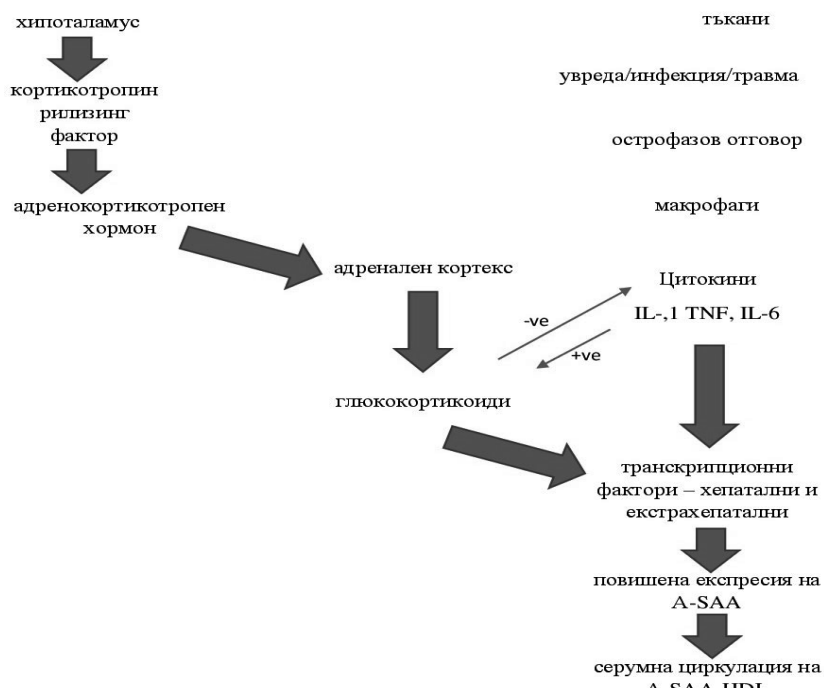
## 2.2. Експресия на SAA

Секрецията на SAA се осъществява главно от чернодробните клетки. По време на острофазов отговор, серумната му концентрация нараства около 1000 пъти над изходната<sup>136</sup>, достигайки нива от порядъка на 1 мг/мл. Проучвания върху миши модели, сочат че около 2,5% от функционалната активност на черния дроб по време на остро възпаление е свързана със синтез на SAA. Нивата му в серума започват да нарастват през първите 3-6 часа от действието на възпалителния стимул, достигат пикова стойност на 3 ден, след което при липса на усложнения показват тенденция към нормализиране.<sup>94</sup> Според Kisilevski и колектив, SAA притежава най-кратък плазмен полуживот от всички ОФП – около 24 часа<sup>87</sup>, въпреки че по време на възпаление, черния дроб реагира с понижена способност за разграждането му.

Главни индуктори за продукция на A-SAA по време на острофазов отговор са проинфламаторните цитокини – *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*.<sup>25,144</sup> Централно място заема *IL-6*.<sup>189</sup> След взаимодействие между *IL-1β* и *TNF-α*, настъпва активация на т.нар. нуклеарен фактор *каппа-бета* (*NF-κB*)<sup>73</sup>. В този момент, *IL-6* отключва функционалната активност на определен протеин, отговорен за последващата транскрипция на SAA-нуклеиновата киселина. Кооперативна роля имат и вторичните цитокини, бактериални



липополизахариди и други биологично активни вещества.<sup>33,34,102</sup> Крайният резултат е своевременно и бързо нарастваща серумна концентрация на SAA (фиг. 6).



\*-ve – отрицателна обратна връзка; +ve – положителна обратна връзка

**Фиг.6. Синтез на A-SAA по време на острофазов отговор<sup>190</sup>**

Освен под влияние на *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , чернодробната продукция на SAA настъпва и под влияние на липополизахаридите, отделяни от бактериалните клетки. Последните взаимодействат със специфични клетъчни рецептори, каквито са *TLRs*. Централно място заема *TLR4*, отговорен за активация на *NF- $\kappa$ B* и последваща транскрипция на SAA-нуклеиновата киселина.<sup>128,129</sup>

Редица автори потвърждават и масивната екстрахепатална продукция на SAA (табл. 4). Множество клетки са свързани с неговата експресия: епителни, фибробласти, лимфоцити, моноцити, макрофаги, гладкомускулни клетки и др.<sup>48,136,181</sup> Серумният амилоид А протеин и неговата информационна РНК са доказани в тъканите на различни органи като тънки черва, бял дроб, бъбреци, кожа, тонзили, простата, млечна жлеза, щитовидна жлеза, панкреас, а също и в хистологични препарати от синовия на пациенти с ревматоиден артрит, болни с хепатални и екстрахепатални тумори, вкл. цервикален карцином.<sup>152,193,200</sup> Yamada и колектив доказват експресията му в атеросклеротични плаки<sup>200</sup>, а Liang и колектив – от мозъчна тъкан на лица с болест на Алцхаймер<sup>106</sup>. Счита се, че мастната тъкан поддържа базалните нива при липса на

възпалителен стимул<sup>201</sup>. Въпреки разнообразната органна продукция, между хепаталните и екстрахепатални форми съществува абсолютна структурна хомоложност и функционална идентичност<sup>191</sup>.

Тъкан	Състояние	Тип SAA	mRNA SAA <sup>a</sup>	SAA протеин <sup>b</sup>	Литературен източник
Клетки в атеросклеротични лезии (ендотелни клетки, макрофаги, адипоцити и гладкомускулни клетки)	Атеросклеротични лезии	ns*	+	nd**	Meek et al. (1994)
Атеросклеротични лезии	Атеросклеротични лезии	Ns	nd	+	Yamada et al. (1996)
Мозък	Болест на Алцхаймер	A-SAA	+	+	Liang et al. (1997); Chung et al. (2000)
Синовия	Ревматоиден артрит; Остеоартрит	SAA1; SAA2; SAA4  SAA4	+	+	Kumon et al. (1999); O'Hara et al. (2000)
Хондроцити	Остеоартрит	A-SAA	nd	+	Vallon et al. (2001)
Здрави тъкани: мозък хипофиза млечни жлези  бъбреци  панкреас плацента простата кожа  слезка  щитовидна жлеза		ns ns SAA1; SAA2; SAA4;  SAA1; SAA2; SAA4;  ns ns ns ns  SAA1; SAA2; SAA4;  ns	+	+	Urieli-Shoval et al. (1998)

тонзили		ns	+	+	
хранопровод		SAA1; SAA2; SAA4;	+	nd	
стوماх		ns	+	nd	
тънко черво		ns	+	+	
дебело черво		SAA1; SAA2; SAA4;	+	+	

**Табл.4. Екстрахепатална продукция на SAA при човека<sup>192</sup>**

*\*ns – no specific type SAA; \*\*nd – not done; <sup>a</sup>mRNA е доказана чрез in situ хибридизация, northern blot анализ или RT-PCR; <sup>b</sup>продукция на SAA протеин*

Опити върху прасета, инфектирани с вируса на свинския респираторен и репродуктивен синдром, доказват масивна екстрахепатална продукция на SAA – изоформа SAA3 от алвеоларните макрофаги, мандубуларните и хиларни лимфни възли<sup>77</sup>.

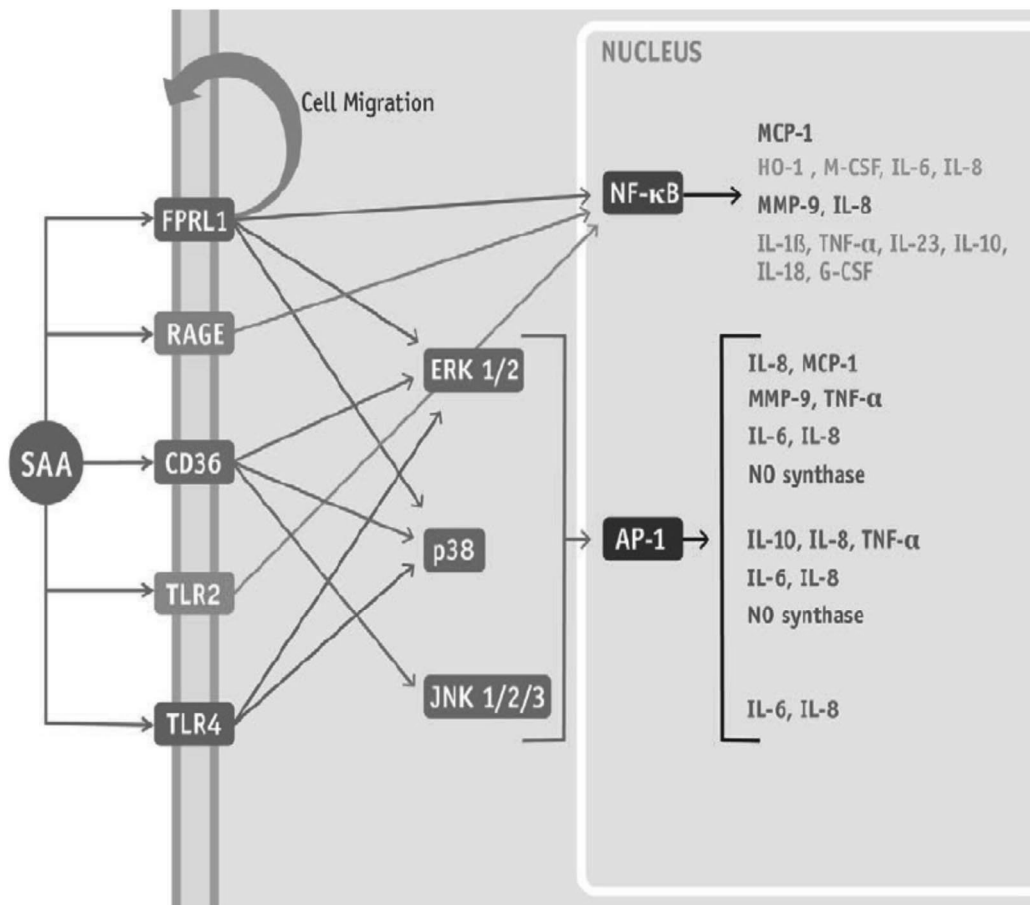
### 2.3.Функционална характеристика на SAA

Дълго време, SAA е приеман за белтък без съществено функционално значение. С развитието на имунологията се описват редица биологични процеси, в които той изпълнява централна роля.<sup>136</sup> Основната част от серумния SAA циркулира в комплекс с HDL<sub>3</sub> измествайки аполиipoprotein A-I (apoA-I) по време на острофазовия отговор.<sup>155</sup> В тази връзка, показателят притежава проатерогенни качества, поради което може да се използва като прогностичен маркер, отчитащ риска за развитие на миокарден инфаркт.<sup>25</sup> Съвременни доказателства сочат, че функционалната активност на SAA е свързана предимно с действието му като хемоатрактант, проинфламаторен медиатор и белтък, участващ в липидния метаболизъм и в процеса на опсонизация на Грам-отрицателни бактерии.<sup>33,34</sup>

Kisilevsky и колектив<sup>88</sup> описват специфични SAA-свързващи зони върху повърхността на макрофагите, чиято експресия нараства значително в хода на острофазов отговор. Подобно протеин-клетъчно коопериране опосредства навлизането на SAA интрацелуларно чрез ендоцитоза. Този процес е зависим от наличието на хепарансулфат, асоцииран към хепарансулфат-свързващия домен на SAA. Счита се, че хепарансулфатът, в условията на ниско рН и физиологична калциева концентрация,

стимулира отцепването на SAA от HDL и последващия клетъчен захват на SAA, въпреки, че е възможно и директно интрацелуларно интегриране на целия комплекс SAA-HDL. Съвременни проучвания върху миши модели сочат, че в клетката навлиза единствено SAA2.1, а попадането на целия комплекс с HDL е свързано с прехвърляне на SAA или негови фрагменти към ядрото, връщане към цитоплазмата и последващ ефлукс чрез екзоцитоза.<sup>191</sup>

Освен макрофагите, в интимните механизми на този процес са въввлечени други имунни клетки, върху повърхността на които се експресират специфични рецептори за свързване със SAA (фиг. 7). Едновременното коопериране с повече от един клетъчен рецептор, придава на SAA качества на значим проинфламаторен медиатор.<sup>136</sup> Въпреки задълбочените проучвания по въпроса, все още не е изяснен точният механизъм, по който се осъществяват процесите на сигнална трансдукция.



**Фиг. 7. SAA-рецепторно медираны процеси на сигнална трансдукция<sup>136</sup>**  
*AP-1 – activating protein – 1; CD36 – cluster of differentiation 36; ERK – extracellular signal regulated kinase; HO-1, heme oxygenase 1; JNK – c-Jun N-terminal kinase; MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1;*

*FPRL1* (*formyl peptide receptor like-1*), познат още като липоксин A4 (*LXA4R*) или *N-formyl peptide receptor 2* (*FPR2*), представлява протеин, който след активиране от SAA, стимулира миграцията на фагоцитиращи левкоцити, освобождаване на хемокини *MCP-1* и матриксни металопротеази от човешки моноцити и епителни клетки от човешка пъпна връв.<sup>103,104</sup> В неутрофилната клетка, SAA индуцира *FPRL1* – зависимо калциево освобождаване и активиране на *NF-kB*, *MAPKs* и *AP-1*, отговорни за секрецията *IL-8*.<sup>73,74,108</sup> Крайният резултат е повишаване активността на възпалителния процес (острофазовия отговор).<sup>74</sup>

*Scavenger* рецепторите са група от мембранно-асоциирани макрофагеални рецептори, с основен представител *CD36*.<sup>204</sup> Описани са още *scavenger receptor class B type I* (*SR-BI*), *LIMP II* и *human homologue CD36-LIMP II analogous 1* (*CLA-1*). Анализ от 2010 година посочва, че след свързване на SAA със *scavenger receptor – CD36*, се наблюдава значително завишаване експресията на *IL-8*.<sup>170</sup>

Съвременни автори считат, че *TLRs* са най-важните свързващи SAA рецептори.<sup>30,67</sup> Към момента, фамилията на *TLR* се състои от 11 члена.<sup>136,157,183</sup> Най-проучваните представители са *TLR2* и *TLR4*.<sup>157</sup> Кооперация между SAA и *TLR2* е в основата на цитокиновия синтез от костно-мозъчните макрофаги.<sup>29,143</sup> Разпознаването на *TLR2* от SAA води до развитие на острофазов отговор посредством активиране съответно на *NF-kB*<sup>102,141</sup> и *MAPK*.<sup>97,192,201</sup>

Активацията на посочените клетъчни рецептори от SAA е задължително условие за протичане на следните имунни процеси:

**а) деградация на екстрацелуларния матрикс:**

Екстрацелуларният матрикс представлява комплекс от молекули, които поддържат интегритета на клетките и тяхната функционална активност.<sup>3</sup> Основен негов компонент са т.нар. матриксни металопротеинази (*matrix metallo-proteases*, *MMPs*) – сложна група цинк-зависими протеолитични ензими, разграждащи компоненти на междуклетъчното вещество<sup>7</sup>. Познати са около 28 вида.<sup>3,7</sup> Основен активатор на *MMPs* по време на острофазов отговор е SAA<sup>34,41</sup>, вследствие на което те придобиват активност за разграждане на колагена и еластина от междуклетъчното вещество<sup>104</sup>. SAA-зависимото активиране на матриксните протеини лежи в основата на ставната деструкция при пациенти с ревматоиден артрит.<sup>128,129</sup>

### **б) стимулиране хемиотаксиса на имунни клетки:**

Серумният амилоид А протеин действа като хемоатрактант за неутрофили и моноцити.<sup>29,58</sup> Тази функция е доказана в клинично проучване на Badaloto и колектив<sup>28</sup>, използвайки рекомбинантен SAA в количества, съизмерими със серумната му концентрация, достигана по време на острофазов отговор ( $>0,8 \mu\text{M}$ ). Доказано е, че предварителното свързване с HDL, блокира хемоатрактантния му ефект.

### **в) участие в цитокиновата продукция:**

Серумният амилоид А протеин стимулира различни клетки за продукция на проинфламаторни цитокини.<sup>29,58</sup> Не и колектив<sup>72,73,74</sup>, доказват, че синтеза на *IL-8* и *TNF- $\alpha$*  от неутрофили, стимулирани *in vitro* със SAA нараства 2-5 пъти, в сравнение с продукцията им от „не стимулирана“ неутрофилна популация. От друга страна, SAA проявява и антиинфламаторни ефекти, потискайки секрецията на простагландин E2 и продукцията на свободни кислородни радикали.<sup>39</sup> Това ограничава пирогенната циркулация, блокира тромбоцитната агрегация и продукцията на колагенази от фибробластите.

Серумният амилоид А протеин, инжектиран в организма на мишки, блокира развитието на фебрилитет, индуциран от ендогенните пирогени *IL-1 $\beta$*  и *TNF- $\alpha$* ,<sup>169</sup> което потвърждава тезата, че SAA проявява антиинфламаторна активност.<sup>144</sup>

През последните години, различни автори мобилизират усилията си за проучване влиянието на SAA върху тромбоцитите.<sup>125,192,193,205</sup> Към момента е известно, че SAA инхибира тромбин-индуцирана тромбоцитна агрегация.<sup>205</sup> Счита се, че по време на остро възпаление, SAA потиска тромбоцитната адхезия към субендотелно разположения фибронектин<sup>192</sup>, с което се разкриват нови хоризонти за провеждане на съвременни клинични проучвания, анализиращи физиологичната роля на SAA в процесите на хемостаза и тромбоза.

### **г) бактериална опсонизация и фагоцитоза:**

Литературни данни сочат, че SAA опсонизира предимно Грам-отрицателните бактерии като *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* и *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).<sup>168</sup> Подобна функционална активност осигурява стимулиране на фагоцитозата, както и нарастваща цитокиновата продукция от периферните мононуклеарни клетки<sup>29,41</sup>. Достатъчни за протичане на ефективна фагоцитоза са серумни концентрации на SAA от порядъка на  $1 \mu\text{g/ml}$  – значително по-ниски от измерените по време на остро

възпаление. Главни лиганди в случая са външномембранните протеини (*OmpA*) на Грам-отрицателните микроорганизми.<sup>136</sup>

**д) инхибиране адхезията на различни бактериални щамове към чревни епителии:**

Някои от белтъчните молекули, кодирани от SAA гените, блокират *in vitro* прикрепването на ентеропатогенни *E. coli* към ентероцитите.<sup>57</sup> Тази способност е опосредствана от 4 аминокиселинен участък в N – терминалния регион на белтъчната молекула. По – нови проучвания също доказват тези ефекти, но все още липсват *in vivo* получени резултати.<sup>28,33,98,99,100</sup>

**е) директен антимикробен ефект:**

Серумният амилоид А протеин притежава директни антимикробни свойства по отношение на широк спектър бактериални щамове.<sup>146,148</sup> Подчертан бактерициден ефект е наблюдаван спрямо *E. coli*, *Streptococcus uberis* и *P. aeruginosa*. Антимикробните ефекти са доза-зависими и при концентрации около 63 µg/ml се реализират в максимална степен.<sup>41</sup> SAA свързва ретинола, образуван в хода на остро възпаление, с което индиректно ограничава бактериалната репликация и последващото разпространение на микробните агенти в атакуваните тъкани.<sup>54</sup>

**ж) участие в липидния метаболизъм:**

Измествайки *apoA-I* от HDL, липопротеин-асоциирания SAA участва в транспорта на HDL към местата на тъканна деструкция и холестеролово натрупване.<sup>28,29</sup> Опази част от SAA, която остава несвързана с HDL, е отговорна за холестероловия ефлукс, чрез *ABCA1*-зависими и независими механизми. Серумният амилоид А протеин регулира и клирънса на клетъчния холестерол, чрез повлияване на лецитин:холестерол ацилтрансферазната активност, а също и чрез промяна в холестероловия метаболизъм, функционирайки и като холестерол-свързващ протеин.<sup>29,63</sup> При лица със затлъстяване, както и при болни с метаболитен синдром, адипоцитите освобождават големи количества SAA. Постоянно завишените в този случай серумни нива обуславят развиващите се на по-късен етап инсулинова резистентност и атеросклероза. Съвременни проучвания сочат, че за преодоляването на инсулиновата резистентност, освен редукция на телесно тегло и подходяща медикаментозна терапия, значение има и ограничаване експресията на SAA от адипоцитите.<sup>201</sup>

В резюме всички известни до момента функции на SAA са посочени на табл.5.

Функция	Литературен източник
<p align="center"><b><u>Липиден метаболизъм</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*естерификация на холестерола в плазмата;</li> <li>*комплесът HDL-SAA проявява висока активност за свързване с макрофагите</li> <li>*осигурява селективен липиден захват</li> <li>*усилва холестероловия захват от хепатоцитите</li> <li>*намалява липидния биосинтез</li> <li>*инхибира синтеза на фосфолипиди, триглицериди, холестерол</li> </ul>	<p align="center"> <i>Steinmetz et al. (1989);  Kisilevsky and Subrahmanyam (1992);  Cai et al. (2005);  Liang and Sipe (1995); Liang et al. (1996);  Schreiber et al. (1999);</i> </p>
<p align="center"><b><u>Имуномодулиращи функции:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*индуцира продукцията на MMP;</li> <li>*инхибира тромбин-индуцираната тромбоцитна агрегация;</li> <li style="padding-left: 20px;">*хемоатрактант;</li> <li>*усилва фагоцитната активност;</li> <li>*индуцира цитокиновия синтез;</li> <li>*индуцира ентероцитите за продукция на муцин;</li> <li>*инхибира адхезията на бактерии към ентероцитите</li> </ul>	<p align="center"> <i>Brinckerhoff et al. (1989);  Sack and Talbot (1989);  Mitchell et al. (1991);  Strissel et al. (1997);  Migita et al. (1998);  Zimlichman et al. (1990);  Syversen et al. (1994);  Badolato et al. (1994);  Olsson et al. (1999);  Kumon et al. (2002);  Xu et al. (1995);  Hershkoviz et al. (1997a);  Hershkoviz et al. (1997b);  Badolato et al. (2000);  Patel et al. (1998);  Preciado-Patt et al. (1998);  Ribeiro et al. (2003);  Hatanaka et al. (2004);  Larson et al. (2003a);  Mack et al. (2003);</i> </p>

**Табл. 5. Функции на SAA<sup>192</sup>**

### **2.3.1. Проинфламаторни ефекти на SAA**

Синтезата на ОФП настъпва в отговор на проинфламаторни цитокини, синтезирани от активирани моноцити и макрофаги, вследствие на възпалителен стимул.<sup>115,140</sup>

Резултатите от различни клинични проучвания разкриват, че SAA индуцира освобождаването антиинфламаторни цитокини, предимно *IL-10*, от моноцити и периферни мононуклеарни клетки и взема активно участие в инхибирането на тромбоцитната агрегация.<sup>136,140,192</sup> Поради това, за дълъг период от време се приемаше, че в човешкият организъм SAA проявява единствено антиинфламаторна активност. В свое проучване от 2006 година, група холандски автори с водещ изследвател R.



*Renckens* доказват това схващане, провеждайки опити върху мишки, заразени с *Acinetobacter baumannii*. Авторският колектив открива, че в случаите, при които серумни нива на SAA са високи, развитието на локален възпалителен процес е ограничено, а клиничната изява на болестта – лека. Причината за този феномен не е напълно изяснена, но вероятно е свързана с потискане активността на неутрофилите. Освен това, със своя C-терминален свързващ домен, SAA образува комплекс с неутрофилните клетки, потискащ развитието на оксидативен стрес.

Установено е още, че SAA влияе върху активността на Т-лимфоцитите – стимулира развитието на *Th17* тип имунен отговор у мишки с експериментално индуцирана бронхиална астма, чрез засилена експресия на *IL-1β*.<sup>136</sup> Подобно схващане, поставя SAA в ролята на свързващо звено между естествения и придобития имунитет и му придава качества на молекула, заемаща централно място в развитието на острофазовия отговор.

Днес съществуват и противоположни схващания, според които SAA се характеризира единствено със своите проинфламаторни качества<sup>33,202</sup>. Обяснението се крие в масивната експресия на редица медиатори на възпалението като *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*, *TNF-α* от моноцити, макрофаги, неутрофили, лимфоцити, фибробласти и адипоцити – процес, който се осъществява преимуществено под влиянието на SAA.<sup>177</sup>

Чрез употребата на рекомбинантна хибридна молекула, rSAA (хибрид между SAA1 и 2), която не съществува *in vivo*, са проведени редица експериментални *in vitro* проучвания, целящи да отговорят на въпроса, дали реално SAA функционира като проинфламаторна молекула с цитокино-подобни качества<sup>28,33,43,72</sup>. Използвани са два варианта – rSAA, кореспондиращ с SAA1 и хибрид между SAA1 и SAA2, кореспондиращ с човешкия SAA1a, но с известна аминокиселинна субституция – вмъкване на аспартова киселина вместо аспаргин на 60 позиция и хистидин вместо аргинин на позиция 71. Резултатите посочват, че тези молекули стимулират клетки от неутрофилния ред за продукция на свободни кислородни радикали и IL-8, посредством отцепване на *L-селектин*. Хибридният SAA е около 100 пъти по-потентен в сравнение с рекомбинантния SAA1<sup>43</sup>. Всъщност проинфламаторните ефекти на SAA зависят до голяма степен от мястото на неговата секреция. Известно е, че част от SAA подлежи на екстрахепатална продукция и именно тази част проявява цитокино-подобни ефекти. Така например, откакто синовиоцитите са идентифицирани като участник в

екстрахепаталната продукция на SAA, се появяват твърдения, според които SAA заема централно място в патогенезата на ревматоидния артрит, функционирайки предимно като проинфламаторен медиатор.<sup>33,34</sup>

Освен като активатор на неутрофилите, rSAA молекула притежава и други проинфламаторни ефекти, които проявява единствено в кооперация с *TLR* и *SR*. В *HeLa* клетъчни линии, *TLR2* свързва rSAA, което води до активиране на *NF-κB*.<sup>102</sup> *TLR4* също служи като рецептор за SAA, експресиран върху повърхността на миши перитонеални макрофаги, които след стимулация с rSAA, индуцират транскрипцията на *NO* синтетаза. *SR-BI* и *CD36* функционират като rSAA рецептори и стимулират продукцията на проинфламаторни цитокини, когато са експресирани в различни клетъчни линии.<sup>197</sup> След стимулация на синовиални фибробласти с rSAA, настъпва внезапна активация на *NF-κB*, в резултат от асоциация със специфичен рецептор – *receptor for advanced glycation end-products (RAGE)*.<sup>33,34,105</sup> Това води до масивна секреция на проинфламаторни цитокини, действащи на местно ниво и обуславящи развитието на ставна деструкция.

