



**Медицински университет - Варна  
„Проф. д-р Параскев Стоянов”**

---

**Факултет „Медицина”  
Катедра “Пропedeutика на вътрешните болести ”**

**РОЛЯТА НА НЕКРОПТОЗАТА ПРИ  
ВЪЗПАЛИТЕЛНИТЕ ЧРЕВНИ  
ЗАБОЛЯВАНИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане  
на образователна и научна степен  
„Доктор“

**Д-р Елена Панайотова Панайотова**

**Област на висшето образование: 7. Здравеопазване и спорт,  
Професионално направление: 7.1. Медицина,  
Научна специалност: „Вътрешни болести“**

**Научен ръководител:  
Доц. д-р Антония Йорданова Атанасова, д.м.н.**

**Варна 2022 г.**

Дисертационният труд съдържа 166 стандартни страници и е онагледен с 16 таблици, 90 фигури и 2 снимки. Литературната справка включва 283 литературни източника, от които 9 на кирилица и 274 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедрата по „Пропедевтика на вътрешните болести“ при Медицински университет ”Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна на 27.04.2022 г.

Външни членове:

1. Проф. д-р Ваня Александрова Герова – Нанкова, д.м.
2. Проф. д-р Деян Тонев Желев, д.м.н.
3. Проф. д-р Ивайло Петров Въжаров, д.м.

Резервен външен член:

1. Проф. д-р Христо Благоев Цеков, д.м.н

Вътрешни членове:

1. Доц. д-р Мария Стоянова Димова – Милева, д.м.
2. Проф. д-р Миглена Димитрова Георгиева, д.м.

Резервен вътрешен член:

1. Доц. д-р Елеонора Георгиева Димитрова - Господинова, д.м.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 22.06.2022 г. от .... часа във Факултет по Медицина – гр. Варна на открито заседание на Научното жури.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ - Варна и са публикувани на интернет страницата на Медицински университет - Варна.

Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите съответстват на номерата в дисертационния труд.

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

<b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ</b>	<b>4</b>
<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b>	<b>6</b>
<b>ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И ХИПОТЕЗА</b>	<b>8</b>
<b>МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ</b>	<b>9</b>
<b>РЕЗУЛТАТИ</b>	<b>22</b>
<b>ОБСЪЖДАНЕ</b>	<b>73</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>80</b>
<b>ИЗВОДИ</b>	<b>82</b>
<b>ПРИНОСИ</b>	<b>84</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b>	<b>85</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ</b>	<b>86</b>

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

### ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА КИРИЛИЦА

<b>АМП</b>	Антимикробни пептиди
<b>БК</b>	Болест на Крон
<b>ВЧЗ</b>	Възпалителни заболявания на червата
<b>ГИТ</b>	Гастроинтестинален тракт
<b>ЕИП</b>	Екстраинтестинални прояви
<b>ИО</b>	Имунен отговор
<b>ИС</b>	Имунна система
<b>КРК</b>	Колоректален карцином
<b>ПКК</b>	Пълна кръвна картина
<b>ФГДС</b>	Фиброгастродуоденоскопия
<b>ФКП</b>	Фекален калпротектин
<b>ФКС</b>	Фиброколоноскопия
<b>ЧМ</b>	Чревна микробиота
<b>ЯК</b>	Язвен колит

### ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА ЛАТИНИЦА

<b>ACD</b>	Accidental cell death
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma-2
<b>CARD 15</b>	Caspase recruitment domain family, member 15(formerly NOD2)
<b>CDAI</b>	Crohn's Disease Activity Index
<b>cIAPs</b>	Cellular inhibitor of apoptosis proteins
<b>CYLD</b>	Cylindromatosis
<b>DAI</b>	Disease Activity Index
<b>DAMPs</b>	Danger associated molecular patterns
<b>DD</b>	Death Domain
<b>DISC</b>	Death-inducing signaling complex
<b>DRs</b>	Death receptors (DR 1-6)
<b>DRLs</b>	Death receptor ligands
<b>FADD</b>	Fas associated Death Domain
<b>FAS</b>	First apoptosis signal receptor
<b>FASL</b>	FAS лиганд
<b>FLICE</b>	FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme
<b>cFLIP</b>	cellular FLICE-like Inhibitory Protein
<b>GALT</b>	Gut - associated lymphoid tissue
<b>HMGB1</b>	High mobility group box 1
<b>HSP70</b>	Heat shock protein 70
<b>IBD</b>	Inflammatory Bowel Disease

<b>IECs</b>	Intestinal epithelial cells
<b>IKK 1,2</b>	IkB киназа 1 и 2
<b>IL</b>	Интерлевкин
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinases
<b>LUBAC</b>	Linear ubiquitination assembly complex
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MLKL</b>	Mixed lineage kinase domain-like protein
<b>NEMO</b>	NF-κB essential modulator
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor κB, ядерен фактор κB
<b>NOD</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain
<b>NLRs</b>	NOD-like receptors
<b>PAMPs</b>	Pathogen-associated molecular pattern
<b>PCD</b>	Programmed Cell Death
<b>PRRs</b>	Pattern recognition receptors
<b>RAGE</b>	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
<b>RHIM</b>	RIP homotypic interaction motif
<b>RIPK1</b>	Receptor interacting protein kinase 1
<b>RIPK3</b>	Receptor interacting protein kinase 3
<b>RIG</b>	Retinoic acid-inducible gene
<b>RLR</b>	RIG-like receptors (Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors)
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>CRP</b>	C-reactive protein / C- реактивен протеин
<b>TAB 1/2</b>	TAK1-binding protein 1/2
<b>TAK1</b>	TGF - β activated kinase
<b>TGF- β</b>	Transforming growth factor β
<b>TNF-α</b>	Tumor necrosis factor α
<b>TNFR</b>	Tumor necrosis factor receptor
<b>TRADD</b>	TNFR1 – associated death domain protein
<b>TRAFs</b>	TNFR – associated factor
<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor – related apoptosis inducing ligand
<b>TRAILR1</b>	TNF- related apoptosis inducing ligand receptor 1
<b>TRIF</b>	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

## **ВЪВЕДЕНИЕ**

Възпалителните заболявания на червата (ВЧЗ), с основни представители болестта на Крон (БК) и язвения колит (ЯК), са група идиопатични заболявания, характеризиращи се с хронично-рецидивиращо възпаление на гастроинтестиналния тракт. Това са болести, които засягат предимно млади хора и имат еволюция през целия живот. Протичат с редуване на периоди на ремисии и релапси, като фазите на активност имат различна продължителност и често водят до локални и системни усложнения. Това влошава качеството на живот на пациентите, налага продължително лечение и е свързано със значителни социално-икономически разходи.

Въпреки интензивните усилия през годините за разбиране на етиологията и патогенезата на ВЧЗ, те все още остават неясни. Това ограничава терапевтичните възможности до степен повлияване на симптомите, поддържане на ремисия и избягване на рецидиви, но не и до дефинитивно излекуване на пациентите.

Натрупаните доказателства през последните години разкриват, че нарушената чревна бариерна функция, като първичен дефект, е ключов фактор за развитие на ВЧЗ.

За да се осигури структурна цялост и стабилност на бариерата е необходимо клетъчната смърт на чревните епителни клетки да бъде строго регулирана.

Скорешни експериментални изследвания идентифицират нов тип клетъчна смърт в чревния епител, наречена некроптоза, която води до възпаление, с характеристики подобни на възпалителните чревни заболявания. Това е предположило участието ѝ в патогенезата на тези заболявания.

Некроптозата е регулирана форма на клетъчна смърт, която възниква когато апоптозата е инхибирана, но извънклетъчната апоптична стимулация продължава. Тя притежава морфологични характеристики подобно на пасивната некроза, но сходно на апоптозата е строго регулирана от интрацелуларна протеинова платформа.

Предполага се, че некроптозата е еволюирала като „резервно копие“ на апоптозата, в случаите когато патогени са разработили механизми за инхибиране на апоптозната машина.

Като литична клетъчна смърт, тя води до бързо разрушаване на клетъчната мембрана и освобождаване в извънклетъчната среда на имуногенно цитозолно съдържимо, което активира имунната система и предизвиква възпалителен отговор. По този начин некроптозата директно предизвиква възпаление и се възприема за възпалителен модел на клетъчна смърт. Некроптозата в чревния епител, може и

индиректно да индуцира възпаление чрез нарушаване на бариерната цялост, което позволява инвазията на коменсални и патогенни бактерии и допълнително стимулира имунната система и усилва възпалението в чревната лигавица. Следователно некроптозата играе роля в иницирането, усилването и създава порочен кръг на хронично възпаление, което е в основата на патогенезата на ВЧЗ.

RIPK3 протеинът е идентифициран като ключова молекула необходима за изпълнение на некроптозния път, а експресията му корелира с чувствителността на клетките да претърпяват некроптоза.

Следователно инхибирането на ключови молекули, участващи в некроптозния път, може да предостави нови възможности за лечение на тези заболявания, като не само намали или потисне симптомите на чревно възпаление, но и възпрепятства основните молекулярни процеси.

В литературата съществуват малко данни за ролята на некроптозата при ВЧЗ при хората. Предвид това възникна необходимостта да се изследва експресията на RIPK3 сред пациентите с ВЧЗ, като първа стъпка в персонализирания подход при лечение, проследяване и стадиране.

## **ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И ХИПОТЕЗА**

### **2.1. Цел**

Цел на настоящата работа е да се изследва наличието на некроптоза при болни с възпалителни чревни заболявания (болест на Крон и язвен колит), като се определи нивото на експресия на маркера за некроптоза – RIPK3 в чревната лигавица и връзката му с клинично-патологичните показатели при пациенти с възпалителни чревни заболявания.

### **2.2. Задачи**

1. Да се изследва нивото на експресията на RIPK3 в ендоскопски променените участъци (чревен резектат) при пациенти с БК и съпостави с клиничните, лабораторните, ендоскопски и хистологични индекси на активност.
2. Да се изследва нивото на експресията на RIPK3 в ендоскопски променените участъци при пациенти с ЯК и съпостави с клиничните, лабораторните, ендоскопски и хистологични индекси на активност.
3. Да се сравнят нивата на експресия на RIPK3 при пациенти с възпалителни чревни заболявания и здрави контроли.
4. Да се съпоставят нивата на експресия на RIPK3 при пациенти с БК и ЯК.
5. Да се установи потенциала на нивата на RIPK3 като прогностичен маркер за прогресиране и развитие на тежка болест при пациенти с ВЧЗ.

### **2.3. Хипотеза**

- 1) Допуска се, че има съществена разлика в експресията на RIPK3 при пациентите с ВЧЗ и може да се използва като маркер за разграничаване на БК от ЯК и като прогностичен маркер за развитието на тежка болест и прогресия.
- 2) Допуска се, че експресията на RIPK3 не се различава съществено при БК и ЯК и не може да се използва като прогностичен маркер.



## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

### **3.1. Пациенти**

В проучването са включени 170 пациента, над 18 годишна възраст с поставена диагноза ВЧЗ (от които 85 пациента с болест на Крон и 85 с язвен колит), както и 30 здрави контроли, преминали през структурите на УМБАЛ „Св. Марина „ ЕАД – Варна за периода от 2011г. – м.06.2020г.

Изследването е ретроспективно, като участниците, включени в изследването са пациенти с поставена диагноза БК и ЯК според критериите на ЕССО. За всеки пациент има налична пълна медицинска документация, както и наличен биопсичен материал. Медицинската документация на всеки болен е подробно прегледана като са събрани анамнестични, клинични, лабораторни, образни, ендоскопски и морфологични данни и са използвани в анализите.

Пациентите включени в контролната група нямат анамнеза за заболявания и не приемат никакви медикаменти.

Всички клинични, лабораторни, образни, ендоскопски (фиброгастродуоденоскопия, илеоколоноскопия) и морфологични изследвания, както и оперативните интервенции с резекции на сегменти от гастроинтестиналния тракт (инцизионни биопсии), които са използвани за имунохистохимичния анализ са извършени на територията на УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна.

Изследването получи положителна оценка от КЕНИ към МУ-Варна с протокол с №96/24.09.2020г .

В проучването са подбрани пациенти, отговарящи на предварително дефинирани включващи критерии.

#### **3.1.1. Критерии за включване на пациентите в проучването**

- Пациенти хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна за периода от 2011 г. до месец 06.2020г. с поставена диагноза болест на Крон според критериите на ЕССО.
- Пациенти хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна за периода от 2011г. до месец 06.2020г. с поставена диагноза язвен колит според критериите на ЕССО.

- Пациенти с налична пълна медицинска документация (данни за заболяването на пациента – анамнестични, клинични, лабораторни, образни, ендоскопски и хистологични), доказваща диагнозата и определяща активността на заболяването.
- Пациенти на възраст над 18 години, ало- и автопсихично ориентирани.

### **3.1.2. Изключващи критерии:**

- Пациенти под < 18 год. възраст, ало- и автопсихично дезориентирани.
- Пациенти, неотговарящи на критериите за включване.

### **3.1.3. Контролна група**

#### **3.1.3.1. Критерии за включване**

- Пациенти хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна за периода от 2011г. до м. 06.2020г., диагностицирани с функционални стомашно-чревни нарушения, при които липсват клинични, лабораторни, образни, ендоскопски и хистологични данни за гастроинтестинални заболявания, както и без данни за възпалителни, онкологични и тежки придружаващи заболявания.
- Лица навършили 18 годишна възраст.

#### **3.1.3.2. Изключващи критерии**

- Лица, ненавършили 18г възраст;
- Пациенти, неотговарящи на критериите за включване.

## **3.2. Методи**

### **3.2.1. Клинични изследвания**

Пациентите са подбрани според наличието в медицинската им документация на диагноза болест на Крон и язвен колит поставена според Критериите на ЕССО.

#### **3.2.1.1. Клинични изследвания при пациентите с БК**

В групата пациенти с БК подробно е събрана и анализирана информация за:

- пол
- възраст
- брой хоспитализации
- давност на заболяването

- възраст при дебют
- клинични симптоми
- локализация (L)
- протичане (B)
- активност - CDAI
- наличие на ЕИП
- наличие на усложнения
- наличие на операции
- провеждано лечение
- наличие на придружаващи заболявания

### 3.2.1.1.1. Клинични класификация на БК

За определяне на локализацията и протичането при пациентите с БК е използвана Монреалската класификация (Silverberg MS et al., 2005). (Табл. 1)

**Табл. 1. Монреалска класификация на БК**

	<b>Монреалска класификация на БК (2005)</b>
<b>Възраст (A)</b>	A1: < 16 г
	A2: < 17 - 40 г
	A3: > 40 г
<b>Локализация (L)</b>	L1 – терминален илеум
	L2 – дебело черво
	L3 – илеум + дебело черво
	L1 -3 + L4 - засягане на горен ГИТ
<b>Протичане на болестта (B)</b>	B1 – възпалителна (нестриктурираща, непенетрираща)
	B2 - стриктурираща
	B3 – пенетрираща
	B 1-3 + p – перианална болест

### 3.2.1.1.2. Определяне на клиничната активност

Използван е най-често употребявания в клиничните проучвания индекс за оценка на болестната активност при БК (CDAI), известен също като индекс на Best, който се състои от осем клинични параметри (Табл. 2). Според броя на точките, оценени по CDAI, болестта се разделя на неактивна (ремисия) - CDAI < 150, лека - CDAI = 150 до 219, умерена - CDAI = 220 до 450 и тежка при CDAI стойности > 450 (Best WR et al., 1976).

**Табл.2. Индекс за активност при болест на Крон (Crohn's Disease Activity Index – CDAI)**

<b>Показател</b>	<b>Коефициент</b>	<b>Точки</b>
<b>Брой течни или кашави изхождания за 1 седмица (като сума за една седмица)</b>	<i>x 2</i>	
<b>Сумата от ежедневното отчитане на болката за 1 седмица по следната скала:</b> - липсва = 0 - слаба = 1 - умерена = 2 - силна = 3	<i>x 5</i>	
<b>Сумата от ежедневната самооценка на общото състояние:</b> - добро = 0 - леко увредено = 1 - лошо = 2 - много лошо = 3 - изключително лошо = 4	<i>x 7</i>	
<b>Общ брой на усложненията – по 1 точка за всяко:</b> Артрит, артралгия, ирит, увеит, еритема нодозум, пиодерма гангренозум, афтозен стоматит, анална фисура или фистула, периректален абсцес, друга чревна фистула, повишена температура над 38С.	<i>Брой x 20</i>	
<b>Симптоматични противодиарийни средства:</b> - не = 0 - да = 1	<i>x 30</i>	
<b>Палпираща се коремна формация:</b> - липсва = 0 - вероятна = 2 - налична формация = 5	<i>x 10</i>	
<b>Хематокрит (норм.Нст - измерения Нст)</b> - за жени :42 - измерения Нст - за мъже: 47 - измерения Нст	<i>x 6</i>	
<b>Процент на телесната маса под стандартната:</b> $100 \times \frac{[(\text{стандартното тегло} - \text{актуалното тегло}) / \text{стандартното тегло}]}$	<i>x 1</i>	
<b>Общ сбор = CDAI</b>		

### 3.2.1.2. Клинични изследвания при пациентите с ЯК

В групата пациенти с ЯК подробно е събрана и анализирана информация за:

- пол
- възраст
- брой хоспитализации
- давност на заболяването
- възраст при дебют

- клинични симптоми
- обхват (E)
- тежест на протичане (S)
- индекс на активност – общ Мауо скор
- наличие на ЕИП
- наличие на усложнения
- наличие на операции
- провеждано лечение
- наличие на придружаващи заболявания

### 3.2.1.2.1. Клинични форми при ЯК

За определяне на обхвата и клиничната активност при ЯК е използвана класификацията от Монреал (Magro F et al., 2017; Silverberg MS et al., 2005). (Табл. 3 и табл. 4).

**Табл.3. Монреалска класификация за обхвата на ЯК**

<i>Обхват</i>	<i>Анатомична зона</i>
<b>E1</b> – Язвен проктит	Ректум
<b>E2</b> – Левостранен ЯК	Обхващане на колоректум, дистално от лявата дебелочревна флексура
<b>E3</b> - Панколит	Обхващането се разпростира и проксимално от лявата дебелочревна флексура

**Табл. 4. Монреалска класификация за активност на ЯК**

<i>Тежест</i>	<i>Определение</i>
<b>S0</b> – Клинична ремисия	безсимптомна
<b>S1</b> – Лек язвен колит	≤ 4 изхождания дневно (с/без кръв) Без системна болест С нормални стойности на възпалителните маркери
<b>S2</b> – Умерен язвен колит	> 4 изхождания дневно с кръв С минимални белези на системна интоксикация (Hb 105 – 115)
<b>S3</b> – Тежък язвен колит	≥ 6 кървави изхождания дневно + СЧ> 90/мин; Т> 35,5С; Hb <105; СУЕ >30; CRP>30

За да бъдат съпоставими резултатите, използвахме Монреалската класификация (2005) на БК за възраст при дебют (A) и разделихме пациентите с ЯК на същите възрастови групи: A1: < 16 г, A2: < 17 - 40 г, A3: > 40 г.

## Индекс на активност

За оценка на тежестта на ЯК е използван най-често употребявания в клиничната практика Мауо индекс (скор) (Magro F et al., 2017) (Табл. 5). Според сбора на точките за ремисия се приема:  $\leq 2$ ; за лек колит: 3-5; умерено тежък колит: 6-10; тежък ЯК: 11-12.

Табл. 5. Мауо-класификация за оценка на тежестта при язвения колит (DAI = disease activity index)

Мауо индекс	0	1	2	3
Брой дефекации дневно	Нормален брой за пациента	1-2 над нормалния	3-4 над нормалния	>5 над нормалния
Хематохезия	Липсва	Следи	Очевидна	Предимно кървава
Лигавица	Нормална лигавица	Еритем Намален съдов рисунок Лека чупливост	Изразен еритем Липсва тотално съдов рисунок Чупливост на съдовете Ерозии	Спонтанно кървене Язви
Общо състояние, според лекаря	Нормално състояние	Леко увредено състояние	Умерено увредено състояние	Тежко увредено състояние

### 3.2.2. Лабораторни изследвания

При пациентите се събра информация за проведените по време на хоспитализацията лабораторни изследвания – СУЕ, ПКК, С реактивен протеин (CRP), албумин, серумно желязо, феритин, ФКП, както и вирусологични и микробиологични изследвания.

### 3.2.3. Образни изследвания

При пациентите включени в проучването е извършена абдоминална ехография, а при необходимост и допълнителни образни изследвания (КТ, КТ- ентоерография, ЯМР/ МР-ентерография, рентгено-контрастно изследване на ГИТ) с оглед оценка на обхвата на промените.

### 3.2.4. Ендоскопски изследвания

#### 3.2.4.1. Ендоскопски изследвания при БК

Ендоскопията играе съществена роля в диагностиката, определяне на терапевтичното поведение, прогнозата и проследяването на пациентите с ВЧЗ. За разлика от ЯК, където признаците на ендоскопската активност са ясно дефинирани, а при

ФКС промените лесно достъпни, то при БК измененията са пръснати и разнообразни, а промените по хода на тънкото черво не винаги могат да бъдат визуализирани директно. Поради сложността в използването на повечето ендоскопски индекси при БК, обикновено в ежедневната работа отразяването на ендоскопските промени е описателно. За да изпълним заложените цел и задачи в настоящия труд и да систематизираме описателните ендоскопски протоколи, оценихме ендоскопската активност в участъка, от който е взета биопсията за имунохистохимично изследване чрез наскоро валидираната опростена ендоскопска точкова система за оценка на лигавицата при болест на Крон (SEMA-CD, Simplified endoscopic mucosal assessment for Crohn's disease) (Adler J et al.,2021) (Табл.6). За 0 се приема отсъствие на лигавични промени в илеум или колон; 1 - няколко афтозни лезии, останалата лигавица е нормална; 2 - разпръснати афтозни лезии или малки язви, липсват големи язви (т.е. язви > 2 см); 3 - разпръснати големи язви или множество разпръснати малки язви или множество стенози, които позволяват преминаване на ендоскопа; 4 - множество разпръснати големи язви, стеноза, която не може да бъде премината или наличие на видима фистула. По този начин количествено оценихме промените в засегнатите сегменти от гастроинтестиналния тракт и сравнихме степента на ендоскопската активност в засегнатия сегмент и степента на експресия на RIPK3.

Rutgeerts скорът приложихме при пациентите с БК след проведена хирургична интервенция (Rutgeerts P et al.,1990) (Табл. 7).

**Табл.6 Опростената ендоскопска точкова система за оценка на лигавицата при болест на Крон (Simplified endoscopic mucosal assessment for Crohn's disease, SEMA-CD).**

<b>Точки</b>	<b>Илеум/Колон</b>	<b>Описание</b>
<b>0</b>	<b>Ендоскопска ремисия</b>	Отсъствие на лигавични промени в илеум или колон.
<b>1</b>	<b>Минимална активност</b>	Няколко афтозни лезии. Останалата лигавица е нормална.
<b>2</b>	<b>Лека активност</b>	Разпръснати афтозни лезии или малки язви. Няма големи язви (т.е. язви > 2 см).
<b>3</b>	<b>Умерена активност</b>	Разпръснати големи язви или множество разпръснати малки язви. Множество стенози, които могат да бъдат преминати.
<b>4</b>	<b>Тежка активност</b>	Множество разпръснати големи язви. Стеноза, която не може да бъде премината или наличие на видима фистула.

**Табл. 7. Rutgeerts score за стадиране при БК след резекция**

<b>i0</b>	Без рецидив (post-surgery remission)
<b>i1</b>	< 5 афтозни лезии в нео-терминаления илеум = post-surgery remission
<b>i2</b>	> 5 афтозни лезии с нормална лигавица между лезиите (substantial post-surgery recurrence)
<b>i3</b>	Дифузен афтозен илеит с дифузно възпалена лигавица (advanced post-surgery recurrence)
<b>i4</b>	Дифузно възпаление с големи язви, нодули и/или стеснения (advanced post-surgery recurrence)

Rutgeerts score  $\geq$  i2 – ендоскопски рецидив и активност.

### 3.2.4.2. Ендоскопски изследвания при ЯК

При определяне на ендоскопската активност при пациентите с ЯК е използван ендоскопският Mayo score (EMS) (Magro F et al., 2017). (Табл. 8.)

**Табл. 8. Ендоскопско точкуване при ЯК според EMS.**

Скала	0 точки	1 точка	2 точки	3 точки
<b>Endoscopic Mayo Score (EMS)</b>	Нормално	Редуциран съдов рисунък Лека ранимост	Загуба на съдов рисунък Лесна ранимост Ерозии	Язви Спонтанно кървене

### 3.2.5. Хистологични изследвания

Използвани са хистологични материали от готови парафинови блокчета от хистотеката на Клиниката по обща и клинична патология на УМБАЛ „Света Марина“ - Варна, с поставена диагноза болест на Крон, язвен колит и дразним колон от ендоскопски и инцизионни биопсии. Биопсичните материали, постъпили в Клиниката по обща и клинична патология на УМБАЛ „Света Марина“ - Варна, са фиксирани за минимум 24 ч в 10% неутрален формалин, след което са включени в парафин с точка на топене 52-54°C с цел изготвяне на парафинови блокчета. За поставяне на морфологична диагноза са използвани хистологични срези с дебелина 4  $\mu$ m, монтирани върху предметни стъкла и оцветени с хематоксилин и еозин.

Извършена е повторна оценка на биопсиите и подробно се анализирани хистологичните промени в участъците с възпалителна активност.

Основната характеристика на хистологичната активност при ВЧЗ се определя от наличието на активно възпаление на чревната лигавица, изразено с наличието на неутрофилни гранулоцити в епитела и/или лумена на чревните крипти, както и наличието на ерозии и/или разязвявания на lamina propria на червото. Липсата на активно възпаление съответства на хистологична ремисия.



За целите на това проучване са определени хистологичните параметри за възпалителна активност при ВЧЗ - процента на жлезите с криптит, крипт абсцеси, ерозии и улцерации. За криптит - се приема наличието на неутрофилни гранулоцити в епитела на жлезните крипти, за крипт абсцеси - наличието на неутрофилни гранулоцити в лумена на криптите, за ерозии - масивно излющване на лигавичния епител до нивото на muscularis mucosae с подлежаща възпалителна реакция от неутрофилни гранулоцити, а за улцерации – случаите, в които лигавичния дефект преминава отвъд muscularis mucosae на чревната стена.

Използвана бе опростената скорова система на Британското дружество по гастроентерология (British Society of gastroenterology IBD biopsy pathology guidelines ) за оценка на активното възпаление в биопсичните проби при пациентите с ВЧЗ. При нея възпалението е оценено в 4 - степенна скала – неактивна болест, лека, умерена и тежка степен на активност (Feakins RM, 2013). (Табл. 9)

**Табл. 9. Опростена скорова система на Британското дружество по гастроентерология за хистологична оценка на биоптати при ВЧЗ (British Society of gastroenterology IBD biopsy pathology guidelines)**

<i>Степени</i>	<i>Критерии</i>
<i>Неактивна болест</i>	Няма интраепителни неутрофили, ерозии или улцерации
<i>Лека степен на активност</i>	Криптит в < 25 % от криптите или крипт абсцеси до 10 % или и двете
<i>Умерена степен на активност</i>	Криптит в > 25 % от криптите или крипт абсцеси в > 10 % от криптите или редки малки огнища на повърхностни ерозии или комбинация от тези
<i>Тежка степен на активност</i>	Улцерации или множество огнища на ерозии

### **3.2.6. Имунохистохимичен анализ**

#### **3.2.6.1. Използвани антитела, реактиви за оцветяване и работни концентрации**

Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024. Антитялото, реактивите за оцветяване и използваните работни концентрации са представени в табл. 10. и табл. 11.

Използвано е антитялото Anti-RIPK3, с каталожен № ab56164. Антитялото е производство на ABCAM's RabMab technology.

Негативни контроли: При негативните контроли, вместо първичното антитяло, срези от използваните парафинови блокчета се инкубират с нормален неимуни серум.

За позитивни контроли са използвани тъкани от черен дроб, оцветени за Anti-RIPK3.

**Табл.10. Използвани реагенти**

Антитяло	Разреждане	Позитивна контрола	Маркер за	Фирма производител
Anti-RIPK3(ab56164) Rabbit polyclonal to RIP3	1:100	Черен дроб	Некроптоза	ABCAM's RabMab technolog

**Табл. 11. Система за оцветяване и други реактиви**

HRP- DAB System	Оригинална оцветяваща система	Dako
Mayer's hematoxilin	Counterstaining	Dako

### 3.2.6.2. Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване

От биопсичните материали, фиксирани в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета, се приготвят срези с дебелина 4  $\mu\text{m}$ , които се монтират върху силанизиран стъкло.

Депарафинирането се осъществява в низходяща редица от алкохолни концентрации, както следва: Ethanol 100% 3 минути, Ethanol 90% 3 минути, Ethanol 80% 3 минути, Ethanol 70% 3 минути, Xylol 3 x 10 минути. След това срезите се измиват с течаща вода и се поставят в дестилирана вода.

Разкриването на антигените се осъществява с предварително загрят до 65°C работен разтвор En Vision FLEX Target Retrieval Solution в PT Link контейнер. Срезите се инкубират за 20 минути при температура 97°C и pH =9. След охлаждане, пробите се промиват на стайна температура с измиващ буфер FLEX Wash Buffer (20x) за 1-5 минути.

### 3.2.6.3. Имунохистохимичен протокол

Срезите са оцветени по FLEX протокол, като за всички стъпки се използва влажна камера.

Инкубация с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) за 5 минути на стайна температура за блокиране на ендогенната пероксидазна активност. Изплакване с измиващ буфер за 5 мин.

Инкубация с първичното антитяло Анти RIP3 (ab62344) с разреждане за 20 мин. на стайна температура.

Промиване с измиващ буфер за 2 x 5 мин. на стайна температура.

Инкубация с маркиран полимер HRP за 20 мин. на стайна температура.

Промиване с измиващ буфер за 3 x 5 мин. на стайна температура.

Инкубация на срезове с хромоген DAB пероксидазен разтвор за 2 x 5 мин., при непрекъснато микроскопиране.

Промиване с буфер за 2 мин.

Изплакване с дестилирана вода за 2 мин.

Контраоцветяване с Mayer's hematoxylin за 5 мин.

Изплакване на пробите с дестилирана вода за 5 мин.

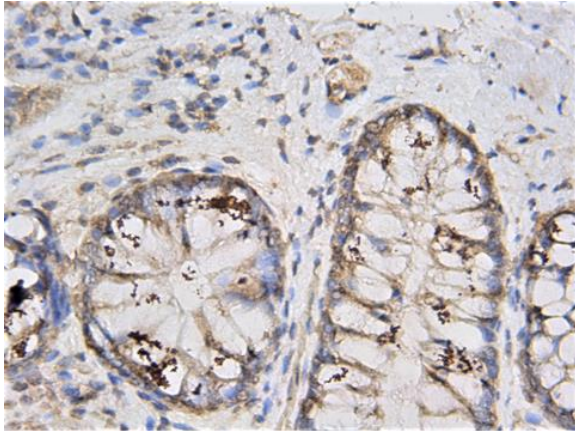
Дехидриране в обратен възходящ ред етанол 70%, етанол 80%, етанол 90%, етанол 100% със същата продължителност както при депарафинирането.

Поставяне в монтираща среда.

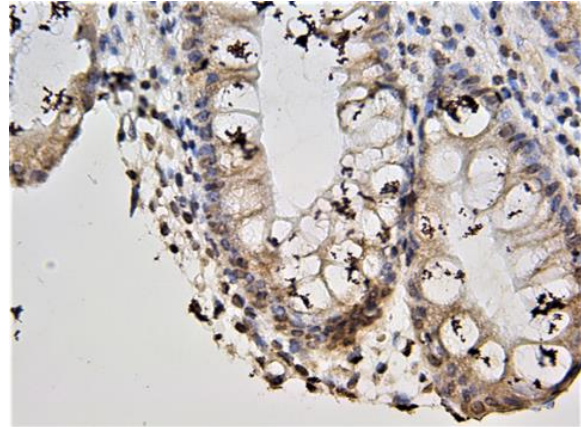
#### **3.2.6.4. Определяне на степента на експресия на RIP3 и интерпретация на резултатите.**

Имунохистохимичната експресия на RIP3 е оценена чрез използване на H-score (хистологичен скор) върху тъканните проби. За всяка клетка се определи интензитета на ядрената експресия, както следва (сн. 1 и сн. 2):

- ( 0 ) - липса на ядрена експресия, ядрата са безцветни
- (1+) - слаба ядрена експресия - ядрата са светложълти до светлокафяви (слабо оцветени)
- (2+) - умерена ядрена експресия - ядрата са светлокафяви (умерено оцветени)
- (3+) - интензивна ядрена експресия - ядрата са тъмнокафяви ( изразено оцветени)



**Сн. 1. Дебелочревна лигавица без възпалителна активност, от контролната група, със слаба експресия**



**Сн. 2. Колит с висока експресия на RIP3: ясно се виждат различните степени на ядрената експресия на антитялото в различните епителни клетки, H-score 218; RIP3 x 400**

Определен е процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет, като накрая H-score е изчислен посредством следната формула:

$$1x (\% \text{ клетки с } 1+) + 2x (\% \text{ клетки с } 2+) + 3x (\% \text{ клетки с } 3+) = \text{H-score (степената на експресия на RIP3)}$$

Така изчислен, диапазонът на H-score варира от 0 до 300.

### 3.2.7. Статистически методи

При обработка на данните е използван статистическия софтуерен пакет – IBM SPSS for Windows, v.20.0.

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост  $p < 0,05$  при доверителен интервал 95%.

- Дисперсионен анализ (ANOVA) за оценка доколко влиянието на даден фактор е статистически значимо или не.
- Вариационен анализ за изследване на количествените характеристики на показателите.
- Анализ за оценка на риска за настъпване на дадено събитие (OR, HR, RR).
- Корелационен анализ за оценка на зависимостта между изследваните показатели. Оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на резултатите

от коефициента на Пийрсън (r) и на Спиърман (p), като коефициентът на Спиърман изчислява корелацията на базата на монотонни взаимоотношения, а на Пийрсън на базата на линейни връзки.

Степента на асоциация между променливите е определяна като:

- $0 < r(p) < 0.3$  – слаба корелация
  - $0.3 < r(p) < 0.5$  – умерена корелация
  - $0.5 < r(p) < 0.7$  – значителна корелация
  - $0.7 < r(p) < 0.9$  – висока корелация
  - $0.9 < r(p) < 1$  – много висока корелация
- Регресионен анализ за оценка на възможните функционални зависимости между изследваните показатели. Изследване на причинно-следствените връзки.
  - ROC curve анализ за определяне на cut-off стойността, за разграничаване на ниска и висока експресия на изследваните антитела.
  - Прогностичен анализ – Positive predictive value (PPV) за определяне на прогностичната стойност за настъпване на дадено събитие според конкретната извадка.

$$PPV = \frac{\text{Броя на истински положителните отговори}}{\text{Броя на истински положителните отговори} + \text{Броя на фалшиво положителните отговори}}$$

- Прогностичен анализ - Negative predictive value (NPV) за определяне на прогностичната стойност за настъпване на дадено отрицателно събитие според конкретната извадка

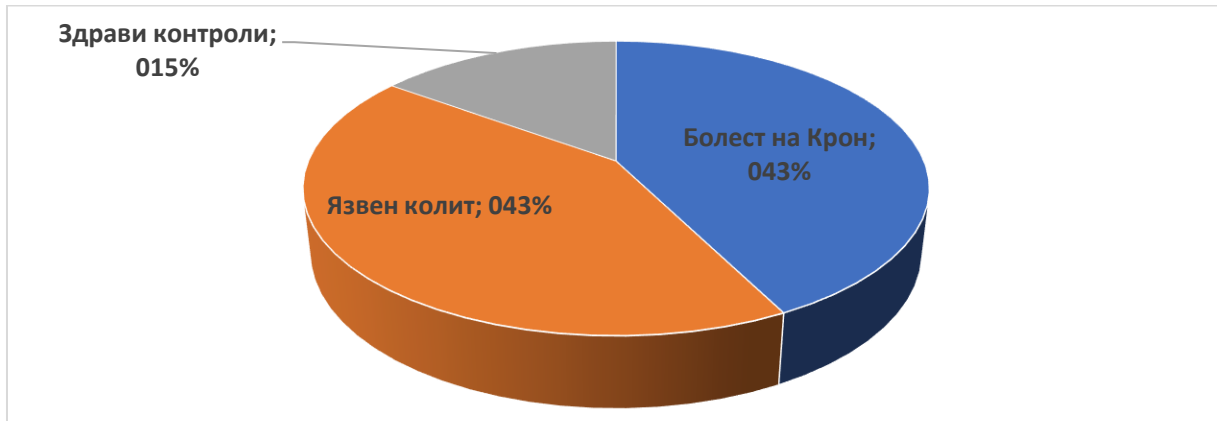
$$NPV = \frac{\text{Броя на истински отрицателните отговори}}{\text{Броя на истински отрицателните отговори} + \text{Броя на фалшиво отрицателните отговори}}$$

- Сравнителен анализ (оценка на хипотези) –  $\chi^2$ , t-test Student's за сравняване на количествени и качествени показатели и изследване на разликата между тях.
- Графичен и табличен метод на изобразяване на получените резултати.

## РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Характеристика на изследваните групи и определяне на праговите стойности на RIPK3

Експресията на RIPK3 е изследвана при 200 лица, от които 170 са с ВЧЗ и 30 са здрави контроли, като разпределението е представено на Фиг. 10.



**Фиг. 10.** Разпределение на пациентите според изследваните групи

На табл. 12 е представена характеристика на изследваните пациенти и контролната група.

От лицата с ВЧЗ 50.6 % (86) са мъже и 49.4 % (84) – жени на средна възраст към момента на наблюдение 41.67 г.  $\pm$  14. г., като минималната възраст е 18 г., а максималната 83 г.

Установена е съществена разлика във възрастта на изследваните лица ( $p < 0.001$ ), като пациентите с БК са най-млади.

Сигнификантна разлика се установява и по отношение на пола ( $p = 0.015$ ), като при пациентите с БК и здравите контроли преобладават жените, докато при пациентите с ЯК преобладават мъжете.

По отношение на локализацията при пациентите с БК 27 (31.8%) пациенти са с илеална локализация (L1), 15 (17.6%) – с колонна локализация (L2) и 36 (42.4 %) – с илео-колонна локализация (L3) (Табл. 12). Седем (8.3 %) от пациентите с БК имат и засягане на горен ГИТ.

Най-голям процент са пациентите с панколит (E3) - 46/54.1%, следвани от ляв колит (E2) - 38/44.7% и само един пациент е с проктит (E1).

Табл. 12. Обща характеристика на изследваните лица

Показател		Болест на Крон (n=85)	Язвен колит (n=85)	Здрави контроли (n=30)
Възраст, год.	mean±SD (range)	40.8±14.0 (18.0-74.0)	42.6±15.9 (18.0-83.0)	53.3±13.1 (28.0-81.0)
Пол	Мъже	40/47.1%	46/54.1%	7/23.3%
	Жени	45/52.9%	39/45.9%	23/76.7%
Локализация БК/ЯК*	L1/E1	27/31.8%	1/1.2%	-
	L2/E2	15/17.6%	38/44.7%	-
	L3/E3	36/42.4%	46/54.1%	-
	L1+L4	2/2.4%	-	-
	L2+L4	1/1.2%	-	-
	L3+L4	4/4.7%	-	-
Форма на протичане*	B1	41/48.2%	-	-
	B2	27/31.8%	-	-
	B3	4/4.7%	-	-
	B2+B3	13/15.3%	-	-
Давност на ВЧЗ, год.	mean±SD (range)	4.2±4.1 (0-20)	4.6±5.2 (0-20)	-
CDAI	Ремисия	3/3.5%	-	-
	Лека активност	29/34.1%	-	-
	Умерена активност	48/56.5%	-	-
	Тежка активност	5/5.9%	-	-
S (severity)* Тежест на протичане	Ремисия	-	-	-
	Лека активност	-	7/8.2%	-
	Умерена активност	-	26/30.6%	-
	Тежка активност	-	52/61.2%	-
Mayo score (DAI)	Ремисия	-	-	-
	Лека активност	-	9/10.6%	-
	Умерена активност	-	59/69.4%	-
	Тежка активност	-	17/20.0%	-
Ендоскопски Mayo score	Лека активност	-	12/14.2 %	-
	Умерена активност	-	28/32.9%	-
	Тежка активност	-	45/52.9%	-
Екстраинтестинални прояви		54/63.5%	51/60.0%	-
Тромбоемболични усложнения		5/5.9%	1/1.2%	-
Интестинални усложнения		64/75.3%	19/22.4%	-
Придружаващи заболявания		61/71.8%	30/35.3%	-
Операция		26/30.6%	3/3.5%	-
Лечение	5-АСА	65/87.8%	64/87.7%	-
	КС	30/40.5%	22/30.1%	-
	Имуномодулатори	24/32.4%	11/15.1%	-
	Биологично лечение	24/28.2%	8/9.4%	-

С удебелен шрифт е представено p<0.05 \*Монреалска класификация

Установи се, че при пациентите с БК интестиналните усложнения имат значително по-голяма честота в сравнение с пациентите с ЯК (съответно 75.3 % за БК към 22.4 % за ЯК;  $p < 0.001$ ). Може да се каже, че в настоящото изследване интестиналните усложнения корелират силно с БК ( $r = 0.530$ ;  $p < 0.001$ ).

Съществена разлика се установи и по отношение на придружаващите заболявания ( $p < 0.001$ ), като при пациентите с БК се наблюдава по-висока честота на тази група заболявания. Установена е умерена зависимост между наличието на придружаващи заболявания и БК ( $r = 0.366$ ;  $p < 0.001$ ).

По отношение на проведените операции се установява, че при пациентите с БК има 10 пъти повече оперативни намеси в сравнение с пациентите с ЯК (съответно 30.6 % към 3.5 %;  $p < 0.001$ ). Установена е и умерена зависимост между оперативната намеса и БК ( $r = 0.360$ ;  $p < 0.001$ ).

При пациентите с БК относителният дял на лицата, които се лекуват с имуномодулатори е два пъти по-висок в сравнение с този при пациентите с ЯК ( $p = 0.011$ ). Наблюдава се слаба зависимост между лечението с имуномодулатори и БК ( $r = 0.204$ ;  $p = 0.013$ ).

Резултатите от анализа показват, че биологичната терапия се е прилагала по-често при пациентите с БК ( $p = 0.006$ ), като се установява слаба зависимост ( $r = 0.245$ ;  $p = 0.001$ ).

Пациентите с дебют са 26 (15.3%), от които 12 (46.2 %) са с БК и 14 (53.8 %) с ЯК. От пациентите с БК при дебют 41.7 % са жени и 58.3 % са мъже, при пациентите с ЯК разпределението мъже:жени е 50:50. Не се установява и разлика по отношение на средната възраст при дебют на заболяването, като при пациентите с БК тя е 36.75 г. ± 19.21 г., а при пациентите с ЯК е 38.0 г. ± 14.26 г.

На табл. 13 е представена характеристика на пациентите според лабораторните показатели. Установява се съществена разлика между нивата на ФКП при пациентите с БК и пациентите с ЯК ( $p = 0.042$ ), като при първите е значително по-нисък. При останалите показатели не се наблюдава значима разлика между двете групи пациенти.



**Табл. 13. Обща характеристика на изследваните лица – лабораторни показатели**

Показател		Болест на Крон (n=85)	Язвен колит (n=85)
СУЕ	mean±SD (range)	62.65±33.69 (3.0-120.0)	51.08±31.37 (6.0-120.0)
	Не е повишен	27/31.8%	28/32.9%
	Повишен	58/68.2%	57/67.1%
CRP	mean±SD (range)	45.79±52.53 (0.78-232.0)	35.72±52.45 (0.11-270.0)
	Не е повишен	19/22.4%	22/25.9%
	Повишен	66/77.6%	63/74.1%
Левкоцити	mean±SD (range)	9.55±4.04 (4.0-26.90)	9.38±3.42 (3.40-20.20)
	Не са повишени	55/64.7%	55/64.7%
	Повишени	30/35.3%	30/35.3%
Тромбоцити	mean±SD (range)	369.0±130.4 (48.0-917.0)	375.9±127.7 (137.0-791.0)
	Норма	68/80.0%	64/75.3%
	Понижени	1/1.2%	1/1.2%
	Повишени	16/18.8%	20/23.5%
Албумин	mean±SD (range)	39.69±5.74 (24.0-53.0)	38.32±6.73 (22.0-53.0)
	Норма	76/89.4%	71/83.5%
	Понижен	9/10.6%	14/16.5%
Феритин	mean±SD (range)	75.62±105.59 (0-432.0)	125.39±195.72 (6.70-668.0)
	Норма	7/36.8%	10/50.0%
	Понижен	11/57.9%	8/40.0%
	Повишен	1/5.3%	2/10.0%
Хемоглобин	mean±SD (range)	125.31±20.50 (53.0-165.0)	124.04±18.32 (70.0-166.0)
	Норма	51/60.0%	48/56.5%
	Понижен	33/38.8%	37/43.5%
Fe	mean±SD (range)	9.29±6.94 (0.60-34.0)	7.67±4.68 (1.0-24.0)
	Норма	29/34.1%	21/24.7%
	Понижено	56/65.9%	64/75.3%
<b>ФКП</b>	<b>mean±SD (range)</b>	<b>703.19±597.29 (39.9-1747.0)</b>	<b>1636.38±1393.63 (359.0-5910.0)</b>

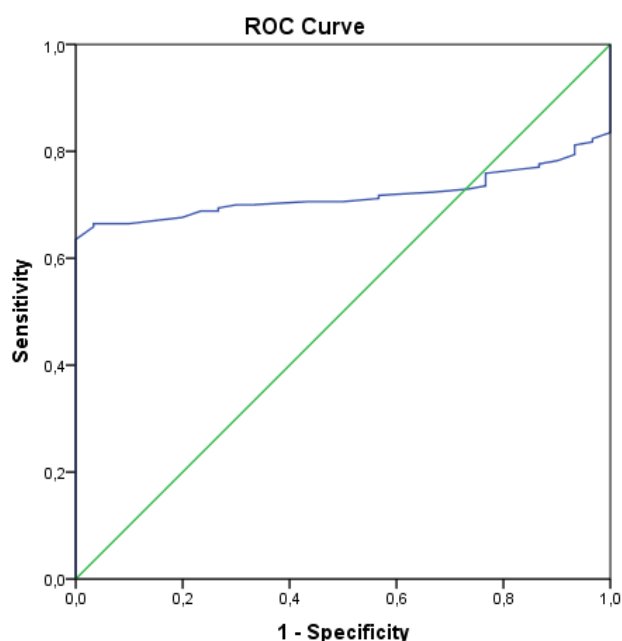
С удебелен шрифт е представено  $p < 0.05$ .

Поради липсата на валидирани референтни стойности на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ с помощта на ROC curve анализ са изчислени праговите стойности на маркера. На табл. 14 са представени праговите стойности (Cut-off) на експресията на RIPK3 за разграничаване на пациенти с ВЧЗ от здрави контроли, както и за разграничаване на пациенти с БК и ЯК. На тази таблица също така е представена чувствителността и специфичността на RIPK3, както и положителната предсказваща стойност (PPV) и негативната предсказваща стойност (NPV).