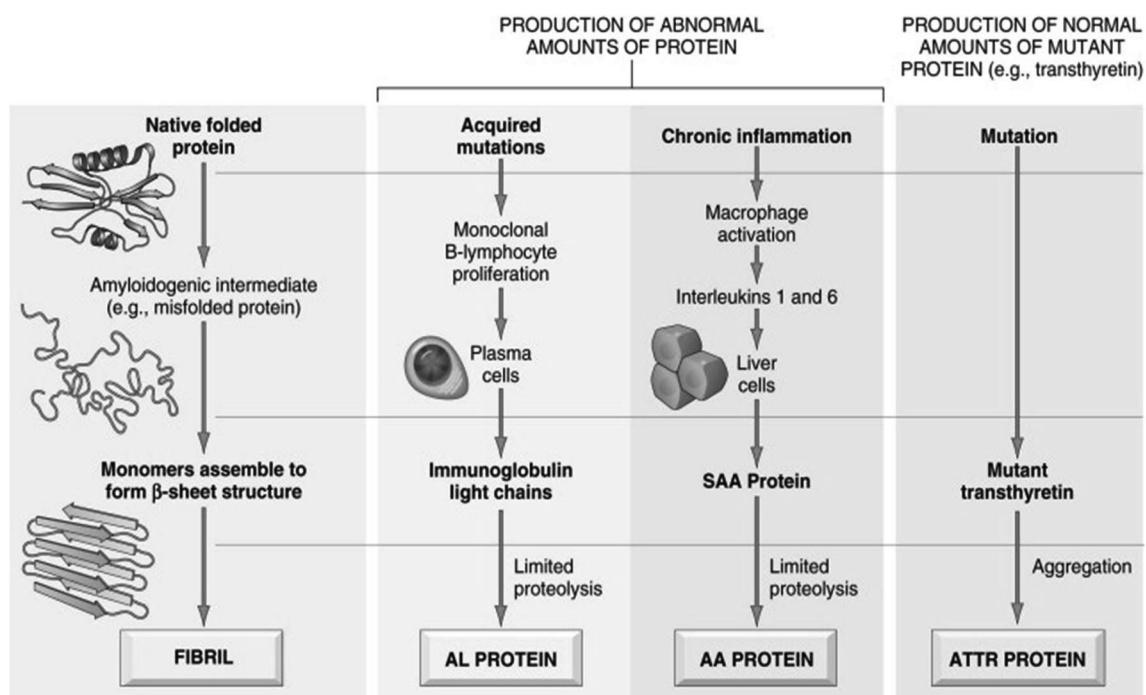
Значителен проблем с рекомбинантните молекули от бактериален произход представлява възможността за контаминацията им с различни продукти от микробната клетка, в това число и ендотоксини, които могат да причинят биологични ефекти, несвързани със самата рекомбинантна молекула. Включената в проведените до момента клинични проучвания rSAA, съдържа следови количества ендотоксин, но въпреки това, не би могла да се изключи напълно възможността за контаминация с други бактериални компоненти. Активирането на неутрофилите от rSAA се извършва по механизъм различен от онзи, по който действат ендотоксините, поради което установените до момента проинфламаторни качества не са подлагани под съмнение.<sup>33,34</sup>

В свое проучване, Patel и колектив<sup>144</sup> също анализират възможността SAA да индуцира синтез на проинфламаторни цитокини. Изследователският екип инкубира *THP-1* клетъчни линии с rSAA, серумен *HDL* (съдържащ SAA в концентрации по – ниски от 30μg/ml) и комплекс *HDL- rSAA*. Отчетено е сигнификантно повишаване в концентрациите на *IL-1β*, *IL-1ra*, *sTNFR-II* протеин и *mRNA*. Чрез предварително извършена протеинова денатурация, възможността за контаминация на рекомбинантната молекула с бактериален липополизахарид е практически

елиминирана. Интересен е фактът, че rSAA и HDL не водят до синтез на вторични проинфламаторни цитокини като *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  протеин или негова *mRNA*. Когато обаче в работната среда се добави едва 10  $\mu\text{g/ml}$  липополизахарид, *THP-1* клетките реагират с продукция на *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , както и *IL-1ra* и *sTNFR-II*. На по-късен етап дизайнът на проучването е разширен чрез подкожно инжектиране на rSAA в организма на мишки. На 72-ят час от инжекцията, е проведено биопсично изследване от мястото на инокулация, където авторите установяват струпване на голямо количество имунни клетки, доказвайки че *in vivo*, rSAA проявява свойства на хемоатрактант.

## 2.4.Амилоидоза

Серумният амилоид А протеин изгражда не имуноглобулиновите фибрилерни протеини на АА-амилоида, синтезиран в хода на вторична амилоидоза.<sup>53</sup> За пусков механизъм се приема постоянната експресия на SAA, развиваща се в хода на персистиращи и хронични възпалителни заболявания (фиг. 8). С най-важно значение са туберкулозата и хроничните остеомиелити, както и някои заболявания на съединителната тъкан, протичащи с асептичен тип възпаление (лупус еритематодес, ревматоиден артрит, анкилозиращ спондилит, дерматомиозит), болест на Крон, хроничен пиелонефрит и др.<sup>127,162</sup>



Фиг. 8. Амилоидоза – патогенеза<sup>90</sup>

АА-амилоидът се натрупва в черния дроб, слезката, бъбреците, храносмилателния тракт и надбъбреците и е причина за развитието на органна недостатъчност.<sup>92,93</sup> Следователно ролята на SAA за човешкия организъм се оказва многокомпонентна. От една страна действа като острофазов протеин, изпълняващ редица имунни функции в хода на остро възпаление. От друга страна, в случаите на хронично протичащи инфламаторни процеси, SAA е отговорен за развитието на амилоидоза, която причинява органна недостатъчност и влошава дългосрочната прогноза за качеството на живот при конкретния пациент.<sup>69</sup>

От посочената характеристика, произтичат някои значителни ползи за клинициста. Ясно е, че в хода на остро възпаление задържането на серумните концентрации на SAA над референтните, е резултат от непълно овладян инфламаторен процес. Това налага мобилизиране на усилията за откриване на подлежащия възпалителен фокус, оптимизиране на диагностичния, а така също и на терапевтичния режим до нормализиране на плазмените му нива, с цел профилактика на възникващата на по-късен етап амилоидоза.

## **2.5.Клинична стойност на SAA**

Още през 1989 година, Перус и колектив<sup>145</sup> достигат до извода, че „SAA има важна роля в диагностиката и лечението на вирусни и бактериални инфекции при коне“ и препоръчват рутинно изследване на показателя при всички животни, които се подготвят за участие в състезания по надбягване.

Както бе посочено по-горе, SAA представлява позитивен ОФП, чиято серумна концентрация нараства значително по време на острофазов отговор. Дори минимални изменения в плазмените му нива насочват към подлежащ инфламаторен процес и налагат мобилизиране усилията на медицинските специалисти за откриване на възпалителен фокус.<sup>164</sup> В хода на различни инфекциозни заболявания, независимо от етиологичния агент-вируси или бактерии, SAA се увеличава до 1000 пъти над нормата, корелирайки с размера и тежестта на увредената тъкан.<sup>94,164,191,201</sup>

Yamada и колектив<sup>200</sup> посочват, че SAA нараства „първите три и най-късно до шестия час от появата на клинична симптоматика, достига максимум около третия ден и най - рано след 96 часа (при липса на усложнениални я), с навлизането в стадия на реконвалесценция, настъпва обратна динамика в стойностите му и серумните

концентрации достигат базални нива“. Редица проучвания установяват сходни резултати: максимално високи нива са измерени 36-48 часа след интрамускулно приложение на етиохоланолон<sup>122</sup>; 3 дни след инфекция с грипен вирус<sup>200</sup>; между 36-я и 48 час от развитието на миокарден инфаркт<sup>15</sup>; на 2 ден след стимулация на хепатоцити с IL-1 $\beta$  и IL-6<sup>100</sup>; 3-5 дни след заразяване с *human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)*.<sup>46</sup> Така SAA се оказва важен за клиничната практика биомаркер, отчитащ наличие на възпалителен процес, в най-ранните етапи от неговото развитие. За сравнение, CRP е значително по-консервативен показател, който реагира предимно в хода на бактериални инфекции, а промени в серумните му нива се установяват най-рано след първите 6 часа от началото на заболяването.<sup>2</sup>

Серумният амилоид А протеин се отличава с кратък плазмен полуживот – средно 30-120 мин<sup>76,81</sup>. Castl и колектив<sup>37</sup> съобщават за по-продължителна серумна циркулация – до 5 часа. Бързото нормализиране на концентрациите му в серума отразява стихването на възпалителните процеси. Следователно, динамичното изследване на SAA би било от полза за клинициста, корелирайки своевременно с тежестта и клиничния ход на заболяването, както и ефекта от приложеното лечение. Достигането до референтни стойности насочва към липса на възпалителна активност в организма. Това позволява своевременно преустановяване на лечението. Скъсява се болничния престой и намаляват финансовите разходи, както за пациента, така и за здравното заведение.<sup>138</sup> В свое проучване обаче, Cicarelli и колектив<sup>45</sup> оспорват гореописаните твърдения, посочвайки, че значителен процент обследвани лица, загиват с картина на септичен шок и нормални стойности на SAA в серума. Поради това, необходимостта от допълнителни анализи за преценка приложимостта в клиничната практика се увеличава. През последните години, все повече автори работят по този въпрос, извеждайки на преден план преимуществата на SAA като най-чувствителен маркер за остро възпаление, реагиращ дори в хода на вирусни инфекции (когато рутинно прилаганите до момента показатели остават в референтни граници).<sup>49,62,94,95,96</sup>

Динамичното изследване на SAA по време на боледуване дава важна информация за клинициста. Оформящата се тенденция към нарастване, както и случаи, при които стойностите на SAA се задържат завишени за период по-дълъг от 4 дни след първите симптоми на болестта, се свързват с терапевтичен неуспех, релапс или развитие на усложнения от различно естество. В хода на вирусни инфекции, втори пик

в серумните му нива, измерен средно на 96-я час, отразява възможност за суперпонирана бактериална инфекция. Липсата на обратна динамика въпреки проведеното антибиотично лечение се свързва с потенциална антибиотична резистентност и налага промяна в антибактериалната терапия.<sup>138</sup>

Динамиката в серумните концентрации на SAA корелира и с давността на оплакванията.<sup>192</sup> Нарастващите стойности през първите 24-48 часа от проследяването, отразяват нормалната еволюция на острофазов отговор у пациенти, заболели скоро в рамките на няколко часа или 1-2 дни. Обратно, при лица с хронични инфекции, SAA е леко завишен и при повторно изследване не показва съществена динамика. С оглед правилно тълкуване на получените резултати, Lannerguard и колектив<sup>98</sup> препоръчват „метода на двойните проби“ – изследване на SAA при първа среща с болния и още един път – минимум 48 часа по-късно.

Според Tamamoto и колектив<sup>184</sup> промените в нивата на SAA корелират в максимална степен с изхода от заболяването. В случаи на тежки инфекции, протичащи с тенденция към хронифициране, при развитие на усложнения от различно естество или при неефективност от проведената терапия, постоянно обновяващият се пул от медиатори на възпалението води до трайно високи серумни нива на SAA.<sup>66</sup> В последствие се увеличава и рискът от развитие на вторична, реактивна амилоидоза<sup>92</sup>, шодеща до съотшетни функционални увреди и развиваща се органна недостатъчност<sup>85</sup>. По тази причина, основна цел в лечението на пациентите с инфекциозни и възпалителни заболявания е своевременното нормализиране нивата на SAA в серума. В противен случай, следва да се положат максимални усилия за оптимизиране на терапевтичния режим или откриване на „скрити“ възпалителни огнища.

Серумният амилоид А протеин би могъл да се изследва и в пунктатна течност, разграничавайки отлично трансудат от ексудат. В ексудативни изливи, SAA достига 10% от серумната си концентрация.<sup>142,153</sup> Според Okino и колектив<sup>142</sup> доказването на SAA и CRP в ексудативна течност подкрепя тезата, за участието на тези острофазови протеини в имунните отговори и тъканните репаративни процеси. Същевременно в проби от трансудат, SAA се измерва едва в следови количества. Най-ранните проучвания върху възможността за изследване на SAA в секрети и екскрети са проведени от *Fathi* и *Farahzadi*.<sup>62</sup> Авторският колектив обследва 56 крави от породата *Holstein*, страдащи от различни инфекциозни заболявания и доказва, че високите

стойности на SAA в млякото на болните животни, корелират с тежестта на инфекцията, а бързото нормализиране на нивата им отразява навлизането в периода на реконвалесценция.

Серумният амилоид А протеин е чувствителен маркер за остро възпаление, но неспецифичен по отношение на етиологичния агент.<sup>200</sup> Стойностите му нарастват както при вирусни, така и при бактериални инфекции. Поради тази причина, изследването му не бива да замества пълния клиничен преглед на пациента и съответните микробиологични, вирусологични и молекулярни методи за идентификация на конкретния причинител.<sup>119,120</sup>

Нормалните за човешката популация серумни концентрации на SAA варират между 5 мг/л и 15 мг/л. Мерните единици мг/л и мкг/мл са еквивалентни, а концентрации, изразявани в нг/мл се изчисляват като една хилядна част от горепосочените.<sup>138</sup> Някои автори посочват, че SAA не бива да се открива у здрави лица и дори концентрации над 0 мг/л са белег за подлежащ възпалителен процес. При свои анализи върху коне, Satue и колектив<sup>164</sup> доказват, че вариант на нормата са стойности между 0,5 мг/л и 10 мг/л. Нови проучвания сочат, че базалните нива на SAA са генетично определени и наред с това, възрастово обусловени.<sup>75,112</sup> Най-ниски са те кръвни проби от пъпна връв, а най-високи (до 15 мг/л) – при здрави лица над 65 години.<sup>96,97,98</sup> Подобни вариации се обясняват с ниската активност на острофазовия отговор у новородените, както и със съответния коморбидитет в старческата възраст.<sup>50</sup> Според изследователи в Мериленд, САЩ обаче<sup>75</sup>, най-ниски нива – 5 мг/л са измерени във възрастовата група 60+. Имайки предвид технологията за изследване на SAA в хода на отделните проучвания и липсата на методи за стандартизация, вероятно тези различия се дължат именно на аналитични грешки, особено в случаите, когато резултатът е оценяван чрез реакция преципитация в агаров гел.

Важна особеност е фактът, че стойностите на SAA не зависят от пола на пациентите.<sup>156</sup> През 2001 година, в Италия е проведено клинично проучване, обхващащо 12 здрави жени и 12 здрави мъже, при които SAA е изследван петкратно при еднакви условия – всяка сряда сутрин, в седнало положение, в рамките на 5 последователни седмици, като пробонабирането е извършено от един и същ лабораторен специалист. Кръвта е центрофугирана при 3000 об/мин за 15 мин., през първия час от вземането ѝ. Супернатантата е съхранявана при -70°C до приключване на проучването. Нивата на

SAA са определени чрез *LENI* (*latex-enhanced nephelometric immunoassay*). Средните и индивидуални вариации в стойностите на SAA са сходни за двата пола – 2,36 мг/л<sup>52</sup>, потвърждавайки резултатите, получени в хода на други проучвания<sup>55,75</sup>, според които нормалните стойности на SAA в серума на здрави лица не бива да надвишават 10 мг/л.

При разработването на настоящия литературен обзор (2018 година), бяха открити редица публикации, свързани с приложението на SAA в практиката и с неговата клинична стойност. За територията на България, до момента той е изследван единствено при пациенти с неинфекциозни заболявания. Евтимов Н.<sup>10</sup> анализира динамиката в стойностите му след лапароскопска и класическа радикална простатектомия при пациенти с карцином на простатната жлеза. Николова М.<sup>13</sup> проучва диагностичната му стойност при пациенти със системен *lupus erythematoses*, а Ходжев В.<sup>16</sup>, Дикова З.<sup>8</sup> и Шишков В.<sup>18</sup> отчитат, че системното възпаление при ХОББ се характеризира с нарастване на всички острофазови протеини, включително и на SAA. Според Налбански А.<sup>12</sup> показателят е ценен биохимичен маркер, намиращ място в диагностиката и лечението на генитална ендометриоза. Безспорно, най-много национални проучвания са проведени при кардиологични пациенти<sup>1,6,9,15</sup>, в хода на които е установено, че завишените нива на SAA корелират с тежка атеросклероза и висок риск от развитие на последваща миокардна исхемия.

Thompson и колектив<sup>185</sup> съобщават, че проатерогенните ефекти на SAA са резултат от индукция на *Transforming growth factor beta*, завишени нива на биглигани в съдовете и масивна ретенция на LDL. Следователно, острите инфекциозни заболявания, протичащи с кратковременни, но значително повишени нива на SAA в серума, вероятно имат връзка с развиващите се на по-късен етап кардиоваскуларни увреди. По данни на международни автори, показателят корелира в максимална степен с активността и на туморни заболявания<sup>136</sup>, артериит на Такаясу, васкулит, анкилозиращ спондилит (болест на Бехтерев), саркоидоза.<sup>30,33,34,42,44</sup> Налице е значима асоциация и с тежестта на вторичната амилоидоза, захарен диабет, инсулинова резистентност, метаболитен синдром.<sup>21,29,124,136</sup> Особено полезна за клиничната практика се оказва корелацията между нарастващите нива на SAA в ранните етапи на отхвърляне на присадката (*graft versus host*) при пациенти с бъбречна трансплантация.<sup>36,37</sup> При болни с ревматоиден артрит, високите стойности на SAA се асоциират с активността на заболяването и риска от развитие на кардиоваскуларни или бъбречни усложнения на по-късен етап.<sup>110,131,180</sup>



С динамиката в стойностите на SAA при различни инфекциозни заболявания се занимават различни чуждестранни учени, но най-голям принос безспорно има шведският изследовател Anders Lannergard.<sup>94,95,96,97,98,99</sup>

### **2.5.1. SAA при бактериални инфекции**

Редица автори считат, че SAA е значително по-чувствителен показател за остро възпаление от бактериален произход, в сравнение с рутинно изследваните до момента CRP, фибриноген, прокалцитонин, хаптоглобин и общ брой левкоцити в периферната кръв.<sup>32,39,149,164,198</sup> Високи нива на SAA са регистрирани при болни с пневмония, пиелонефрит, сепсис, ендокардит, септичен артрит, еризипел, салмонелоза, бактериален менингит, бруцелоза.<sup>39,168</sup> У имунокомпрометирани, стойностите му нарастват в хода на пневмония, причинена от *Pneumocystis carinii*<sup>94</sup>, а при болни от муковисцидоза – след екзацербации с етиологичен агент *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>176</sup> Освен това, Lannergard и колектив<sup>98</sup> отчитат ролята му по отношение мониториране ефекта на антибактериалната терапия в хода на инфекции на пикочните пътища, бактериални инфекции при неутропенични болни и белодробни инфекции при пациенти с кистична фиброза.

Установените промени в серумните концентрации на SAA сред хора, боледуващи от инфекциозни заболявания с бактериална етиология се оказват разнопосочни. Някои автори считат, че в тези случаи показателят не превъзхожда CRP и динамиката в стойностите на двата лабораторни маркера е съизмерима.<sup>108</sup> От друга страна, Arnon и колектив<sup>23,24</sup> доказват, че при болни с неонатален сепсис, SAA нараства много преди CRP, достига по-високи серумни концентрации, а при положителен ефект от проведеното лечение, паралелно с развитие на оздравителния процес, клирънсът му изпреварва с близо 48 часа този на останалите острофазови протеини.

Сходни резултати са съобщени от група китайски изследователи, които провеждат мета-анализ върху 823 деца, развили сепсис през първите 28 дни след раждането.<sup>203</sup> Известен е фактът, че в подобни случаи клиничната симптоматика е неспецифична, а отчитането на резултата от хемокултурите изисква технологично време. С-реактивният протеин, прокалцитонин и други маркери за остро възпаление също не подпомагат поставянето на ранна диагноза, тъй като промените в серумните им концентрации настъпват късно. Възниква необходимостта от изследване на друг

острофазов протеин, чиито стойности се изменят в първите часове от началото на заболяването. Оказва се, че SAA отлично отговаря на това условие. Високи стойности са измерени още в първите 8 часа от развитието на клиничната симптоматика, доказвайки, че в случаи на неонатален сепсис, SAA се отличава с висока чувствителност и специфичност по отношение на инфекциозния процес.

Marhaug и колектив<sup>118</sup> също отчитат значително превъзходството на SAA над CRP що се отнася до случаи на бактериални инфекции. Таргетна група в проведеното от тях проучване са болни от муковисцидоза, при които серумните нива на SAA корелират отлично (за разлика от CRP) с тежестта на дихателната недостатъчност, развиваща се в следствие на честите инфекции с различни бактериални агенти, както и колонизирането на респираторния тракт от *Pseudomonas aeruginosa*.

Проучванията относно мястото, което SAA заема в лабораторната диагностика на възпалителните заболявания продължават и през 1993 година се развива идеята за ролята му като маркер, отчитащ ефективността от проведената антибиотична терапия. При пациенти с уросепсис и пиелонефрит, още през първите 48 часа от развитието на болестта, SAA достига стойности от порядъка на 800-900 мг/л.<sup>97,99</sup> Бързата обратна динамика в серумните му концентрации корелира с положителен ефект от антибиотичното лечение. При липса на усложнения, показателят достига референтни граници около 4-ти ден. При инфекция с бактерии, резистентни на емпирично подбрани антибиотик, SAA нараства експоненциално и в рамките на първите 48 часа, серумните му концентрации достигат стойности от порядъка на 1200 мг/л. Това позволява ранна преоценка на лечението, ограничава провеждането на дълги и неефективни антибиотични курсове, водещи както до алергизация на организма, така и до значителни финансови разходи за болничното заведение.<sup>36,37</sup>

Lannerguard и колектив<sup>97</sup> проучват въпроса за промените в серумните нива на SAA при болни лица с по-леки форми на възпаление от бактериален произход като острия цистит. Известно е, че в тези случаи, стойностите на CRP остават в референтни граници или нарастват несигнификатно, рядко надвишавайки 40 мг/л, което води до диференциално диагностични трудности и неадекватно лечение. Обратно, още в първите няколко часа от заболяването, SAA достига трицифрени стойности, отразявайки локалния острофазов отговор, развиващ се срещу етиологичния агент. Така, при пациенти с фебрилитет и оплаквания от страна на пикочо-отделителната

система, комплексният лабораторен анализ, включващ едновременно изследване на SAA и CRP позволява провеждане на своевременна и точна диференциална диагноза. Високите стойности на SAA при нормални или слабо завишени стойности на CRP насочват към остър цистит, докато за случаите на пиелонефрит са характерни серумни концентрации на SAA и CRP надвишаващи 100 мг/л.

Интересен поглед върху клиничната стойност на SAA е представен в хода на интернационално проучване, обхващащо пациенти със субарахноидална хеморагия, настъпила вследствие на руптурирала аневризма.<sup>26</sup> По време на хоспитализацията, авторският колектив описва завишена честота от нозокомиални (вътреболнични) инфекции на трахеобронхиалното дърво или пикочо-половата система, които влошават състоянието на болните и често стават основна причина за леталния изход. Оказва се, че в тези случаи, дори към момента на хоспитализацията, серумните нива на SAA са абнормно завишени, достигащи средно 90,9 мг/л. Въз основа на това, авторският колектив изказва твърдението, че показателят се отличава с висока чувствителност и специфичност към последващо развитие на вътреболнични инфекции. Именно тогава се налага предприемане на съответни профилактични действия, свързани със съхраняване живота на пациентите и подобряване изхода от заболяването.

### ***2.5.2. SAA при вирусни инфекции***

Както е известно, повечето вирусни инфекции не водят до промени в серумните концентрации на CRP. В някои случаи обаче, проинфламаторните цитокини достигат системната циркулация и обуславят хепаталната експресия на CRP.<sup>2</sup> Създават се значителни диференциално-диагностични затруднения, свързани с етиологията на заболяването: вирусна или бактериална. Правилният отговор е от особено важно значение, тъй като назначаването на антибиотик в случаи на вирусни инфекции се асоциира както с терапевтичен неуспех, така и с развитие на бактериална резистентност и алергизация на организма. Оказва се, че изследването на SAA разрешава дилемата. Нивата му при вирусни инфекции достигат 200-300 мг/л, докато при бактериални, нерядко надвишават 1000 мг/л<sup>164,170,176</sup>. Lannerguard и колектив<sup>94</sup> посочват, че за максимална информативност по отношение на етиологичния агент при пациент с инфекциозно заболяване следва да се провежда комплексно лабораторно изследване, включващо както CRP, така и SAA.

Риновирусните инфекции са пример за заболявания с минимална инфламаторна активност. В тези случаи, CRP е винаги в норма, а пациентите не съобщават за системни симптоми като интоксикация, фебрилитет или липса на апетит. Нерядко, поради сходство в симптоматиката и най-вече поради отсъствие на тоksiинфекциозен синдром, заболяването минава под рубриката ”сенна хрема“ или ”алергичен ринит“. Именно в тези случаи SAA би могъл да служи като дискриминативен лабораторен показател тъй като завишените му серумни концентрации винаги корелират с активността на подлежащия инфекциозен процес<sup>164</sup>.

Динамиката в стойностите на SAA при пациенти с различни вирусни инфекции е проучвана както върху човешката, така и върху животинската популация. Nulten и колектив<sup>78</sup> потвърждават, че при коне, боледуващи от грип, показателят корелира както с тежестта и клиничния ход на заболяването, така и с ефекта от приложеното лечение. Завишени серумни концентрации са отчетени както по време на инфекция с вируса на говеждата диария<sup>190</sup>, така и при заразяване на коне с херпес симплекс вирус тип 1<sup>164</sup>. Andersen и колектив<sup>22</sup> проучват ролята му като маркер, отразяващ степента на напрегнат имунитет след противотетанична ваксинация и препоръчват извършване на догонващи (*catch-up*) имунизации, в случаи когато серумните му нива достигнат базални стойности.<sup>130</sup>

Първите проучвания върху промените в нивата на SAA сред хора, страдащи от инфекциозни заболявания с вирусна етиология, датират от осемдесетте години на двадесети век. Достъпни в международната медицинска периодика са материали, представящи клиничната стойност на показателя сред пациенти с грип, риновирусна инфекция, морбили, рубеола, цитомегаловироза, варицела, СПИН.<sup>95,96,97,169</sup> Whicher и колектив<sup>198</sup> регистрират високи серумни концентрации на 3 ден от грипна инфекция и на 4 ден при обикновена настинка. За разлика от бактериалните инфекции, където CRP и SAA имат сходен кинетичен отговор (бързо достигат максимални стойности, бързо се нормализират, корелирайки с ефективността на лечението и липсата на усложнения), при острите вирусни инфекции, CRP реагира в значително по-тесни граници, рядко надвишавайки 100 мг/л<sup>135</sup>. В подобни случаи, SAA остава единствен индикатор за протичащия острофазов отговор, със средни серумни концентрации от 141 мг/л при аденовирусни инфекции, 77 мг/л при болни от морбили, 63 мг/л при пациенти с грип. Изненадващ факт се оказва, че най-ниски стойности – 31 мг/л са измерени в случаите на серозен менингит.<sup>135,198</sup>

При пациенти с коронавирусна инфекция, промените в SAA диференцират отлично усложнените с пневмония случаи от обичайно протичащия катар на горните дихателни пътища. Сигнификантно по-високи стойности са отчетени в първия случай, а паралелно с овладяване на клиничната симптоматика и негативиране на рентгенологичната находка, SAA достига референтни граници. При един от обследваните лица, чиито серумни проби реагират с нарастващи стойности на SAA е доказана вторична бактериална инфекция.<sup>187</sup>

Според различни автори, комплексното изследване на SAA и CRP при пациенти с остри инфекциозни заболявания предоставя максимална информативност в няколко различни аспекта. Завишените нива на SAA, в случаите при които CRP остава в референтни граници или нараства незначително, насочват към вирусна етиология на заболяването. Когато още при първоначалното пробонабиране и двата лабораторни показателя са измерени във високи и едновременно съизмерими стойности, вероятно се касае за заболяване с бактериална етиология. В този случай е налице необходимост от стартиране на съответна емпирична антибактериална терапия.<sup>135</sup> Особено важно е критичното и динамично изследване на SAA в хода на заболяването. Тенденция към задържане на високи серумни нива или повторно нарастване след предварително регистриран спад се асоциира с развиващи се усложнения, вкл. насложена инфекция. Така, въз основа на данните от анамнеза, клиничният преглед и стойностите на SAA и CRP, още в първите часове след срещата с пациента, с успех биха могли да се прогнозира етиологията и тежестта на заболяването.