**Табл. 14. Прагова стойност на RIPK3 за разграничаване на ВЧЗ от здрави контроли**

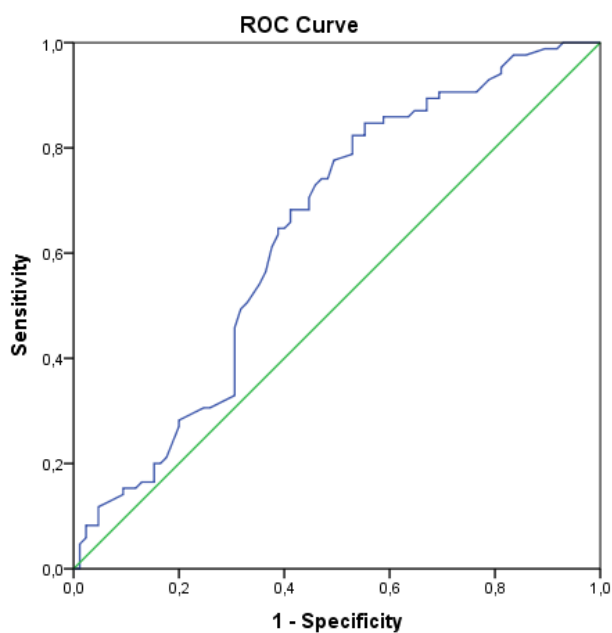
	Cut-off	AUC 95%CI	P value	Чувствителност/ Специфичност	PPV	NPV
Разграничаване на здрави контроли от пациенти с ВЧЗ	163.5	0.718 (0.653-0.784)	<0.001	70.0%/70.0%	92.9%	29.2%
Разграничаване на здрави контроли от пациенти с БК	174.5	0.418 (0.335-0.502)	0.048	45.9%/46.1%	100 %	39.5%
Разграничаване на здрави контроли от пациенти с ЯК	179.5	0.696 (0.621-0.770)	<0.001	68.2%/70.0%	100 %	52.6%
Разграничаване на пациенти с БК от пациенти с ЯК	185.5	0.642 (0.558-0.726)	0.001	61.2%/62.4%	61.9%	61.6%

При определянето на праговата стойност на ядрената експресия на RIPK3 за разграничаване на здравите контроли от пациентите с ВЧЗ се установи cut-off -163.5 (AUC = 0.718 (0.653-0.784);  $p < 0.001$ ) със сензитивност и специфичност 70 % (Фиг. 11).



**Фиг. 11. ROC curve анализ за определяне на праговата стойност на RIPK3 за разграничаване на здравите контроли от пациентите с ВЧЗ**

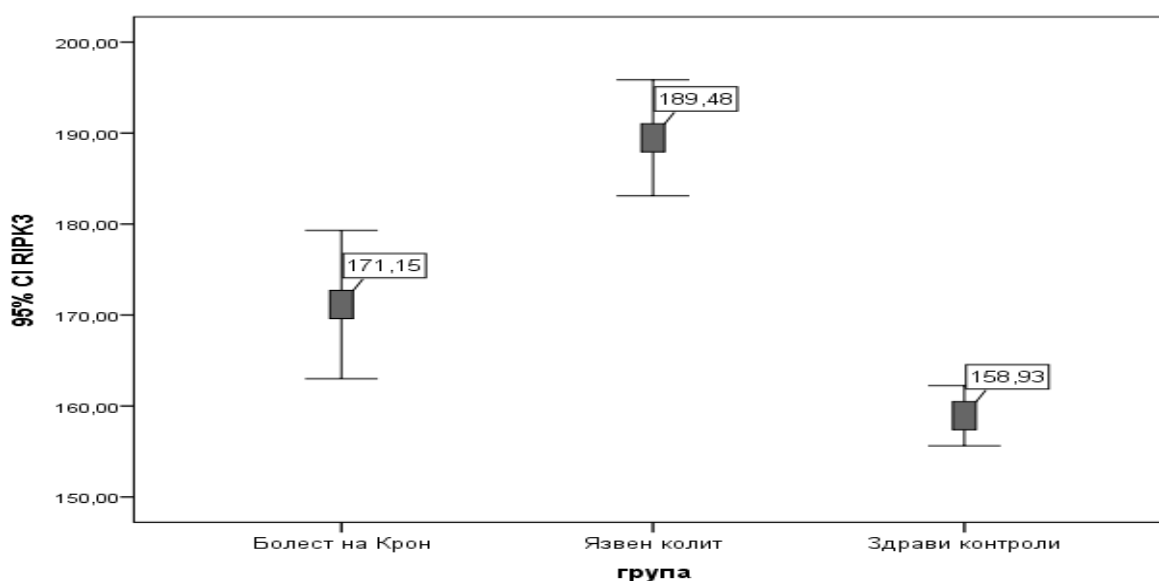
При определянето на праговата стойност на ядрената експресия на RIPK3 за разграничаване на пациентите с ЯК от пациентите с БК се установи cut-off -185.5 (AUC = 0.642 (0.558-0.726);  $p = 0.001$ ) със сензитивност 61.2% и специфичност 62.4% (Фиг. 12)



**Фиг. 12. ROC curve анализ за определяне на праговата стойност на RIPK3 за разграничаване на пациентите с ЯК от пациентите с БК**

При изследване на връзката между нивата на експресията на RIPK3 и наличието на ВЧЗ, се установи че високата експресия корелира с наличието на ВЧЗ спрямо здравите контроли ( $r=0.398$ ;  $p<0.001$ ).

Установи се наличието на съществена разлика в ядрената експресия при пациенти с БК, ЯК и лицата от контролната група, като най-ниска експресия се наблюдава при здравите контроли (158.9), а най-висока при пациентите с ЯК (189.4) (Фиг. 13)



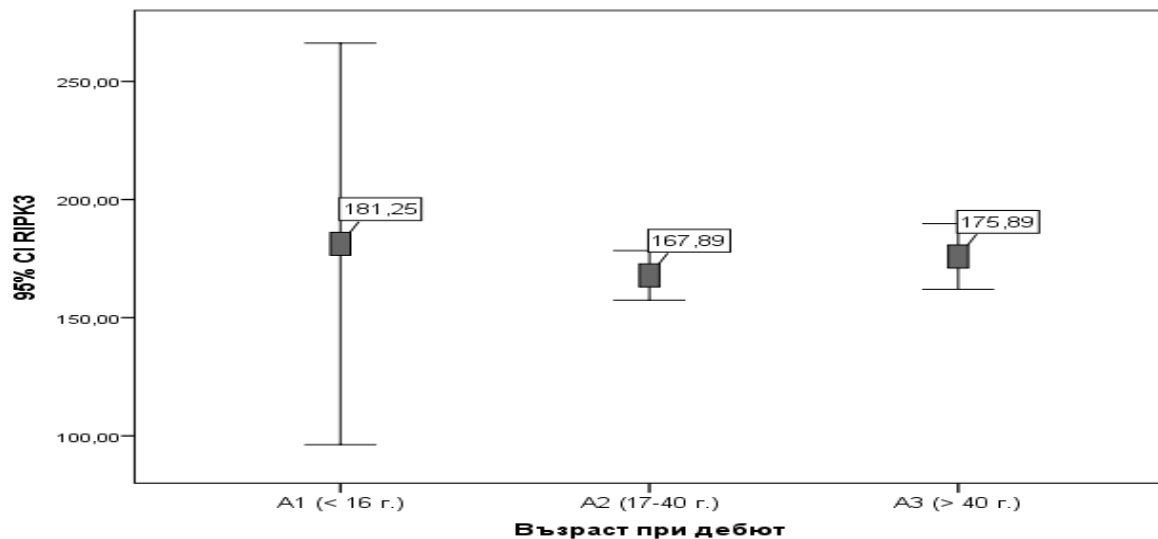
**Фиг. 13. Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3**

При допълнителен анализ на експресията на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ и здрави контроли се установи, че високата експресия на маркера води до 4.14 пъти по-висок риск за висока активност на ВЧЗ (RR=4.15 (2.01-8.57); p<0.001).

При оценката за разграничаване на пациентите с БК и пациентите с ЯК според експресията на RIPK3, се установи, че високата експресия се свързва с над 2 пъти по-голяма вероятност пациентите с ВЧЗ да имат ЯК (RR=2.61 (1.41-4.85); p<0.05).

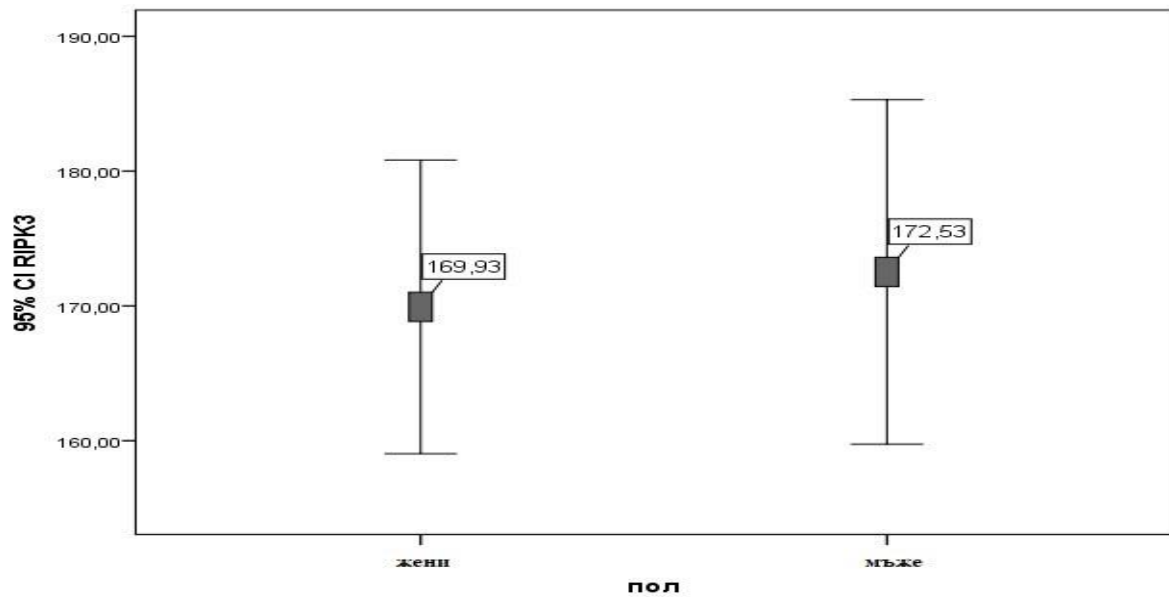
#### 4.2. Изследване на нивото на експресията на RIPK3 в ендоскопски, променените участъци или чревен резектат при пациенти с БК и съпоставяне с клиничните, лабораторните, ендоскопски и хистологични индекси на активност.

При анализа на връзката между експресията на RIPK3 и възрастта на пациентите с БК и давността на заболяването, не се намери зависимост между показателите. Съществена разлика не се установява и по отношение на експресията на RIPK3 според възрастта при дебют на БК, като пациентите с дебют в най-ниската възрастова група (A1 < 16 г) показват по-високи нива на експресията на маркера в сравнение с останалите (Фиг. 14).



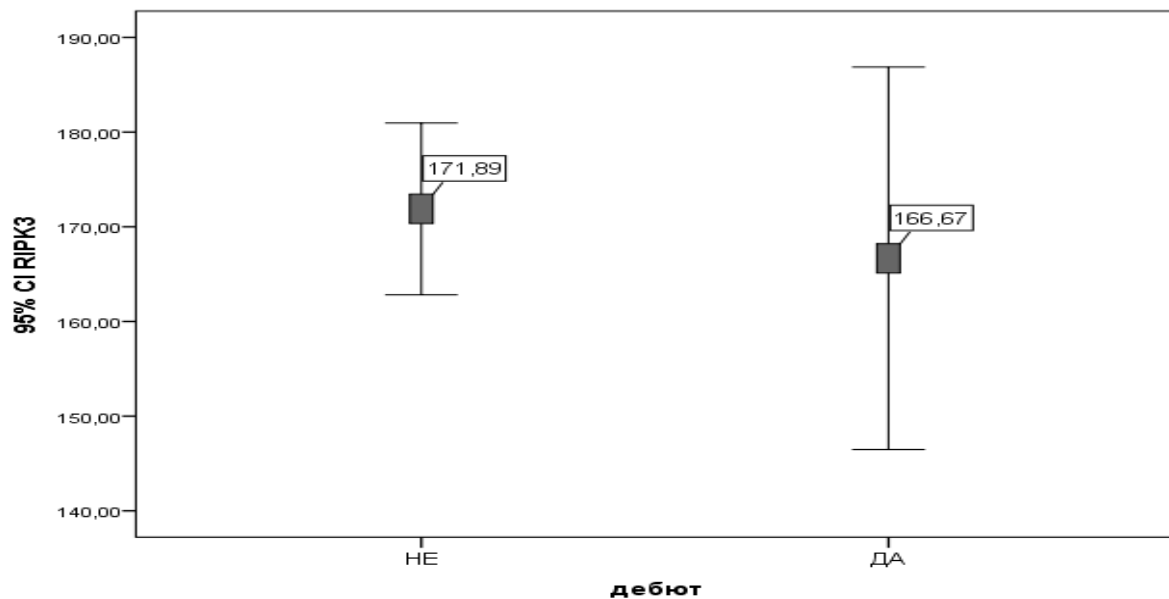
Фиг. 14. Средни стойности на RIPK3 според възрастовата група на пациентите с БК при дебют

Връзка не беше установена и по отношение на пола, въпреки, че при жените експресията е малко по-ниска (Фиг. 15).



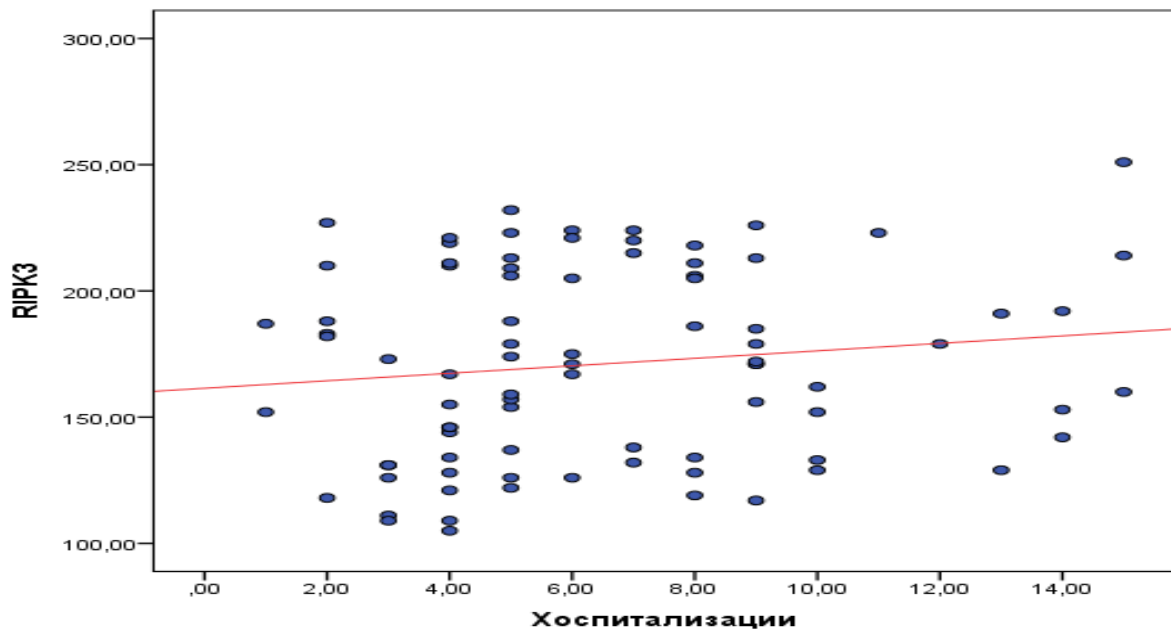
**Фиг. 15. Средни стойности на експресията на RIPK3 според пола**

От изследваните пациенти само 12 (14.1 %) са с дебют на БК, като при тези пациенти се наблюдава малко по-ниска експресия на RIPK3 (Фиг. 16).



**Фиг. 16. Средни стойности на RIPK3 при пациенти с дебют на БК**

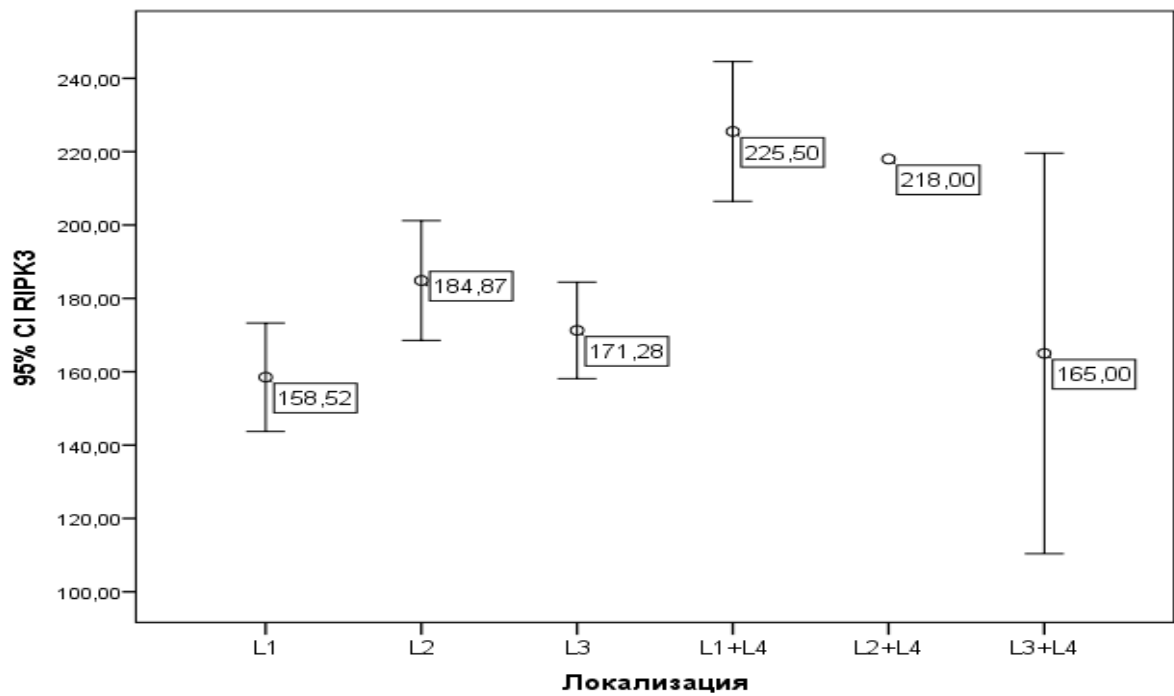
Средният брой хоспитализации на пациентите с БК е  $6.54 \pm 3.48$ , като минималния брой е 1, а максималния 15. Въпреки, че не е статистически значима се установява слаба положителна зависимост между броя на хоспитализациите и експресията на RIPK3 ( $r=0.213$ ;  $p=0.137$ ) (Фиг. 17).



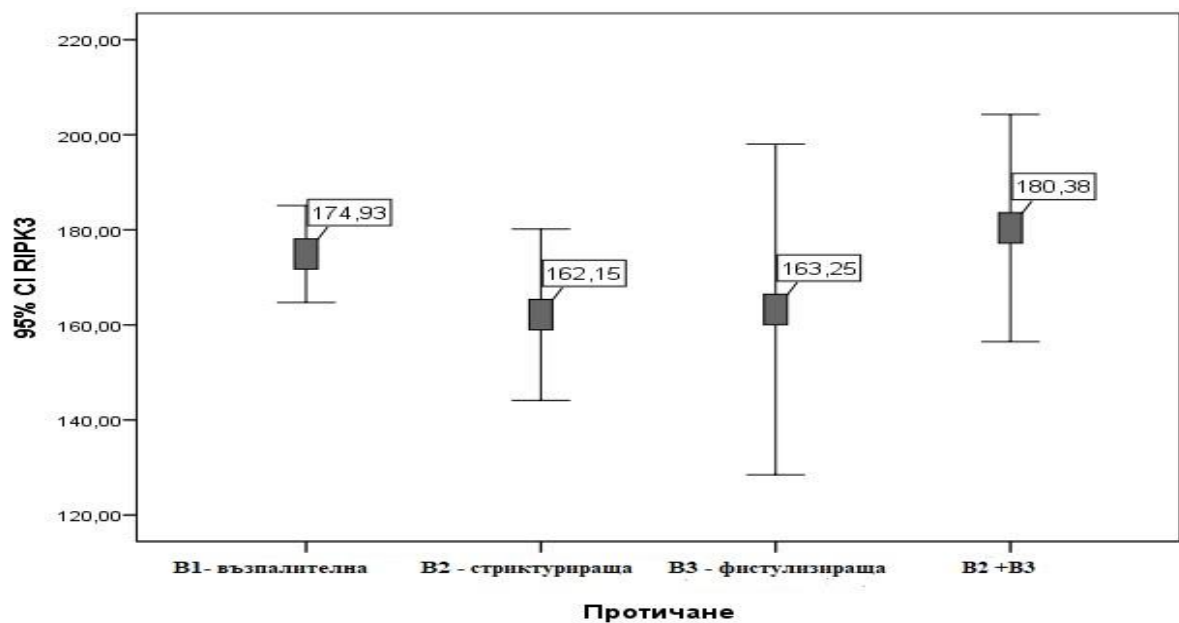
**Фиг. 17. Корелационен анализ между броя на хоспитализациите и експресията на RIPK3**

Установи се съществена разлика в експресията на RIPK3 според локализацията на БК ( $p < 0.05$ ), като най-висока експресия на RIPK3 има в илеум (L1) и колон (L2) при екстензивен обхват на заболяването със засягане и на горен ГИТ (L4) – L1+L4 (225.50) и L2 + L4 (218.00). От друга страна засягането само на терминален илеум (L1) се откроява с най-ниска експресия на маркера (158.52), докато колонната локализация запазва позицията си на локализация, характеризираща се с висока експресия на RIPK3 (184.87) (Фиг. 18).

Не се установява съществена разлика в експресията на RIPK3 според формата на протичане, като при пациентите със стриктурираща и фистулираща форма почти не се наблюдава разлика в експресията на маркера (Фиг. 19). Въпреки това, най-висока експресия на маркера има при фенотип B2 +B3 - стриктурираща с фистулираща форма, следвана от възпалителната форма (B1).



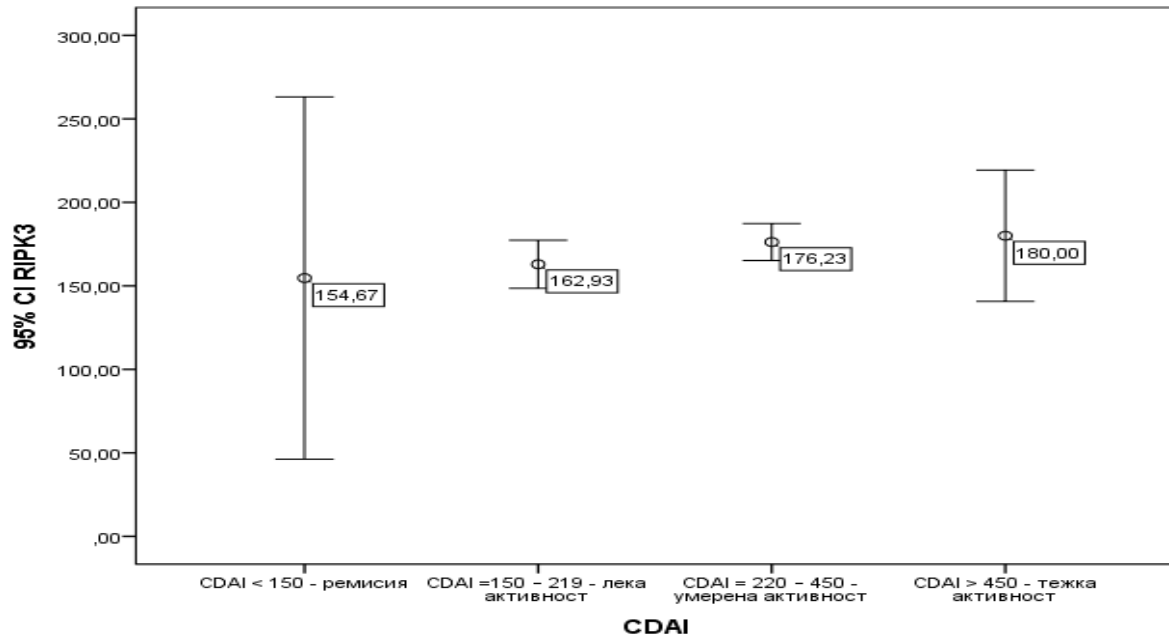
**Фиг. 18.** Средни стойности на експресията на RIPK3 според локализацията на БК



**Фиг. 19.** Средни стойности на експресията на RIPK3 според формата на протичане на БК

Перианалната болест допълнително води до повишаване на експресията на RIPK3, като пациентите с БК, които имат придружаваща перианална болест се характеризират с висока експресия на маркера (съответно 181.85 към 167.86 за тези без перианална болест;  $p < 0.05$ ).

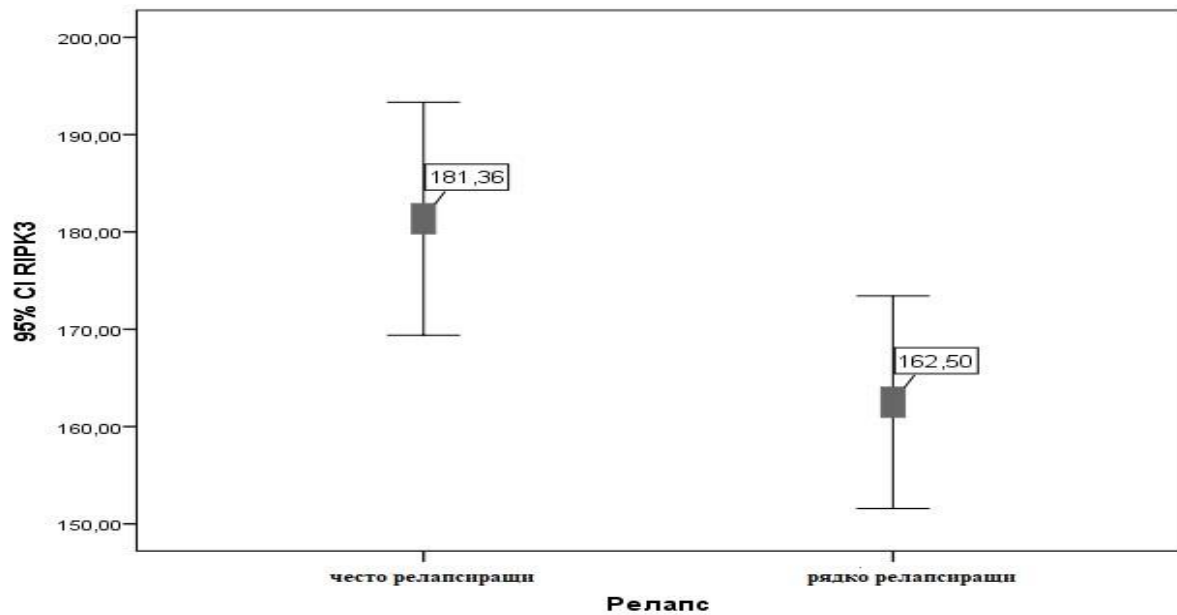
Наблюдава се тенденция към повишаване на експресията на RIPK3 с клиничната активност при БК (CDAI) ( $p=0.038$ ), като пациентите в ремисия имат най-ниска експресия (154.67), докато пациентите с тежка активност имат свръхекспресия на маркера (180.0) (Фиг. 20).



**Фиг. 20. Средни стойности на експресията на RIPK3 според клиничната активност на БК**

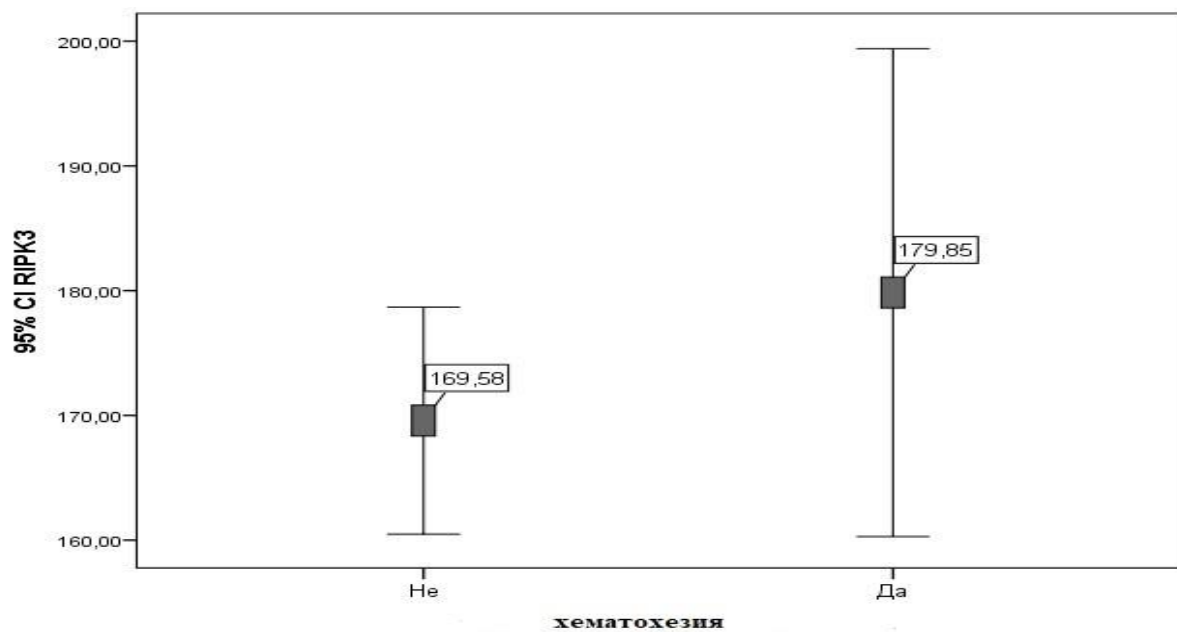
Пациентите, които често правят релапси ( $\geq 2$  пъти в годината) имат значително по-висока експресия на RIPK3 спрямо тези, които са рядко релапсиращи ( $\leq 1$  път годишно) (съответно 181.36 към 162.50;  $p=0.021$ ) (Фиг. 21). Установена е правопрпорционална слаба зависимост между честотата на релапсиране и експресията на RIPK3 ( $r=0.250$ ;  $p=0.021$ ), която показва, че с увеличаването на релапсите се повишава и експресията на маркера.





**Фиг. 21. Средни стойности на експресията на RIPK3 според честотата на релапсиране при пациентите с БК**

Не беше намерена връзка между експресията на RIPK3 и някои клинични показатели, като например честота на диаричните изхождания по време на хоспитализацията. От друга страна хематохезията се свързва с по-висока експресия на маркера ( $p=0.043$ ) (Фиг. 22).



**Фиг. 22. Средни стойности на експресията на RIPK3 според наличието на хематохезия**

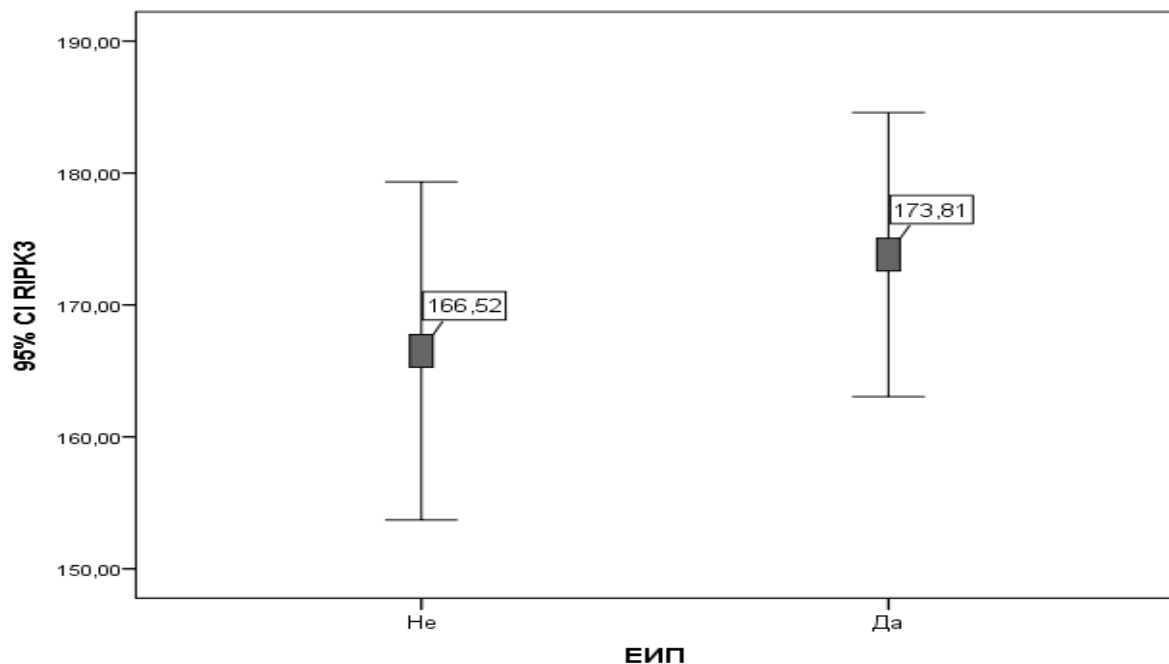
Въпреки, че няма сигнификантна разлика, наличието на коремната болка също се свързва с по-висока експресия на RIPK3 (съответно 171.88 за пациенти с БК и коремна болка и 166.27 за пациенти с БК без коремна болка). С палпираща се коремна формация са само двама пациенти с БК, които имат значително завишени стойности на ядрената експресия на маркера ( $191.50 \pm 41.72$ ).

Интересен е фактът, че при пациентите с установена загуба на тегло се наблюдава понижена експресия на RIPK3 ( $160.84 \pm 39.02$ ), докато при пациентите с БК, при които няма отчитане на промяна в теглото експресията на маркера се запазва висока ( $175.45 \pm 36.79$ ).

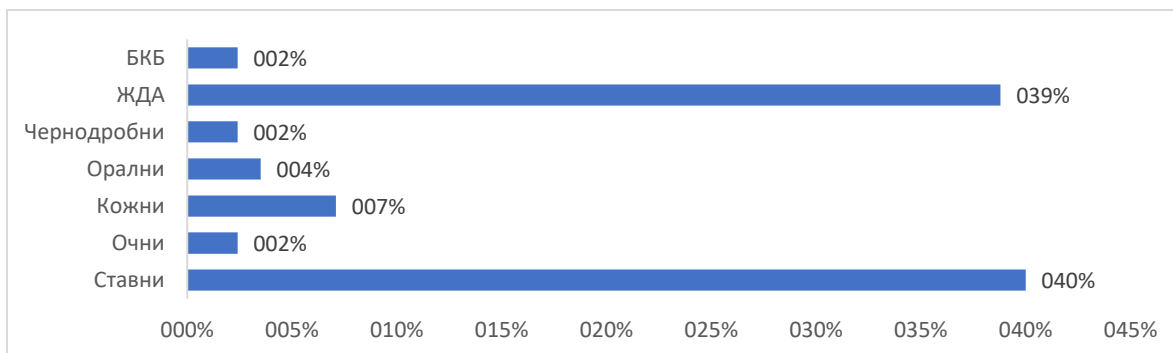
Както е показано в Таблица 12 с ЕИП са 63.5 % от пациентите с БК, които имат средна стойност на експресията на RIPK3  $173.81 \pm 39.45$  (Фиг. 23), която е по-висока в сравнение с пациентите, при които липсват ЕИП.

С най-голяма честота са ставните прояви (40.0 %) и ЖДА (38.8 %) (Фиг. 24).

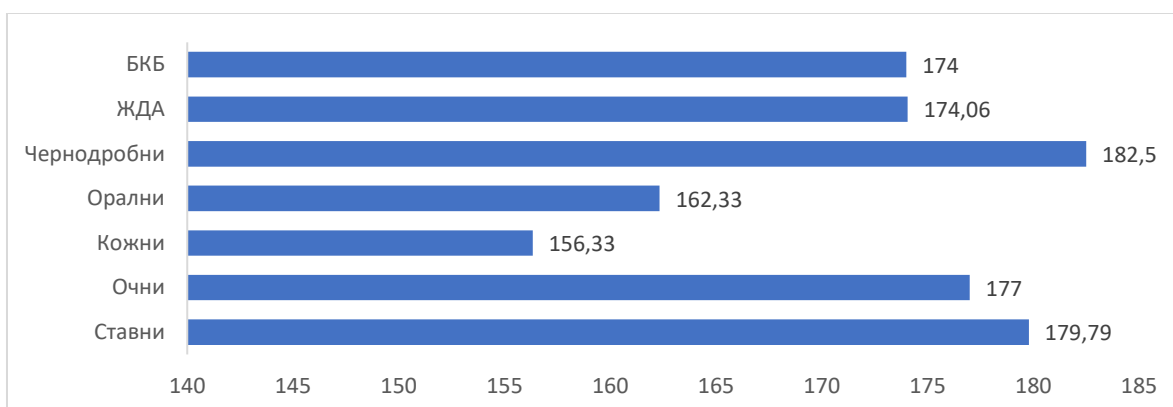
Установена е съществена разлика в експресията на RIPK3 при отделните видове ЕИП ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 25). С най-ниска експресия на маркера са пациентите с кожни прояви (156.33), а с най-висока експресия са пациентите с чернодробни ЕИП (чернодробна стеатоза) (182.5).



**Фиг. 23. Средни стойности на експресията на RIPK3 според наличието на ЕИП**

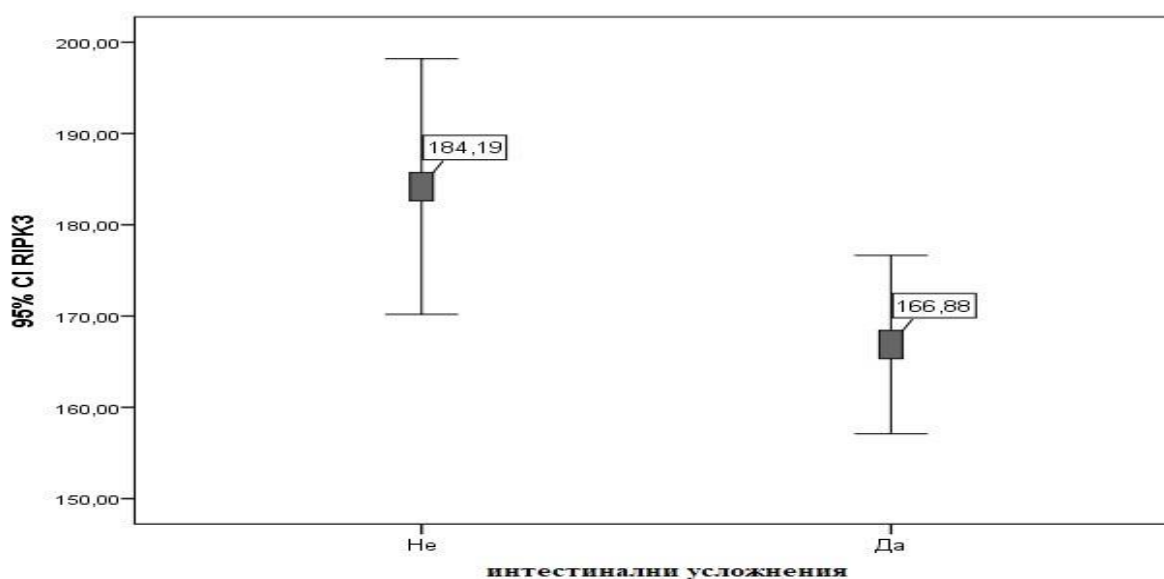


**Фиг. 24. Видове ЕИП при пациентите с БК**



**Фиг. 25. Средна експресия на RIPK3 според видовете ЕИП при пациентите с БК**

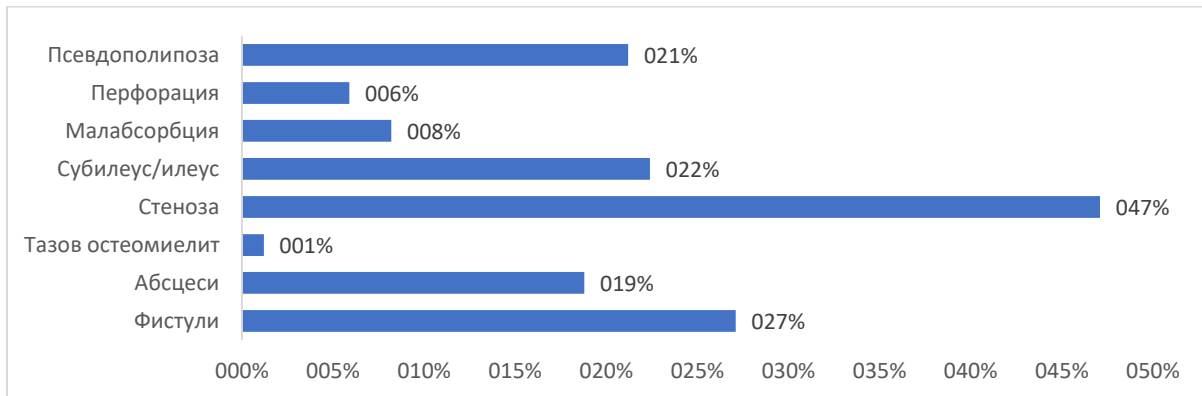
Не се установява съществена разлика в експресията на RIPK3 според наличието или отсъствието на тромбоемболични усложнения, което може да се дължи и на малкия брой пациенти (5 пациенти).



**Фиг. 26. Средни стойности на RIPK3 според наличието или липсата на интестинални усложнения**

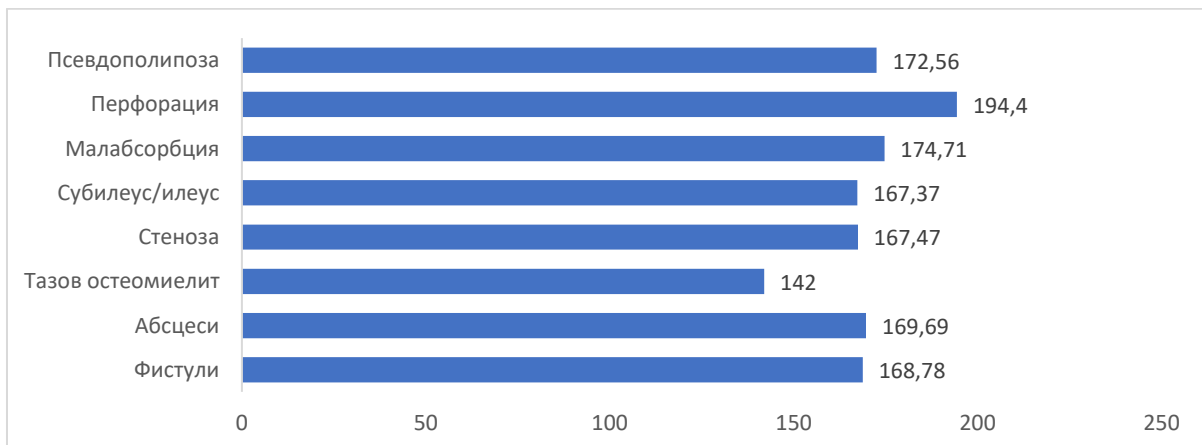
При пациентите с интестинални усложнения (стеноза, фистули, абсцеси, псевдополипоза, субилеус, илеус, малабсорбция и други показани на Фиг.27) се наблюдава значително по-ниска експресия на RIPK3 в сравнение с тези без усложнения ( $p=0.048$ ) (Фиг. 26).

От интестиналните усложнения с най-голяма честота са стенозите (47.1 %) и фистулите (27.1 %). Тазовият остеомиелит е проява при един пациент (Фиг. 27).



**Фиг. 27. Разпределение на пациентите с БК според типа интестинални усложнения**

Установена е съществена разлика в експресията на RIPK3 при отделните типове интестинални усложнения ( $p<0.05$ ) (Фиг. 28).

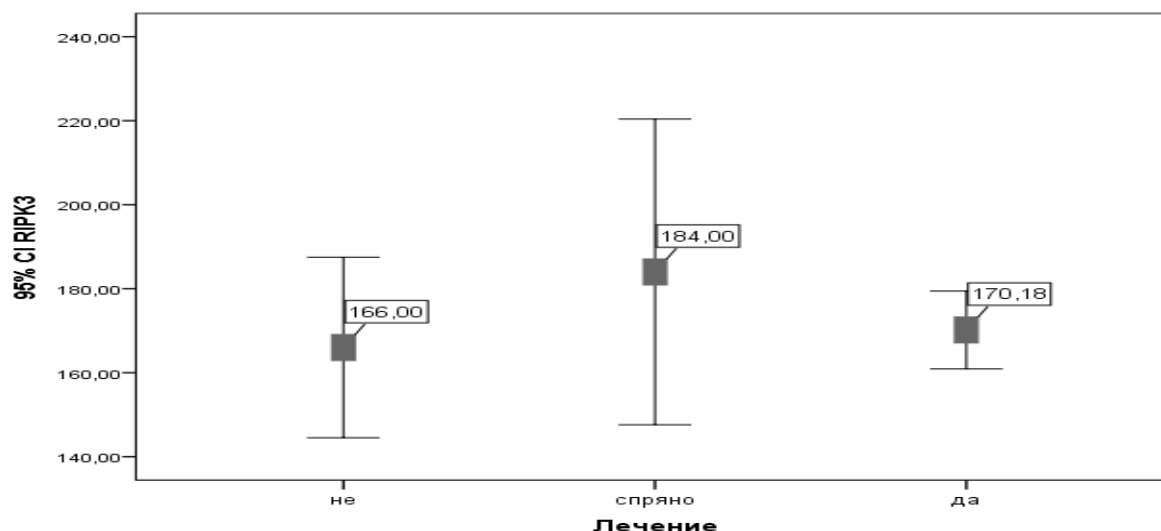


**Фиг. 28. Средна стойност на експресията на RIPK3 според типа интестинални усложнения**

Оперативна интервенция са претърпели 30.6 % от пациентите с БК, като средната стойност на експресията на RIPK3 е  $168.08 \pm 45.06$ . Пациентите с апендектомия в миналото имат най-ниски нива на експресията на маркера (156.22), докато при тези с

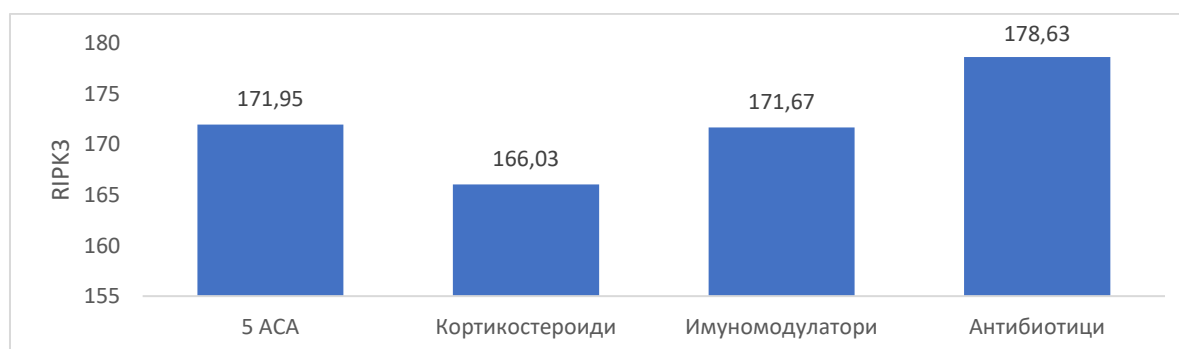
хемиколектомия и резекция на тънко черво се установява висока експресия (съответно 184.14 и 183.60).

Установена е съществена разлика по отношение на експресията на RIPK3 между пациентите с БК, при които е спряна конвенционалната терапията и тези, които са на лечение ( $p=0.036$ ) (Фиг. 29). Групата на пациентите без лечение включват 10 пациента с дебют на БК, приемали противодиарийни средства до поставяне на диагнозата.