### **2.5.3. SAA и други маркери за остро възпаление**

В клиничната практика, изследването на острофазовите протеини е важна част от диагностиката на инфекциозните заболявания. Показателите не са строго специфични за конкретна болест, поради което следва да се назначават комбинирани, а резултатите да се тълкуват критично и в единство с клиничната симптоматика.<sup>171</sup> Спазването на посочените препоръки, корелира в максимална степен с поставянето на ранна и адекватна диагнозата, както и с провеждане на ефективно лечение.<sup>48</sup>

Първият ОФП, познат на медицината е CRP. Открит е през 1930 година от *Tillet* и *Francis*, като преципитиращ C-полизахаридите в капсулата на *Streptococcus pneumoniae*.<sup>1,2</sup> Таксономично се отнася към пентраксиновата фамилия.<sup>55</sup> Изграден е от 5 субединици с общо молекулно тегло 118 kD. Синтезира се в черния дроб и

епителните клетки след стимулация от проинфламаторни цитокини – IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , продуцирани предимно в хода на инфекции, с бактериална етиология.<sup>32,94</sup> За референтни се приемат стойности до 6 мг/л.<sup>94</sup>

В сравнение със SAA, CRP е значително по-консервативен маркер за остро възпаление. Серумните му нива показват тенденция към нарастване около 6-10 часа след началото на инфекцията (или 3-4 часа след SAA).<sup>154</sup> Когато последната е максимално проявена, показателят достига пикови концентрации, а с прилагането на ефективни лечебни средства, бързо се достигат изходни стойности<sup>2</sup>. Бактериалните инфекции покачват стремглаво серумната концентрация на CRP, докато вирусните не (за разлика от SAA). Въпреки това, някои вирусни агенти, предимно аденовируси, предизвикват масивна тъканна увреда и стават причина за нарастване на CRP като стойностите му достигат 30-60 мг/л. Това създава диференциално диагностични затруднения. Както стана ясно и по-горе, в тези случаи, единствено паралелното изследване на SAA и CRP осигурява поставяне на правилна диагноза, преди готовност на микробиологичните и серологични изследвания.

Скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ) е основен критерий в клиниката за оценка на суспекционния стабилитет на кръвта. Реакцията измерва скоростта, с която се утаяват червените кръвни клетки в проба от кръв за период от 1 час. Резултатите се отчитат в милиметри височина на плазмата, която се формира над утаените еритроцити.<sup>56</sup> Този тест е описан за първи път през 1897 година от полския патолог *Edmund Biernacki*. Еритроцитите се утаяват по-бързо в присъствието на по-голямо количество ОФП в кръвта на болния, поради което показателят се използва като маркер за остро възпаление.<sup>31</sup> Въпреки това обаче, тестът е неспецифичен, тъй като не дава информация за конкретния причинител и за мястото на възпалението, промените настъпват на по-късен етап от развитието на възпалителния процес, стойностите се нормализират бавно в хода на ефективна терапия. Наред с това, СУЕ нараства при заболявания протичащи с увеличение на глобулините и фибриногена (инфекции, тумори, хемопатии, автоимунни заболявания), както и при някои физиологични състояния като бременност, след тежък физически труд, по време на менструален цикъл, при възрастни лица над 60 години.<sup>47</sup> Поради тази причина, реакцията се характеризира с ниска диагностична стойност и получените резултати следва да се коментират заедно с данните от анамнезата, физикално изследване и стойностите на CRP и SAA.

Референтните граници на СУЕ зависят както от технологията, по която се извършва изследването, така и от възрастта на пациента. При новородените, нормалните стойности са между 0-2 мм/ч, при малките деца и подрастващите достигат 13 мм/ч, а при лицата в активна възраст се прилага следната формула:

$$\text{СУЕ /мм/ч/} \leq \frac{\text{възраст (години)} + 10(\text{за жени})}{2}$$

Със значително повече предимства пред стандартната методология за отчитане на СУЕ е апаратния анализ, при който резултатът е готов за 20 минути. Налице е още възможност за съхраняване в апарата на последните няколко резултата. Едновременно могат да се изследват няколко проби, поради това днес все по-често се прибягва до тази техника.<sup>82</sup>

Промените в левкоцитния брой и в тяхното съотношение се регистрират често в хода на инфекциозни болести от бактериален или вирусен произход. Патогенезата на тези промени е свързана със защитата на организма и поддържането на имунна хомеостаза.<sup>4</sup> Ето защо, заедно със SAA, CRP, СУЕ, белите кръвни клетки също служат като маркер за възпаление. Повишават се (левкоцитоза) предимно в случаите на бактериални инфекции, а в хода на вирусни се наблюдава нормоцитоза или левкопения.<sup>4,134</sup>

Японски автори откриват, че стойностите на SAA, CRP, левкоцитите и съотношението между неутрофили и лимфоцити (*N/L*) остават значително завишени в групата с бактериални инфекции, в сравнение със здравите контроли.<sup>186,192</sup> Съотношението SAA/CRP обаче е ниско. Що се отнася до пациентите с остри вирусни, нивото на SAA и индексът SAA/CRP са значително по-високи, а статистическа разлика с резултатите при здравите контроли за CRP, левкоцити и *N/L* не е регистрирана. Това показва, че SAA, левкоцитният брой и CRP имат важно значение в диагностиката на острите инфекции. При вирусните заболявания, SAA надвишава многократно CRP, индексът SAA/CRP остава висок, придобивайки значима диагностична стойност.

Към настоящия момент SAA продължава да бъде обект на задълбочени изследвания и анализи. В детайли са проучени структурата му, функционална му характеристика и патофизиологичните промени, обуславящи повишена секреция по време на острофазов отговор. Все повече автори се фокусират върху изучаване на проинфламаторните му качества и връзката с процеса амилоидоза, където SAA е

главен структурен компонент на амилоидните фибрили. Достъпни са литературни данни, отразяващи ролята му при някои неинфекциозни заболявания – колагенози, миокарден инфаркт, саркоидоза, хемопатии и други. Сред пациенти, страдащи от различни инфекции, SAA е анализиран главно в комплекс с останалите рутинно назначавани маркери за остро възпаление – CRP, СУЕ, левкоцити. Доказана е високата му чувствителност към развиващия се острофазов отговор. Серумните му нива нарастват дори при заболявания, протичащи с минимална възпалителна активност (каквито са вирусните инфекции), в хода на които CRP, СУЕ и левкоцити остават в норма. Съвременни проучвания са фокусирани върху ролята му като показател за възпаление от вирусен произход, какъвто на този етап в клиничната практика не е въведен. До момента, в България показателят не е изследван сред инфекциозно болни. Поради това, базирайки се на достъпната в научната литература информация, считаме че задълбочените познания върху промените в серумните му концентрации при някои инфекциозни заболявания с вирусна етиология са особено актуални и биха допринесли за подобряване на диагностичния процес, разрешаване на някои диференциално-диагностични затруднения, а така също и за ранно отчитане на възникнали усложнения, ефект от приложеното лечение и изход от болестта.



### **III. Цел и задачи:**

Целта на настоящата работа е да се *проучат промените в стойностите на SAA при пациенти с някои вирусни инфекциозни заболявания и да се оцени значението му като диагностичен и прогностичен маркер за тежест на болестта и ефект от проведеното лечение.*

За реализиране на горепосочената цел си поставихме следните *задачи*:

1. Да се проучат промените в стойностите на SAA в динамика, в хода на някои инфекциозни заболявания с вирусна етиология;
2. Да се проведе сравнителен анализ между промените в стойностите на SAA и други лабораторни показатели, отчитащи остро възпаление – левкоцити, СУЕ и CRP, при болни с някои инфекциозни заболявания от вирусен произход;
3. Да се потърси корелация между нивата на SAA и тежестта на съответното инфекциозно заболяване;
4. Да се анализира клиничната значимост на SAA като маркер за ефективност на проведеното лечение;
5. Да се анализира възможността за приложение на SAA в клиничната практика като маркер, отчитащ ранната прогноза и изходът от заболяването;

## IV. Материал:

Настоящото проучване е извършено в периода октомври 2017-декември 2018 година.

### 1. Изследвани пациенти:

Проспективно са обследвани 102 пациента, на възраст между 1-60 години, хоспитализирани през посочения период в Инфекциозна клиника при УМБАЛ „Св. Марина“ – гр. Варна. Включващите критерии са посочени на табл. 6. Изключени са всички лица на възраст под 1 година и над 60 години. В тези случаи, серумните нива на SAA се влияят значително от допълнителни фактори като имunosупресия и коморбидитет, а това би довело до статистическа недостоверност на получените резултати.

Включващи критерии	Изключващи критерии
Възраст между 1-60 години;	Възраст под 1 или над 60 години;
Клинични данни за остро инфекциозно заболяване с вирусна етиология: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Грип;</li> <li>• Варицела;</li> <li>• Инфекциозна мононуклеоза;</li> <li>• Вирусни менингити/менингоенцефалити/вирусна енцефалопатия,</li> </ul> вкл. тежки и усложнени форми на протичане, с давност не повече от 48 часа и без провеждано амбулаторно лечение вкл. с антибиотик;	Клинични данни за остри инфекциозни заболявания, извън посочените като включващи, или същите, но с давност повече от 48 часа и/или проведено амбулаторно лечение, вкл. с антибиотик. ;
Липса на придружаващи хронични неинфекциозни заболявания, влияещи значително върху серумната концентрация на SAA – ХОББ*, ХБ**, ИБС***, ЗД****, нефропатия, колагенози, хипоалбуминемия под 30г/л и др;	Данни за придружаващи хронични неинфекциозни заболявания, влияещи значително върху серумната концентрация на SAA - ХОББ, ХБ, ИБС, ЗД, нефропатия, колагенози, хипоалбуминемия под 30г/л и др;
Ваксинация, извършена повече от 30 дни преди поява на настоящите оплаквания;	Ваксинация, извършена по – малко от 30 дни преди поява на настоящите оплаквания;
Пациенти, подписали информирано съгласие;	Пациенти, неподписали информирано съгласие;

**Табл. 6. Критерии за включване и изключване на пациентите в проучването: ХОББ\* – хронична обструктивна белодробна болест; ХБ\*\* - хипертонична болест; ИБС\*\*\* - исхемична болест на сърцето, ЗД\*\*\*\* - захарен диабет;**

Контролната група включва от 30 здрави лица, насочени от различни медицински специалисти или директно от членовете на екипа. От тях, 50,00% (15/30) са от мъжки пол, а 50,00% (15/30) са от женски пол. На табл. 7 са посочени критериите за включване и изключване на участниците от контролната група.

<b>Включващи критерии</b>	<b>Изключващи критерии</b>
Възраст между 1-60 години;	Възраст под 1 или над 60 години;
Здрави лица, без клинични данни за остро инфекциозно заболяване към момента на изследването;	Болни лица, с клинични данни за остро инфекциозно заболяване към момента на изследването;
Лица без установени хронични заболявания към момента на изследването;	Лица с установени хронични заболявания, към момента на изследването;
Ваксинирани преди повече от месец спрямо началото на изследването;	Ваксинирани преди по-малко от месец спрямо началото на изследването;
Лица, подписали информирано съгласие;	Лица, неподписали информирано съгласие;

**Табл. 7. Критерии за включване и изключване на участниците в контролната група**

Всички участници са включени в проучването след предварително информирано съгласие, потвърдено чрез собственоръчно поставен подпис в специално разработен за тази цел документ. В случаите, когато се касае за деца/юноши/младежи на възраст под 18 години, съгласието за участие е дадено от техен родител/настойник.

## V. Методи

### 1. Анкетно проучване:

Към момента на хоспитализацията, всеки участник в проучването /негов родител или настойник/ е попълнил анкетна карта, оценяваща преморбидния му статус. За изработването ѝ са използвани образци към документи по клинични пътеки. Резултатите са обработени своевременно, а въз основа на тях е оценена изпълнимостта на включващите критерии.

### 2. Клинико-лабораторни методи:

Серумният амилоид А протеин, както и останалите лабораторни показатели, включени в настоящото проучване – общ брой левкоцити, CRP, СУЕ (включително общ белтък и албумин) са изследвани в динамика в Централна Клинична Лаборатория при УМБАЛ „Св. Марина“ – гр. Варна. При всички болни е осъществено двукратно пробонабиране – в деня на хоспитализацията и  $4,73 \pm 1,33$  дни по-късно. Необходимото количество венозна кръв – 5 мл е взето посредством венепункция на периферна вена, чрез стерилни еднократни системи тип *Vacutainer*, *Becton – Dickinson* или други лицензирани марки. Пробите са центрофугирани на 3500 об/мин за период от 10 мин, на центрофуга *HERAEUS*, *Kendro*, *Германия*, която се намира в лабораторията на Инфекциозна клиника. Отделеното количество серум е съхранявано в хладилник в същата сграда, при  $t^0 -20^{\circ}\text{C}$ , до 6 месеца или до изработване на резултата за SAA. Всички останали параметри са изработени в деня на пробовземането.

Нивата на SAA при всички пациенти и в групата на здравите контроли са определени по имунотурбидиметрична методика с реагенти на *MEDICON*, на автоматичен биохимичен анализатор ‘*OLYMPUS*’ *AU 400*. Референтните стойности са до 10 мг/л.

Острофазовият протеин CRP е изследван в серума на пациентите по имунотурбидиметрична методика с реагенти на *SIEMENS*, на автоматичен биохимичен анализатор *ADVIA 1800*. Референтните стойности са до 5 мг/л.

Показателят СУЕ е отчетен по автоматизирана технология, чрез апарат *Roller20PN* на фирма *ALIFAX*. Технологичният процес включва работа в микрокапилярка, където след хомогенизиране при температура  $37^{\circ}\text{C}$  е определен агрегационният капацитет на изследваната проба на база 1000 измервания на оптичната плътност за 20 секунди и в последствие, по математически модели,

електронно е изчислена стойността на СУЕ в мм/ч. Референтните стойности са посочени по-долу:

### **Деца:**

до 14г.: (2-34 мм/ч)

### **Възрастни:**

Под 50г.: мъже (2 – 28 мм/ч);  
жени (2 -37 мм/ч)

Над 50г.: мъже (2 – 37 мм/ч);  
жени (2 -39 мм/ч)

Над 70г.: (3-46 мм/ч)

Нивата на общ белтък и албумин са определени на фотометричен принцип с реагенти на *SIEMENS* на автоматичен биохимичен анализатор *ADVIA 1800*. Референтните стойности са съответно от 32 г/л до 48 г/л за албумин и от 57 г/л до 82 г/л за общ белтък.

### **3. Вирусологични методи:**

Серологичните изследвания за етиологично разшифроване на случаите са извършени във Вирусологична лаборатория при УМБАЛ „Св. Марина“ – гр. Варна. Титърът на антителата от клас имуноглобулин М срещу причинителите на грип, инфекциозна мононуклеоза и варицела е отчетен чрез *ELISA*, като за диагностични, се приемат нива над 1,1. Използвани са тестове на компания *Euroimmun, Lubek, Germany*.

За дефиниция на случай с тежко, усложнено протичане, използвахме определението на Радев М и сътр., *Шокови състояния и интензивно лечение на инфекциозните заболявания, 1982: „клинична форма на инфекциозно заболяване по тежест се определя според степен на обща интоксикация и изразеността на органични увреждания вкл. шок“*.

### **4. Статистически методи:**

#### **4.1. Дескриптивен статистически анализ**

Чрез дескриптивен анализ бяха описани основните характеристики на проучените групи и на изследваните клинично-лабораторни показатели. В анализа бяха използвани:

- резултати от средни стойности, стандартна грешка (SD), ранг и минимални-максимални стойности;

- непараметрични тестове като кростабулация и Хи-квадрат ( $\chi^2$ ) при търсене на значими разлики в честотното представяне на категорийни стойности. Статистическа значимост при непараметричните тестове бе приемана при  $p \leq 0,05$ ;
- графично и честотно (таблично) описание и представяне на променливите в извадката. За графичното оформяне на представената информация бе използван *Microsoft Office (Excel)* за *Windows 10*;
- метод на статистическото оценяване – при проверка на хипотезите на изследването, нивото на значимост на нулевата хипотеза бе определяно според установената практика като  $\alpha = 0,05$ ;

Всички анализи в представения научен труд са извършени с помощта на статистически пакет за обработка на информация *IBM SPSS* за *Windows v.25*.

### **5.2. Вариационен анализ**

Стойностите на изследваните непрекъснати и интервални величини са обработени по метода на вариационния анализ. Получените данни са представени като средна аритметична величина и стандартно отклонение за отделните изследвани групи. Използван е 95% интервал на доверителност. Проведен е *t-тест* по двойки (*Paired T-тест*) и еднофакторен дисперсионен анализ (еднофакторна) *ANOVA (One-Way ANOVA)*.

### **5.3. Корелационен анализ**

Корелационният анализ на *Pierson (r)* бе използван за определяне на зависимости между полуколичествено определените признаци в изследването и определяне на силата на тяхното влияние на основата на тестване на линейни функции за връзки между променливите. Степента на асоциативна зависимост е значителна при  $0,5 < r = 0,7$ ; голяма при  $0,7 < r = 0,9$  и изключително голяма при  $r > 0,9$ . Статистическа значимост беше приемана при  $p \leq 0,05$ .

### **5.4. Графичен анализ:**

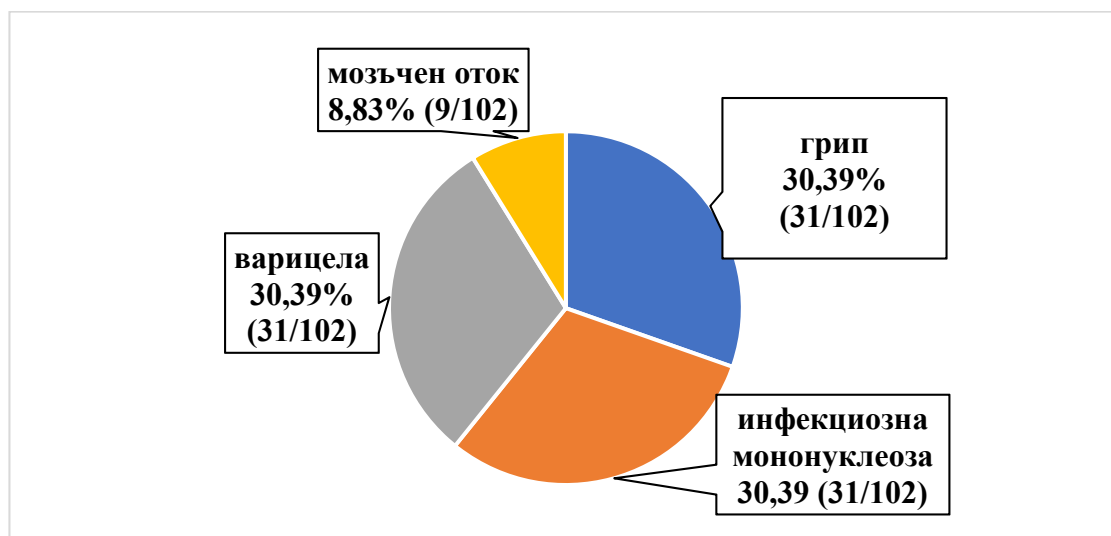
“*ROC*” графичен анализ беше използван за определяне ролята на точността и специфичността на предвидимостта на SAA, ESR, CRP и Leuco спрямо проследените инфекциозни заболявания. Стойността на площта под кривата се движи между 0,5 и 1,0. Пълно разделяне на здравните състояния чрез даден показател да се извърши при резултат над 0,75 или 75%. Статистически значими бяха разликите между групите при  $p \leq 0,05$ .

## VI. Резултати и обсъждане:

### 1. Разпределение на пациентите, включени в проучването според нозологични единици и тежест на протичане:

#### 1.1. Разпределение по нозологични единици

Разпределението на включените в настоящото проучване пациенти, според диагнозата е представено на фиг. 9. Оформи се четири групи болни: 30,39% (31/102) с грип, 30,39% (31/102) с инфекциозна мононуклеоза, 30,39% (31/102) с варицела и 8,83% (9/102) с мозъчен оток. Диагнозата <мозъчен оток> е синдромна диагноза, която при всички обследвани 9 болни, на по-късен етап, разшифровахме като вирусен менингит или менингоенцефалит. Малкият брой пациенти включени в тази група е резултат от епидемичността на инфекциозните заболявания – за периода, в който е проведено проучването, това са всички хоспитализирани с невроинфекции пациенти, отговарящи на включващите критерии. В бъдеще си поставяме за цел да разширим обхвата на тази група.



Фиг. 9. Разпределение на обследваните болни по нозологични единици

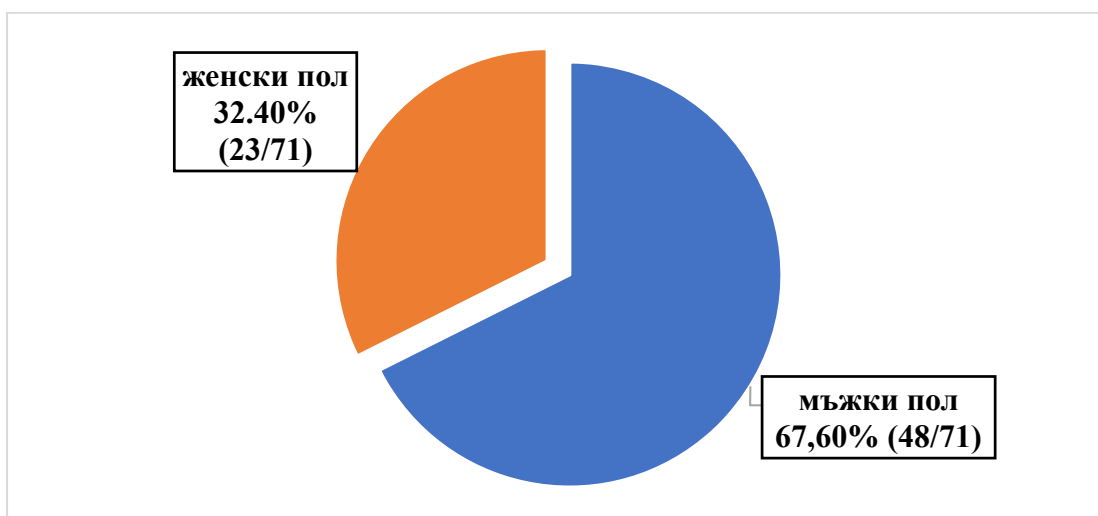
#### 1.2. Разпределение по тежест на заболяването

За целите на настоящото проучване, обследваните болни разпределихме в две подгрупи – *подгрупа А*, включваща пациенти със средно тежка форма на основното заболяване, протичащо обичайно, без регистрирани усложнения – 69,61% (71/102) и *подгрупа Б* – пациенти, при които са установени компликации от различно естество – 30,39% (31/102). Пациентите с леки клинични форми на заболяванията оставихме на

домашно лечение, поради липсата на индикации за хоспитализация. Въз основа на това, те не бяха включени в проучването.

### 1.2.1. Подгрупа А:

В подгрупа А, от всички 71 пациента, мъжете са 67,60% (48/71), а жените са 32,40% (23/71) (фиг. 10). Липсата на еквивалентност по пол отново е вследствие епидемичността на инфекциозните заболявания, а така също и поради ограничения период, в който е проведено проучването.



Фиг. 10. Разпределение на пациентите от подгрупа А по пол

Средната възраст на пациентите в тази подгрупа е  $14,24 \pm 14,25$  години, като преобладаващата възрастова група е между 1-14 години, следвана от тази между 15-44 години. Най-малък брой пациенти, регистрирахме във възрастта между 45-60 години (табл. 8).

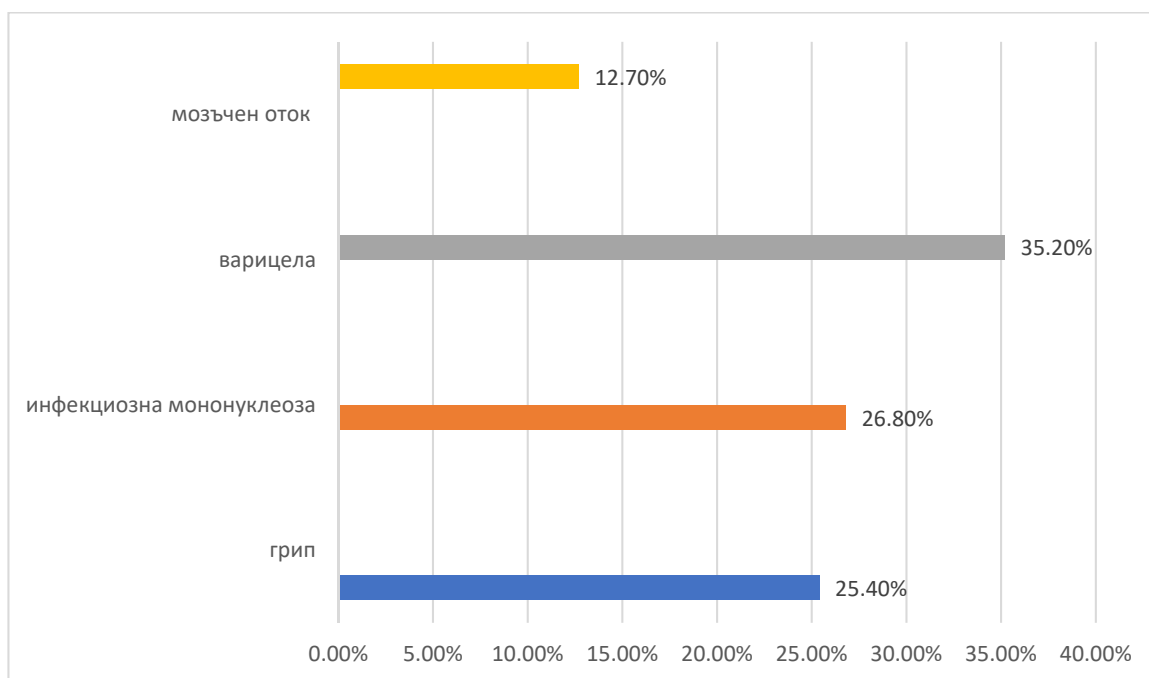
Възраст	Брой	Относителен дял, %
1-14	46	64,79%
15-44	22	30,99%
45-60	3	4,22%

Табл. 8. Разпределение на пациентите по възрастови групи

Разпределението по нозологични единици е представено на фиг. 11. Най-голям е процентът пациенти, боледуващи от средно тежка, неусложнена форма на варицела – 35,20% (25/71), следвани от болни с типично протичаща инфекциозна мононуклеоза – 26,80% (19/71). Неусложнени случаи на грип регистрирахме при 25,40% (18/71)



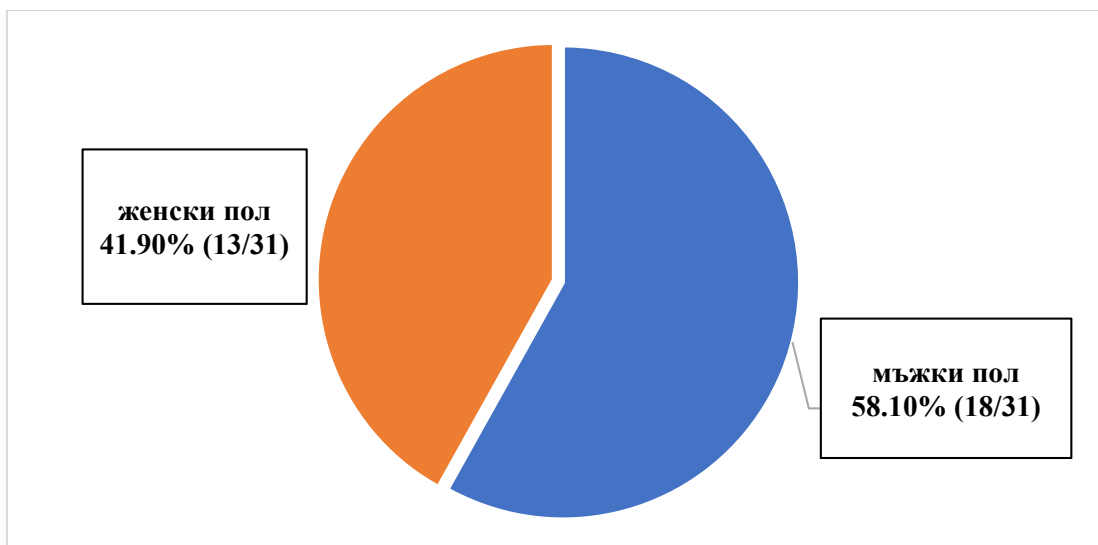
пациента, а вирусен менингит/менингоенцефалит, представен клинично с прояви на мозъчен оток – при 12,70% (9/71).