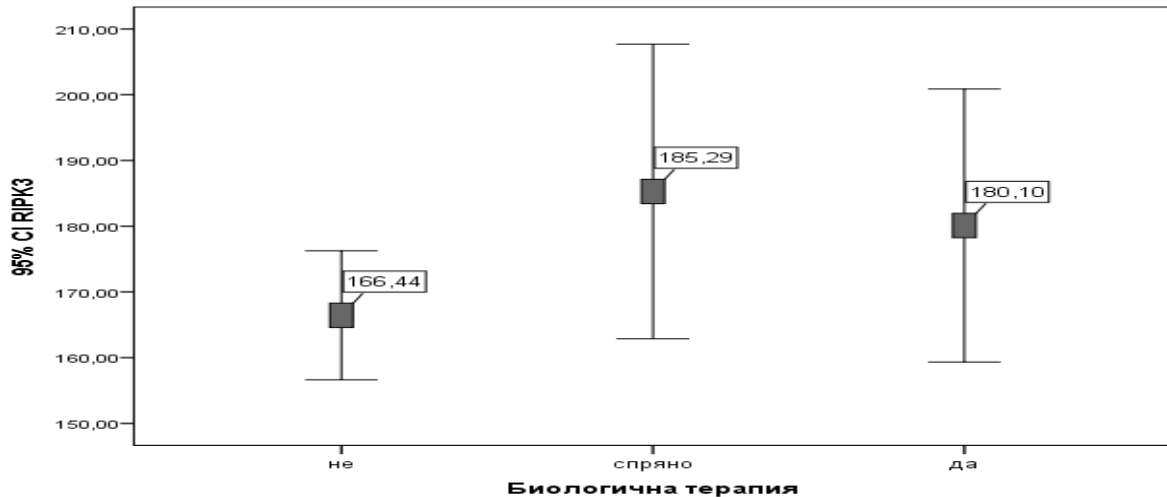
**Фиг. 29. Средни стойности на експресията на RIPK3 според провеждането на лечение**

На фиг. 30 са представени резултатите от анализа на експресията на RIPK3 според вида на провежданата терапия. Резултатите показват, че с най-ниска експресия са пациентите с БК на кортикостероидна терапия. Докато лечението с имуномодулатори и 5-АСА (5-аминосалицилова киселина) не показва съществена разлика в нивата на експресията на маркера.



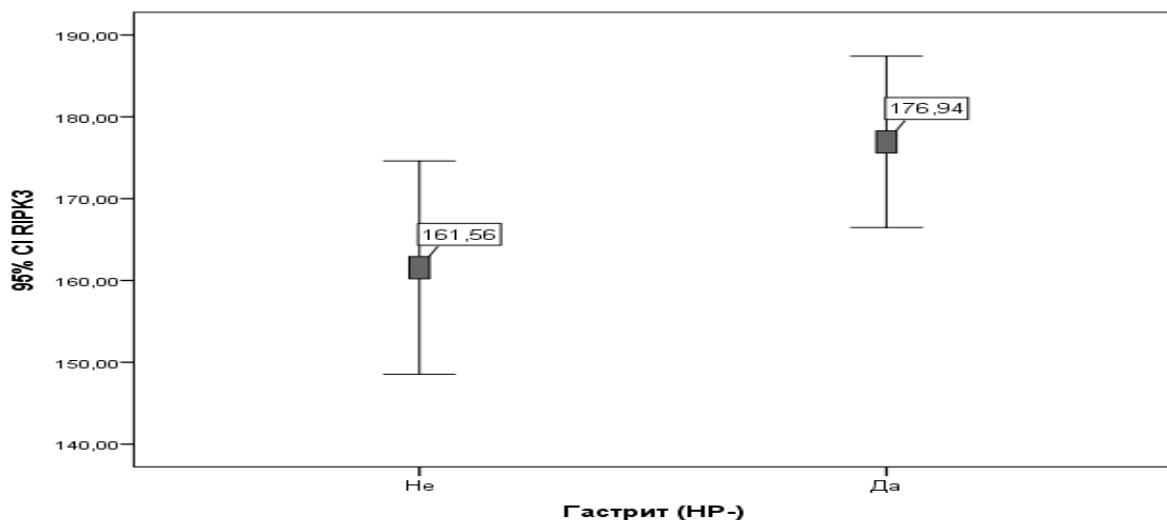
**Фиг. 30. Средна стойност на експресията на RIPK3 според вида на проведената терапия**

Пациентите с БК, които в момента провеждат биологична терапия или са провеждали биологично лечение имат свръхекспресия на маркера за некроптоза. Тези, които не са на биологична терапия имат по-ниска експресия на RIPK3 ( $p=0.018$ ) (Фиг. 31). Това са пациенти с дебют на БК и такива на конвенционално лечение.



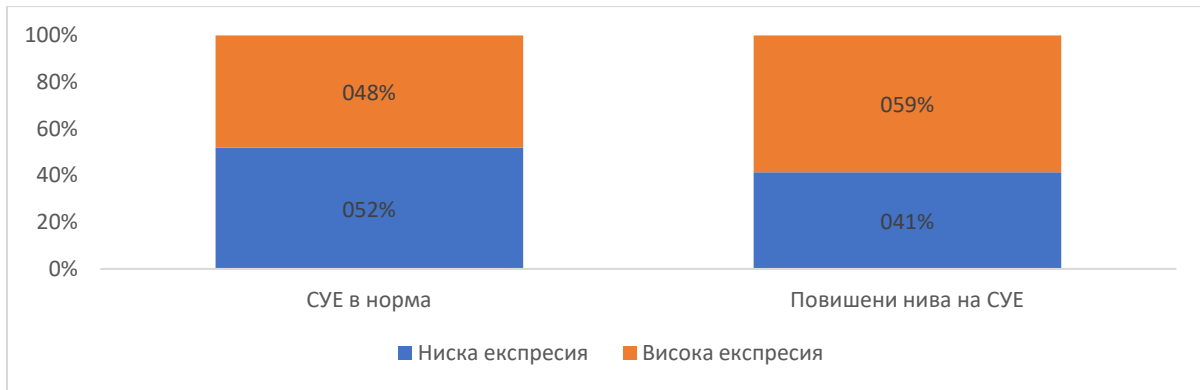
**Фиг. 31. Средни стойности на експресията на RIPK3 според провежданата биологична терапия**

Значителната част от пациентите с БК (71.8 %) имат различен брой придружаващи заболявания, като експресията на RIPK3 при тях е  $173.51 \pm 37.33$ . Над половината от пациентите имат придружаващ гастрит, НР (-) (62.4 %) и 15.3 % имат ХБ. Сравнителният анализ на експресията на RIPK3 според наличието на гастрит показва съществена разлика ( $p < 0.05$ ), като пациентите с хроничен гастрит имат по-висока експресия на маркера (Фиг. 32)



**Фиг. 32. Средна стойност на експресията на RIPK3 според наличието на гастрит НР(-)**

Не се установи зависимост между нивата на СУЕ и RIPK3, но може да се каже, че при лицата с нормални нива на СУЕ малко над половината са с ниска експресия на RIPK3 <163.5, докато над половината от пациентите с повишени нива на СУЕ имат висока експресия на маркера (Фиг. 33)



**Фиг. 33. Разпределение на пациентите с БК според нивата на СУЕ и експресията на RIPK3**

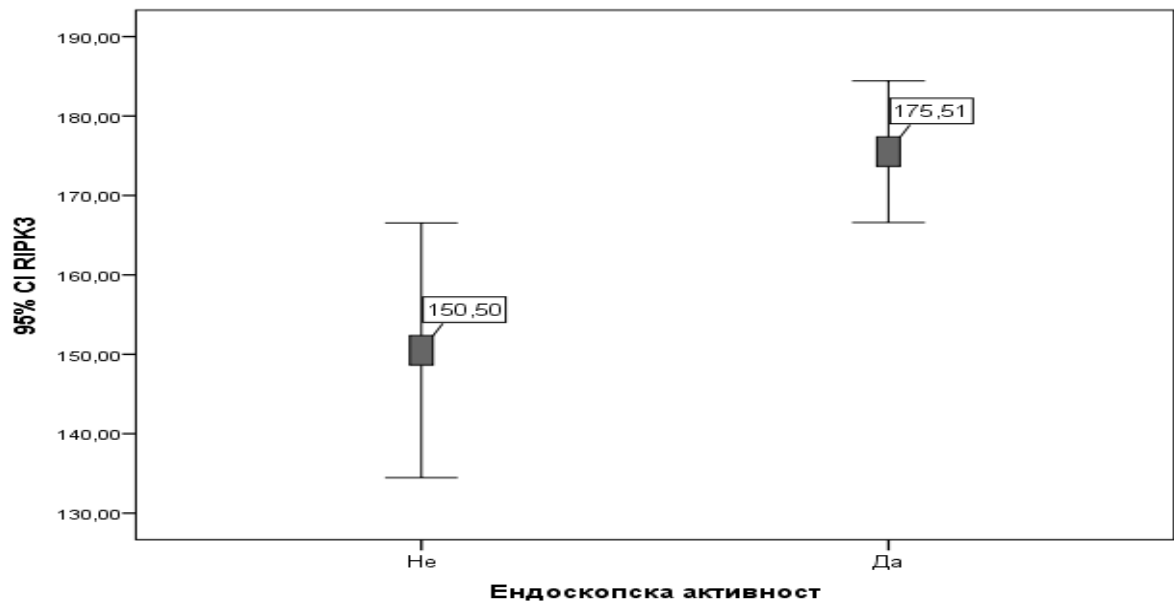
Не се установява зависимост и по отношение на нивата на CRP и експресията на RIPK3 като преобладават пациентите с повишена експресия, независимо от нивата на CRP. Подобна тенденция се установява и по отношение на нивата на левкоцитите, тромбоцитите, албумина, феритина, хемоглобина и серумното желязо.

Не се установява зависимост между наличието на съпътстваща чревна инфекция с *C. Difficile* и ядрената експресия на RIPK3, като може да се каже, че пациентите с инфекция имат по-ниска експресия на маркера (съответно 144.00 и 172.65 за пациенти с БК без инфекция).

Установена е съществена разлика и правопрпорционална слаба зависимост между ядрената експресия на RIPK3 при пациенти с и без ендоскопска активност ( $r=0.236$ ;  $p=0.031$ ) (Фиг. 34).

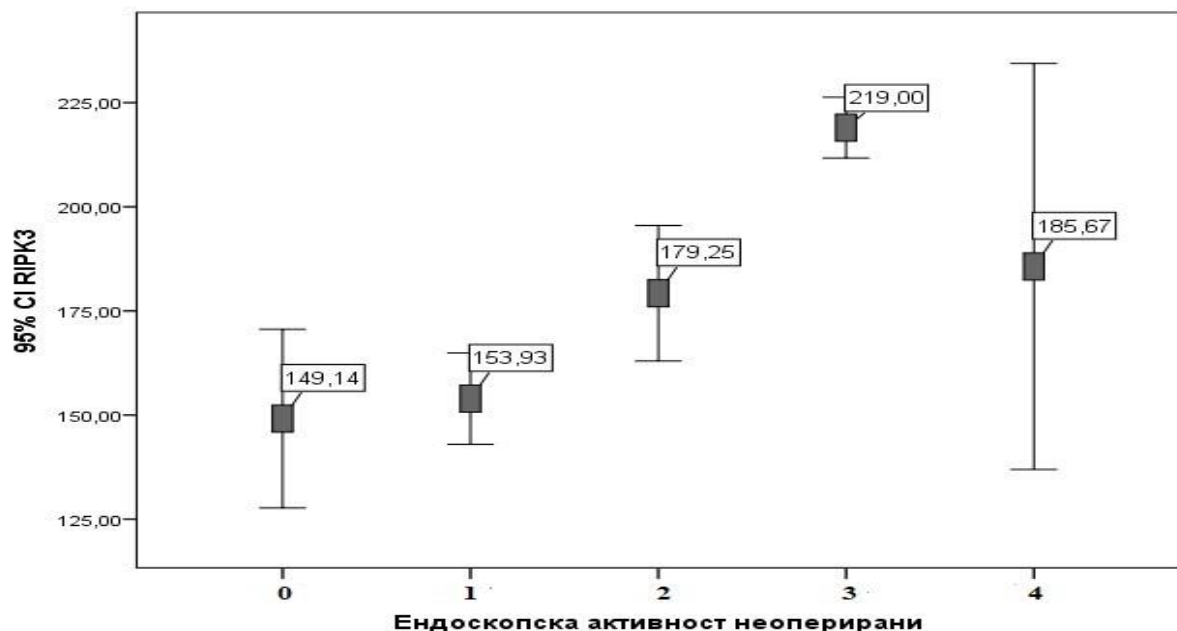
При 8 пациенти с БК диагнозата е поставена интраоперативно по повод илеус, като установената експресия на RIPK3 в резектата е 197.5 ( $p=0.038$ ).

При други 10 пациенти е изследвана ендоскопската активност постоперативно, която е оценена с Rutgeerts score. Не се установява съществена разлика в експресията на маркера за некроптоза при стойностите на Rutgeerts score от 1 до 3.



**Фиг. 34. Средни нива на ядрената експресия на RIPK3 според ендоскопската активност**

При по-голямата част от пациентите, които не са преминали оперативна намеса ендоскопската активност е оценена чрез опростената ендоскопска точкова система (SEMA-CD, Simplified endoscopic mucosal assessment for Crohn's disease), като се установи съществена разлика в експресията на RIPK3 според съответната степен ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 35).

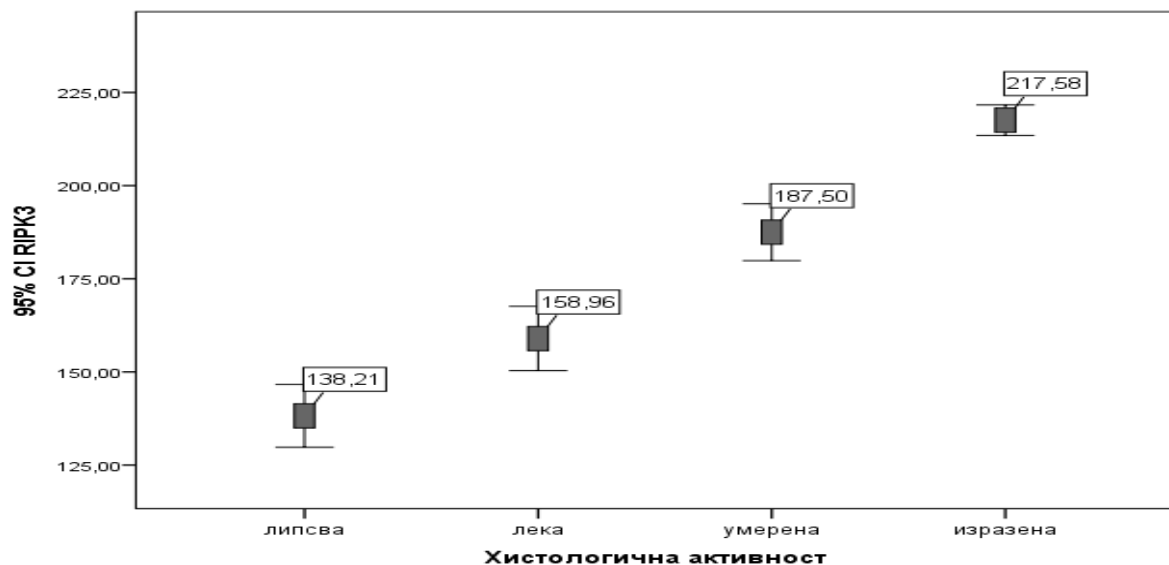


**Фиг. 35. Средни стойности на RIPK3 според опростената ендоскопска точкова система за оценка на ендоскопската активност при болест на Крон (SEMA-CD).**



Според установените резултати може да се каже, че независимо дали експресията на RIPK3 е изследвана в интраоперативен материал или в ендоскопски биоптати, при Rutgeerts score или SEMA- CD над 3 се наблюдава свръхекспресия на маркера.

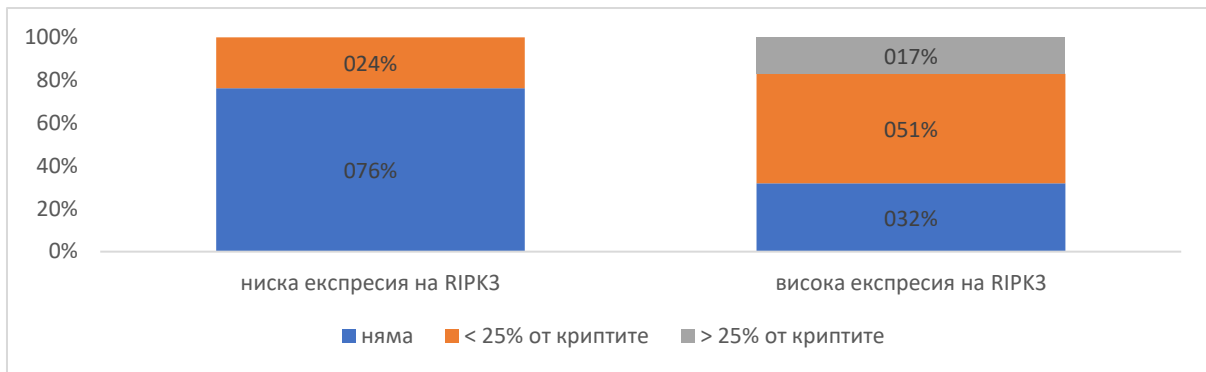
При сравняване на експресията на RIPK3 с хистологичната активност се установи, че с увеличаване на възпалителната активност нарастват и нивата на експресията на маркера ( $p < 0.001$ ). При пациентите с БК и изразена хистологична активност стойностите на експресията на маркера за некроптоза са два пъти по-високи в сравнение с тези на пациентите без активност (съответно 217.57 към 138.21) (Фиг. 36).



**Фиг.36. Средни стойности на експресията на RIPK3 според хистологичната активност на пациентите с БК**

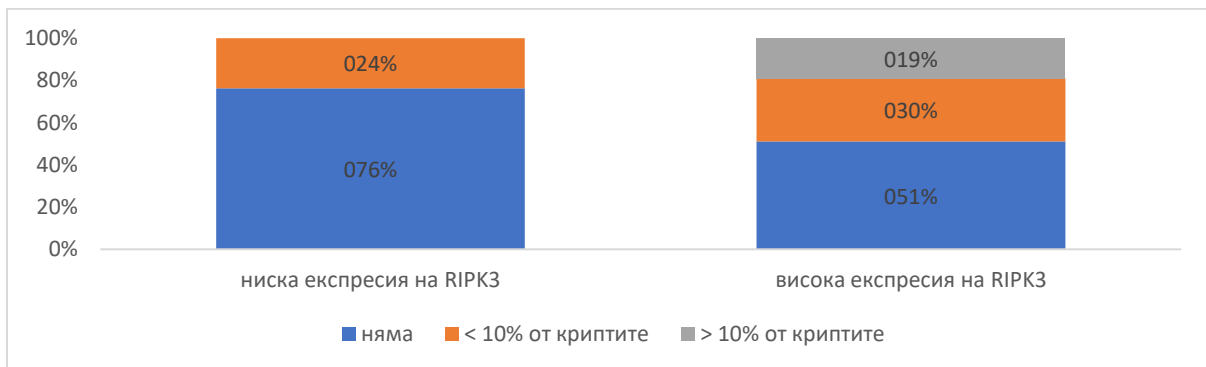
Установи се силна правопрпорционална зависимост между хистологичната активност и експресията на RIPK3 ( $r=0.874$ ;  $p < 0.001$ ), като 76.4 % от случаите високата експресия на маркера за некроптоза е свързана с висока възпалителна активност при пациентите с БК.

При дебелочревна локализация на БК, анализът на хистологичните проби показва, че с нарастването на процента на крипити се увеличава и експресията на маркера за некроптоза ( $r=0.464$ ;  $p < 0.001$ ) (Фиг. 37).



**Фиг. 37. Експресия на RIPK3 според процента на засягане на криптите**

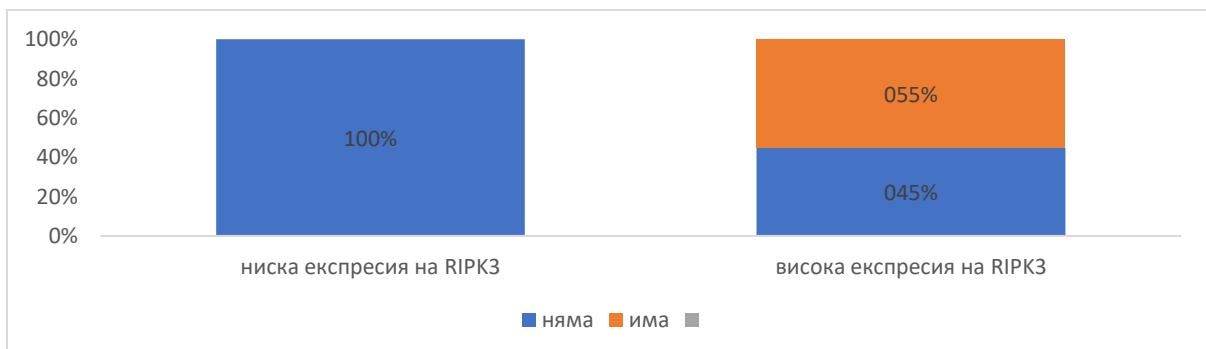
Подобна тенденция се установява и по отношение на крипт абсцесите (Фиг. 38). Експресията на RIPK3 корелира правопрпорционално умерено с процента на откритите крипт абсцеси ( $r=0.325$ ;  $p=0.002$ ).



**Фиг. 38. Експресия на RIPK3 според процента на крипт абсцесите**

Установява се силна зависимост между ерозиите и високата експресия на RIPK3 ( $r=0.597$ ;  $p<0.001$ ) (Фиг. 39).

По отношение на грануломите не се установява разлика в експресията на RIPK3.

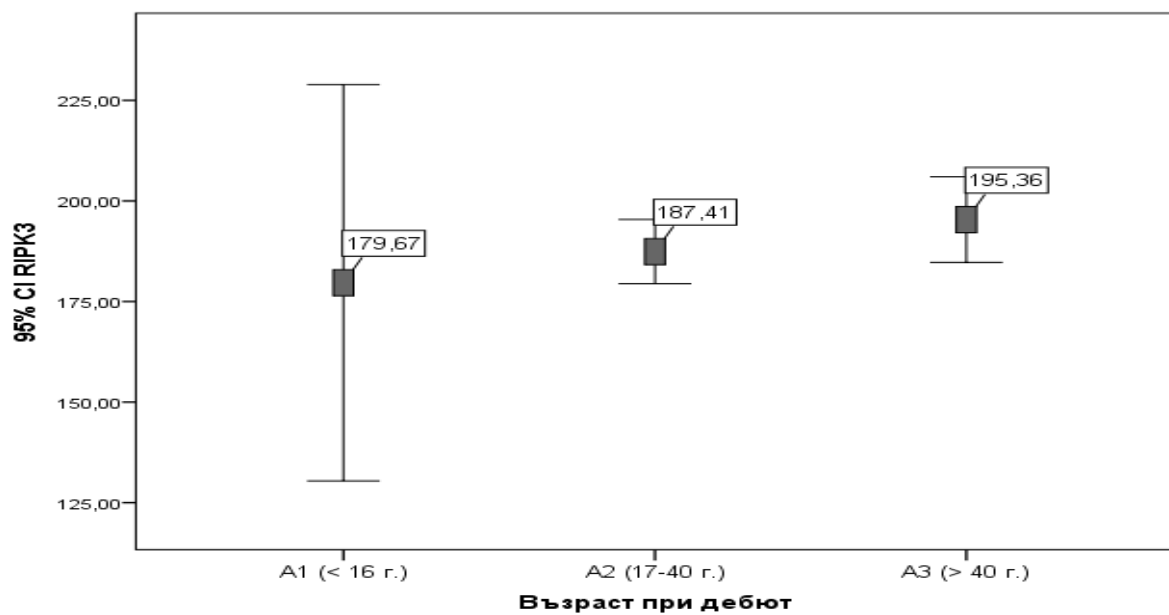


**Фиг. 39. Експресия на RIPK3 според наличието на ерозии**

#### 4.3. Изследване на нивото на експресията на RIPK3 в ендоскопски променените участъци при пациенти с ЯК и съпоставяне с клиничните, лабораторните, ендоскопски и хистологични индекси на активност.