**Фиг. 11. Разпределение на пациентите от подгрупа А по нозологични единици**

### 1.2.2. Подгрупа Б:

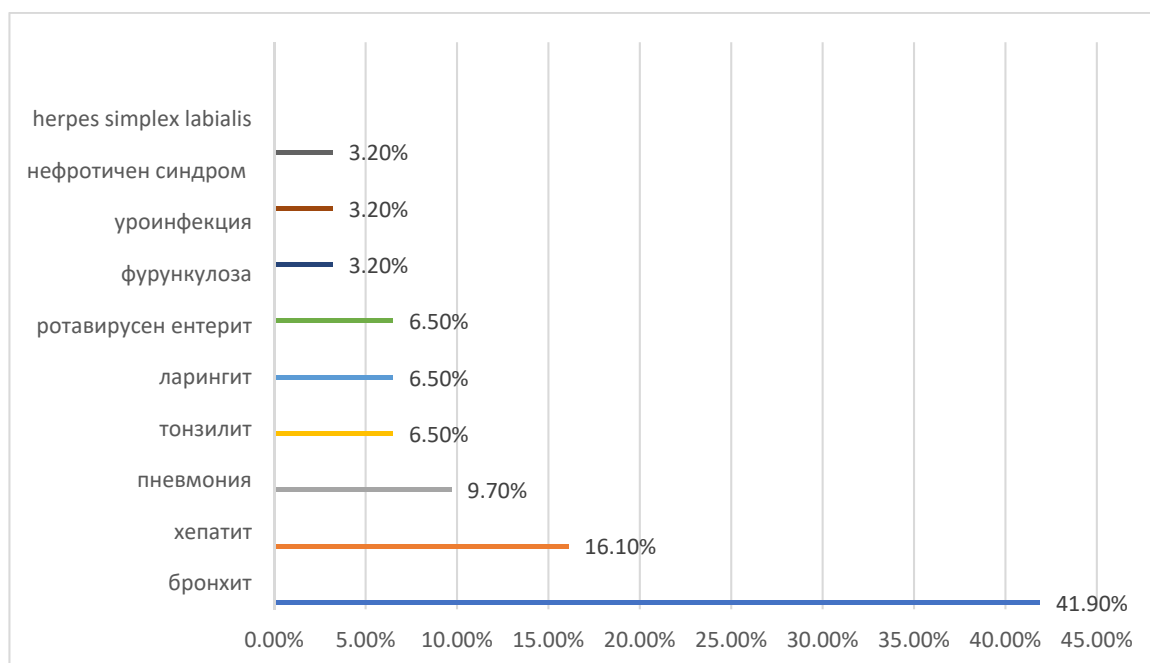
В *подгрупа Б* са включени 31 пациента с остри вирусни инфекциозни заболявания, при които към момента на хоспитализацията са регистрирани усложнения от различно естество, утежняващи клиничното протичане на основното заболяване. 58,10% (18/31) са от мъжки пол, а 41,90% (13/31) са от женски (фиг. 12).



**Фиг. 12. Разпределение на пациентите от подгрупа Б по пол**

Средната възраст на наблюдаваните болни е  $10,61 \pm 12,30$  години, а разпределението по нозологични единици е както следва: 41,90% (13/31) пациента с грип, 38,70% (12/31) с инфекциозна мононуклеоза и 19,40% (6/31) с варицела. При пациентите с вирусен менингоенцефалит не установихме усложнения в клиничното протичане и заболяването протече благоприятно.

Разпределението на болните според регистрираните усложнения е отразено на фиг. 13. При 41,90% (13/31) регистрирахме остър бронхит като най-честа компликация на острите вирусни инфекциозни заболявания. Второ място по честота заемат случаите, протичащи с полиорганно засягане – ангина+хепатит при 16,10% (5/31) болни с инфекциозна мононуклеоза.



**Фиг. 13. Разпределение на пациентите от подгрупа Б според регистрираните усложнения**

Интересен за нас беше 1 случай на дете с нефротичен синдром, отключен по време на боледуване от варицела. Касае се за момче на 1 годишна възраст – *Й.Б.Ф, ИЗ №10228*, което постъпи в Инфекциозна клиника – Варна с прояви на типичен варицелен обрив и аназарка. От изследванията установихме хипопротеинемия, хипоалбуминемия, хиперхолестеролемия, хипертриглицеридемия, масивна протеинурия (количество белтък в урина за 24 часа - 4,33 гр/л) и беден уринен седмимент. Въз основа на това, проведохме консултация с детски нефролог и

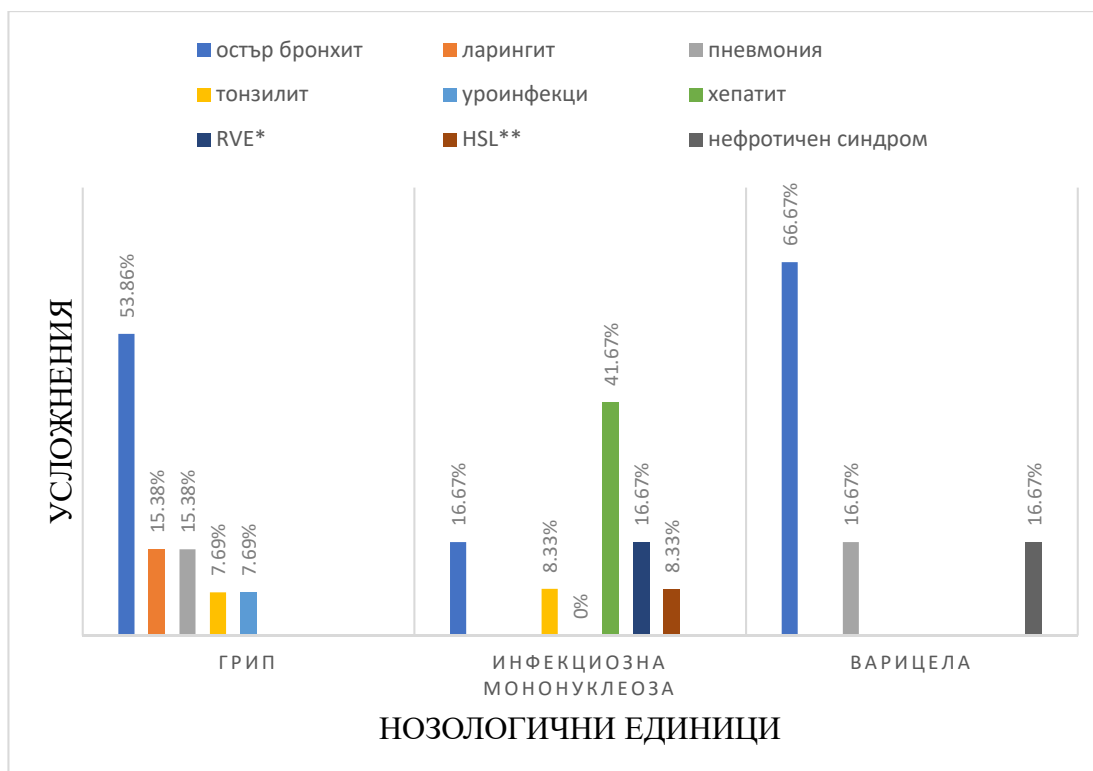
поставихме диагноза нефротичен синдром. На фона на проведеното лечение с ацикловир, флуидотерапия, хуман албумин, плазмопреливане и кортикостероид (включен към момента, в който обривът претърпя обратно развитие) отчетохме значително подобрене и детето бе дехоспитализирано. Пет дни по-късно постъпи в отделение по детска нефрология при УМБАЛ Св. Марина – Варна, с оплаквания от отново появили се генерализирани отоци, в хода на остър катар на горните дихателни пътища. След съответни терапевтични мероприятия бе дехоспитализирано в задоволително общо състояние.

Сред всички 13 болни с грип, включени в *подгрупа Б*, най-честото регистрирано усложнение беше остър бронхит – при 53,86% (7/13). Следват остър ларингит – 15,38% (2/13) и пневмония – 15,38% (2/13). При 7,69% (1/13) установихме бактериален тонзилит, а при 7,69% (1/13) – уроинфекция.

Сред пациентите с тежка форма на инфекциозна мононуклеоза, допълнително засягане на черния дроб наблюдавахме при 41,67% (5/12) от тях. При 16,67% (2/12) доказахме смесена вирусно-вирусна инфекция с ротавирус, а при 8,33% (1/12) с *herpes simplex* type 1. 16,67% (2/12) бяха с клинични и аускултаторни данни за остър бронхит. Бактериален тонзилит регистрирахме при 8,33% (1/12), а фурункулоза, също при 8,33% (1/12).

Сред пациентите с усложнена варицела, установихме че най-честата причина за утежняване клиничния ход на болестта е острият бронхит – 66,67% (4/6). При 16,67% (1/6) доказахме бактериална пневмония, а нефротичен синдром установихме с честота 16,67% (1/6).

Разпределението на болните от *подгрупа Б* по нозологични единици и регистрирани усложнения/коинфекции е представено на фиг. 14.



**Фиг. 14. Разпределение на пациентите от подгрупа Б по нозологични единици и усложнения**

**\*RVE – rotaviral enteritis; \*\*HSL – herpes simplex labialis**

## 2. Контролна група:

Серумните нива на SAA сред лицата от контролната група са изследвани еднократно, при стандартизирани условия, от квалифициран медицински персонал, с цел избягване на преданалитична грешка. Резултатите са сравнени с получените в подгрупа А и подгрупа Б.

Средните стойности на SAA в контролната група са  $3,08 \pm 1,93$  мг/л. Те са съизмерими, с получените резултати в хода на други големи проучвания (табл. 9).

Проучване/зdravi контроли/брой	Средни стойности на SAA, мг/л
Настоящо проучване, n=30	$3,08 \pm 1,93$
d’Eril G et al, n=24	$2,36 \pm 1,28$
Cetinkaya M et al, n=40	$3,2 \pm 3,4$
Esmat S et al, n=15	$4,08 \pm 1,14$

**Табл. 9. Средни стойности ( $x \pm SD$ ) на SAA в мг/л при контролната група лица от настоящото проучване и здрави контроли в други проучвания**

Сравнителният анализ между средните стойности на SAA сред мъжете и жените от настоящото проучване показва, че полът е демографски показател, който не влияе върху нивата на SAA в серума. Пробите на лицата от мъжки пол, реагираха със средни стойности на SAA от порядъка на  $2,95 \pm 1,82$  мг/л, а при жените установихме серумни концентрации, средно  $3,21 \pm 1,96$  мг/л. Получените резултати са съизмерими по между си, а разликата е статистически незначима. Редица международни проучвания анализират влиянието на пола върху нормалните нива на SAA, като представените в литературата изводи са сходни с установените от нас.<sup>75,112,164</sup> Средните стойности на SAA при 24 здрави мъже и жени, съответно  $2,35$  мг/л и  $2,37$  мг/л, представени от d'Eril G и колектив<sup>52</sup>, се доближават в максимална степен с установените в настоящото проучване, като разликите също са несигнификантни.

Възрастта е друг демографски показател, който за разлика от полът, значително повлиява базалните нива на амилоидния А протеин в серума. Според Stoneham и колектив<sup>158</sup> и Paltrinieri и колектив<sup>159</sup>, SAA достига пикови концентрации около 72-ия час след раждането. Това се дължи на комплексното влияние на тъканната травма, индуцирана от преминаването на плода през родовия канал, както и на голямото количество проинфламаторни цитокини, освобождаващи се в майчиното кръвообращение и преминаващи трансплацентарно. Значение имат и имуноглобулините приемани чрез коластрата, поради което, SAA може да е физиологично завишен след раждането. При лицата над 65 години, поради честата коморбидност SAA нараства, което се асоциира с хипердиагностика на острите възпалителни процеси, включително различни инфекциозни заболявания.<sup>138</sup> Поради това, в настоящото проучване са включени единствено лица на възраст между 1 и 60 години, средно  $11,47 \pm 6,62$  години, клинично здрави до момента, без анамнеза за хронично страдание.

Използвайки методите на дескриптивния анализ, установихме, че при 90,00% (27/30) от участниците, серумните концентрации на SAA остават под 5 мг/л, а при 10,00% (3/30) те са над 5 мг/л (табл. 10). Минималните стойности достигат 0,4 мг/л, а максималните 9,20 мг/л. Подобни резултати са съобщени от Satoh и колектив<sup>163</sup> и Nunokawa и колектив<sup>139</sup>, според които при здрави контроли на възраст над 18 месеца, SAA достига респективно стойности от порядъка на  $14,93 \pm 9,07$  мкг/мл и  $21,53 \pm 9,81$  мкг/мл. Въз основа на това, за горна референтна граница на показателя в нашето проучване, приехме стойност на показателя 10 мг/л.

Пол	Дескриминативен показател	SAA		Общо
		<5 мг/л	>5 мг/л	
Мъже	Брой	13	2	15
	Относителен дял, %	43,3	6,7	50,0
Жени	Брой	14	1	15
	Относителен дял, %	46,7	3,3	50,0
Общо	Брой	27	3	30
	Относителен дял, %	90,0	10,0	100,0

**Табл. 10. Серумни нива на SAA при участниците в контролната група**

### **3. Промени в серумните нива на SAA при пациенти от подгрупа А:**

При дескриптивен анализ на 71 серумни проби на болни, хоспитализирани в Инфекциозна клиника – Варна, с остри инфекциозни заболявания от вирусен произход, протичащи без усложнения (*подгрупа А*), установихме средна стойност на SAA равна на  $195,97 \pm 217,99$  мг/л. Посочените серумни нива надвишават многократно средните стойности на показателя, регистрирани в контролната група –  $3,08 \pm 1,93$  мг/л. Непараметричните тестове като кростабулация и  $\chi^2$  показаха, че установената разлика е статистически значима, както за цялата група, така и спрямо отделните нозологични единици ( $p=0,0001$ ) (табл. 11). Получените резултати насочват към хипотезата, че серумните концентрации на показателя нарастват сигнификантно дори в случаи на заболявания, протичащи със слаба възпалителна активност, каквито са неусложнените вирусни инфекции. Средните стойности от първата проба при обследваните болни, са сравними с получените в хода на мащабни международни проучвания. Така например Lannerguard и колектив<sup>98</sup>, проучват промените в SAA при 52 болни с различни вирусни заболявания, отчитайки средни стойности равни на 164,5 мг/л. В хода на друго проучване, включващо пациенти с морбили, рубеола, епидемичен паротит, варицела и ентеровирусен менингит е установено, че концентрациите на SAA достигат средно  $79,88 \pm 130,26$  мг/л, надвишавайки близо 47 пъти стойностите, отчетени сред контролната група –  $1,72 \pm 1,11$  мг/л.<sup>130</sup>

Важно доказателство за високата чувствителност на SAA в хода на вирусни инфекции е фактът, че при 84,51% (60/71) от нашите болни, наблюдавахме завишени стойности, средно  $230,00 \pm 218,30$  мг/л. Тези резултати са съвместими, както с

горепосоченото твърдение, така и с някои изводи от мащабни международни проучвания, според които SAA е изключително чувствителен острофазов протеин, повишаващ се дори и при инфекции, протичащи със слаба възпалителна активност, каквито са острите вирусни.<sup>98,130,135</sup>

При 15,49% (11/71) серумни проби, SAA бе в референтни граници, средно  $6,60 \pm 2,54$  мг/л. Този резултат може да бъде обяснен с факта, че посочените пациентите са заболяли 2-3 часа преди пробонабирането. По данни на Niemi и колектив<sup>136</sup>, нивата на SAA нарастват най-рано след 3-6 часа от действието на възпалителния стимул. Следователно, промените в SAA следва да се анализират критично и нормалните стойности не бива да се възприемат като негативен прогностичен маркер за остро възпаление от вирусен произход. Това потвърждава едно от основните правила в медицината, според което ”който добре разпитва, добре диагностицира“.

Подгрупа А n=71, SAA, мг/л	Нозологични единици SAA, мг/л	Контролна група n=30, SAA, мг/л	Ниво на значимост
195,97±217,99	<b>Грип</b> n=18 212,45±260,40	3,08±1,93	0,0001
	<b>Инфекциозна мононуклеоза</b> n=19 252,58±216,76		
	<b>Варицела</b> n=25 141,68±160,63		
	<b>Мозъчен оток</b> n=9 194,31±266,69		

**Табл. 11. Средни стойности на SAA ( $x \pm SD$ ) при пациентите от подгрупа А (вкл. по нозологични единици) и при здрави контроли, първа серумна проба**

От таблица 11 е видно, че показателят е с най-чувствително нарастване при пациентите с инфекциозна мононуклеоза, следвани от болните с грип, невроинфекции

и варицела. Резултатите са съпоставими с установените от Lannerguard и колектив.<sup>94</sup> Въпреки, че обследваните от тях пациенти са значително по-малко по брой в сравнение с включените в нашето проучване (инфекциозна мононуклеоза – 15, грип – 11, варицела – 12), авторският колектив отчита добра реактивност на SAA. Средните стойности достигат съответно  $327,35 \pm 292,50$  мг/л,  $924,20 \pm 594,40$  мг/л и  $299,30 \pm 302,60$  мг/л. За сравнение, други вирусни инфекции като морбили, рубеола и паротит, в хода на които не са регистрирани усложнения, индуцират по-слаба експресия на SAA, вероятно поради по-нисък проинфламаторен потенциал на етиологичния агент. В тези случаи, средните стойности на SAA се движат в границите между 31-141 мг/л<sup>135</sup>, но най-често не надвишават 80,0 мг/л<sup>130</sup>. Следователно *influenza*, *varicella – zoster* и *Epstein – Barr* вирусите водят до най-изразени промени в серумните концентрации на SAA. Вътрегрупови сравнения, извършени чрез корелационен анализ, показаха че разликите в стойностите на SAA между отделните нозологични единици са статистически незначими ( $p > 0,01$ ). Въз основа на това, би могло да се приеме, че показателят не корелира с конкретен етиологичен агент, а единствено насочва към възпаление от вирусен произход.

След хоспитализацията, при всички пациенти от *подгрупа А* е назначено комплексно лечение, според правилата на инфектологията. Емпирична антимикробна терапия е проведена единствено в случаите на невроинфекции, до етапа на етиологично разшифроване, както и като ”чадър“ при употреба на системни кортикостероиди. Прилагани са препаратите амикацин или цефтриаксон в стандартни дозировки, съответно 10-15 мг/кг дневно и 100-150 мг/кг дневно.<sup>11,14</sup> Пациентите с грип са лекувани етиологично чрез перорален прием на оселтамивир в доза 2x75 мг на ден за възрастни или 2x2 мг/кг дневно за деца, като терапевтичният курс бе с продължителност 5 дни. При болните с варицела, проведохме 5 дневен курс с ацикловир, в доза 20 мг/кг дневно, разпределена на 4 приема пер ос при деца или 5x800 мг на ден пер ос за възрастни. Патогенетичното лечение включва флуидотерапия с глюкозо-солеви разтвори, в количество равно на дневните нужди + патологичните загуби, а при пациентите с вирусен менингит/менингоенцефалит, проведохме рехидратиращо – дехидратираща терапия, като освен дексаметазон (4x0,16 мг/кг за 5 дни), бе използван и разтвор на манитол (10-15 мг/кг дневно, в 3-4 приема за 5 дни). Прилагани са още антипиретици като парацетамол, метамизол, локални антисептици и витамини.



При всички болни от *подгрупа А*, средно  $4,73 \pm 1,33$  дни след хоспитализацията, паралелно с овладяването на острата симптоматика и навлизането в периода на ранна реконвалесценция, проведохме повторно изследване на SAA. Статистическата обработка на резултатите показва значително понижаване в серумните концентрации на изследвания показател (от  $195,97 \pm 217,99$  мг/л до  $33,88 \pm 120,51$  мг/л при втора проба), като разликата е статистически значима ( $p=0,0001$ ). На табл. 12 са изложени сравнения между стойностите на показателя при проучените пациенти.

Подгрупа А	Средни стойности, мг/л	Брой пациенти, n	Стнд. откл.	Стнд. грешка	Ниво на значимост, p
SAA – първа проба	195,97	71	217,98	25,87	0,0001
SAA – втора проба	33,88	71	120,51	14,30	

**Табл. 12. Сравнение между средни стойности на SAA ( $x \pm SD$ ) от първа и втора проба при пациентите от подгрупа А**

Въз основа на получените резултати, представени в табл. 12, би могло да се приеме, че SAA е важен за клиничната практика лабораторен маркер, който в условия на динамично изследване, корелира с ефективността от проведеното лечение и отчита началото на оздравителните процеси при пациенти с остри вирусни инфекциозни заболявания, протичащи без усложнения. Това е свързано от една страна с възможност за ранна прогноза по отношение изхода от заболяването, а от друга, с оптимизиране продължителността и вида на провежданата медикаментозна терапия.

При 64,79% (46/71) от обследваните пациенти, резултатите от втората проба достигнаха референтни граници, средно  $4,59 \pm 3,27$  мг/л, съизмерими с концентрациите на SAA при лицата от контролната група. Сходни резултати са съобщени и в хода на други проучвания, според които промените в серумните концентрации на SAA дават отлична информация за стадия, в който се намира заболяването.<sup>130</sup>

При 35,21% (25/71) от нашите болни, показателят остана извън референтни граници. Средните стойности са  $87,81 \pm 190,16$  мг/л, многократно надвишаващи средните стойности в контролната група. Причината вероятно е свързана с факта, че при посочените болни, най-вече онези от тях с диагноза грип, към момента на повторното пробонабиране, не бе регистрирана пълна реконвалесценция и те

съобщаваха за оплаквания като фебрилитет, мускулно-ставни болки, главоболие или кашлица. При един пациент с инфлуенца тип А, наблюдавахме нарастване на SAA във втората серумна проба до стойности 982,70 мг/л, което отново показва, че грипният вирус е мощен индуктор на острофазов отговор. Посочените резултати насочват към хипотезата, че случаите, при които SAA остава завишен или показва тенденция към нарастване, се асоциират с по-дълъг болничен престой, вследствие непълно оздравяване. Тук е налице необходимостта от продължаване на провеждания терапевтичен план, отлагане на дехоспитализацията и ново изследване на показателя след около 4 дни.

На табл. 13 са посочени стойностите на SAA по нозологични единици при пациентите от *подгрупа А*, втора серумна проба. Резултатите отчитат най-чувствителен спад (сравнено с първа проба) в групата на пациентите с невроинфекции, където след средно  $3,79 \pm 1,54$  дни, показателят достига горна референтна граница. При болните с инфекциозна моноклеуза и варицела, SAA е значително по-нисък, в сравнение с изходните нива, но остава над средните стойности, получени сред здравите контроли. Най-слабо е повлияването сред пациентите с грип – SAA е спаднал средно 2,5-3,0 пъти при повторното изследване, което потвърждава горепосоченото твърдение, че *influenza virus* притежава значителен проинфламаторен потенциал и отключва тежък инфекциозен процес, ограничаването на който изисква по-дълъг период от време. На този фон обаче, тенденцията към понижаване на SAA се свързва с ограничавашата се в хода на лечението цитокинова буря – патогенетичен момент, който е в основата на съвременното стартирално, но все още непълно развит оздравителен процес. В тези случаи, би могло да се предположи, че изходът от заболяването би бил благоприятен, без последващо развитие на усложнения. Nakayama и колектив<sup>135</sup>, изследвайки SAA в хода на остри вирусни инфекции включително грип, отчитат сходна динамика в стойностите на показателя и достигат до извода, че SAA е отличен показател за ранна прогноза по отношение благоприятния изход от болестта.

Заболяване	SAA $\pm$ SD, мг/л
Грип	74,22 $\pm$ 223,23
Инфекциозна моноклеуза	24,04 $\pm$ 35,94
Варицела	20,61 $\pm$ 46,10
Мозъчен оток	10,88 $\pm$ 13,55

**Табл. 13. Средни стойности на SAA ( $x \pm SD$ ) при пациентите от подгрупа А, по нозологични единици, втора серумна проба**

За да докажем твърдението, че SAA би могъл да се използва в практиката като маркер за ефективност от проведеното лечение и съответно като индикатор за отчитане периода на ранна реконвалесценция, сравнихме регистрираните стойности от първа и втора проба при пациентите от **подгрупа А**, чрез *paired t-test* (табл. 14). Установихме средна разлика между двете проби  $162,08 \pm 179,46$  мг/л, (при стандартна грешка от 21,30), която в рамките на 95% интервал на доверителност (между 119,60 и 204,56) е с ниво на значимост  $p=0,0001$ , тоест статистически значима. Резултатите потвърждават, че понижаването в серумните нива на SAA при втора проба, корелира с клиничното подобрене на пациента и със съответна терапевтична успеваемост от приложеното лечение. Следователно показателят би бил от голяма полза в клиничната практика. Динамичното му изследване позволява адекватна оценка по отношение етапа от развитието на съответния инфекциозен процес при болните с вирусни инфекциозни заболявания, протичащи без усложнения.

Подгрупа А	Подвойкови разлики					t	df	Ниво на значимост
	Средна разлика	Стнд. откл.	Стнд. грешка	95% интервал на доверие				
				долен	горен			
SAA първа – втора проба	162,08	179,46	21,29	119,60	204,56	7,61	70	0,0001

**Табл. 14. Сравнение между първа и втора проба при пациенти от подгрупа А, чрез *paired t-test***

#### **4. Промени в серумните нива на SAA при пациенти от подгрупа Б:**

Използвайки методите на дескриптивната статистика и вариационния анализ, проучихме дали SAA има отношение към лабораторната диагностика на тежките и усложнени случаи на вирусни инфекциозни заболявания. В **подгрупа Б** обследвахме 31 пациента, отговарящи на посочените в раздела материал и методи включващи критерии (табл. 6). Всички регистрирани компликации са ранни, развили се не по-късно от 48 часа след началото на заболяването. По отношение на проведеното лечение до деня на срещата с главния изследовател, болните са приемали единствено антипиретици. Изключени са всички онези лица, лекувани предварително с противовирусни или антибактериални средства, независимо от продължителността на терапевтичния процес. Отчетени са случаите с всякакъв тип усложнения, включително

смесени вирусно-вирусни инфекции (фиг. 13). Демографските показатели на пациентите от **подгрупа Б**, както и разпределението по диагнози и конкретни усложнения са представени в раздел <резултати и обсъждане>.

На табл. 14 са посочени резултатите от средни стойности, стандартна грешка, минимални и максимални стойности за SAA от първата серумна проба, взета при постъпването на пациентите в клиниката.

Показател / Група	Брой пациенти, n	Мин. ст-ти	Макс. ст-ти	Средни ст-ти	Стнд. откл.	Ниво на значимост, p
Подгрупа Б SAA, мг/л	31	2,10	663,20	158,97	212,68	0,0001
Контролна група SAA, мг/л	30	0,4	9,20	3,08	1,93	

**Табл. 14. Средни стойности на SAA ( $x \pm SD$ ) при пациентите от подгрупа Б и при здрави контроли, първа проба**

От таблицата 14 е видно, че средната стойност на SAA от първа серумна проба при пациенти от **подгрупа Б** възлиза на  $158,98 \pm 212,69$  мг/л. В сравнение с контролната група, където нивата му достигат  $3,08 \pm 1,93$  мг/л, разликата е статистически значима ( $p=0,0001$ ), което потвърждава факта, че SAA има място в лабораторната диагностика на тежките и усложнени случаи на остри вирусни инфекциозни заболявания. Измерените стойности на SAA обаче, се отличават от регистрираните в хода на различни международни проучвания<sup>94,95,96</sup>, според които при болни с вирусни инфекции, протичащи комплицирано, SAA достига по-високи серумни концентрации, вариращи между 1500,00-3000,00 мг/л. Считаме, че причината за подобна разлика в случая е многофакторно обусловена. От една страна, значение има по-малкият брой обследвани лица, съставляващи **подгрупа Б**, а от друга – характерът на регистрираните усложнения, които освен смесени вирусно-вирусни или вирусно-бактериални инфекции, включват и случаи на полиорганно засягане, резултат от директното действие на конкретния етиологичен агент. Това разкрива нови хоризонти за провеждане на бъдещи проучвания по въпроса чрез разширяване на пациентския обхват и детайлно анализиране на получените резултати.