При анализа на връзката между експресията на RIPK3 и възрастта на пациентите с ЯК и давността на заболяването не се установи зависимост между показателите.

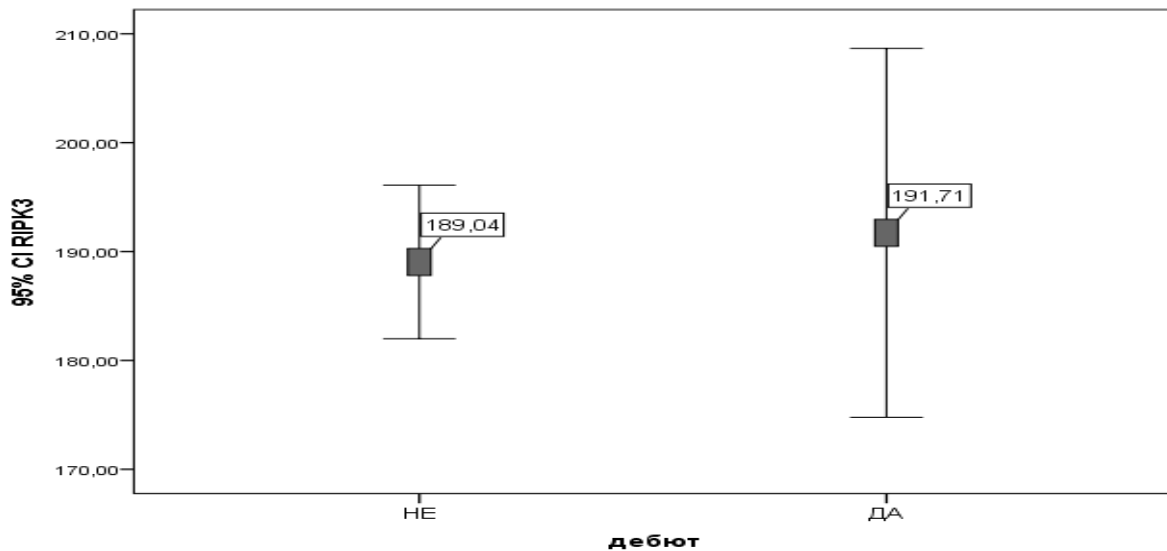
Съществена разлика не се установява и по отношение на експресията на RIPK3 според възрастта при дебют на ЯК, като се наблюдава тенденция за повишаване на експресията с увеличаване на възрастта (Фиг. 40).



Фиг. 40. Средни стойности на RIPK3 според възрастовата група на пациентите с ЯК при дебют

Не беше установена връзка и между маркера за некроптоза и пола, като и при двата пола експресията на маркера е 189.

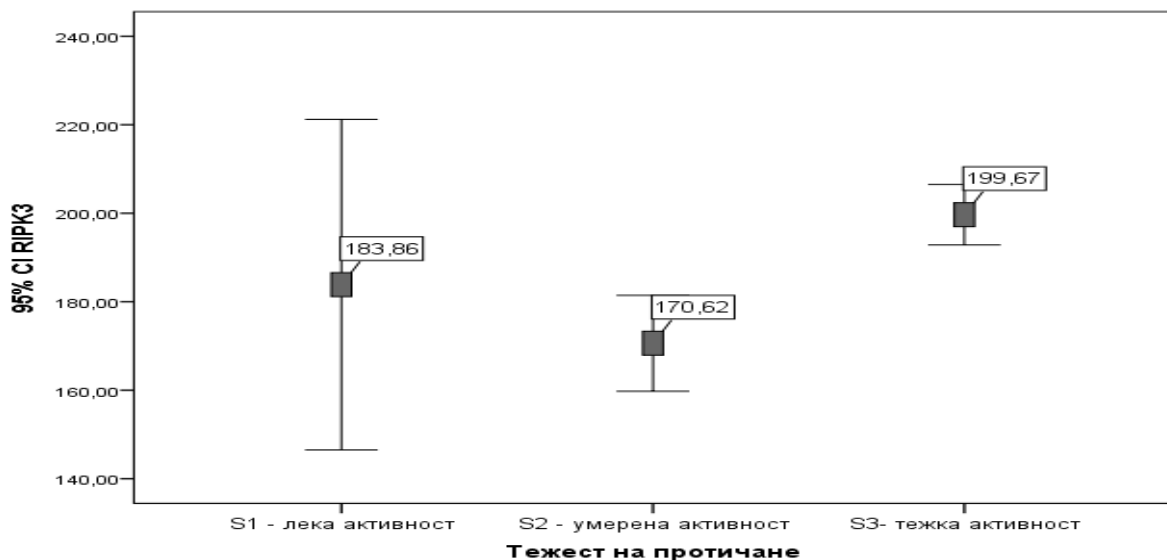
От изследваните пациенти само 14 (16.5 %) са с дебют на ЯК, като при тези пациенти се наблюдава малко по-висока експресия на RIPK3 (Фиг. 41).



**Фиг. 41. Средни стойности на RIPK3 при пациенти с дебют на ЯК**

Средният брой хоспитализации на пациентите с ЯК е  $4.99 \pm 2.93$ , като минималния брой е 1, а максималния 15. Не се установява зависимост между броя на хоспитализациите и експресията на RIPK3 при тази група пациенти.

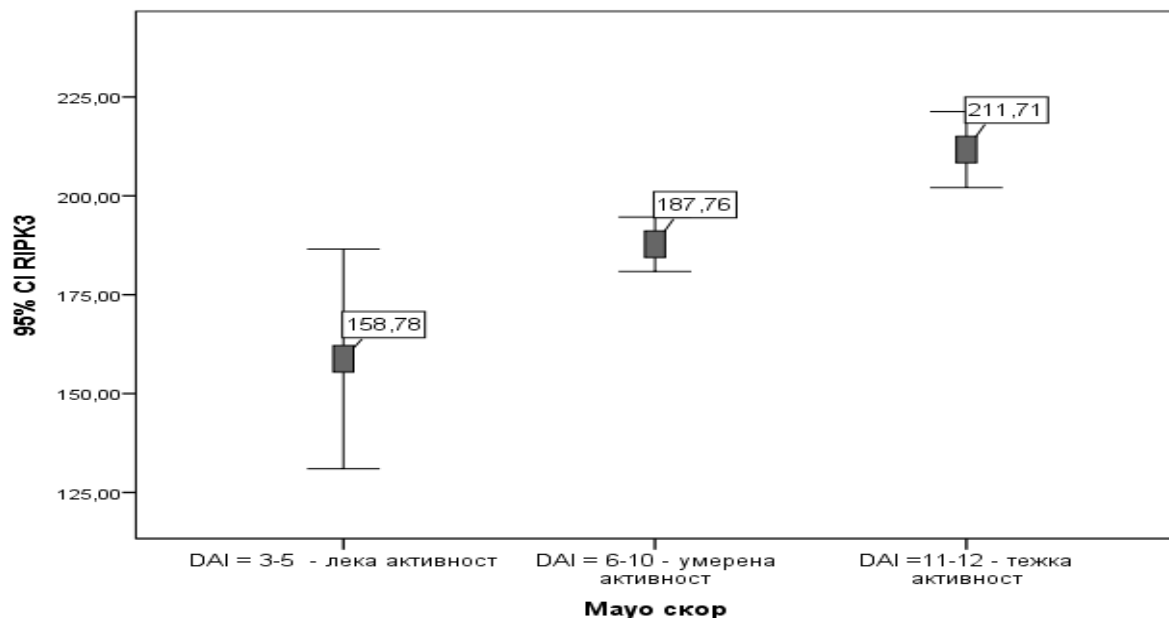
Не се установи разлика в експресията на RIPK3 според обхвата на ЯК, като с обхват E1 има само един пациент с експресия на маркера за некроптоза (186.0). Разликата в експресията на RIPK3 между пациентите с ЯК с обхват E2 и E3 е несъществена (съответно 194.53 за E2 и 185.39 за E3), но експресията и в двата случая е висока.



**Фиг. 42. Средни стойности на експресията на RIPK3 според тежестта на протичане на ЯК**

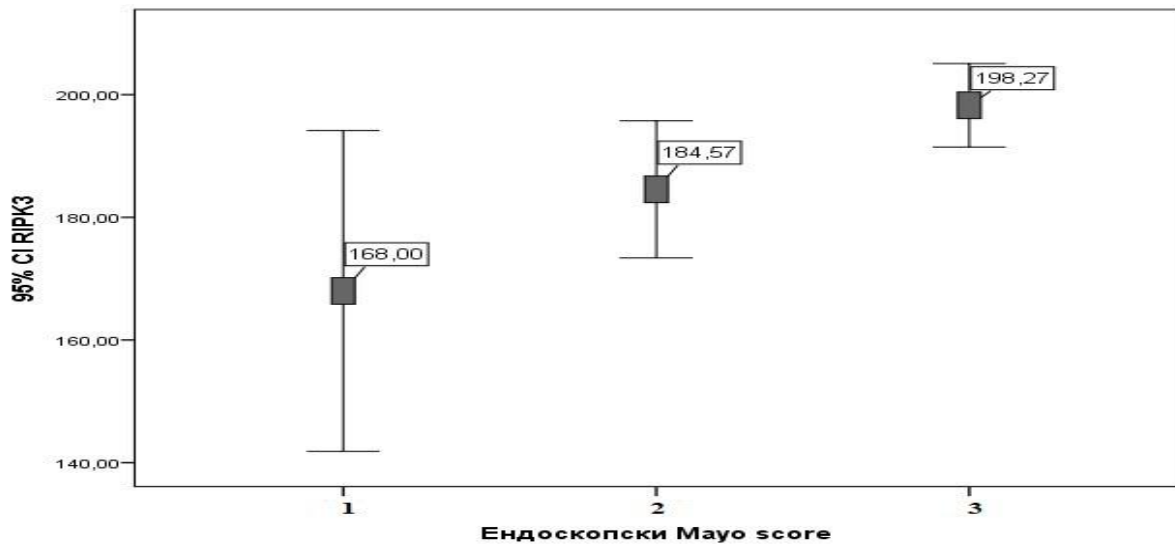
Съществена разлика в експресията на RIPK3 се установява по отношение на тежестта на протичане на ЯК (S), оценена чрез Монреалската класификация ( $p < 0.001$ ). (Фиг. 42). Установена е и правопрпорционална умерена зависимост между тежестта на протичане на заболяването и експресията на RIPK3 ( $r = 0.354$ ;  $p = 0.001$ ), като тежката болест се характеризира със свръхекспресия на маркера (199.67).

Умерена правопрпорционална зависимост се установи и при анализа на експресията на RIPK3 и активността на ЯК, измерена чрез общия Mayo score ( $r = 0.481$ ;  $p < 0.001$ ). Експресията на RIPK3 нараства с увеличаване на активността на болестта ( $p < 0.001$ ), като пациентите с тежка болестна активност имат свръхекспресия на маркера (211.71) (Фиг. 43).



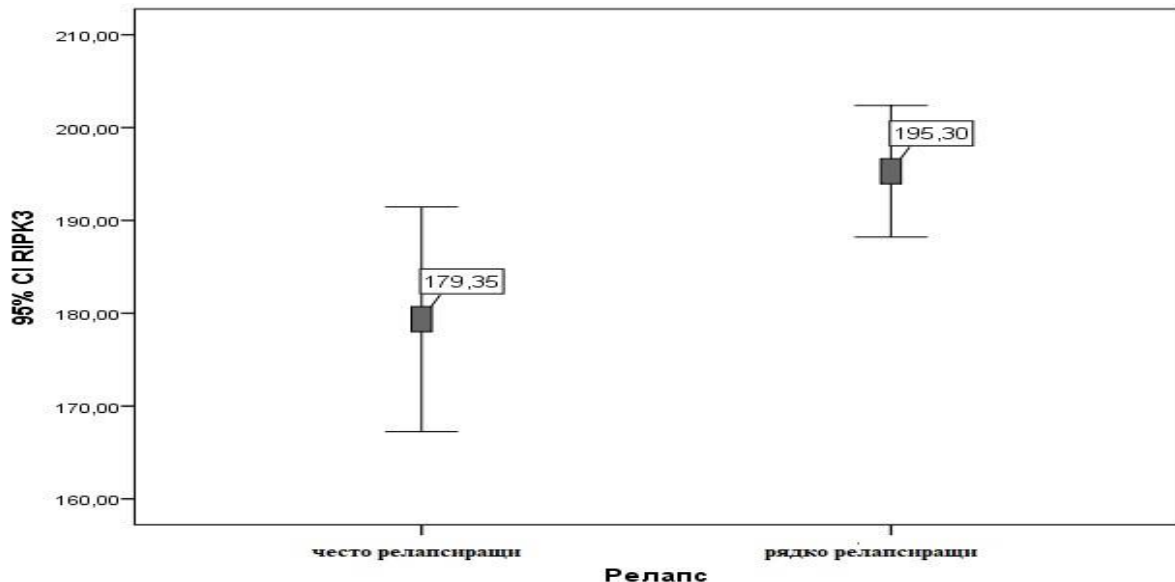
**Фиг. 43. Средни стойности на експресията на RIPK3 според общия Mayo score (DAI, disease activity index) за активност на ЯК**

Изследването на ендоскопската активност, оценена чрез ендоскопския Mayo score показва същата тенденция като индекса за болестна активност (Фиг. 44). Установи се правопрпорционална умерена зависимост между експресията на RIPK3 и степента на ендоскопска активност ( $r = 0.363$ ;  $p = 0.001$ ), като пациентите с тежка ендоскопска активност имат висока експресия на маркера (198.27).



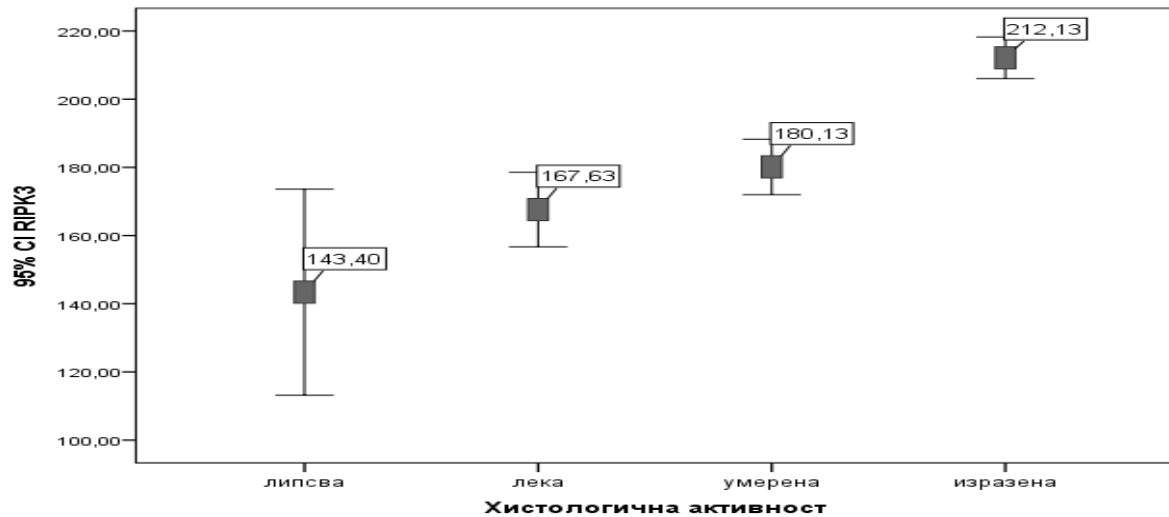
**Фиг. 44. Средни стойности на експресията на RIPK3 според ендоскопската активност на ЯК**

Пациентите, които рядко правят релапси ( $\leq 1$  път годишно) имат значително по-висока експресия на RIPK3 спрямо тези, които са често релапсиращи ( $\geq 2$  пъти в годината) (съответно 195.29 към 179.35;  $p=0.016$ ) (Фиг. 45). Установена е обратнопропорционална слаба зависимост между честотата на релапсите при пациентите с ЯК и експресията на RIPK3 ( $r=-0.261$ ;  $p=0.016$ ), която показва, че с увеличаването на честотата на релапсите се понижава и експресията на маркера.



**Фиг. 45. Средни стойности на експресията на RIPK3 според честотата на релапсите при пациентите с ЯК**

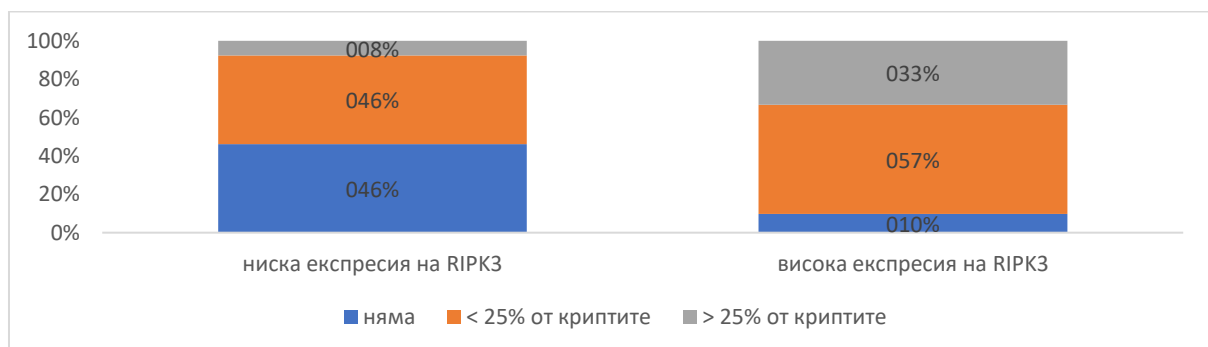
При сравняване на експресията на RIPK3 с хистологичната активност се установи, че с увеличаване на възпалителната активност нарастват и нивата на експресията на маркера ( $p < 0.001$ ). При пациентите с ЯК и изразена хистологична активност стойностите на експресията на маркера за некроптоза са значително по-високи в сравнение с тези на пациентите без активност (съответно 212.13 към 143.40) (Фиг. 46).



**Фиг.46. Средни стойности на експресията на RIPK3 според степента на възпалителна активност на пациентите с ЯК**

Установи се силна правопрпорционална зависимост между хистологичната активност и експресията на RIPK3 ( $r=0.735$ ;  $p < 0.001$ ), като 54.0 % от случаите високата експресия на маркера за некроптоза е свързана с висока възпалителна активност при пациентите с ЯК.

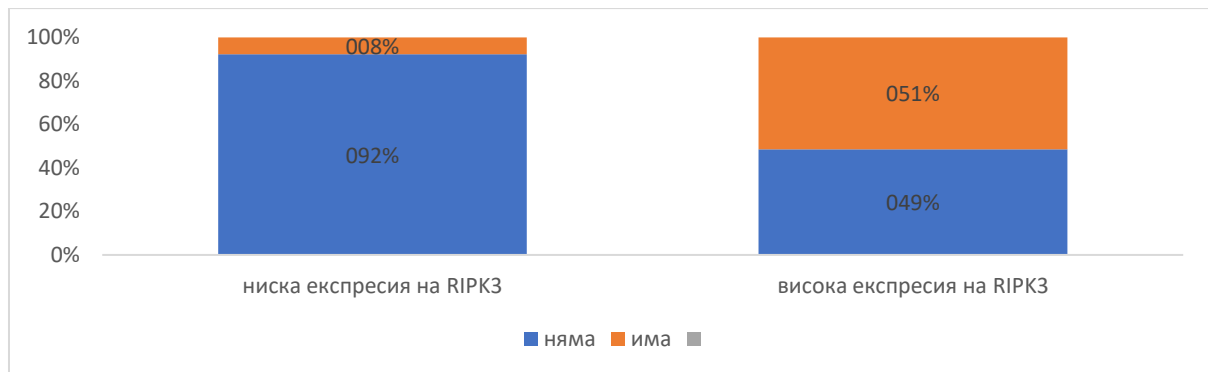
Анализът на хистологичните проби показва, че с нарастването на процента на крипитите се увеличава и експресията на маркера за некроптоза ( $r=0.342$ ;  $p < 0.001$ ) (Фиг. 47).



**Фиг. 47. Експресия на RIPK3 според процента на засягане на крипитите**

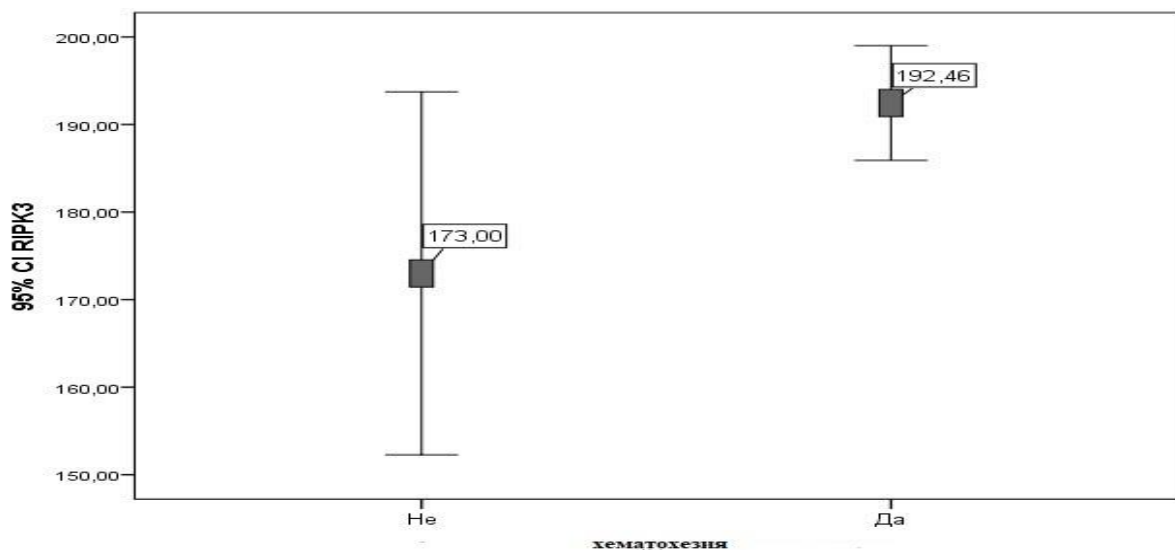
Не се установява зависимост по отношение на крипт абсцесите и експресията на RIPK3.

Установява се умерена зависимост между ерозиите и високата експресия на RIPK3 ( $r=0.316$ ;  $p<0.001$ ) (Фиг. 48).



**Фиг. 48. Експресия на RIPK3 според наличието на ерозии**

Не беше намерена връзка между експресията на RIPK3 и честотата на диаричните изхождания по време на хоспитализацията. От друга страна хематохезията се свързва с по-висока експресия на маркера ( $p=0.028$ ) (Фиг. 49).



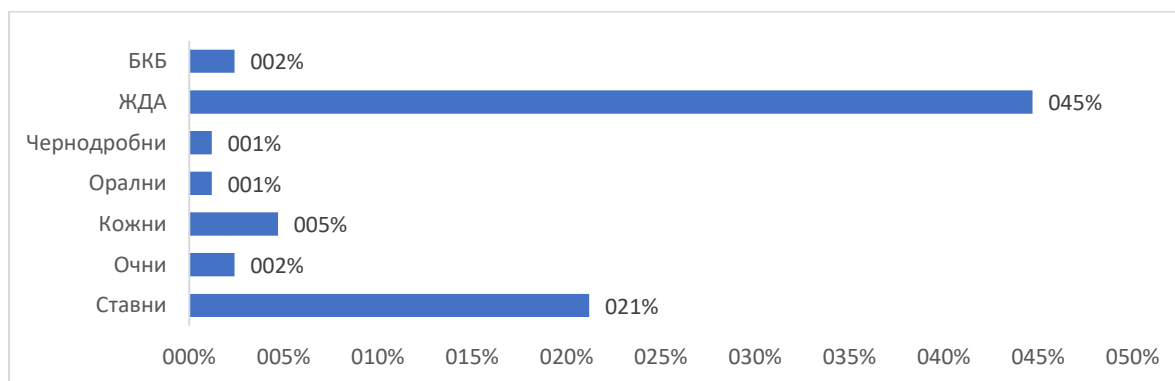
**Фиг. 49. Средни стойности на експресията на RIPK3 според наличието на хематохезия**

Няма сигнификантна разлика в експресията на RIPK3 и наличието на коремната болка.



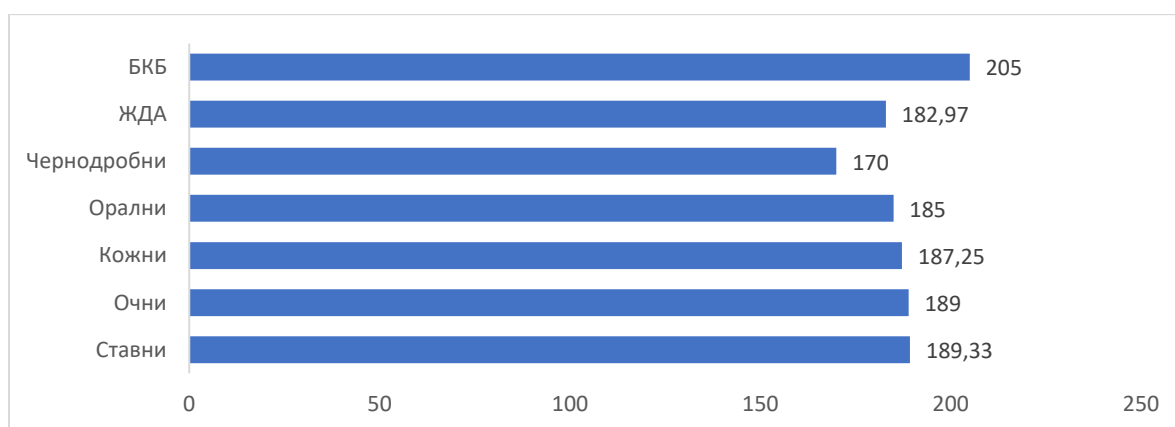
При загубата на тегло не се наблюдава разлика в експресията на RIPK3 при пациентите с ЯК, която остава висока (съответно 191.47 за пациенти със загуба на тегло и 188.40 за такива без загуба на тегло).

Както е показано в таблица 12 с ЕИП са 60.0 % от пациентите с ЯК, като средна стойност на експресията е  $184.41 \pm 28.19$ . С най-голяма честота са ставните прояви (21.2 %) и ЖДА (44.7 %) (Фиг. 50).



**Фиг. 50. Видове ЕИП при пациентите с ЯК**

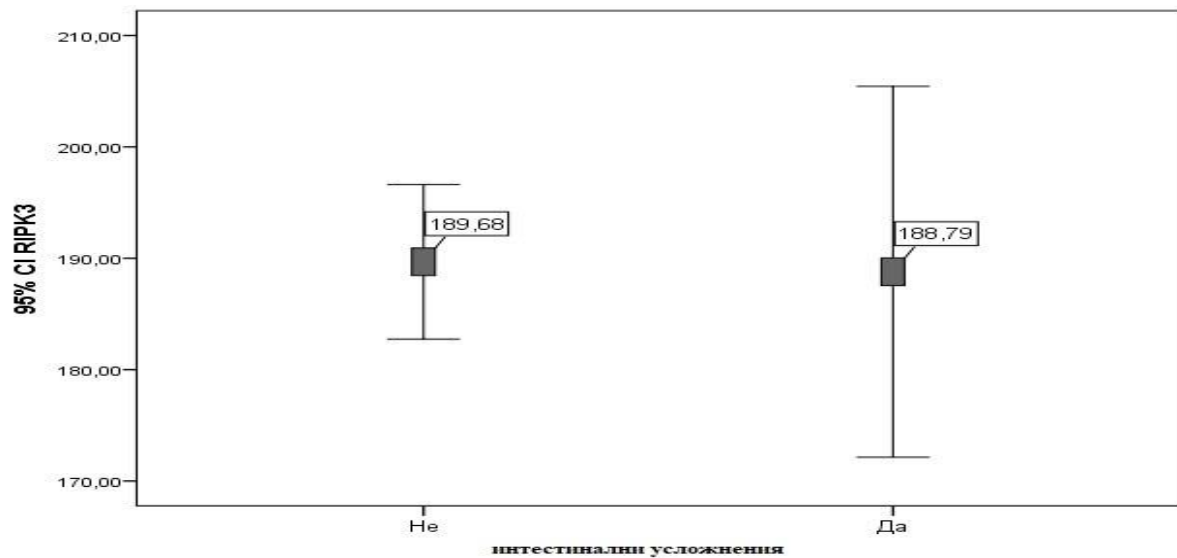
Не се установява съществена разлика между експресията на RIPK3 при отделните видове ЕИП (Фиг. 51) при пациентите с ЯК.



**Фиг. 51. Средна експресия на RIPK3 според видовете ЕИП при пациентите с ЯК**

Не се установява съществена разлика в експресията на RIPK3 според наличието или отсъствието на тромбоемболични усложнения, което може да се дължи и на малкия брой пациенти (1 пациент).

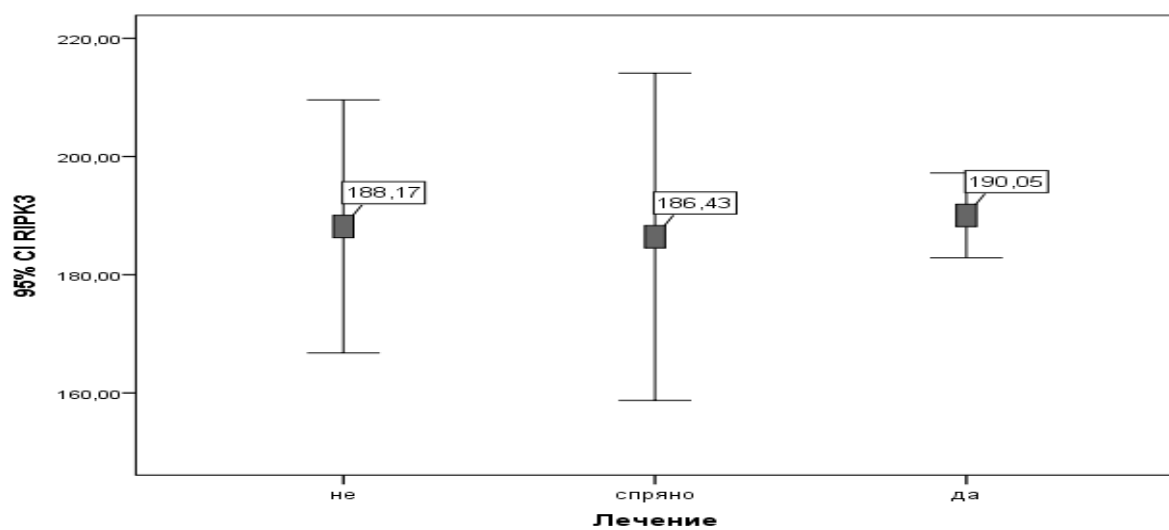
При пациентите с интестинални усложнения не се наблюдава разлика в експресията на RIPK3 в сравнение с тези без усложнения (Фиг. 52).



**Фиг. 52. Средни стойности на RIPK3 според наличието или липсата на интестинални усложнения**

При пациентите с ЯК от интестиналните усложнения се срещат само псевдополипозата (21.2 %)

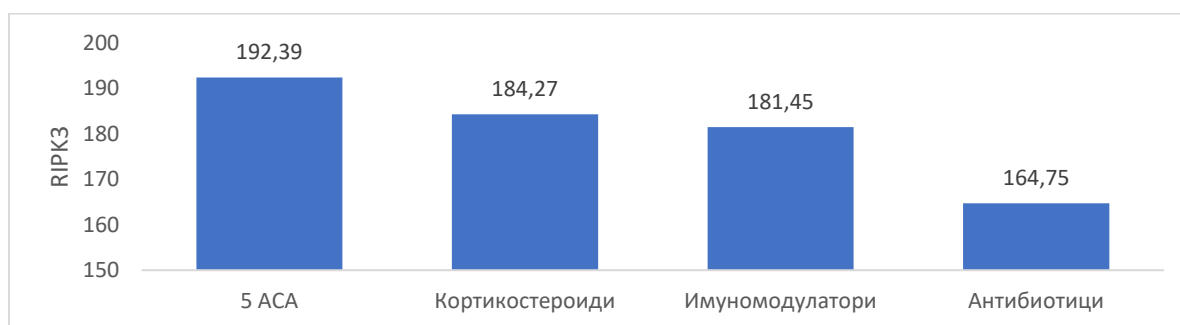
Оперативна интервенция (апендектомия) в миналото са претърпели само 3,5% (трима), като средната стойност на експресията на RIPK3 е  $210.33 \pm 23.16$ .



**Фиг. 53. Средни стойности на експресията на RIPK3 според провеждането на лечение**

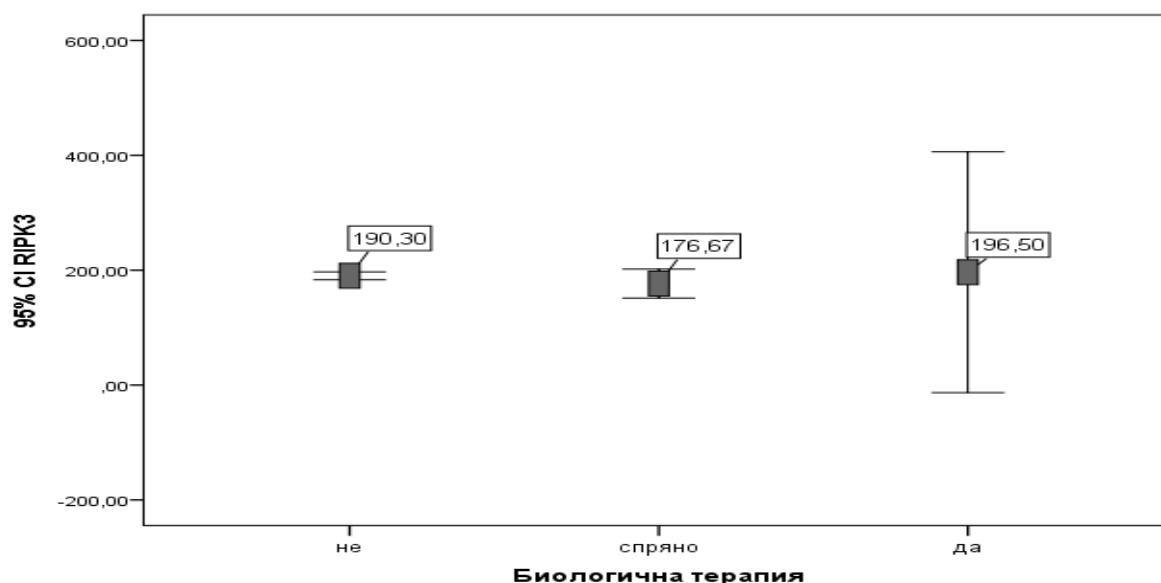
Не се установява съществена разлика по отношение на експресията на RIPK3 между пациентите с ЯК, които към момента на изследването не провеждат лечение (с дебют на ЯК) или тези с продължаваща или спряна терапия (Фиг. 53).

На фиг. 54 са представени резултатите от анализа на експресията на RIPK3 според вида на провежданата терапия. Резултатите показват, че с най-ниска експресия са пациентите с ЯК на антибиотична терапия (164.75). Докато лечението с имуномодулатори и кортикостероиди не показва съществена разлика в нивата на експресията на маркера.



**Фиг. 54. Средна стойност на експресията на RIPK3 според вида на проведената терапия**

Не се установява разлика в експресията на RIPK3 според провеждането на биологична терапия при пациентите в ЯК. (Фиг. 55).



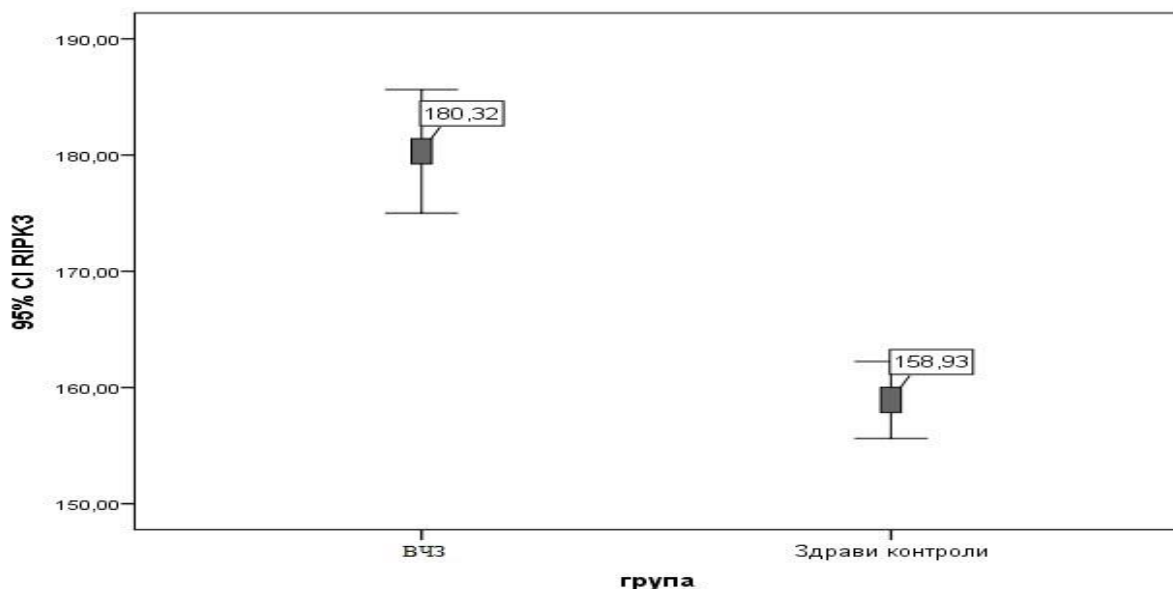
**Фиг. 55. Средни стойности на експресията на RIPK3 според проведената биологична терапия**

Не се установи зависимост между нивата на СУЕ и RIPK3. Не се установява зависимост и по отношение на нивата на CRP и експресията на RIPK3 като преобладават пациентите с повишена експресия, независимо от нивата на CRP. Подобна тенденция се установява и по отношение на нивата на левкоцитите, тромбоцитите, албумина, феритина, хемоглобина и серумното желязо.

Установява се слаба обратнопропорционална зависимост между наличието на съпътстваща чревна инфекция с *Cl. Difficile* и ядрената експресия на RIPK3 ( $r=-0.214$ ;  $p=0.05$ ), като може да се каже, че пациентите с *Cl. Difficile* инфекция имат по-ниска експресия на маркера (съответно 174.00 и 192.03 за пациенти с ЯК без инфекция).

#### 4.4. Сравняване на нивата на експресия на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ и здрави контроли

Установена е съществена разлика между средните стойности в експресията на RIPK3 при пациентите с ВЧЗ и здрави контроли ( $p=0.001$ ) При пациентите с ВЧЗ се установява свръхекспресия на RIPK3 (180.3) спрямо контролите (158.93) (Фиг. 56) .

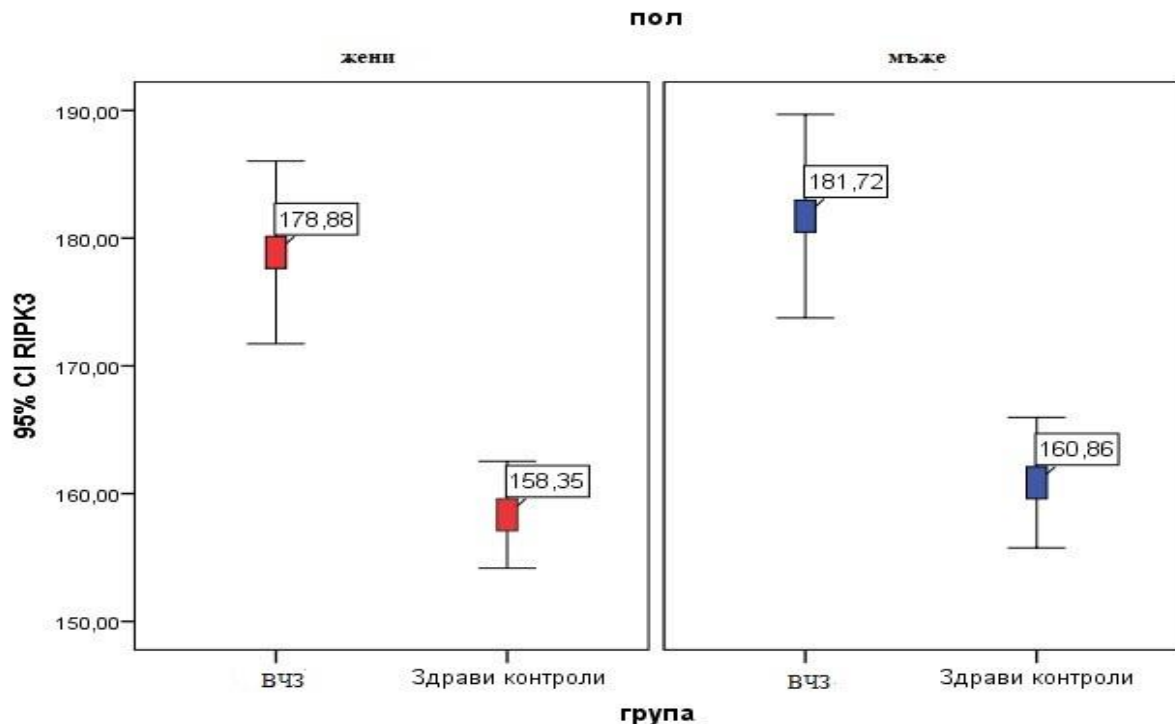


Фиг. 56. Средна стойност на експресията на RIPK3 в изследваните групи

При допълнителен анализ на експресията на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ и здрави контроли се установи, че високата експресия на маркера води до 4.14 пъти по-висок риск за висока активност на ВЧЗ ( $RR=4.15$  (2.01-8.57);  $p<0.001$ ).

Съществена разлика в експресията на RIPK3 се установява и по отношение на пола и изследваната група като при мъжете и жените експресията на маркера е по-висока при пациентите с ВЧЗ ( $p=0.001$ ) (Фиг. 57). Въпреки това при жените и в двете групи стойностите на експресията на RIPK3 са малко по-ниски в сравнение с тези на мъжете.

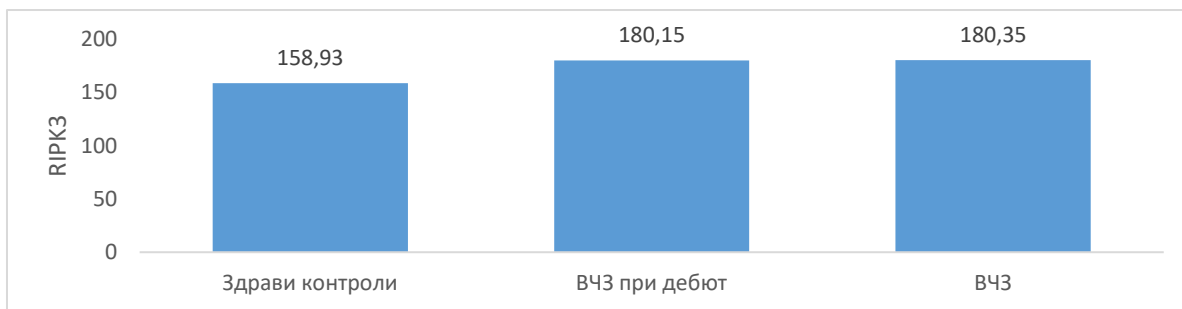
И при двете изследвани групи не се установява зависимост между експресията на RIPK3 и възрастта.



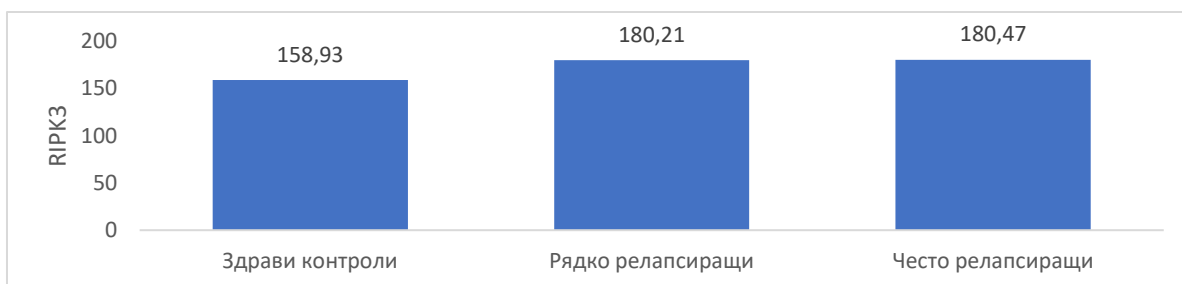
**Фиг. 57. Средна стойност на експресията на RIPK3 според пола и изследваната група**

При изследването на ядрената експресия на RIPK3 при пациенти с дебют на заболяването се установи, че нивата на маркера са значително по-високи в сравнение с тези при здравите контроли ( $p<0.001$ ) (Фиг. 58.). Впечатление прави, че експресията на маркера при пациентите с ВЧЗ, независимо дали са в дебют или вече с известна болест, остава висока, което показва, че маркерът за некроптоза се влияе основно от наличието на възпаление.

Подобни резултати се установяват и по отношение на релапса, където средните стойности на експресията на маркера са значително по-високи при пациентите с ВЧЗ в сравнение със здравите контроли ( $p<0.001$ ) (Фиг. 59).



**Фиг. 58. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи и дебюта на заболяването**

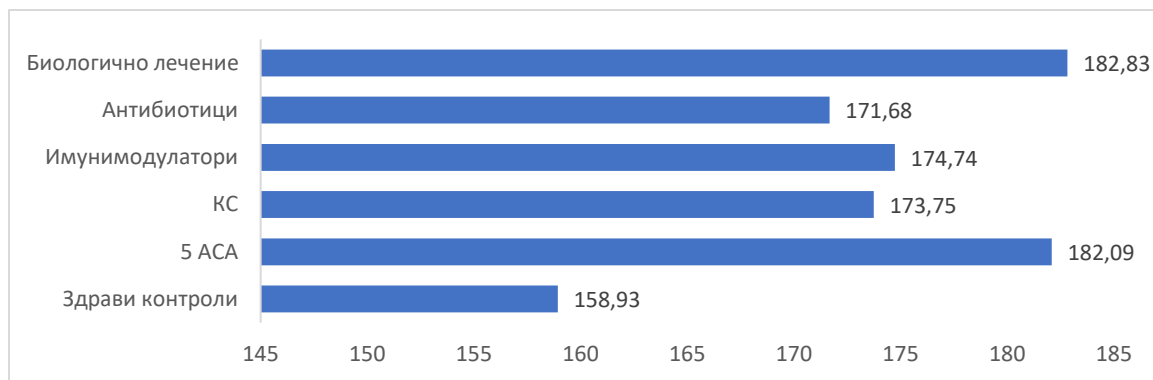


**Фиг. 59. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи и релапса**

Според проведеня сравнителен анализ на експресията на RIPK3 според изследваната група и степента на възпалителната активност се установи значима разлика ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 60). Възпалителната активност е свързана с повишена експресия на маркера за некроптоза в сравнение със здравите контроли, като потискането на възпалителната активност с помощта на медикаментозно лечение води до значително понижаване на експресията.