Сред пациентите от *подгрупа Б*, дескриптивният анализ на резултатите от първата серумна проба посочва, че SAA е абнормно завишен при 90,32% (28/31). Средните стойности достигат  $175,40 \pm 213,73$  мг/л, като те са с близо 98 пъти по-високи от регистрираните в контролната група. Наблюдава се значителна реактивност на показателя в тези случаи, което корелира с твърдението, че SAA служи като дискриминативен показател в случаи на тежки инфекции с усложнено протичане.<sup>96,130</sup> При 9,68% (3/31) болни, SAA е в референтни граници, средно  $5,67 \pm 2,58$  мг/л. В хода на детайлно проучване установихме, че посочените лица са заболели в рамките на последните 6-7 часа. Касае се за по един пациент с грип, инфекциозна моноклеоза и варицела, които при постъпването си в Инфекционна клиника – гр. Варна се представят с клинични данни за съответно остър катарален тонзилит, лекостепенна хепатоцитоза (АлАТ=78 МЕ) и нефротичен синдром. Вероятно краткият период на вирусна експозиция, свързан с те първа развиващия се острофазов отговор, е причина за нормалните стойности на SAA в тези случаи.

Според нашите данни, най-често регистрираните компликации сред пациентите от *подгрупа Б* са от страна на дихателната система – 64,52% (20/31). Наблюдавахме остър бронхит при 65,00% (13/31), рентгенографски доказана инфилтративна пневмония при 15,00% (3/31), остър ларингит при 10,00% (2/31) и остър катарален тонзилит, етиологично разшифрован като стрептококов при 10,00% (2/31). Лабораторният анализ на кръвните проби показва висока чувствителност на SAA към такъв тип усложнения. Серумните му концентрации нарастват близо 100 пъти над нормата и достигат средни стойности  $115,34 \pm 185,85$  мг/л. В сравнение с контролната група, разликата е статистически значима, което показва, че показателят има отношение в диагностиката на острите вирусни инфекциозни заболявания, протичащи с усложнения от страна на дихателната система. Подобен извод е отчетен в хода на мащабно проучване, касаещо острите екзацербации на хроничната обструктивна белодробна болест.<sup>35</sup> Авторският колектив посочва, че стойности на SAA минимум 4 пъти над нормата или повече се асоциират с тежък епизод на хроничен обострен бронхит, а в допълнение към клиничния преглед, изследването на този показател селектира отлично онези пациенти, при които съществува значим риск от последващо развитие на остра дихателна недостатъчност.

Според Vollmer A. и колектив,<sup>194</sup> тежките и летално завършващи случаи на *influenza A (H1N1) pdm09* индуцират силен и значим SAA хепатален синтез, като

серумните нива нарастват около 2000 пъти над нормата. Стойности над 300,00 мг/л се асоциират с прогресия на заболяването и висок риск от усложнения. Регистрирана е предимно бактериална пневмония, довела до ранната смърт (около трети ден) на 9 от 10 опитни животни при експерименталното им заразяване с грипен вирус. Що се отнася до представените в настоящото проучване пациенти с диагноза грип, SAA достигна максимални стойности от 655,90 мг/л, при мъж на 44 години, с рентгенографски доказан инфилтрат в дясна белодробна основа. Базирайки се на това считаме, че SAA намира място в клиничната практика като лабораторен маркер, отчитащ тежките случаи на грипна инфекция, протичащи с компликации от страна на дихателната система. Интерес представлява фактът, според който средните серумни нива на показателя сред пациентите от *подгрупа Б*, страдащи от остри вирусни инфекции, усложнени с пневмония достигнаха  $260,6 \pm 281,27$  мг/л, докато при болните с остър бронхит, те бяха една  $59,21 \pm 45,39$  мг/л. Разликата е статистически значима ( $p=0,0001$ ), въз основа на което, би могло да се приеме, че SAA може да служи като лабораторен показател, подпомагащ диференциалната диагноза между остър бронхит и пневмония, при болни от грип и прояви на ”влажна“ кашлица и слuzно-гнойна експекторация.

Литературните данни за преимуществена хепатална секреция на SAA, предполагат високи серумни концентрации на показателя, в случаи на остра чернодробна увреда. Представените от нас данни са в противовес на подобно твърдение. Резултатите от дескриптивния анализ на серумни проби от пациенти с мононуклеозен хепатит, отчитат средни стойности на SAA равни на  $56,26 \pm 39,67$  мг/л. При анализ на международната медицинска периодика, към момента на изготвяне на настоящия дисертационен труд, не открихме проучвания, касаещи динамиката в стойностите на SAA при пациенти с инфекциозна мононуклеоза, протичаща и с чернодробно засягане. Но резултатите публикувани от Lannergard и колектив<sup>94</sup> върху 9 случая на остър хепатит А и 5 случая на остър хепатит В се оказват съизмерими с посочените по-горе, като SAA и тук достига средни концентрации в серума на болните, не надвишаващи 100 мг/л, съответно  $92,8 \pm 66,2$  мг/л и  $71,4 \pm 2,3$  мг/л. Вероятните причини за подобна по-слаба експресия на SAA в хода на чернодробна увреда в сравнение с друг тип компликации при болни с остри вирусни инфекции към момента остават неизяснени. Съществуват хипотези, според които вирулентния потенциал на етиологичния агент е в право пропорционална зависимост с тежестта на възпалителния

процес, развиващ се в чернодробния паренхим.<sup>68,196</sup> Този въпрос подлежи на бъдещи проучвания и изисква задълбочен анализ върху по-голям брой пациенти.

В случаите на бактериален тонзилит, фурункулоза, инфекции на пикочните пътища, както и сред болните с вирусно-вирусни асоциации, установихме сигнификантно по-високи нива на SAA, в сравнение с контролната група, както и в сравнение с неусложнените случаи от подгрупа А ( $p=0,0001$ ). Средните стойности на показателя са равни на  $467,62 \pm 115,48$  мг/л, многократно над горна референтна граница. Високата серумна концентрация тук е резултат от масивния острофазов отговор, който възниква под едновременното влияние на два различни микробни щама, в условия на ко- или суперинфекция. Следователно, стойностите на SAA корелират с тежестта на инфекцията и високите серумни концентрации (над 200 мг/л) налагат насочен клиничен преглед и провеждане на допълнителни лабораторни и/или инструментални изследвания за откриване на усложнения, предимно случаи на смесени инфекции.

При всички обследвани пациенти от *подгрупа Б*, своевременно след диагностициране и хоспитализация, проведохме комплексно лечение с етиологични, патогенетични и симптоматични средства. Назначен бе диетичен режим в зависимост от основното заболяване, както и в съответствие с наличните усложнения. При болните с грип и варицела, освен терапия с оселтамивир/ацикловир в стандартни дозировки и продължителност (виж по-горе), приложихме интравенозно антибактериален препарат – амоксиклав в доза  $3 \times 25$  мг/кг дневно като емпирична терапия, в случаите с клинични или инструментални данни за бронхит, тонзилит, пневмония или уроинфекция. Препарат от групата на цефалоспорините – цефуроксим, в доза 80-100 мг/кг дневно използвахме при пациентите с инфекциозна мононуклеоза, протичаща като ангинозна форма, при която се подозира насложена вторична бактериална инфекция, с вероятна кокова (стрепто- или стафилококова) етиология. Кортикостероиди – метилпреднизолон, в начална дозировка 1 мг/кг дневно и постепенно титриране на дозата за около 4-5 дни, приложени парентерално, назначихме в случаите на инфекциозна мононуклеоза, при които бе наблюдавано силно увеличение на лимфните възли (над 2 см в диаметър) и хипертрофия на тонзилите (“целуващи“ се тонзили), изразен перинодуларен оток с нарушение на дишането и развиващ се инспираторен стридор, поражение на вътрешните органи – предимно черен дроб, независимо от тежестта на хепатоцитолізата, както и при всички останали случаи (с изключение на болните от варицела, където употребата на кортикостероиди е противопоказана), при

които бяха налице токсични прояви – хиперпирексия, отпадналост, безапетитие, синдром на бронхообструкция и ларингит.

При всички болни, през първите 48 часа от болничния престой проведохме още интравенозна флуидотерапия с глюкозо-солеви разтвори, в количество равно на дневните нужди + патологичните загуби. Към общия терапевтичен план, при съответна необходимост добавихме муколитици, инхалации с вентолин или натриев бикарбонат, витамин С, ментолова пудра.

Основно място в лечението на болните с инфекциозна мононуклеоза усложнена с развитие на остър хепатит, заемаха хепатопротективните средства. Използвахме силимарин в доза 5 мг/кг на ден, разделена на 3 приема (максимална дневна доза 3x90 мг), както и адеметионин – дневна доза 2x5 мг/кг, максимално 2x500 мг. В тези случаи, бяха назначени още постелен режим и млечно-въглехидратна диета.

Серумният амилоид А протеин, би могъл да се прилага в клиничната практика като лабораторен маркер, отчитащ ефект от проведеното лечение и сред пациентите с тежко протичащи остри вирусни инфекциозни заболявания, при които се регистрират усложнения от различен характер. За да докажем това твърдение, при всички болни от **подгрупа Б**, средно  $4,73 \pm 1,33$  дни след хоспитализацията, изследвахме повторно серумните нива на SAA. След статистическа обработка на получените резултати, установихме значителен спад в концентрациите му, които намаляват приблизително 9 пъти, в сравнение с първата проба. Получените средни стойности са равни на  $19,43 \pm 37,45$  мг/л, при стандартна грешка 6,73. В сравнение с контролната група, разликата е статистически значима ( $p=0,020$ ).

Сравнения между регистрираните стойности на SAA от първа и втора проба сред пациентите от подгрупа Б, са представени на табл. 15.

Подгрупа Б	Средни стойности, mg/l	Брой пациенти, N	Стнд. откл.	Стнд. грешка	Ниво на значимост, p
SAA – първа проба	158,97	31	212,68	38,19	0,020
SAA – втора проба	19,43	31	37,45	6,72	

**Табл. 15. Сравнение между средна стойност на SAA ( $x \pm SD$ ) от първа и втора проба, сред пациентите от подгрупа Б**



*Paired t-test* бе използван за паралелно сравнение между установените средни серумни концентрации на SAA от първа и втора проба, сред пациентите от подгрупа Б. Целта на подобно изследване, бе да проучим дали разликите в измерванията са статистически значими и съответно да докажем основният извод, според който SAA е лабораторен маркер, който корелира максимално добре с ефективност от проведеното лечение при болни с усложнено протичане на остри вирусни инфекции.

Анализът изчисли разликите между средните стойности на SAA от първа и втора проба и тества дали те се различават от 0, тоест дали има разлика при сравнението или не и дали тази разлика е статистически значима (приемана при  $p \leq 0,05$ ). Използван е 95% интервал на доверителност. Резултатите са представени на табл. 16.

Подгрупа Б	Подвойкови разлики					t	df	Ниво на значимост
	Средна разлика	Стнд. откл.	Стнд. грешка	95% интервал на доверие				
				долен	Горен			
SAA първа – втора проба	139,55	187,98	33,76	70,59	208,50	4,13	30	0,020

**Табл. 16. Разлика в измерванията между стойностите на SAA от първа и втора проба, при пациенти от подгрупа Б, сравнени чрез *paired t-test***

Видно е, че при средна разлика между първа и втора проба на SAA при пациенти с усложнено протичане на грип, инфекциозна моноклеоза и варицела, равна на  $139,55 \pm 187,98$  мг/л, нивото на значимост попада под 0,05, което означава, че в съответствие с 95% интервал на доверителност, установената разлика е статистически значима и потвърждава твърдението, че SAA е лабораторен показател, отразяващ тежест на протичане и ефект от лечение при усложнени остри вирусни инфекциозни заболявания.

Дескриптивният анализ на втората серумна проба, установи, че SAA е в референтни граници при 61,19% (19/31) от обследваните лица. На табл. 17 са

представени резултатите от средните (минимални и максимални) стойности и стандартно отклонение.

Усложнени, втора проба	Средно артм.	Стнд. откл.	Мин. ст-ти	Макс. ст-ти
SAA, mg/l	3,12	1,85	1,70	10,00

**Табл. 17. Средни стойности, стандартно отклонение ( $x \pm SD$ ), минимални и максимални серумни концентрации на SAA сред пациенти от подгрупа Б, при които показателят е в референтни граници**

Видно е, че при повече от 50% от пациентите, на фона на проведеното лечение, показателят спада до нормални стойности, които са съизмерими с нивата му сред лицата от контролната група –  $3,08 \pm 1,93$  мг/л. Клиничният преглед на тези пациенти, осъществен към деня на пробонабирането, отчита начална, но все още непълна реконвалесценция – болните са трайно афебрилни, но съответно с катарални прояви, хепатоцитоза, нестабилна дефекация или дизурични смущения. Отчетеното подобрене в клиничното състояние и нормалните серумни концентрации на SAA (които отразяват стихнал острофазов отговор), ни дадоха основание да преустановим терапевтичния план и да дехоспитализираме пациентите. При катамнестичното проследяване, извършено на 7- и 14-ти ден, липсваха анамнестични данни за каквито и да било отклонения от нормалното здравословно състояние на обследваните лица. Бихме могли да приемем, че бързото спадане в серумните концентрации на SAA, дори и при тежко болни, корелира с ефективност от проведеното лечение, благоприятен изход от заболяването и съответно по-кратки терапевтични курсове и болничен престой. Последните две характеристики, са свързани с понижаване на финансовите разходи за болнично лечение на пациентите, а също така и с оптимизиране продължителността на антибиотичната терапия, с основна цел – профилактика на бактериалната резистентност.

Останалите 38,71% (12/31) серумни проби на пациенти от **подгрупа Б**, при повторното изследване, реагираха с абнормни стойности на SAA, вариращи между 10,7 мг/л и 179,6 мг/л, средно  $45,24 \pm 49,14$  мг/л. Тези резултати надвишават неколкостранно средните стойности в контролната група, но същевременно са близо 3 пъти по-ниски, в сравнение с първа проба. Не бяха отчетени случаи, при които SAA нараства спрямо резултатите от първоначалното изследване. Причината за абнормните концентрации на

SAA в тези случаи е свързана с факта, че към деня на повторното пробонабиране, липсваше значимо подобрение в общото състояние на болните. Те съобщаваха за фебрилитет, безапетитие, кашлица, експекторация. Физикалният преглед установи персистираща белодробна находка в случаите на остър бронхит и пневмония, задържащ се диарийен синдром при пациентите със смесена инфекция – инфекциозна мононуклеоза и ротавирусен ентерит, както и нарастваща хепатоцитоза при болните с мононуклеозен хепатит. Следователно, като най-чувствителен маркер за остро възпаление, SAA служи и за преценка на ефективността от проведеното лечение. Същевременно, корелира максимално добре с необходимостта от продължаване на терапевтичния процес и удължаване на болничния престой в ситуации, при които клиничното подобрение на болния настъпва на по-късен етап. Обратната динамика в стойностите му обаче, насочва към вероятно благоприятен изход от заболяването, вследствие адекватен подбор на терапевтичния план. Въпреки персистиращата клинична симптоматика, в тези случаи не се налага смяна на етиологичното (антибиотичното) лечение, а единствено неговото удължаване, както и повторно изследване на SAA, средно 4 дни по-късно. Периодът на хоспитализация при посочените 12 болни, удължихме с около 5 дни, в сравнение с пациентите, при които SAA бе в референтни граници от втората серумна проба, без промяна в лечението. При дехоспитализацията, всички бяха афебрилни, а по време на контролния преглед след седмица, липсваха както анамнестични оплаквания, така и отклонения в обективния статус.

#### **5. Сравнителен анализ между SAA и други лабораторни маркери за остро възпаление – левкоцитен брой, СУЕ, CRP сред пациенти от подгрупа А и подгрупа Б:**

За решаване на втората от научно-изследователските задачи проведохме сравнителен анализ между SAA при болни с вирусни инфекциозни заболявания и някои от рутинно назначаваните към момента лабораторни маркери за остро възпаление като левкоцити, СУЕ и CRP. За целта, при всички 102 болни (включени в подгрупа А и в подгрупа Б) изследвахме двукратно общ брой на левкоцити, стойност на СУЕ и серумна концентрация на CRP. Получените резултати сравнихме с тези за SAA, а данните обработихме чрез дескриптивни и аналитични методи.

На табл. 18 са посочени резултатите за левкоцити, СУЕ и CRP – първата кръвна проба, взета при хоспитализацията на пациентите, включени в *подгрупа А*.

Подгрупа А, I проба				Ниво на значимост, p
Показател	Левкоцити, x10 <sup>9</sup> /л	СУЕ, мм/ч	CRP, мг/л	0,0001
	8,35±4,55	35,16±24,39	29,71±38,75	
SAA, мг/л	195,97±217,99			

**Табл. 18. Сравнителен анализ между стойностите на SAA и левкоцити, СУЕ, CRP при болни от подгрупа А, първа проба**

От табл. 18 е видно, че средните стойности на показателите левкоцити и СУЕ, съответно  $8,35 \pm 4,55 \times 10^9/\text{л}$  и  $35,17 \pm 24,40$  мм/ч, при пациенти с остри вирусни инфекциозни заболявания, протичащи без усложнение, остават в референтни граници. При сравнение със SAA, чиито серумни концентрации в този случай нарастват близо 20 пъти над референтните ( $195,97 \pm 217,99$  мг/л) и над установените в контролната група ( $3,08 \pm 1,93$  мг/л), разликата е статистически значима ( $p=0,0001$ ). Това потвърждава изводите от някои международни проучвания<sup>48</sup>, според които левкоцитният брой и СУЕ не превъзхождат SAA като маркер за възпаление от вирусен произход. Този тип патология индуцира острофазов отговор, протичащ с по-слаба интензивност, поради което често се наблюдава нормоцитоза, както и липса на динамика в СУЕ, особено в ранните етапи от развитието на болестта. Според Kusher и колектив<sup>91</sup> изследването на SAA в подобни ситуации е от особена полза за клиничната практика, предвид значително по-високата му чувствителност към възпалителни процеси, протичащи с по-ниска инфламаторна активност, каквито са вирусните инфекции.

Резултатите от анализа на първата серумна проба посочват още, че средните концентрации на CRP при пациентите без усложнения достигат  $29,71 \pm 38,75$  мг/л. Показателят е нарастнал близо 5 пъти над горна граница, но същевременно остава около 6 пъти по-нисък от SAA, чиито средни стойности възлизат на  $195,97 \pm 217,99$  мг/л. Това показва, че SAA е значително по-чувствителен острофазов протеин. Серумните му концентрации варират между  $0,80-1041,00$  мг/л, при стойности на CRP между  $0,25-208,19$  мг/л. Разликата е статистически значима ( $p=0,0001$ ) и насочва към твърдението, че комплексният анализ на SAA и CRP при всеки конкретен пациент, корелира с максимална информативност по отношение генезата на възпалителния

процес. Сходни данни са представени от изследователски екип в Япония.<sup>130</sup> Авторите обследват 301 болни с различни вирусни инфекции, при които диференциалната диагноза е затруднена поради завишени стойности на CRP. Доказва се, че нивата на SAA варират между 2-900 мг/л, докато нивата на CRP се движат в границите 2-100 мг/л. Подобен резултат се свързва с извода, че ограниченото нарастване на CRP, в случаи при които SAA е значително завишен, насочва към по-вероятна вирусна инфекция.

Важно е да се отбележи, че при 14,08% (10/71) от пациентите включени в *подгрупа А*, наблюдавахме завишени стойности на SAA, при нормални серумни концентрации на CRP (табл. 19). Подобна динамика, отчита по-високата чувствителност на SAA в диагностиката на вирусните инфекции над CRP, въпреки че установената от нас разлика, в този случай не е статистически значима. От всички изследвани серумни проби, 71,83% (51/71) реагираха с абнормно завишени нива едновременно на SAA и CRP, което корелира с литературните данни, според които CRP би могъл да нарастне дори до 100 мг/л в случаи на грип или други неусложнени вирусни инфекции, затруднявайки значително диференциалната диагноза с някои бактериално-обусловени заболявания.<sup>130,200</sup> В тази ситуация обаче, съотношението SAA/CRP остава сравнително високо, концентрациите на SAA нерядко достигат 900-1000 мг/л, предполагайки с голяма вероятност и то в рамките на първите 24 часа от срещата с пациента, вирусна генеза на заболяването.<sup>61,135</sup>

<b>Подгрупа А</b>	<b>SAA<math>\geq</math>10 мг/л</b>	<b>SAA&lt;10 мг/л</b>
<b>CRP<math>\geq</math>5 мг/л</b>	51 (71,83%)	1 (1,41%)
<b>CRP&lt;5 мг/л</b>	10 (14,08%)	9 (12,68%)

**Табл. 19. Сравнителен анализ между промените в SAA и CRP при пациенти от подгрупа А, първа серумна проба**

Дескриптивният анализ на получените от нас резултати върху серумните проби, които реагираха със завишени концентрации едновременно на SAA и CRP, отчете средни стойности на SAA, сигнификантно по-високи ( $p=0,0001$ ), над средните за CRP, съответно  $262,12\pm 221,28$  мг/л срещу  $40,22\pm 40,81$  мг/л, а съотношението SAA/CRP в този случай е равно на 6,52 (табл. 19). Следователно, изследването на SAA в комбинация с CRP, би могло да се използва в клиничната практика за потвърждаване

на възпаление от вирусен произход, в случаите когато CRP също нараства, затруднявайки диференциално-диагностичния процес.

При втората серумна проба на пациентите от *подгрупа А*, не установихме съществени изменения в нивата на СУЕ и общ брой левкоцити, спрямо регистрираните стойности при първият етап от пробонабирането. Средните им стойности, отново бяха в референтни граници, съответно  $27,13 \pm 18,35$  мм/ч и  $6,80 \pm 2,45 \times 10^9$ /л. Що се отнася до CRP, динамиката в серумните му концентрации следваше тази на SAA, като и двата показателя спаднаха средно 5 пъти в сравнение с първата серумна проба, достигайки средни стойности, съответно  $6,77 \pm 22,67$  мг/л за CRP срещу  $33,89 \pm 120,51$  мг/л за SAA (табл. 20).

Подгрупа А	Мин. ст-ти	Макс. ст-ти	Средни ст-ти	Стнд. откл.
Левкоцити, $\times 10^9$ /л	2,53	13,93	6,79	2,44
СУЕ, мм/ч	2,00	120,00	27,12	18,34
CRP, мг/л	0,04	185,63	6,77	22,67

**Табл. 20. Средни стойности, стандартно отклонение, минимални и максимални стойности на левкоцити, СУЕ и CRP при болни от подгрупа А, втора проба**

При сравнителен анализ на резултатите от втората серумна проба на пациенти от *подгрупа А* установихме, че CRP е в референтни граници при 80,28% (57/71) от изследваните лица. Средните му стойности са  $1,94 \pm 1,93$  мг/л. Същевременно, при 21,13% (15/71) от тях SAA остана завишен, средно  $32,63 \pm 35,13$  мг/л. Всички те, към деня на пробонабирането бяха клинично подобрили, но все още съобщаваха за оплаквания от различно естество, насочващи към непълна реконвалесценция. Този факт, потвърждава по-високата чувствителност и специфичност на SAA над CRP по отношение активността на острофазовия отговор. Винаги, когато SAA е извън референтни граници, следва да се има предвид, че инфекциозния процес все още не е стихнал изцяло. Това изисква удължаване на терапевтичния процес и последващ лабораторен контрол, след минимум 72 часа.

Сравнението между резултатите от първа и втора проба при пациентите от *подгрупа А*, извършено чрез *paired t-test*, показва, че разликите в стойностите са статистически значими единствено за SAA и CRP. Статистически незначими се оказаха

разликите между първа и втора проба за СУЕ и общ брой левкоцити (табл. 21). Следователно, както SAA така и CRP са индикатори за клинично подобрение и положителен ефект от проведеното лечение при пациенти с неусложнено протичащи остри вирусни инфекции, в случаите когато предварително и за двата показателя са регистрирани абнормни стойности. Ранната обратна динамика в серумните концентрации, маркира началото на оздравителните процеси и позволява адекватна прогноза по отношение изходът от заболяването.

Подгрупа А	Подвойкови разлики					t	Df	Ниво на значимост
	Средна разлика	Стнд. откл.	Стнд. грешка	95% интервал на доверие				
				долен	горен			
SAA първа – втора проба	162,08	179,46	21,29	119,60	204,56	7,61	70	0,0001
ESR първа – втора проба	8,04	18,71	2,22	3,61	12,47	3,62	70	0,001
CRP първа – втора проба	22,93	41,16	4,88	13,19	32,68	4,69	70	0,0001
Leuco първа – втора проба	1,55	4,11	0,48	0,58	2,52	3,18	70	0,002

**Табл. 21. Сравнение между първа и втора проба при пациенти от подгрупа А, чрез paired t-test**

Известен факт е, че както SAA, така CRP, левкоцити и СУЕ, нарастват значително в хода на тежки инфекции, особено в случаите, когато етиологичният агент е от бактериален произход.<sup>166,178</sup> Според съвременни автори обаче, SAA е сигнификантно по-чувствителен лабораторен показател, отчитащ както тежестта на протичане, така и ефекта от приложеното лечение, особено при лица с бактериални инфекции на урогениталния тракт, белия дроб или кожата.<sup>37,118,176</sup> Въз основа на тези литературни данни, проучихме какви промени настъпват в стойностите на CRP, левкоцити и СУЕ сред пациенти с усложнено протичащи остри вирусни инфекции. Получените резултати сравнихме с регистрираните за SAA, следвайки основната цел на настоящия дисертационен труд, свързана с въвеждането на SAA в практика на инфекциониста,

като показател, корелиращ в най-висока степен с диагнозата и клиничния ход на острите вирусни инфекциозни заболявания.

При всички пациенти, включени в *подгрупа Б*, изследвахме двукратно CRP, СУЕ и общ брой левкоцити – веднъж към момента на хоспитализацията и средно  $4,73 \pm 1,33$  дни по-късно. Получените резултати обработихме чрез методите на дескриптивния анализ. От табл. 22 е видно, че средните стойности на СУЕ и левкоцити достигат съответно  $38,39 \pm 24,53$  мм/ч и  $9,73 \pm 4,42 \times 10^9$ /л, без да надвишават горната референтна граница. Максималните стойности на СУЕ достигнаха 98,00 мм/ч, при пациент с инфекциозна мононуклеоза, развил кожна фурункулоза в първите 24 часа от началото на заболяването. Абнормно завишени стойности регистрирахме в 45,16% (14/31), а при 54,84% (17/31), СУЕ остана в референтни граници. Подобни промени наблюдавахме и по отношение на левкоцитния брой. Максималните стойности достигнаха  $19,40 \times 10^9$ /л при пациент с варицела и нефротичен синдром, а в 74,19% (23/31) общият брой левкоцити не надвишаваше горна референтна граница. Поради това считаме, че СУЕ и левкоцити, нямат отношение към ранната диагностика на острите вирусни инфекции, протичащи с усложнения от различно естество.

Подгрупа Б, I проба				Ниво на значимост, p
Показател	Левкоцити, $\times 10^9$ /л	СУЕ, мм/ч	CRP, мг/л	0,0001
	$9,73 \pm 4,42$	$38,39 \pm 24,53$	$49,11 \pm 93,25$	
SAA, мг/л	$158,97 \pm 212,68$			

**Табл. 22. Сравнителен анализ между стойностите на SAA и левкоцити, СУЕ, CRP при болни от подгрупа Б, първа проба**

Серумният амилоид А протеин и CRP са острофазови протеини, чиито серумни концентрации нарастват от 100-1000 пъти над изходните, по време на остри инфекциозни заболявания. Както бе посочено по-горе, разграничаването между вирусни и бактериални инфекции, се оказва изключително трудно, в случаите когато за целта се използва само един от посочените показатели. Причината е свързана със значителната вариация в серумните им концентрации, колебаещи се между 500-1000 мг/л за SAA и 40-100 мг/л за CRP. В подобни ситуации, поставянето на ранна и



адекватна диагноза изисква освен комплексен лабораторен анализ (включващ едновременно изследване на ПКК, СУЕ, SAA и CRP), така също и детайлна анамнеза включително епидемиологични данни и пълен клиничен преглед на пациента.

При болните включени в настоящото проучване, съставляващи *подгрупа Б*, измерихме средни стойности на CRP от първа серумна проба  $49,11 \pm 93,26$  мг/л. Въпреки литературните данни, според които показателят има висока чувствителност и специфичност към тежко протичащи инфекции, включително с усложнения от бактериален произход, установихме, че и по тази точка, SAA превъзхожда значително CRP. Двата показателя са сравними, поради сходната им кинетика по време на острофазов отговор, а също така и предвид факта, че в основната си част, те се синтезират от черния дроб. Сравнителният анализ показва, че SAA заема значително по-важно място от CRP в ранната диагностика на тежките и усложнени вирусни инфекции. Към момента на хоспитализацията, SAA е приблизително 16 пъти над нормата, докато CRP е нарастнал едва 7-8 пъти над горна референтна граница, достигайки стойности  $49,11 \pm 93,26$  мг/л. Разликата между двата показателя е статистически значима ( $p=0,0001$ ), отчитайки факта че SAA, в сравнение с останалите показатели за остро възпаление като CRP, СУЕ и левкоцити, има най-съществена роля в ранната диагностика на острите вирусни инфекциозни заболявания, включително и онези от тях, които протичат с усложнения от различно естество.

Абнормно завишени стойности на SAA и CRP от първа серумна проба регистрирахме в 67,74% (21/31) от пациентите, съставляващи *подгрупа Б* (табл. 23). Серумният амилоид А протеин достигна средно  $221,05 \pm 229,18$  мг/л, докато концентрациите на CRP бяха неколkokратно по-ниски – средно  $71,40 \pm 104,32$  мг/л. Разликата в този случай също е статистически значима ( $p=0,0001$ ), а съотношението между SAA/CRP е равно на 3,01 – два пъти по-ниско в сравнение с абсолютната стойност, която отчетохме при тяхното сравнение сред болните, съставляващи *подгрупа А*. Следователно, бихме могли да приемем обратно пропорционална зависимост между съотношението SAA/CRP и тежестта на заболяването – колкото по-ниска е получената стойност, толкова по-тежка е клиничната форма на болестта. Подобен извод е отчетен и от група китайски автори<sup>193</sup>, според които съотношението SAA/CRP е по-ниско сред болни, страдащи от инфекциозни заболявания, при които е изолиран и бактериален агент, в сравнение с пациентите, боледуващи от „чисти“ вирусни инфекции.

Подгрупа Б	SAA $\geq$ 10 мг/л	SAA $<$ 10 мг/л
CRP $\geq$ 5 мг/л	21 (67,75%)	0 (0,00%)
CRP $<$ 5 мг/л	6 (19,35%)	4 (12,90%)

**Табл. 23. Сравнителен анализ между промените в SAA и CRP при пациенти от подгрупа Б, първа серумна проба**

Едва в 12,90% (4/31) от обследваните болни и двата сравнявани показателя бяха в референтни граници. Считаме, че това се дължи на факта, че всички те са заболяли остро едва няколко часа преди хоспитализацията. В този случай, липсва необходимият интервал от време, в който проинфламаторните цитокини повлияват синтетичната функция на черния дроб и медираат последващата експресия на острофазови протеини. Още един път се подчертава основното правило в медицината, според което резултатите от лабораторните изследвания са допълнение към диагностичния процес, който се основава още на данните от анамнезата и клиничния преглед на болния.

Дескриптивният анализ на втората серумна проба сред пациентите от **подгрупа Б**, показва сходна динамика за четирите сравнявани показателя. Паралелно с настъпване на оздравителните процеси, се наблюдава тенденция към спад в серумните им нива. Общият брой левкоцити достига  $8,29 \pm 3,25 \times 10^9/\text{л}$ , СУЕ –  $35,39 \pm 24,44$  мм/ч, а CRP –  $10,28 \pm 26,97$  мг/л (табл. 24).

Подгрупа Б	Мин. ст-ти	Макс. ст-ти	Средни ст-ти	Стнд. откл.
Левкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	4,00	17,28	8,29	3,24
СУЕ, мм/ч	6,00	104,00	35,39	24,44
CRP, мг/л	0,02	112,85	10,28	26,97

**Табл. 24. Средни стойности, стандартно отклонение, минимални и максимални стойности на левкоцити, СУЕ и CRP при болни от подгрупа Б, втора проба**

Възниква въпросът, кой от изследваните показатели е най-чувствителен по отношение на ефекта от проведеното лечение при пациенти с тежко протичащи остри вирусни инфекции? Отговорът ще даде важна информация, свързана с ранната прогноза за изхода от заболяването, както и за ефекта от назначеното лечение.

Случаите, при които обратната динамика в стойностите от контролното изследване на съответния лабораторен маркер е незадоволителна, насочват към непълна реконвалесценция и изискват удължаване на терапевтичния процес, а в някои случаи и промяна в провежданото до момента лечение.

В тази връзка, при всички пациенти от **подгрупа Б**, измерихме разликата между средните стойности на показателите SAA, CRP, левкоцити и СУЕ от първа и втора серумна проба. За да установим дали получената стойност е статистически значима, използвахме *paired t-test*. Резултатите са посочени на табл. 25.

Подгрупа Б	Подвойкови разлики					t	df	Ниво на значимост, p
	Средна разлика	Стнд. откл.	Стнд. грешка	95% интервал на доверие				
				долен	горен			
SAA първа – втора проба	139,55	187,98	33,76	70,59	208,50	4,13	30	0,0001
ESR първа – втора проба	3,00	18,09	3,24	-3,63	9,63	0,92	30	0,363
CRP първа – втора проба	38,83	69,13	12,41	13,47	64,19	3,12	30	0,004
Leuco първа – втора проба	1,44	3,47	0,62	0,16	2,71	2,31	30	0,028

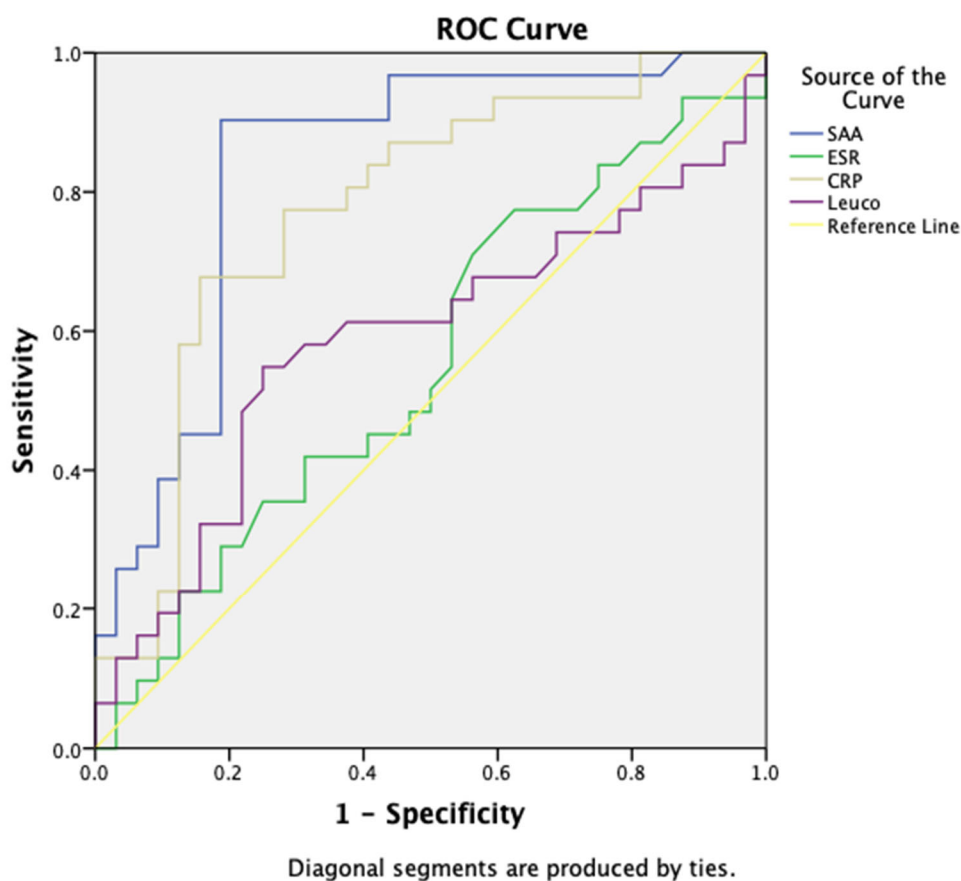
**Табл. 25. Сравнение между първа и втора проба при пациенти от подгрупа Б, чрез *paired t-test***

От табл. 25 е видно, че използвайки *paired t-test* за сравнение между стойностите на показателите от първа и втора серумна проба, най-големи, включително статистически значими средни разлики отчетохме за SAA и CRP. Статистически незначими се оказаха разликите между първа и втора проба при показателите СУЕ и левкоцити, при които отчетохме ниво на значимост, съответно 0,363 и 0,028. Това

показва, че SAA и CRP имат най-важно значение в лабораторната диагностика при пациенти с остри вирусни инфекциозни заболявания, протичащи с усложнения от различно естество. Бързото нормализиране на техните серумни концентрации корелира в най-висока степен с ефективност от провежданото лечение и насочва към извода, че в случаите когато, контролното изследване показва спад в серумните им концентрации, изходът от болестта ще бъде благоприятен. Така демонстрирахме, че SAA би могъл да се включи в задължителния лабораторен минимум при болни, страдащи от различни инфекциозни заболявания, тъй като заедно с CRP, двата показателя корелират в най-висока степен с етиологията на болестта, тежестта на клиничното протичане, ефектът от проведеното лечение и изходът от болестта.

Една от основните задачи, които си поставихме в настоящия дисертационен труд, е свързана с отчитане мястото на SAA като лабораторен маркер, корелиращ с тежест на заболяването и риск от развитие на усложнения. За да определим ролята на точността и специфичността на предвидимостта за развитие и тежест на усложнения сред пациентите, използвахме "ROC" (*Receiver operating characteristic*) графичен анализ (фиг. 15). Стойността на площта под кривата се движи между 0,5-1,0. Покритие на кривата над 0,75 или 75% показва силата на предвидимост от утежняване, основана на показателите SAA, CYE, CRP и левкоцити. За статистически значими бяха приети разликите между групите при  $p \leq 0,05$ .

Резултатите от този анализ показват, че SAA и CRP имат най-голяма и статистически значима предвидимост за развитие на последващи усложнения (над 70%). От табл. 26 е видно, че при стойност на SAA около 10 мг/л, вероятността да се предвиди последващо усложнение е 90% (true positive), при 40% вероятност за грешка (true negative). По-високите серумни концентрации на SAA обаче, се асоциират с по-голяма вероятност за развитие на усложнение. Така, при стойности на показателя около 17 мг/л, съществува вероятност за развитие на последващо усложнение, изчислена на 90% (true positive), а вероятността за грешка в този случай, спада на 22% (true negative). Същевременно, при стойности на CRP около 6,43 мг/л (около и над горна референтна граница), съществува 67% вероятност да се предвиди развитие на последващо усложнение, като грешка в този случай би могла да се допусне едва в 18% от случаите.



**Фиг. 15** „ROC“ графичен анализ за определяне на точността и специфичността на предвидимостта за развитие на тежест и усложнения сред обледваните пациенти

Показател	Cut-off стойности	Чувствителност (Sensitivity – true positive)	Специфичност (Specificity – false positive)	Roc curve площ	Ниво на значимост (p)
<b>SAA</b>	10,30	0,90	0,40	0,85	0,0001
<b>SAA</b>	17,08	0,90	0,22	0,85	0,0001
<b>CRP</b>	6,43	0,67	0,18	0,77	0,0001
<b>ESR</b>	15,30	0,80	0,75	0,55	0,559
<b>Leuco</b>	10,20	0,41	0,21	0,58	0,2370

**Табл. 26.** Зона под кривата за SAA, CRP, ESR и левкоцити и cut – off стойности по отношение предвидимост за развитие на последващи усложнения

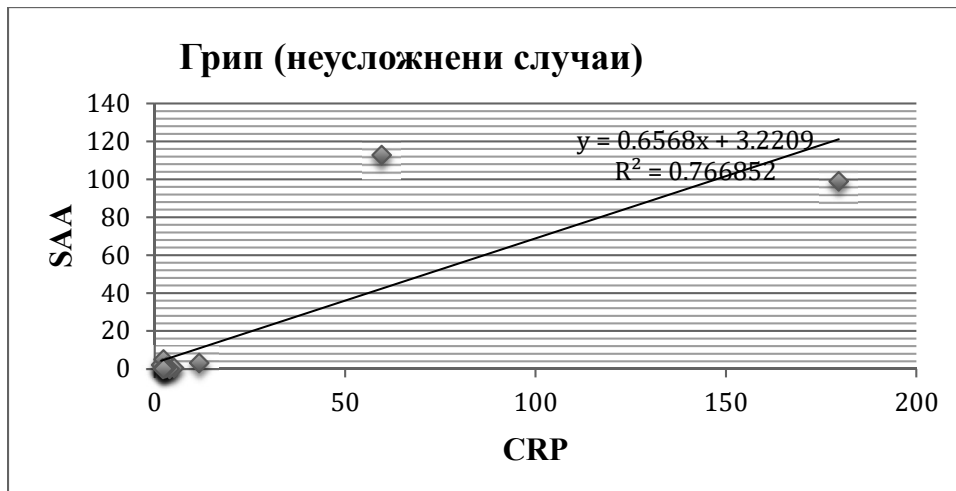
При всички пациенти, включени в настоящото проучване, изследвахме зависимостта между SAA и останалите маркери за остро възпаление – CRP, СУЕ и левкоцити. За целта използвахме методите на корелационния анализ. Оценката на силата на зависимост между променливите се базираше на резултатите от коефициента на *Pierson (r)* при установяване на линейни връзки между тях.

Сред пациентите с грип, установихме силна степен на зависимост на SAA с CRP, СУЕ и левкоцити. Всички корелации са положителни и силни (над 0,5) показващи, че с всяко повишаване на единия показател, настъпва паралелно повишаване/изменение на останалите показатели. Единствената слаба и незначима корелация бе с нивата на левкоцитите ( $r=0,16$ ,  $p=0,59$ ), сред пациентите с неусложнено протичане на заболяването (табл. 27).

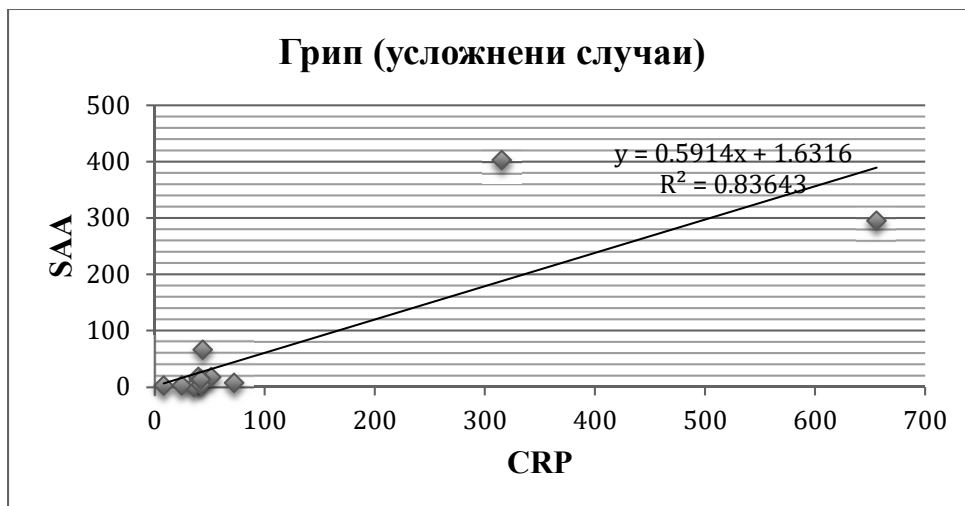
SAA	Грип	Статистически показател	ESR	CRP	Leuco
	неусложнени случаи	Коефициент на Pearson (r)	0,796**	0,766**	0,164
		Ниво на значимост, p	0,001	0,0001	0,592
		n	13	13	13
	усложнени случаи	Коефициент на Pearson (r)	ESR	CRP	Leuco
			0,677*	0,836**	0,775**
		Ниво на значимост, p	0,011	0,0001	0,002
		n	13	13	13

**Табл. 27. Корелационна зависимост между SAA, СУЕ, CRP и левкоцити при пациентите с грип, вкл. тежки, усложнени форми на протичане**

Графично, корелациите са изобразени на фигура 16 и фигура 17.



**Фиг. 16.** Много силна връзка между показателите ( $r(2)=0,76$ ,  $p=0.002$ ) свидетелстваща за силно повлияване на нивата на SAA върху тежестта на грипната инфекция



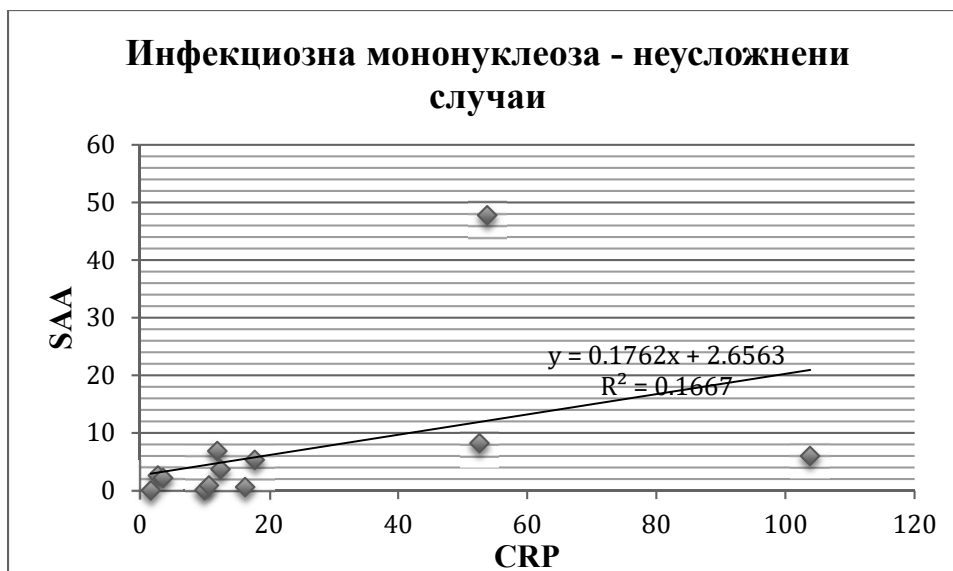
**Фиг. 17.** Силна връзка между показателите ( $r(2)=0,83$ ,  $p=0.001$ ) свидетелстваща за силно повлияване на нивата на SAA върху тежестта на грипната инфекция

Сред болните с инфекциозна мононуклеоза, при които наблюдавахме, типично, средно тежко протичане на заболяването, корелационният анализ не показва значима асоциативна връзка между променливите SAA и CRP, ESR, Leuco (всички корелации са с  $p>0,05$ ). Що се отнася до тежките и усложнени случаи, установихме, че съществува статистически значима връзка между SAA и CRP ( $r=0,53$ ,  $p=0,007$ ). Значима и силна е връзката на показателя и със CUE ( $r=0,68$ ,  $p=0,013$ ) (табл. 28).

SAA	Инфекциозна мононуклеоза	Статистически показател	ESR	CRP	Leuco
	неусложнени случаи		Коефициент на Pearson (r)	0,20	0,17
Ниво на значимост, p			0,52	0,18	0,39
N			12	12	12
усложнени случаи		Коефициент на Pearson (r)	ESR	CRP	Leuco
			0,68*	0,53**	0,10
		Ниво на значимост, p	0,01	0,00	0,75
		n	12	12	12

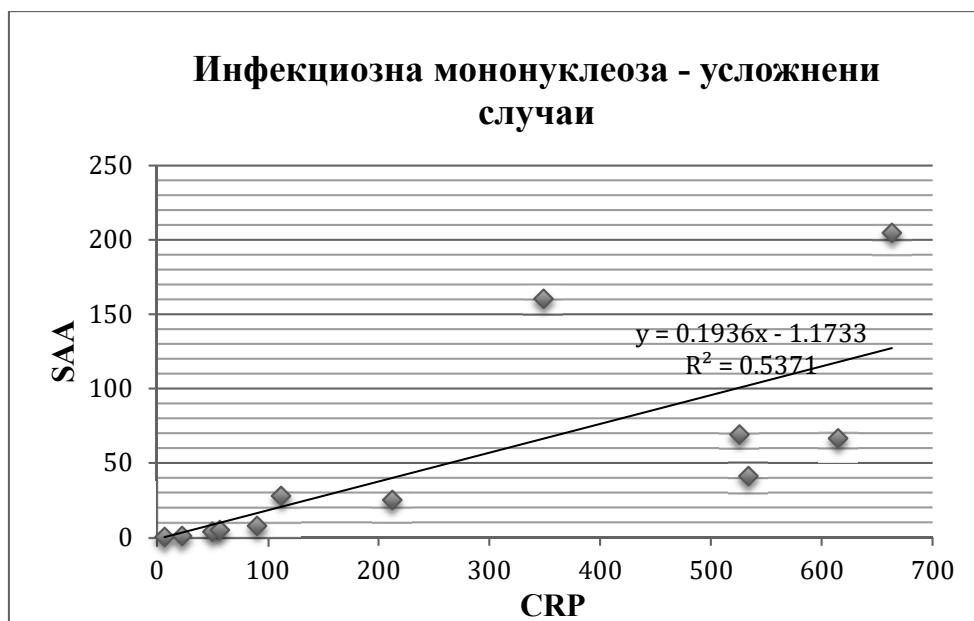
*Табл. 28. Корелационна зависимост между SAA и останалите лабораторни маркери за възпаление, изследвани при пациентите с инфекциозна мононуклеоза, вкл. тежки, усложнени форми на протичане*

Графично, установените в този случай корелации, са изобразени на фигура 18 и на фигура 19.



*Фиг. 18. Слаба и незначима връзка между показателите при пациентите с инфекциозна мононуклеоза, протичаща типично, без усложнения ( $r(2)=0,17$ )*





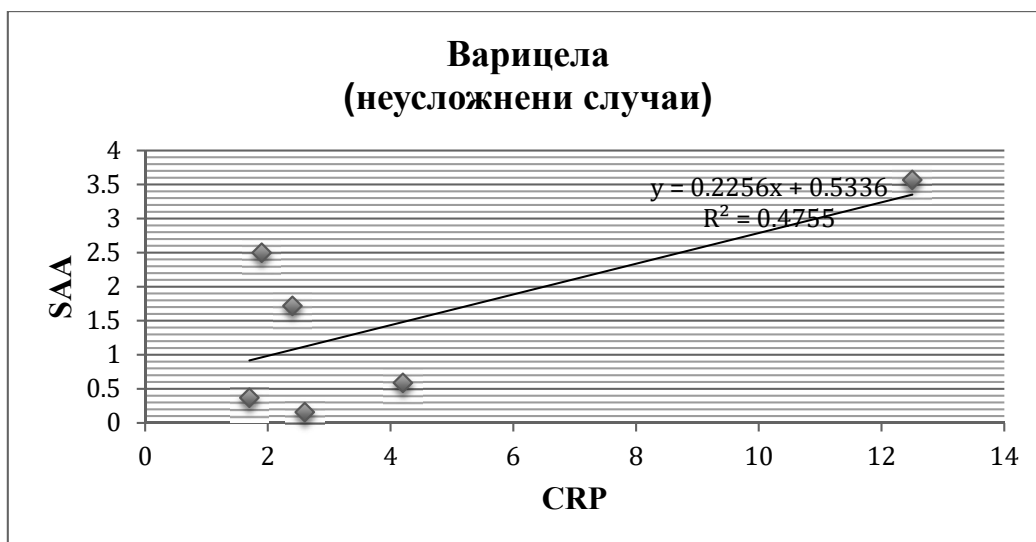
**Фиг. 19. Относително силна връзка между показателите ( $r(2)=0,53$ , при пациентите с инфекциозна мононуклеоза, протичаща с усложнения**

Корелационният анализ при болни от варицела, включително страдащи от тежки, усложнени форми не показва значима асоциативна връзка между променливите SAA с CRP, ESR, Leuco (всички корелации са с  $p>0,05$ ) (табл. 29).

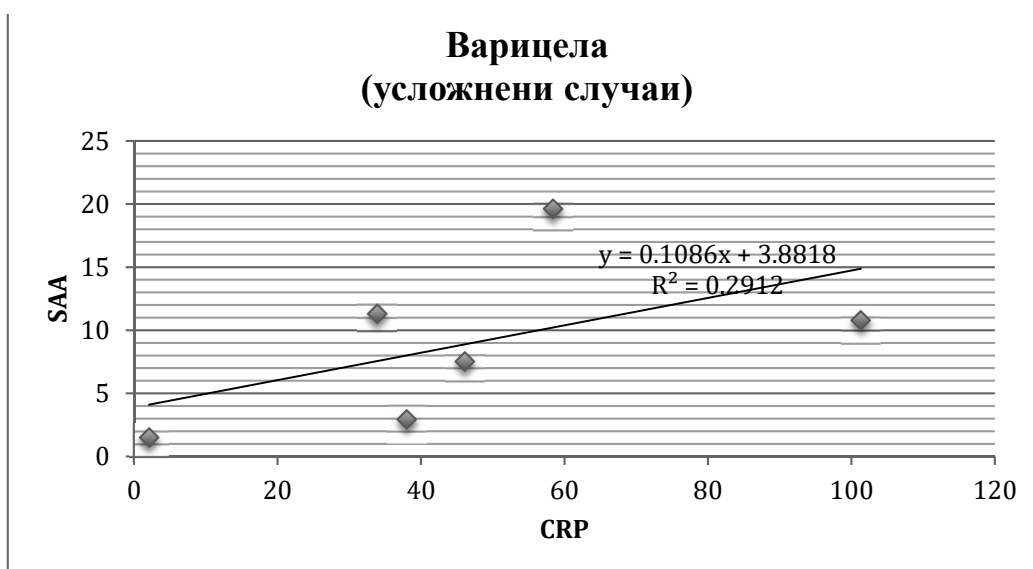
SAA	Варицела	Статистически показател	ESR	CRP	Leuco
	Неусложнени случаи		Коефициент на Pearson (r)	0,20	0,45
Ниво на значимост, p			0,69	0,13	0,79
n			6	6	6
Усложнени случаи		Коефициент на Pearson (r)	ESR	CRP	Leuco
			-0,60	0,28	-0,57
		Ниво на значимост, p	0,20	0,26	0,23
		n	6	6	6

**Табл. 29. Корелационен анализ, отчитащ зависимост между SAA и останалите лабораторни маркери за възпаление, изследвани при пациентите с варицела, вкл. тежки, усложнени форми на протичане**

Фигура 20 и фигура 21 отразяват графично посочените по-горе корелации.



**Фиг. 20.** Графичният корелационен анализ показва линейна степен на асоциация между показателите SAA и CRP ( $r(2)=0,47$ , но тя е статистически незначима  $p=0.13$ )



**Фиг. 21.** Графичният корелационен анализ показва слаба и незначима връзка между показателите SAA и CRP ( $r(2)=0,29$ )

С оглед детайлен анализ върху ролята на SAA и останалите маркери по отношение оценка тежестта на заболяването, проведехме сравнителен анализ между регистрираните серумни концентрации сред пациентите от *подгрупа Б*, в зависимост от конкретното заболяване. В случая, използвахме т.нар. еднофакторна *ANOVA*. Тестът провери дали промяната в показателите, регистрирани сред пациентите с различни нозологични единици е статитически значима (тоест дали промените в показателите се дължат на съответното вирусно заболяване и дали установените промени между

отделните заболявания са сходни или не). За статистически значими, приехме резултатите, при които  $p \leq 0,05$ .

На табл. 30 са представени средните стойности на SAA, CRP, CYE и левкоцити от първа серумна проба, при пациентите от подгрупа Б, в зависимост от конкретната диагноза.

Подгрупа Б, първа проба		n	Средно аритм.	Стнд. откл.	Стнд. грешка	95% интервал на доверие		Мин.	Макс.
						Долен	Горен		
<b>SAA</b>	Грип	13	108,64	181,73	50,40	-1,17	218,46	8,10	655,90
	Инфекциозна мононуклеоза	12	269,68	252,20	72,80	109,44	429,92	6,80	663,20
	Варицела	6	46,33	32,70	13,35	12,31	80,95	2,10	101,30
	<b>Общо</b>	<b>31</b>	<b>158,97</b>	<b>212,68</b>	<b>38,19</b>	<b>80,96</b>	<b>236,99</b>	<b>2,10</b>	<b>663,20</b>
<b>ESR</b>	Грип	13	37,84	20,84	5,77	25,25	50,43	11,00	76,00
	Инфекциозна мононуклеоза	13	38,66	28,97	8,36	20,25	57,07	4,00	98,00
	Варицела	6	39,00	26,84	10,96	10,82	67,17	12,0	89,00
	<b>Общо</b>	<b>31</b>	<b>38,38</b>	<b>24,53</b>	<b>4,40</b>	<b>29,38</b>	<b>47,38</b>	<b>4,00</b>	<b>98,00</b>
<b>CRP</b>	Грип	13	65,88	128,61	35,67	-11,83	143,61	0,17	402,87
	Инфекциозна мононуклеоза	12	51,02	66,61	19,22	8,70	93,34	0,25	204,72
	Варицела	6	8,94	6,58	2,68	2,03	15,85	1,50	19,63
	<b>Общо</b>	<b>31</b>	<b>49,11</b>	<b>93,25</b>	<b>16,74</b>	<b>14,90</b>	<b>83,32</b>	<b>0,17</b>	<b>402,87</b>
<b>Leuco</b>	Грип	13	7,61	3,60	0,99	5,43	9,79	2,61	16,25
	Инфекциозна мононуклеоза	12	11,63	3,95	1,14	9,12	14,15	4,37	19,13
	Варицела	6	10,51	5,56	2,27	4,67	16,35	4,60	19,40
	<b>Общо</b>	<b>31</b>	<b>9,73</b>	<b>4,42</b>	<b>0,79</b>	<b>8,11</b>	<b>11,35</b>	<b>2,61</b>	<b>19,40</b>

**Табл. 30. Сравнителна характеристика между стойностите на SAA, CRP, CYE и левкоцити от първа серумна проба, при пациентите от подгрупа Б, в зависимост от конкретната диагноза**

От табл. 30 е видно, че при пациентите с различни диагнози, съществуват разлики в серумните концентрации на отделните показатели. Така например сред болните с варицела, средните нива на SAA са  $46,63 \pm 32,70$  мг/л, докато в случаите на инфекциозна мононуклеоза, те са значително по-високи, средно  $269,68 \pm 252,20$  мг/л. Към момента, в който е изготвен настоящия дисертационен труд, при насочено търсене, не открихме литературни данни, отразяващи право пропорционална зависимост между конкретен вирусен агент и съответно по-високи или по-ниски серумни концентрации на SAA. Както бе посочено по-горе, подобна корелация се наблюдава единствено по отношение тежестта на основното заболяване. Едно възможно обяснение е, че по-високите стойности на SAA в конкретния пример, при болните с инфекциозна мононуклеоза, са резултат от характера на регистрираните усложнения, причиняващи по-тежко протичане на основното заболяване.

Резултатите от *ANOVA – тестът* показаха, че статистически значими разлики в стойностите на показателите има само по отношение на SAA (табл. 31).

Лабораторен маркер	Welch	Стойност	Ниво на значимост „p“
	Brown-Forsythe		
SAA	Welch	4,89	0,021*
	Brown-Forsythe	4,33	0,027*
ESR	Welch	0,00	0,994
	Brown-Forsythe	0,00	0,995
CRP	Welch	3,43	0,058
	Brown-Forsythe	1,08	0,359
Leuco	Welch	3,44	0,065
	Brown-Forsythe	2,50	0,120

**Табл. 31. Сравнение между SAA и останалите маркери за остро възпаление при пациенти от подгрупа А, чрез ANOVA – тест**

**\*статистически значими разлики**

От табл. 31 е видно, че разликите в стойностите на изследваните лабораторни показатели при пациентите с усложнено протичащи остри вирусни инфекциозни заболявания, са значими единствено за показателя SAA ( $W=4,89$ ,  $p=0,021$ ). По

отношение на останалите показатели, не се откриха статистически значими разлики между пациентите в отделните нозологични групи. Въз основа на това можем да предположим, че SAA има по-съществено значение за клиничната практика като показател за тежко, усложнено протичащи случаи на варицела, инфекциозна мононуклеоза и грип.

В допълнение, проведохме *post hoc* анализ, чрез който осъществихме вътрегрупово сравнение, тоест в групата пациенти, при които наблюдавахме тежко, усложнено протичане на основното заболяване, сравнихме показателите SAA, CRP, СУЕ и левкоцити. Теста ни помогна да установим, в кои случаи (при кои заболявания) се наблюдават съществени различия ( $p \leq 0,05$ ) по отношение на измерените показатели (табл. 32).

Games-Howell							
Показател	Диагноза	Диагноза	Средна разлика	Стнд. грешка	P	95% интервал на доверие	
						Долен	Горен
SAA	Грип	Инфекциозна мононуклеоза	-161,04	88,54	0,189	-385,17	63,09
		Варицела	62,00	52,14	0,479	-74,94	198,96
	Инфекциозна мононуклеоза	Грип	161,04	88,54	0,189	-63,09	385,17
		Варицела	223,05	74,01	0,028*	24,94	421,15
	Варицела	Грип	-62,00	52,14	0,479	-198,96	74,94
		Инфекциозна мононуклеоза	-233,05	74,01	0,028*	-421,15	-24,94
ESR	Грип	Инфекциозна мононуклеоза	-0,82	10,16	0,996	-26,55	24,91
		Варицела	-1,15	12,39	0,995	-36,64	34,33
	Инфекциозна мононуклеоза	Грип	0,82	10,16	0,996	-24,91	26,55
		Варицела	-0,33	13,78	1,000	-37,64	36,98
	Варицела	Грип	1,15	12,39	0,995	-34,33	36,64
		Инфекциозна мононуклеоза	0,33	13,78	1,000	-36,98	37,64

<b>CRP</b>	Грип	Инфекциозна мононуклеоза	14,86	40,52	0,929	-88,41	118,13
		Варицела	56,94	35,77	0,286	-38,35	152,23
	Инфекциозна мононуклеоза	Грип	-14,86	40,52	0,929	-118,13	88,41
		Варицела	42,08	19,41	0,120	-10,07	94,23
	Варицела	Грип	-56,94	35,77	0,286	-152,23	38,35
		Инфекциозна мононуклеоза	-42,08	19,41	0,120	-94,23	10,07
<b>Leuco</b>	Грип	Инфекциозна мононуклеоза	-4,02	1,51	0,037*	-7,82	-0,21
		Варицела	-2,90	2,48	0,506	-10,20	4,40
	Инфекциозна мононуклеоза	Грип	4,02	1,51	0,037*	0,21	7,82
		Варицела	1,12	2,54	0,900	-6,22	8,46
	Варицела	Грип	2,90	2,48	0,506	-4,40	10,20
		Инфекциозна мононуклеоза	-1,12	2,54	0,900	-8,46	6,22

**Табл. 32. Сравнения между диагнозите по лабораторни показатели**  
\*статистически значими разлики

От таблицата на *Post hoc* анализа е видно, че разлики се откриват единствено по отношение на показателя SAA и то само между диагнозите инфекциозна мононуклеоза и варицела. Средната разлика между стойностите на SAA сред пациентите с инфекциозна мононуклеоза и варицела бе 223 единици и статистически значима,  $p=0,028$ . Статистически значими разлики открихме и за левкоцитите, сред пациентите с грип и инфекциозна мононуклеоза (средна разлика – 4,02,  $p=0,037$ ). Следователно, SAA е лабораторен маркер, който в сравнение с останалите рутинно прилагани в практиката показатели (СУЕ, CRP и левкоцити) заема най-важно място в диагностиката на вирусните инфекциозни заболявания, включително онези от тях, протичащи тежко, с различни по характер усложнения. Що се отнася до конкретна нозологична единица, ползите от изследването на SAA биха били най-големи в случаите на тежко протичаща инфекциозна мононуклеоза и варицела.

## VII. Заключение

Клинико-лабораторните изследвания заемат основно място в диагностичния процес при пациенти, страдащи от инфекциозни заболявания. Те позволяват адекватна преценка функционалното състояние на редица органи и системи, откриват настъпили нарушения в някои физиологични механизми на хомеостазата, кръвосъсирването и други, но най-вече имат отношение при обсъждане на диференциално-диагностичните възможности. Бактериалните инфекции, поради освобождаване в кръвообращението на ендотоксини и други биологично активни вещества с висока проинфламаторна активност, отключват интензивен острофазов отговор. Той би могъл да се обективизира чрез промените, настъпващи в броя и съотношението на левкоцитите (най-често левкоцитоза с неутрофилия и олевяване), в стойностите на СУЕ, но най-често в практиката се изследва CRP.

Различни проучвания сочат, че вирусните инфекции предизвикват протичането на по-слаб по интензивност острофазов отговор<sup>123,165</sup>, в хода на който CRP и СУЕ най-често остават в референтни граници. Поради това, като изключим възможните левкопения с лимфо-моноцитоза, липсват други лабораторни маркери, изследването на които, категорично да насочва диагностичното мислене към инфекции с вирусна етиология. В някои случаи обаче, главно при по-тежко протичащи остри вирусни заболявания, възможно е да бъдат регистрирани и завишени стойности на СУЕ и CRP. Тогава се създават условия за хипердиагностика на бактериални инфекции, което води след себе си до провеждането на излишни и неоправдани антибиотични курсове, потенциращи развитието, на по-късен етап на бактериална резистентност. Така например Mangiarotti и колектив<sup>116</sup> посочват, че при пациенти с ротавирусен ентерит, CRP нерядко достига 17 мг/л. Сходни нива (CRP – 19 мг/л) са измерени и в хода на аденовирусни инфекции<sup>135</sup>, а при болни с неусложнено протичане на грип, CRP често нараства до 41 мг/л<sup>107</sup>. Whicher и колектив<sup>198</sup> доказват, че дори и в случаи на леки инфекциозни заболявания с вирусна етиология, като обикновената настинка, серумните концентрации на CRP достигат 35 мг/л.

Поради това, днес се появява необходимостта от въвеждане в практиката на лабораторен показател, корелиращ с възпаление от вирусен произход. Въз основа на литературните данни от научната периодика, както и според резултатите, посочени в предните раздели на настоящия дисертационен труд, SAA се оказва острофазов

протеин с висока чувствителност и специфичност по отношение на остър възпалителен процес с вирусна етиология.

Серумният амилоид А протеин представлява плазмен белтък, функциониращ като аполипопротеин на високоплътностните липопротеини, чиято концентрация в серума нараства приблизително 1000 пъти, в отговор на възпалителен стимул.<sup>48,83,132</sup> Той проявява значими проинфламаторни и антиинфламаторни качества, обективизирани в хода на редица международни проучвания.<sup>54,75,94,95,96</sup> Съвременни автори отчитат факта, че той е особено полезен в лабораторната диагностика на вирусните инфекции, а също и в провеждането на съответна диференциална диагноза между вирусни и бактериални инфекциозни заболявания.<sup>130,136,190,200</sup> За територията на България, до настоящия момент SAA не е изследван при пациенти с инфекциозни заболявания. Резултатите от настоящото проучване предоставят данни, според които показателят нараства сигнификатно в хода на едни от най-честите остри вирусни инфекции, срещащи се в практиката на инфекциониста, а именно варицела, инфекциозна мононуклеоза, грип и вирусни менингити и менингоенцефалити. Наред с това, динамиката в стойностите му корелира с давност на оплакванията, тежест на заболяването и налични усложнения. Установи се още, че ефективните терапевтични мероприятия водят до бърза обратна динамика в стойностите му, като за период от 3-4 дни (при липса на усложнения) SAA достига референтни граници. Поради това, считаме, че с успех той би могъл да се прилага в мониторирането на ефекта от приложеното лечение. Бързото нормализиране в концентрациите му се свързва и с липса на трайни увреди за болния и съответно със своевременна и адекватна прогноза за изхода от болестта. Серумният амилоид А протеин превъзхожда всички останали острофазови протеини и маркери за остро възпаление, прилагани рутинно към момента в клиничната практика. Следователно, включването му като част от задължителния лабораторен минимум при пациенти с остри инфекциозни заболявания би било от особена полза, както за пациента, така и за лекуващия лекар.



## VIII. Изводи

При обследваните от нас пациенти с остри вирусни инфекциозни заболявания установихме следното:

1. SAA нараства сигнификантно в случаи на грип, инфекциозна мононуклеоза, варицела и вирусни менингити/менингоенцефалити.
2. SAA корелира с тежестта на вирусната инфекция.
3. Изследването на SAA в динамика, в хода на заболяването (през интервал от 4 дни) в острия период и ранната реконвалесценция позволява своевременна и адекватна оценка на клиничния ход на болестта.
  - 3.1.Тенденцията към спад в нивата на SAA корелира с положителен ефект от приложеното лечение и благоприятен изход от заболяването.
  - 3.2.Тенденцията към нарастване в нивата на SAA корелира с терапевтичен неуспех, затегнат ход на основното заболяване или развитие на усложнения от различно естество.
4. Изследването на SAA в комплекс с останалите рутинно назначавани лабораторни маркери за остро възпаление – СУЕ, CRP и общ брой левкоцити корелира с максимална информативност по отношение на диференциация между вирусни и бактериални инфекции.
5. В сравнение със СУЕ, CRP и общ брой левкоцити, SAA е значително по-чувствителен лабораторен показател, насочващ към активен възпалителен процес и се отличава с най-голяма и статистически значима предвидимост по отношение последващо развитие на усложнения от различно естество.
6. Съотношението SAA/CRP корелира с тежестта на основното заболяване – колкото по-ниска е регистрираната стойност (cut-off value = 3,01), толкова по-тежка е клиничната форма на болестта.
7. Регистрирани са стойности на SAA, съизмерими с установените в хода на различни мащабни интернационални проучвания.

# **IX. Приноси на дисертационния труд**

## **ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР**

1. За първи път в България е проведено клинично проучване върху промените, които настъпват в серумните концентрации на SAA при пациенти, страдащи от остри инфекциозни заболявания с вирусна етиология.
2. За първи път в България са изведени положителните страни от изследването на SAA при пациенти с остри вирусни инфекциозни заболявания.
3. За първи път в България е проведен сравнителен анализ между SAA и рутинно изследваните маркери за остро възпаление – СУЕ, левкоцити и CRP при пациенти с остри вирусни инфекциозни заболявания
4. За целите на проучването е адаптиран съвременен аналитичен метод за изследване на SAA в минимално количество серум, който може да бъде използван при включването на показателя като част от лабораторния минимум сред пациенти с остри инфекциозни заболявания;
5. Доказана е необходимостта от включване на SAA като част от задължителния лабораторен минимум при болни с остри инфекциозни заболявания;

## **ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН И НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР**

1. Проведен е актуален анализ върху специализираната медицинска литература относно мястото на SAA в клинично-лабораторната диагностика при болни с остри инфекциозно заболявания с вирусна етиология.
2. Установено е сходство между получените в хода на настоящото проучване резултати относно клиничната стойност на SAA и данните от медицинската периодика.
3. Потвърден е фактът, че в сравнение с CRP, СУЕ и левкоцити, SAA е сигнификатно по-добър лабораторен показател, отчитащ тежест на инфекциозния процес, ефект от приложеното лечение и изход от болестта.

# **Х. Публикации, доклади и съобщения ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

## **ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ**

1. **Тодоров И**, Господинова М, Серумен амилоид А протеин при остри инфекциозни заболявания - Детски и инфекциозни болести, 10, 2018, №1, 25-36.
2. **Todorov Piyan et al.** Prognostic Value of Serum Amyloid A Protein Compared with C-Reactive protein in Patients with Influenza. Scripta Scientifica Medica, [S.l.], v. 50, n. 1, mar. 2018, 15-19. ISSN 1314-6408.
3. **TODOROV I**, Bocheva Y, Gospodinova M, Popcheva G, Yordanov Y, Changes in the sera levels of amyloid A protein in the course of influenza, chickenpox and infectious mononucleosis. Scripta Scientifica Medica, [S.l.], v. 51, p. 32-35, nov. 2019. ISSN 1314-6408.

## **НАУЧНИ ДОКЛАДИ И СЪОБЩЕНИЯ**

1. **Тодоров И**, Господинова М, Бочева Я, Попчева Г, Изследване на серумен амилоид А протеин при болни с инфекциозна мононуклеоза – постер, XII Годишна национална конференция по инфекциозни болести, 11-13.10.2018г., х-л Сол Несебър Бей, Несебър, България.
2. **Todorov I.**, Bocheva Y., Popcheva G., Gospodinova M., EVALUATION OF BOTH SERUM AMYLOID A PROTEIN AND C - REACTIVE PROTEIN IN HOSPITALIZED PATIENTS WITH INFLUENZA, IFCC-EFLM EuroMedLab Congress, 11-15 june, 2017, Athens, Greece.
3. **I. Todorov**, Y.Bocheva, M.Gospodinova, G.Popcheva, Serum amyloid A protein as a diagnostic marker for viral infections, W238, 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine EuromedLab, 19-23 May 2019, Barcelona.



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА

**ДОКТОРАНТСКО УЧИЛИЩЕ**



## ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

ПО ЧЛ. 27, АЛ. 2 ОТ ППЗРАСРБ

Долуподписаният Илиян Тодоров Тодоров  
*/име, презиме, фамилия/*

ЕГН 8710192220, с постоянен адрес: гр. Габрово, бул. Хемус №49, ет. 1,  
ап. 3

В качеството ми на участник в процедура за придобиване на

*ОНС „Доктор“  
/ОНС „Доктор“/НС “Доктор на науките“/*

по специалност „инфекциозни болести“,  
Катедра/ УС „Инфекциозни болести, паразитология и  
дерматовенерология/Инфекциозни болести и паразитология“, Факултет  
„медицина“ в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ -  
Варна,

Декларирам, че представения от мен дисертационен труд на тема:  
„Промени в серумния амилоид А протеин при някои инфекциозни  
заболявания с вирусна етиология” е оригинална научно-приложна  
разработка и не е част от колективен труд.

Дата: 25.01.2020г.  
гр. Варна

Декларатор:  
д-р Илиян Тодоров

## *Използвана литература*

1. Аврамов Д, Гочева Н, Възпалителни биомаркери – роля в развитието на атеросклерозата, Наука Кардиология, 5, 2007, 203-214.
2. Бончева М, CRP – маркер на възпалението, София, сп. Мединфо, 7, 2006.
3. Велев Г, Патология, Обща патология, Възпаление, 1999, 191-220.
4. Генев Г, Попова М, Клинична стойност на съвременните лабораторни изследвания в инфектологията, Пловдив, 2001.
5. Господинова М, Тодоров И, Близнакова Д, Минало, настояще и бъдеще на инфекциозните болести
6. Гочева Н, Метаболитен синдром, възпаление (С-реактивен протеин) и сърдечно-съдов риск, Българска кардиология, том XV, 4, 2009, 5-11.
7. Григорян А, Костов К, Димитрова А, Ролята на матриксните металопротеинази в процеса на костното ремоделиране при естрогенен дефицит, Science and Technologies, 2014, IV, 1, 171-175.
8. Дикова З, Иванов Я, Фенотипи при ХОББ, сп. InSpigo, 3(23), 2013, 17-21.
9. Дончева Н, Няголов Ю, Липидни, хемостазни и възпалителни маркери за атеротромбозен риск, Медицински преглед, 45, 2, 2009, 5-16.
10. Евтимов Н, Системен възпалителен отговор при лапароскопска и и класическа радикална простатектомия при карцином на простатната жлеза. Хирургично и функционално сравнение. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор”, МУ – Варна, 2012.
11. Йочев С, Попиванова Н, Въртигова М, Инфекциозни болести, Учебник за студенти по медицина, Пловдив, 2007.
12. Налбански А, Кюркчиев Д, Използването на някои биохимични маркери при диагностиката на гениталната ендометриоза, Акушерство и гинекология, 4, 2008.
13. Николова М, Диагностична стойност на някои лабораторни показатели при пациенти със системен lupus erythematosus и лупусен нефрит, Медицински преглед, 39, 2003, 2, 23-33.
14. Радев М, Йочев С, Диков И, Кънева Ж, Инфекциозни болести, Учебник за студенти по медицина, Увод, София, 1993, 4-7.
15. Траянов И, Ендотелна функция и възпалителни процеси при коронарна болест, сп. КардиоD, 2, 2006, 44-45

16. Ходжев В, ХОББ и астма – поглед отвъд белите дробове, сп. InSpiro, 1(9), 2010, 12-16.
17. Цветкова, Т, Клиниколабораторни резултати, Ръководство за медици, част 1, 2004, 10. Клиниколабораторна оценка на серумните белтъци, Индивидуални белтъци, 196-197.
18. Шишков В, Хронична обструктивна белодробна болест – различните лица, сп. Медикарт, 5, 2011, 4-8.
19. Aggett J, The Effect of Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD) Proteins on the Secretion of Cytokines from Macrophages, The Plymouth Student Scientist, 2008, 1, (1), 312-330.
20. Aitken, MR, Stefanovski, D, Southwood, LL. Serum amyloid A concentration in postoperative colic horses and its association with postoperative complications. *Veterinary Surgery*. 2019; 48: 143– 151.
21. Anderberg R, Meek R, Hudkins K, Cooney S, Alpers C, Leboeuf R, Tuttle K, Serum amyloid A and inflammation, in diabetic kidney disease and podocytes, *Laboratory Investigation*, 2015, 95, 250-262.
22. Andersen SA, Petersen HH, Ersbøll AK, Falk-Rønne J, Jensen AL, Jacobsen S, EQUINE SERUM AMYLOID A RESPONSE FOLLOWING VACCINATION AGAINST INFLUENZA AND TETANUS, 5th International Colloquium on Animal Acute Phase Proteins – Dublin – March 2005.
23. Arnon S, Litmanovitz I, Regev R, Bauer S, Lis M, Sha R. Serum amyloid a protein is a useful inflammatory marker during late-onset sepsis. *Biol Neonate* 2005; 87:105–110.
24. Arnon S, Litmanovitz I, Regev RH, Bauer S, Shainkin-Kestenbaum R, Dolfin T. Serum amyloid A: an early and accurate marker of neonatal early-onset sepsis. *J Perinatol* 2007; 5: 297–302.
25. Artl A, Marsche G, Lestavel S, Sattler W, Malle E, Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, March, 2000, 20: 763-772.
26. Azurmendi L, Degos V, Tiberti N et al, Measuring serum amyloid A for infection prediction in aneurismal subarachnoid hemorrhage, *J. Proteome Res*, 2015, 14(9), 3948-3956.
27. Babior M, Matzner Y, The familial Mediterranean fever gene – cloned at last, *N Engl J Med*, 1997, 337: 1548-49.

28. Badaloto W, Wang J, Murphy W et al, Serum Amyloid A Is a Chemoattractant: Induction Migration, Adhesion, and Tissue Infiltration of Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes, *The Journal of Experimental Medicine*, 1994, 180, 203-209.
29. Baranova, I.N., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Kurlander, R., Chen, Z., Fu, D., Arias, I.M., Csako, G., Patterson, A.P. and Eggerman, T.L. 2010. CD36 is a novel serum amyloid A (SAA) receptor mediating SAA binding and SAA-induced signaling in human and rodent cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11):8492-8506.
30. Bargagli E, Magi B, Olivieri C, Bianchi N, Landi C, Rottoli P, Analysis of serum amyloid A in sarcoidosis patient, *Respiratory medicine*, 2011, 105, 775-780.
31. Batlivala SP. Focus on diagnosis: the erythrocyte sedimentation rate and the C-reactive protein test. *Pediatr Rev.* 2009;30(2):72-74.
32. Batrel A, et al. SAA and CRP in Febrile Neutropenia, *J Microbiol Infect Dis*, Vol 4, No 4, December 2014.
33. Bjorkman L, The role of serum amyloid A in inflammatory disease – proinflammatory mediator or inert biomarker?, Sweden, 2010.
34. Bjorkman L, Raynes J, Shah C, Karlsson A, Dahlgren C, Bylund J, The proinflammatory activity of recombinant serum amyloid A is not shared by the endogenous protein in the circulation, *Arthritis and Rheumatism*, 62, 6, June 2006, 1660-1665.
35. Bozinovski S et al, Serum Amyloid A is a Biomarker of Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177, 2008, 269-78.
36. Casl M, Bulatovic G, Orlic P, Matavinovic M, Serum amyloid A protein monitoring for early prediction of kidney allograft rejection, *Nephron*, 1995, 70: 112-113.
37. Casl MT, Sabljari-Matovinović M, Kovacević S, Pocanić D, Preden-Kereković V, Jagarinec N, Clinical relevance of serum amyloid A protein monitoring in urinary tract infections, *Ann Clin Biochem.* 1993 May;30 ( Pt 3):272-7.
38. Cetin G, Ganiyusufoglu E, Solmaz D et al, The rate and significance of type1/type 2 serum amyloid a protein gene polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis and amyloidosis, *Amyloid*, 2015, 22(3):207-208.
39. Cetinkaya M et al, Comparison of serum amyloid A concentrations with those of C-reactive protein and procalcitonin in diagnosis and follow-up of neonatal sepsis in premature infants, *Journal of Perinatology* (2009) 29, 225–231.

40. Chambers R, Hutton C, Dieppe P, Whicher J, Comparative study of C reactive protein and serum amyloid A protein in experimental inflammation, *Annals of the Rheumatic Diseases* 1991; 50: 677-679.
41. Chaplin D, Overview of the immune response, *J Allergy Clin Immunology*, 2010, 125, 2, S3-23.
42. Chen E, Song Z, Willet M, Serum amyloid A regulates granulomatous inflammation in sarcoidosis through Toll-like receptor – 2, *Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010, 181(4):360-373.
43. Christenson K, Bjorkman L, Ahlin S, Olsson M, Sjöholm K, Karlsson A, Bylund J, Endogenous acute phase serum amyloid A lacks pro-inflammatory activity, contrasting the two recombinant variants that activate human neutrophils through different receptors, *Frontiers in Immunology*, 2013, 4, 92, 1-11.
44. Chung TF1, Sipe JD, McKee A, Fine RE, Schreiber BM, Liang JS, Johnson RJ, Serum amyloid A in Alzheimer's disease brain is predominantly localized to myelin sheaths and axonal membrane, *Amyloid*. 2000 Jun;7(2):105-10.
45. Cicarelli D, Vieira J, Bensenor P, Comparison of C-reactive protein and serum amyloid A protein in septic shock patients, *Mediators of Inflammation*, 2008, 5 pg.
46. Cohen M, Shaw G, McMichael A, Haynes B, Acute HIV-1 infection, *N Engl J Med*, 2011, 364:1943-54.
47. Colombet I, Pouchot J, Kronz V, et al. Agreement between erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in hospital practice. *Am J Med*. 2010;123(9):863.e7-13.
48. Cray C, Zaias J, Altman N, Acute phase response in animals: a review, *Comparative medicine*, 2009, 59, 6, 517-526.
49. Cywinska A, Witkowski L, Szarska E et al, Serum amyloid A (SAA) concentration after training sessions in Arabian race and endurance horses, *BMC Veterinary Research*, 2013, 9:91.
50. Deetman P, Bakker S, Dullaart R, High sensitive C-reactive protein and serum amyloid A are inversely related to serum bilirubin: effect-modification by metabolic syndrome, *Cardiovascular Diabetology*, 2013, 12:166.
51. Delves P, Roitt I, The immune system, *N Engl J Med*, 2000, 343(1): 37-49.
52. d'Eril G, Anesi A, Maggiore M, Leoni V, Biological variation of serum amyloid A in healthy subjects, *Clinical Chemistry* 47, 8, 2001, 1498-1499.
53. Dember L, Hawkins P, Hazenberg B et al, Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis, *N Engl J of Med*, 2007, 356: 2349-60.



54. Derebe M, Zlatkov C, Gattu S, Ruhn K, Vaishnava Sh, Diehl G, MacMillan J, Williams N, Hooper L, Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection, *eLife* 2014, 3: e03206, DOI: 10.7554/eLife.03206.
55. dos Anjos, B. & Grotto, H. (2010). Evaluation of C-reactive protein and serum amyloid A in the detection of inflammatory and infectious diseases in children. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(4), pp. 493-499.
56. Eastham, R. D (1954). "The Erythrocyte Sedimentation Rate and the Plasma Viscosity". *Journal of Clinical Pathology*. 7 (2): 164–167.
57. Eckhardt E, Witta J, Zhong J, Arsenescu R, Arsenescu V, Wang Y, Ghoshal S, Beer M, Beer F, Villiers W, Intestinal epithelial serum amyloid A modulates bacterial growth in vitro and pro-inflammatory responses in mouse experimental colitis, *BMC Gastroenterology* 2010, 10:133,
58. Eklund KK, Niemi K, Kovanen PT, Immune functions of serum amyloid A, *Crit. Rev Immunol*, 2012, 32(4):335-48.
59. Elimova E, Kisilevsky R, Ancsin J, Heparan sulfate promotes the aggregation of HDL-associated serum amyloid A: evidence for a proamyloidogenic histidine molecular switch, *The FASEB Journal*, 2009, 23, 3436-3448.
60. Esmat S, El-Serif H, Anwar S et al, Serum amyloid A protein level, and its significance in systemic lupus erythematosus patients, *Egyptean Dermatology Online Journal*, 2005, 1, 2:2.
61. Falsey A, Walsh E, Francis C, Looney R, Kolassa J, Hall W, Abraham J, Response of C-Reactive Protein and Serum Amyloid A to Influenza A Infection in Older Adults, *The Journal of Infectious Diseases* 2001;183:995–9.
62. Fathi E, Farahzadi R, Survey on relationship between acute phase proteins (serum amyloid A, milk amyloid A and serum haptoglobin) in inflammatory diseases of dairy cattle, *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 2011, 3, 2, 57-65.
63. Faty A, Ferre P, Commans S (2012), The acute phase protein serum amyloid A induces lipolysis and inflammation in human adipocytes through distinct pathway, *PLoS ONE* 7(4):e 34031.
64. Furlaneto CJ, Campa A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;268(2):405–408.

65. Gabay C, Kushner I, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *N Engl J Med*, 1999, 340(6): 448-54.
66. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, et al.: 2001, Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet* 358:24–29.
67. Gribar S, Anand R, Sodhi C, Hackam D, The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation, *Journal of leukocyte biology*, 2008, 83, 493-498.
68. Gschwantler, M., Dulic, M., Dulic-Lakovic, E., Schwarzer, R., Rieder, F., Graninger, W., & Steininger, C. (2014). Increased levels of serum amyloid A during the early phase of hepatitis C treatment with interferon are associated with sustained virologic response - a pilot study. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*, 23(1), 101–102.
69. Guo J, Yu J, Grass D, Beer F, Kindy M, Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid A protein in a mouse model of amyloidosis, *The Journal of Neuroscience*, July 15, 2002, 22(14):5900-5909.
70. Hatanaka E, Furlaneto CJ, Ribeiro FP, Souza GM, Campa A. Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human neutrophils. *Immunology Letters*. 2004;91(1):33–37.
71. Hawkins J, Wu Q, Wang Y, Lu C, Deficits of serum amyloid A contribute to increased neonatal mortality during murine listeriosis, *Pediatric Research*, 2013, 74(6):668-674.
72. He R, Hanson C, Chen J, Cheng N, Ye R, Serum amyloid A induce G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2, *Blood*, January, 2009, 113, 2, 429-437.
73. He R, Sang H, Ye R, Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R, *Blood*, 2003, 101, 4, 1572-1581.
74. He R, Shepard L, Chen J, Pan Z, Ye R, Serum amyloid A is an endogenous ligand that differentially induces IL-12 and IL-23, *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 4072-4079.
75. Hijmans W, Sipe JD. Levels of the serum amyloid A protein (SAA) in normal persons of different age groups. *Clinical and Experimental Immunology*. 1979;35(1):96-100.
76. Hillstrom A, Tvedten H, Lilliehook I, Evaluation of an in-clinic serum amyloid A (SAA) assay and assessment of the effects of storage on SAA samples, *Acta Veterinaria Scandinavia*, 2010, 52:8, 6 pages.

77. Huan B, Liu K, Li Y, Wei J, Shao D, Shi Y, Qiu Y, Li B, Ma Z., Porcine serum amyloid A3 is expressed in extrahepatic tissues and facilitates viral replication during porcine respiratory and reproductive syndrome virus infection, *Dev Comp Immunol.* 2018 Feb;79:51-58.
78. Hulten C, Sandgren B, Skioldebrand E, Klingeborn B, Marhaug G, Forsberg M, The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection, *Acta Vet Scand*, 1999, 40(4):323-33.
79. HULTÉN, C. and DEMMERS, S. (2002), Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. *Equine Veterinary Journal*, 34: 693–698. doi:10.2746/042516402776250360.
80. Husby G, Natvig JB. A serum component related to nonimmunoglobulin amyloid protein AS, a possible precursor of the fibrils. *J Clin Invest* 974;53:1054-61.
81. Jacobsen, S. and Andersen, P. H. (2007), The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education*, 19: 38–46.
82. Janson L, Tischler M. *The Big Picture: Medical Biochemistry*. New York, NY: McGrawHill; 2012.
83. Jayaraman S, Haupt C, Gursky O, Thermal transitions in serum amyloid A in solutions and on the lipid: implications for structure and stability of acute-phase HDL, *The Journal of Lipid Research*, 2015, 56, 1531-1542.
84. Jensen L, Whitehead A, Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response, *Biochem J*, 1998, 334, 489-503.
85. Kajikawa T, Furuta A, Onishi T, et al.: 1999, Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Vet Immunol Immunopathol* 68:91–98.
86. Kinkley SM, Bagshaw WL, Tam SP, Kisilevsky R., The path of murine serum amyloid A through peritoneal macrophages, *Amyloid*. 2006, 13(3):123-34.
87. Kisilevski R, Manley PN, Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological role, *Amyloid*, 2012, 19(1): 5-14.
88. Kisilevski R, Tam S, Macrophage cholesterol efflux and the active domains of serum amyloid A 2.1, *Journal of Lipid Research*, 2003, 44, 2257-2269.
89. Kradin R, Mark E, Case 23-1996-A 62-year-old woman with progressive dyspnea and diffuse reticulonodular pulmonary infiltrates, *N Engl J Med*, 1996, 335: 266-273.

90. KUMAR, V., ABBAS, A. K., ASTER, J. C., & ROBBINS, S. L. (2013). Robbins basic pathology. Philadelphia, PA, Elsevier/Saunders.
91. Kushner I, Gewurz H, Benson ML. C-reactive protein and the acute-phase response. *J Lab Clin Med* 1981;97:739-49.
92. Lachmann H, Goodman H, Gilberstone J, Gallimore J, Sabin C, Gillmore J, Hawkins P, Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis, *N Engl J of Med*, 2007, 356: 2361-71.
93. Lachman H, Paut I, Deschner J et al, Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome, *N Engl J Med*, 2009, 360: 2416-25.
94. Lannergard A, Serum amyloid A protein (SAA) in healthy and infected people, *Acta Universitatis Upsaliensis*, 2005, 50 pages.
95. Lannergard A, Friman G, Ewald U, Lind L, Larsson A, Serum amyloid A (SAA) protein and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in healthy newborn infants and healthy young through elderly adults, *Acta Paediatrica*, 2005, 94: 1198-1202.
96. Lannergard A, Larsson A, Friman G, Ewalds U, Human serum amyloid A (SAA) and high sensitive C-reactive protein (hsCRP) in preterm newborn infants with nosocomial infections, *Acta Pædiatrica*, 2008, 97, 1061-1065.
97. Lannergard A, Friman G, Larsson A, Serum amyloid A: a novel serum marker for the detection of systemic inflammatory response in cystitis, *The Journal of Urology*, 2003, 170, 804-806.
98. Lannergard A, Larsson A, Kragbjerg P, Friman G, Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases, *Scand J Clin Lab Invest*, 2003, 63: 267-272.
99. Lannergard A, Viberg A, Cars O, Karlsson M, Sandstrom M, Larsson A, The time course of body temperature, serum amyloid A protein, C-reactive protein and interleukin-6 in patients with bacterial infection during the initial 3 days of antibiotic therapy, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2009; 41: 663671.
100. Lappalainen T, Kolehmainen M, Schwab U et al, Serum concentrations and expressions of serum amyloid A and leptin in adipose tissue are interrelated: the Genobin study, *European Journal of Endocrinology*, 2008, 158, 333-341.
101. Lavie G, Franklin D, Franklin E, Degradation of serum amyloid A protein by surface – associated enzymes of human blood monocytes, *J Exp Med*, 1978, 148, 1020-1031.
102. Lawrence T, The nuclear factor NF – kB pathway in inflammation, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009; 1: a001651.

103. Lee H, Kim M, Park K et al, Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes, *Molecular Pharmacology*, 2006, 170:241-248.
104. Lee HY, Kim MK, Park KS, Bae YH, Yun J, Park JI, Kwak JY, Bae YS, Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells, *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(3):989-98.
105. Liang J, Sipe J, Recombinant human serum amyloid A (apoSAA,) binds cholesterol and modulates cholesterol flux, *Journal of Lipid Research*, 1995, 36, 199, 37-46.
106. Liang J, Sloane J, Wells J, Evidence for local production of acute phase response apolipoprotein serum amyloid A in Alzheimer's disease brain, *Neurosci Lett*, 1997, 225(2):73-6.
107. Lindback S, Hellgren U, Julander I, Hansson LO. The value of C-reactive protein as a marker of bacterial infection in patients with septicaemia/endocarditis and influenza. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 543 – 9.
108. Liu M, Bao S, Napolitano J et al, Zinc regulates the acute phase response and serum amyloid A production in response to sepsis through JAK-STAT3 signaling, *PLoS ONE*, 2014, 9, 4, e94934.
109. Liuzzo G, Biasucci L, Gallimore R et al, The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina, *N Engl J Med*, 1994, 331(7): 417-24.
110. Liuzzo G et al, Inflammation and coronary artery disease, *N Engl J Med*, 1994, 331(7): 468-69.
111. Lu J, Yu Y, Zhu I, Cheng Y, Sun P, Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis, *PNAS*, April, 2014, 111, 14, 5189-5194.
112. MacGregor A, Gallimore R, Spector T, Pepys M, Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid A protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins, *Clinical Chemistry*, 2004, 50:1, 130-134.
113. MacPherson G, Austyn J, *The immune system, Exploring immunology: concepts and evidence*, first edition, 2012, 5-47.
114. Mak T, Sanders M, Jett B, *Primer to the immune response*, 2014, 2th edition.
115. Malle E, De Beer FC, Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice, *Eur J Clin. Invest.*, 1996, Jun, 26(6):427-35.

116. Mangiarotti P, Moulin F, Palmer P, Ravilly S, Raymond J, Gendrel D. Interferon-alpha in viral and bacterial gastroenteritis: a comparison with C-reactive protein and interleukin-6. *Acta Paediatr* 1999; 88: 592 – 4.
117. Manski G, Dailey N, Canna S et al, Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1 $\beta$  inhibition, *N Engl J Med*, 2006, 355: 581-92.
118. Marhaug G, Permin H, Husby G. Amyloid-related serum protein (SAA) as an indicator of lung infection in cystic fibrosis. 1983; 72: 861 – 6.
119. Marzi C, Huth C, Herder C et al., Acute-phase serum amyloid A protein and its implication in the development of type 2 diabetes in the Kora S4/F4 study, *Diabetes care*, 36, 2013, 1321-1326.
120. Mateusz Wierdak, Magdalena Pisarska, Beata Kuśnierz-Cabala, Jan Witowski, Piotr Major, Piotr Ceranowicz, Andrzej Budzyński, and Michał Pędziwiatr. *Surgical Infections*, Volume: 19 Issue 6: August 1, 2018.
121. Maury CP, Ehnholm C, Lukka M. Serum amyloid A protein (SAA) subtypes in acute and chronic inflammatory conditions. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1985;44(10):711-715.
122. McAdam K, Elin R, Sipe J, Wolf S, Changes in human serum amyloid A and C-reactive protein after etiocholanolone-induced inflammation, *The Journal of Clinical Investigation*, 1978, 61, 390-394.
123. McCarthy PL, Frank AL, Ablow RC, Masters SJ, Dolan TF. Value of C-reactive protein test in the differentiation of bacterial and viral pneumonia. *J Pediatr* 1978;92:454-6.
124. McEneny J, Daniels J, McGowan A, Gunness A, Moore K, Stevenson M, Young I, Gibney J, A cross-sectional study demonstrating increased serum amyloid A related inflammation in high-density lipoproteins from subjects with type 1 diabetes mellitus and how this association was augmented by poor glycaemic control, *Journal of Diabetes Research*, Article ID: 351601.
125. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(8):3186-90.
126. Merle N, Noe R, Mecarelli L et al, Complement system part II: role in immunity, *Frontiers in immunology*, 2015, 6, 257.
127. Merlini G, Bellotti V, Molecular mechanisms of amyloidosis, *N Engl J Med*, 2003, 349: 583-96.

128. Migita K, Abiru S, Nakamura M et al, Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro, *FEBS letters*, 569, 2004, 235-239.
129. Migita K, Kawabe Y, Tominaga M, Origuchi T, Aoyagi T, Eguchi K., Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts, *Lab Invest.*, 1998;78(5):535-9.
130. Miwata H, Yamada T, Okada M, Kudo T, Kimura H, Morishima T, Serum amyloid A protein in acute viral infection, *Archives of Disease in Childhood*, 1993, 68: 210-214.
131. Morrow D, Rifai N, Antman E et al, Serum amyloid A predicts early mortality in acute coronary syndromes: A TIMI 11A substudy, *Journal of American College of Cardiology*, 35, 2, 2000, 358-362.
132. Munford S, Statins and the acute-phase response, *N Engl J Med*, 2001, 344:2016-2018.
133. Murphy K, Janeway's Immunology, 8<sup>th</sup> edition, July 2011, Chapter 2.
134. Naik U, Harrison R, Phagocytosis, 2013.
135. Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Yamada T, Okada M, Monitoring both serum amyloid A protein and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases, *Clin. Chem.*, 39/2, 293-297, 1993.
136. Niemi K, Serum amyloid A (SAA): proinflammatory functions and their regulation by serum lipoproteins, Academic dissertation, Helsinki, 2012.
137. Noborn F, Ancsin J, Ubhayasekera W et al, Heparan Sulfate Dissociates Serum Amyloid A (SAA) from Acute-phase High-density Lipoprotein, Promoting SAA Aggregation, *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287, 30, 25669 –25677.
138. , How to interpret Serum amyloid A Concentration, 2015, Vol. 61 AAEP PROCEEDINGS.
139. Nunokawa Y, T. Fujinaga, T. Taira, M. Okumura, K. Yamashita, N. Tsunoda and M. Hagio, "Evaluation of Serum Amyloid A Protein as an Acute-Phase Reactive Protein in Horses," *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 55, No. 6, 1993, pp. 1011-1016.
140. O'Brien K, Chait A, Serum amyloid A: The "other" inflammatory protein, *Nonstatin drugs*, 2006, 63-68.
141. Okamoto H, Katagiri Y, Kiire A, Momohara S, Kamatani N., Serum amyloid A activates nuclear factor-kappaB in rheumatoid synovial fibroblasts through binding to receptor of advanced glycation end-products, *J Rheumatol.*, 2008; 35(5):752-6.

142. Okino A, Burger C, Cardoso J, Lavado E, Lotufo P, Campa A, The acute-phase proteins serum amyloid A and C-reactive protein in transudates and exudates, *Mediators of Inflammation*, 2006, Article ID 47297, pages1-6.
143. O'Reilly S, Cant R, Ciecchomska M, Finnigan J, Oakley F, Hambleton S, van Laar JM, Serum amyloid A induces interleukin-6 in dermal fibroblasts via Toll-like receptor 2, interleukin-1 receptor-associated kinase 4 and nuclear factor-kappa B, *Immunology*, 143, 3, 331-340.
144. Patel H, Fellowes R, Coade S, Woo P, Human serum amyloid A has cytokine – like properties, *Scand J Immunol*, 1998, 48: 410-418.
145. PEPYS, M. B., BALTZ, M. L., TENNENT, G. A., KENT, J., OUSEY, J. and ROSSDALE, P. D. (1989), Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *Equine Veterinary Journal*, 21: 106–109.
146. Perera C1, McNeil HP, Geczy CL, S100 Calgranulins in inflammatory arthritis, *Immunol Cell Biol.*, 2010, 88(1):41-9.
147. Pomares L, The mannose receptor, *Journal of leukocyte biology*, 2012, 92, 6, 1177-1186.
148. Prusiner S, Shattuck lecture – neurodegenerative diseases and prions, *N Engl J Med*, 2001, 344(20):1516-26.
149. QU et al: PCT, CRP, IL-6 & SAA IN FEBRILE PATIENTS, *Indian J Med Res* 141, March 2015, pp 315-321.
150. Rau B1, Steinbach G, Baumgart K, Gansauge F, Grünert A, Beger HG, Serum amyloid A versus C-reactive protein in acute pancreatitis: clinical value of an alternative acute-phase reactant, *Crit Care Med*. 2000 Mar;28(3):736-42.
151. Ray A, Yu G, Ray B, Cytokine-Responsive Induction of SAF-1 Activity Is Mediated by a Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway, *Mol Cell Biol*, 2002, 22(4): 1027-1035.
152. Ren Y, Wang H, Lu D, Xie X et al, Expression of serum amyloid A in uterine cervical cancer, *Diagnostic Pathology*, 2014, 9:16, 9 pages.
153. Ribeiro FP, Furlaneto CJ, Hatanaka E, et al. mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. *Mediators of Inflammation*.2003;12(3):173–178.
154. Ridker P, Hennekens C, Buring J, Rifai N, C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women, *N Engl J Med*, 2000, 342(12):836-43.



155. Rienhoff HY Jr, Huang JH, Li XX, Liao WS, Molecular and cellular biology of serum amyloid A, *Mol Biol Med*, 1990, 7(3):287-98.
156. Rosenthal CJ, Franklin EC. Variation with age and disease of an amyloid A protein-related serum component. *Journal of Clinical Investigation*. 1975;55(4):746-753.
157. Ruemmele F, Beaulieu J, Dionne S et al, Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor  $\alpha$ , *Gut, Intestinal infection*, 2002, 51: 842-848.
158. S. J. Stoneham, L. Palmer, R. Cash and P. D. Rossdale, "Measurement of Serum Amyloid A in the Neonatal Foal Using a Latex Agglutination Immunoturbidimetric Assay: Determination of the Normal Range, Variation with Age and Response to Disease," *Equine Veterinary Journal*, Vol. 33, 2001, pp. 559-603.
159. S. Paltrinieri, "The Feline Acute Phase Reaction," *Veterinary Journal*, Vol. 177, No. 1, 2008, pp. 26-35.
160. Salini V, Saggini A, Maccauro G et al, Inflammatory markers: serum amyloid A, fibrinogen and C-reactive protein – a revisited study, *European Journal of Inflammation*, 2011, 9, 2, 95-102.
161. Sandri S, Rodriguez D, Gomes E, Monteiro H, Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist?, *Journal of Leukocyte Biology*, 83, May 2008, 1174-1180.
162. Saraiva M, Sporadic cases of hereditary systemic amyloidosis, *N Engl J Med*, 2002, 346(23): 1818-19.
163. Satoh M, T. Fujinaga, M. Okumura and M. Hagio, "Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitative Measurement of Serum Amyloid A Protein in Horses," *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 56, Vol. 10, 1995, pp. 1286-1291.
164. Satue K, Calvoo A, Gardon J, Factors influencing serum amyloid type A (SAA) concentrations in horses, *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 3, 28-66.
165. Saundraraj T, *Microbiology*, 1th edition, 2004, 193-208.
166. Saxstad J, Nilsson LA, Hanson LA. C-reactive protein in serum from infants as determined with immuno diffusion techniques. II. Infants with various infections. *Acta Paediatr Scand* 1970;59:676-80.
167. Schultz DR, I. AP. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum* 1990; 20: 129 – 47.

168. Sellar G, DeBeer M, Lelias J et al, Dog Serum amyloid A protein, Identification of multiple isoforms defined by cDNA and protein analyzes, *The Journal of Biologic Chemistry*, 1991, 266, 6, 3505-3510.
169. Shah C, Hari-Dass R, Raynes J, Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria, *Blood*, 2006, 108:5, 1751-1757.
170. Shainkin-Kestenbaum R. et al., Serum amyloid A (SAA) in viral infection: rubella, measles and subacute sclerosing panencephalitis (SSPE), *Clin. exp. Immunol.* (1982) 50, 503-506.
171. Shida T, Kuribayashi T, Seita T et al, Characteristics of increased serum amyloid A (SAA) and a-1 acid glycoprotein (AAG) concentrations in cats subjects to experimental surgical treatment or inoculated with *Bordetella bronchiseptica*, *Intern J Appl Res Vet Med*, 2012, 10, 1, 69-75.
172. Shimetani N, Shimetani K, Mori M, Clinical evaluation of the measurement of serum procalcitonin: comparative study of procalcitonin and serum amyloid A protein in patients with high and low concentrations of serum C-reactive protein, *Scand J Clin Lab Invest.* 2004;64(5):469-74.
173. Shimetani N, Shimetani K, Mori M, Levels of three inflammation markers, C-reactive protein, serum amyloid A protein and procalcitonin, in the serum and cerebrospinal fluid of patients with meningitis, *Scand J Clin Lab Invest.* 2001;61(7):567-74.
174. Sipe, J. Revised nomenclature for serum amyloid A (SAA). Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 1999, 6(1):67-70.
175. Sipe J.D., Serum amyloid A: from fibril to function. Current status., *Amyloid.*, 2000, 7(1):10-2.
176. Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J. and Westermark, P., Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 2010, 17(3-4):101-104.
177. Smith J, The clinical significance of serum amyloid A and the effects of corticosteroid on its production by HEPG2 cells, 1992.
178. Song C, Hsu K, Yamen E, Yan W, Fock J, Witting PK, Geczy CL, Freedman SB, Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes, *Atherosclerosis*, 2009; 207(2):374-83.

179. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today* 1994; 15: 81 – 8.
180. Stenfeldt, Heegaard P, Stockmarr A et al, Analyses of acute phase responses of serum amyloid A, haptoglobin and type 1 interferon in cattle experimentally infected by food-and-mouth disease virus serotype O, *Veterinary Research*, 2011, 46: 66.
181. Stepniak B, Majdan M, Serum amyloid A as a marker of persistent inflammation and an indicator of cardiovascular and renal involvement in patient with rheumatoid arthritis, Hindawi Publishing Corporation, *Mediators of Inflammation*, 2014, 793628, 7 pages.
182. Stevens FJ, Hypothetical structure of human serum amyloid A protein, *Amyloid*, 2004, 11(2):71-80.
183. Takahashi E, Kuwayama H, Kawamoto K, Matsui T, Inokuma H, Detection of serum amyloid a isoforms in cattle, *J Vet Diagn Invest*, 2009, 21: 874-877.
184. Takeda K, Akira S, Toll-like receptors in innate immunity, *International Immunology*, 2005, 17, 1, 1-14.
185. Tamamoto T, Ohno K, Takahashi M, Nakashima K, Fujino Y, Tsujimoto H, Serum amyloid A as a prognostic marker in cats with various diseases, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(3), 428–432.
186. Thompson J, Jayne C, Thompson J et al, A brief elevation of serum amyloid A is sufficient to increase atherosclerosis, *Journal of Lipid Research*, 2015, 562, 286-93.
187. TIAN Yueru, LI Wei, YE Zhicheng. Determinations of serum amyloid A and C-reactive protein for the diagnosis of infectious diseases in children[J]. *Laboratory Medicine*, 2017, 32(5): 382-385.
188. Timothy Y, Chan J, Cho W et al, Protein chip array profiling analysis in patient with severe acute respiratory syndrome identified serum amyloid A protein as a biomarker potentially useful in monitoring extend of pneumonia, *Clinical Chemistry*, 2005, 51:1, 47-55.
189. Tohyama Y, Yamamura H, Complement-mediated phagocytosis: the role of syk, *IUBMB Life*, 2006, 58 (5-6): 304-308.
190. Uhlar C, Whitehead A, Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant, *Eur J Biochem*, 2001, 265, 501-523.

191. Ulutas B, Tan T, Ulutas P, Bayramli G, Haptoglobin and serum amyloid A responses in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, *Acta Scientiae Veterinariae*, 2011, 39(3): 973.
192. Upragarin N, Landman W, Gaastra W, Gruys E, Extrahepatic production of acute phase serum amyloid A, *Histol Histopathol*, 2005, 20: 1295-1307.
193. Urieli-Shoval S, Shubinsky G, Linke R et al, Adhesion of human platelets to serum amyloid A, *Blood*, 2002;99:1224-1229.
194. Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y, Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states, *Curr. Opin Hematol.*, 2000, Jan, 7(1), :64-9.
195. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1351-7.
196. Vollmera A, Gebrea M, Barnard D, Serum amyloid A (SAA) is an early biomarker of influenza virus disease in BALB/c, C57BL/2, Swiss-Webster, and DBA.2 mice, *Antiviral Res.* 2016 September ; 133: 196–207. doi:10.1016/j.antiviral.2016.08.011.
197. Wang, Y., Huang, H., Sun, R., Chen, B., Han, F., Li, Q., ... Tu, Y. (2017). Serum amyloid a induces M2b-like macrophage polarization during liver inflammation. *Oncotarget*, 8(65), 109238–109246. doi:10.18632/oncotarget.22652
198. Wang L, Lashuel H, Walz T, Colon W, Murin apolipoprotein serum amyloid A in solution forms a hexamer containing a central channel, *PNAS*, 2002, December, 99, 25, 15947-15952.
199. Weichhard T, Kopecky S, Kubicek M, Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation, *J Am Soc Nephrol* 23: 934-947, 2012.
200. Whicher JT, Chambers RE, Higginson J, Higgins PG, Acute phase response of serum amyloid A protein and C reactive protein to the common cold and influenza, *J Clin Pathol* 1985;38:312-316.
201. Wierdak et al, Serum amyloid A as an early marker of infectious complications after laparoscopic surgery for colorectal carcinoma, *Surgical infections*, 19, 6, 2018, 622-28.
202. Yamada T, Inflammatory markers; C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA), *Rinsho Byori.*, 2005, 53(6):558-61.
203. Yang R, Lee M, Hu h et al, Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications, *PLoS Med*, 2006, 3(6): e287.

204. Ye, R. D. and Sun, L. (2015), Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 98: 923–929.
205. Yuan H, Huang J, Lv B, Yan W, Hu G, Wang J, Shen B, Diagnosis value of the serum amyloid A test in neonatal sepsis: a meta-analysis, *BioMed Research International*, 2013, 520294, 9 pages.
206. Zani I, Stephen S, Mughal N et al, Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease, *Cells*, 2015, 4, 178-201.
207. Zimlichman S1, Danon A, Nathan I, Mozes G, Shainkin-Kestenbaum R., Serum amyloid A, an acute phase protein, inhibits platelet activation, *J Lab Clin Med*. 1990 Aug;116(2):180-6.

### **С благодарност към:**

- Научните ми ръководители: проф. д-р Маргарита Господинова, дм и доц. д-р Яна Бочева, дм;
- Колектива на Инфекциозна клиника, УМБАЛ „Св. Марина“, гр. Варна
- Моето семейство и приятели за безрезервната подкрепа и вяра в мен;
- Д-р Гергана Попчева, Катедра Обща медицина и клинична лаборатория, УС Клинична лаборатория;
- Гл. ас. Силвия Павлова Николова, Катедра Социална медицина и организация на здравеопазването, УС