**Фиг. 60. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи и степента на възпалителна активност**

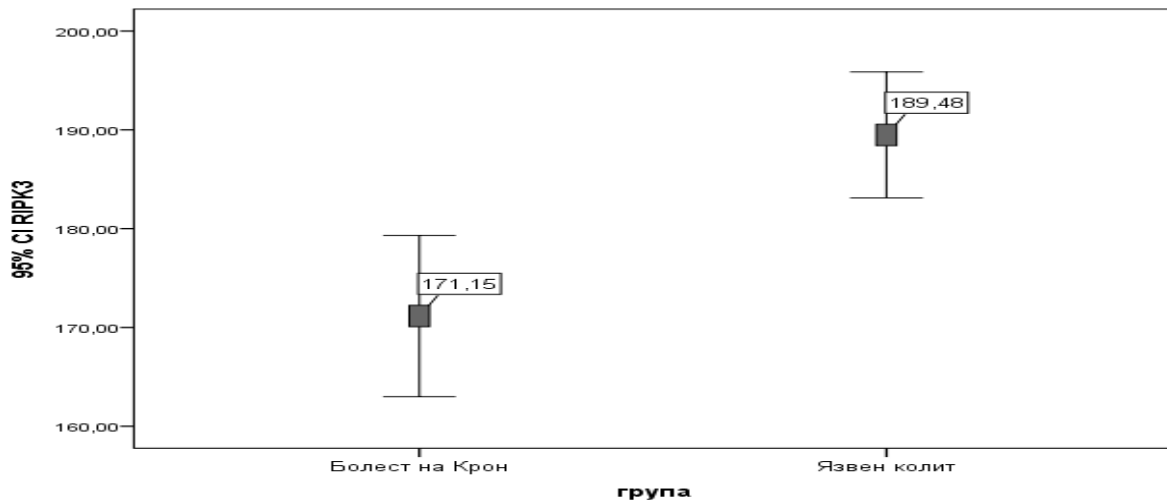


**Фиг. 61. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи и провежданото лечение**

Резултатите от анализа показват, че независимо от вида на провежданото лечение не може да се постигне такова потискане на експресията на RIPK3 при пациентите с ВЧЗ, което да я доближи до тази на здравите контроли ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 61). Най-ниски стойности на експресията на маркера се наблюдава при приложението на антибиотици (171.68). От друга страна при лечението с 5-АСА и биологична терапия експресията на RIPK3 остава висока. Тъй като лечението с биологични медикаменти се прилага при пациенти, които имат умерено-тежка до тежка активност на болестта, не отговорили на конвенционалната терапия, наличието на повишена експресия на маркера за некроптоза говори, че дори и тази най-мощна терапия все още не е в състояние да овладее възпалението и да понижи стойностите на експресия на RIPK3 до нива, както при здрави контроли или ремисия на съответната болест.

#### **4.5. Съпоставяне на нивата на експресия на RIPK3 при пациенти с болест на Крон и язвен колит**

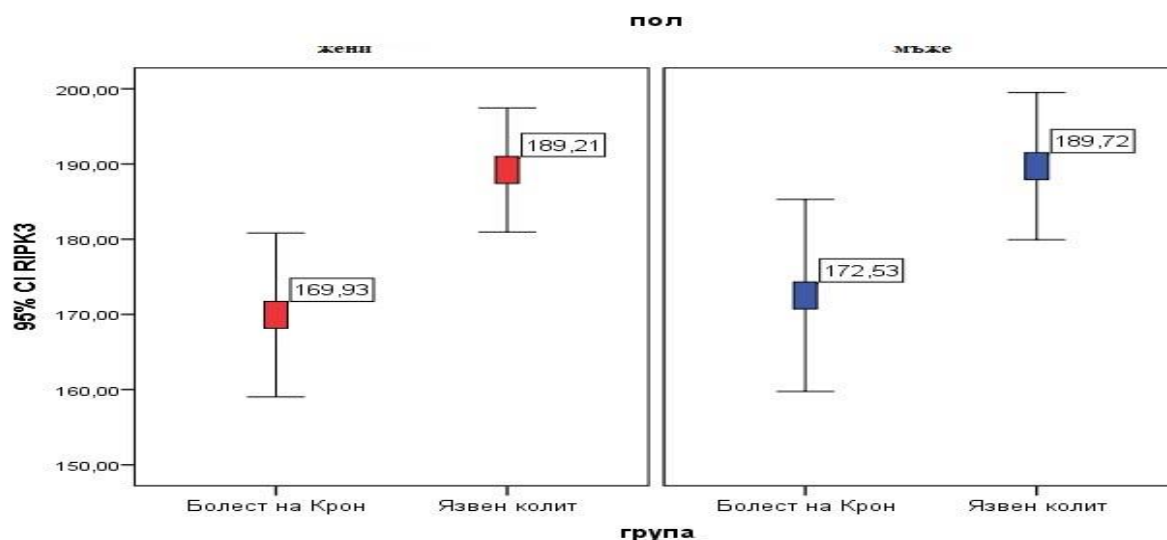
Сравнителният анализ на нивата на експресията на маркера за некроптоза при пациентите с БК и ЯК показва наличието на съществена разлика ( $p = 0.001$ ), като пациентите с ЯК показват по-високи нива на експресия в сравнение с пациентите с БК (съответно 189.48 към 171.15) (Фиг. 62).



**Фиг. 62. Средна стойност на експресията на RIPK3 според изследваната група пациенти**

Установена е умерена зависимост между експресията на RIPK3 и ЯК ( $r=0.321$ ;  $p<0.001$ ), като наличието на некроптоза увеличава риска от ЯК повече от 4 пъти ( $OR=4.47$  (2.160-9.284);  $p<0.001$ ).

Установена е съществена разлика между експресията на маркера за некроптоза, изследваните групи пациенти и пола ( $p<0.001$ ) (Фиг. 63). От друга страна се установи, че при жените експресията на RIPK3 корелира умерено с ЯК ( $r=0.345$ ;  $p=0.001$ ), при мъжете зависимостта също е умерена ( $r=0.300$ ;  $p=0.005$ ). Интересен е фактът, че при жените високата експресия се свързва с повече от 5 пъти по-висок риск за ЯК ( $OR=5.44$  (1.797-16.469);  $p<0.001$ ), докато при мъжете този риск е почти 4 пъти по-висок ( $OR=3.88$  (1.452-10.402);  $p<0.001$ ).



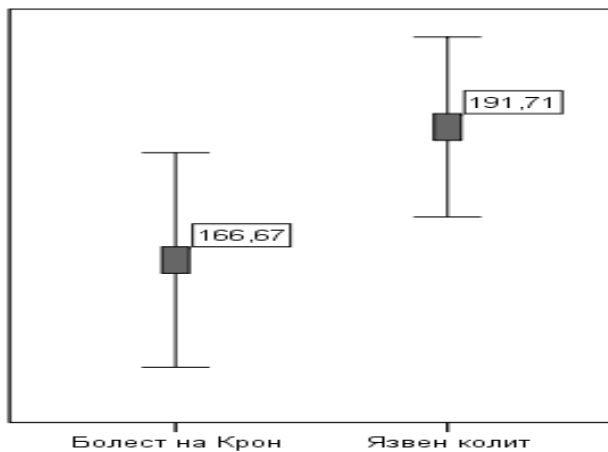
**Фиг. 63. Средна стойност на експресията на RIPK3 според изследваната група пациенти и пола**



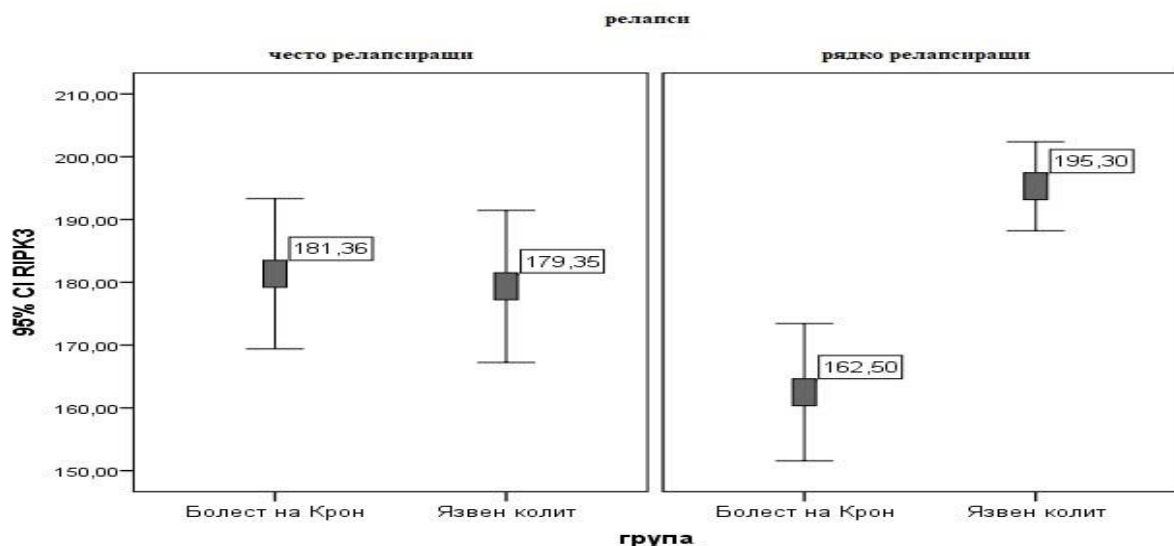
Не се установява зависимост между експресията на RIPK3 и възрастта според изследваната група пациенти.

Изследването на експресията на маркера за некроптоза при пациентите в дебют показва съществена разлика между пациентите с ЯК и БК ( $p < 0.001$ ), като пациентите с ЯК дебютират със свръхекспресия на RIPK3 (Фиг. 64).

Съществена разлика в експресията на RIPK3 между пациентите с БК и ЯК с релапс е установена в групата на тези, които рядко релапсират ( $p < 0.001$ ), като при пациентите с БК нивата на експресията са сигнификантно по-ниски (съответно 162.5 към 195.3) (Фиг. 65).

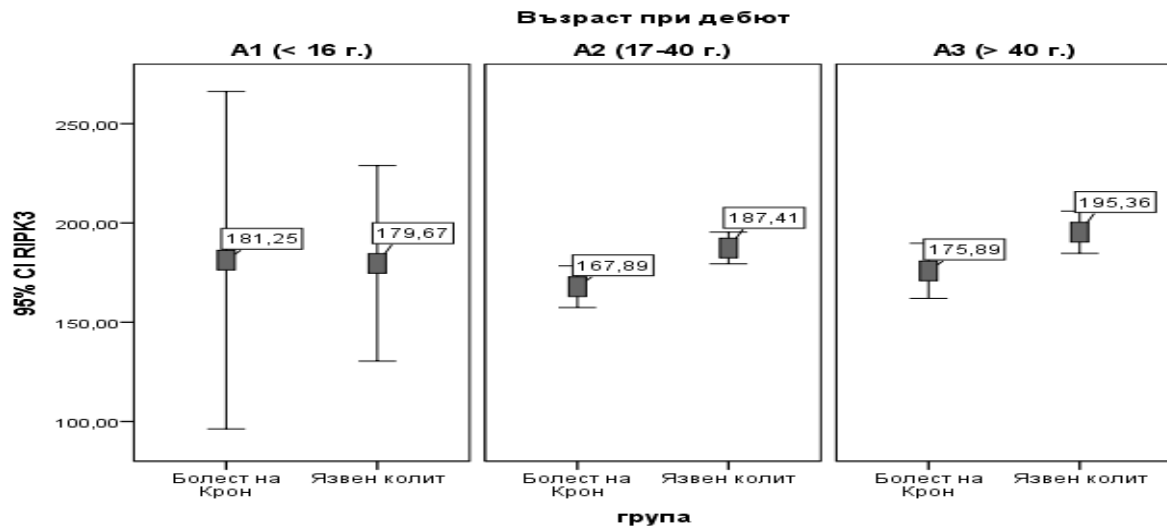


**Фиг. 64. Средни стойности на RIPK3 при дебют според изследваната група пациенти**



**Фиг. 65. Средни стойности на експресията на RIPK3 при релапс според изследваните групи пациенти**

Изследването на експресията на RIPK3 според възрастта при дебют между изследваните групи пациенти, съществена разлика се установява при пациентите в група A2 ( $p < 0.01$ ) и A3 ( $p < 0.01$ ), където експресията на маркера е значително по-висока при пациентите с ЯК (Фиг. 66).



**Фиг. 66. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и възрастта при дебют**

И при двете заболявания се наблюдава повишаване на експресията на RIPK3 с повишаване на активността на заболяването (Фиг. 67). Резултатите показват, че пациентите, които са в ремисия и с лека активност показват експресия на маркера близка до тази на здравите контроли, като няма разлика между двете заболявания. При пациентите с умерена и тежка активност се установява по-висока експресия при пациентите с ЯК.



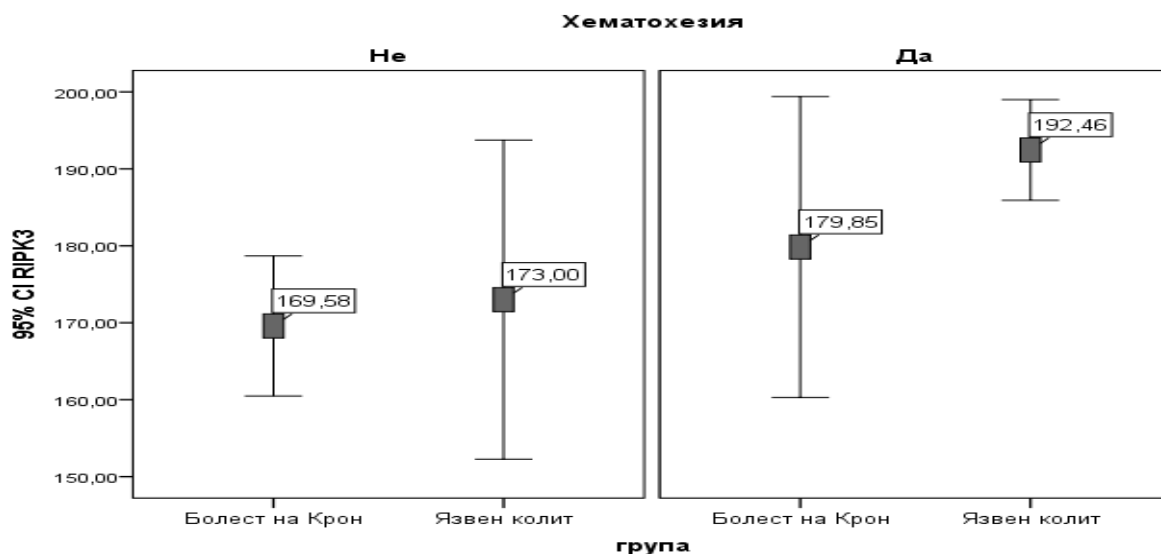
**Фиг. 67. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и активността на заболяването**



**Фиг. 68. Изследването на средните стойности на експресията на RIPK3 според броя на диаричните изхождания и изследваните групи**

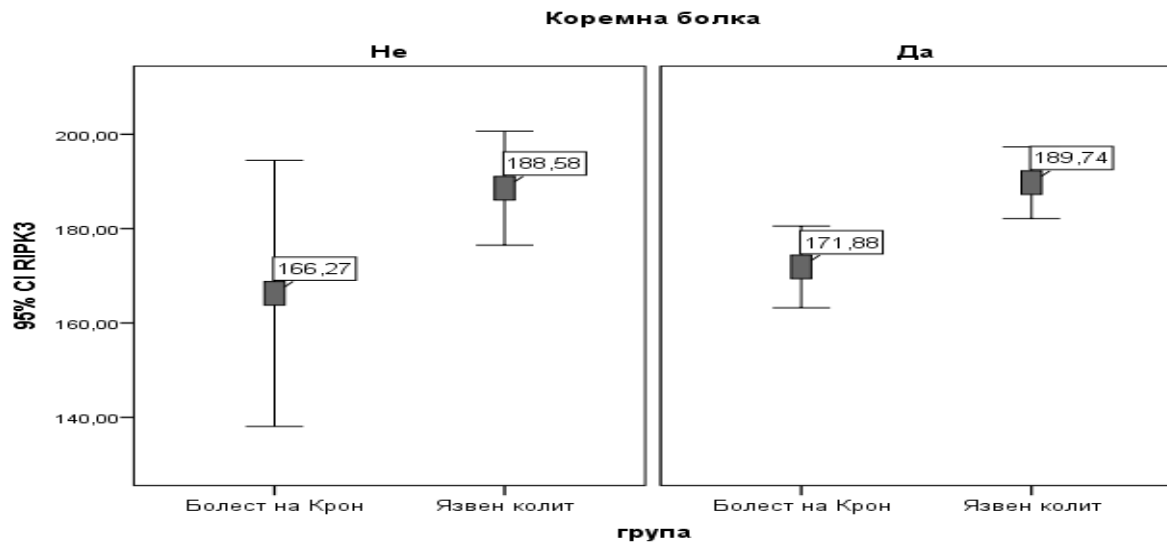
Според представените данни на фиг. 68, сравнителният анализ на експресията на RIPK3 между изследваните групи установява, че при пациентите с ЯК се наблюдава повишена експресия на маркера, като съществена разлика се установява при броя на диаричните изхождания до 4 (съответно 172.42 за БК и 181.21 за ЯК;  $p < 0.05$ ) и при повече от 6 изхождания (съответно 169.94 за БК и 196.67 за ЯК;  $p < 0.01$ ).

При наличието на хематохезия също се наблюдава сигнификантна разлика в експресията на RIPK3, където стойностите при пациентите с ЯК са значително по-високи (съответно 179.85 за БК и 192.46 за ЯК;  $p < 0.01$ ) (Фиг. 69).



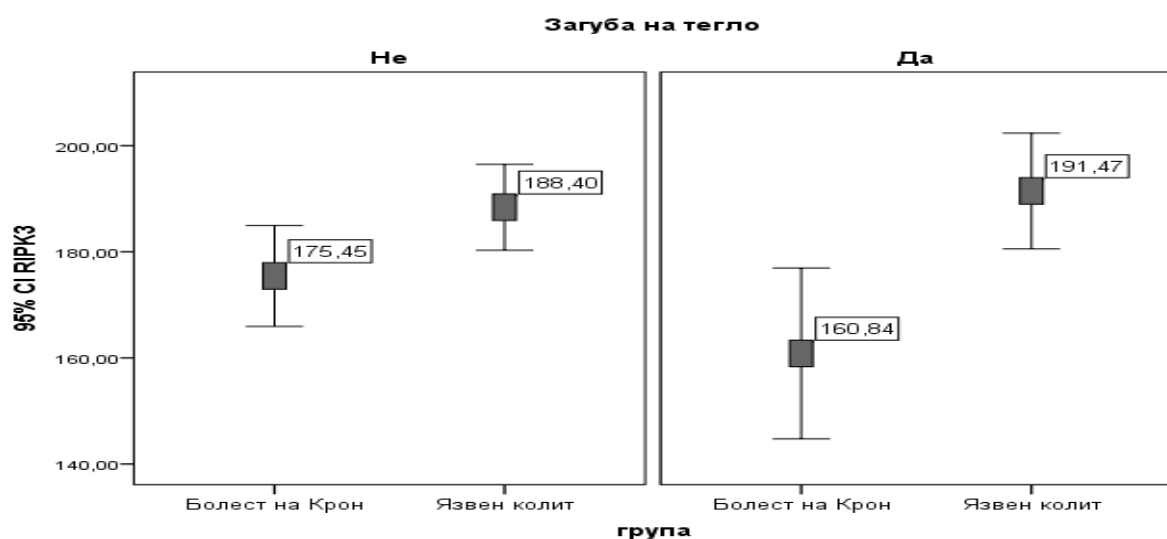
**Фиг. 69. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и наличието на хематохезия**

По отношение на коремната болка (Фиг.70), сравнителният анализ на резултатите на експресията между двете изследвани групи пациенти показва съществена разлика в експресията на маркера, която е значително по-висока при пациентите с ЯК ( $p < 0.001$ ).



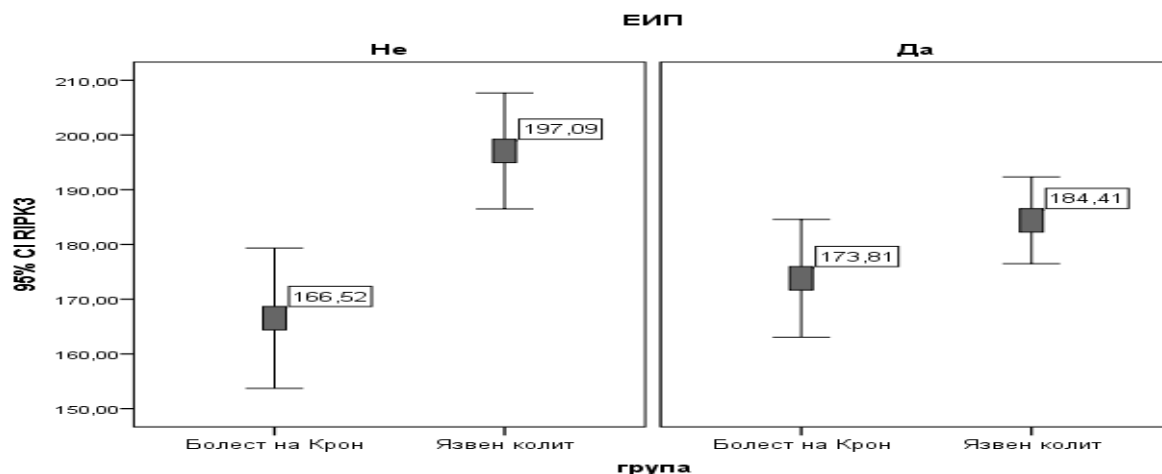
**Фиг. 70. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и наличието на коремна болка**

Загубата на тегло разкрива разлика и в двете посоки (Фиг.71). Установява се значително по-висока експресия на RIPK3 при пациентите с ЯК спрямо пациентите с БК (съответно 191.47 за ЯК и 160.84 за БК;  $p < 0.001$ ). Загубата на тегло при пациентите с БК се свързва с понижаване на експресията на маркера за некроптоза, докато при пациентите с ЯК се установява обратна зависимост – експресията се увеличава със загубата на тегло.



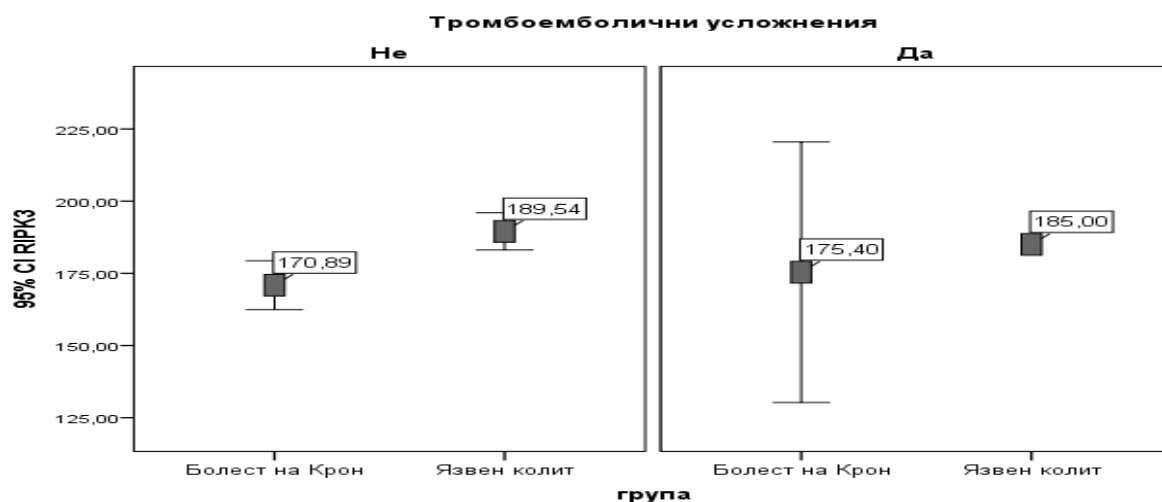
**Фиг. 71. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и загубата на тегло**

ЕИП също показват разлика в експресията на RIPK3 и в двете посоки (Фиг. 72). От една страна има съществена разлика при липса на ЕИП, където експресията на маркера за некроптоза е значително по-висока при пациентите с ЯК (197.09), спрямо тези с БК (166.52) ( $p < 0.001$ ). От друга страна наличието на ЕИП при пациентите с БК се свързва с повишаване на експресията на RIPK3, докато при пациентите с ЯК се наблюдава значително понижаване.

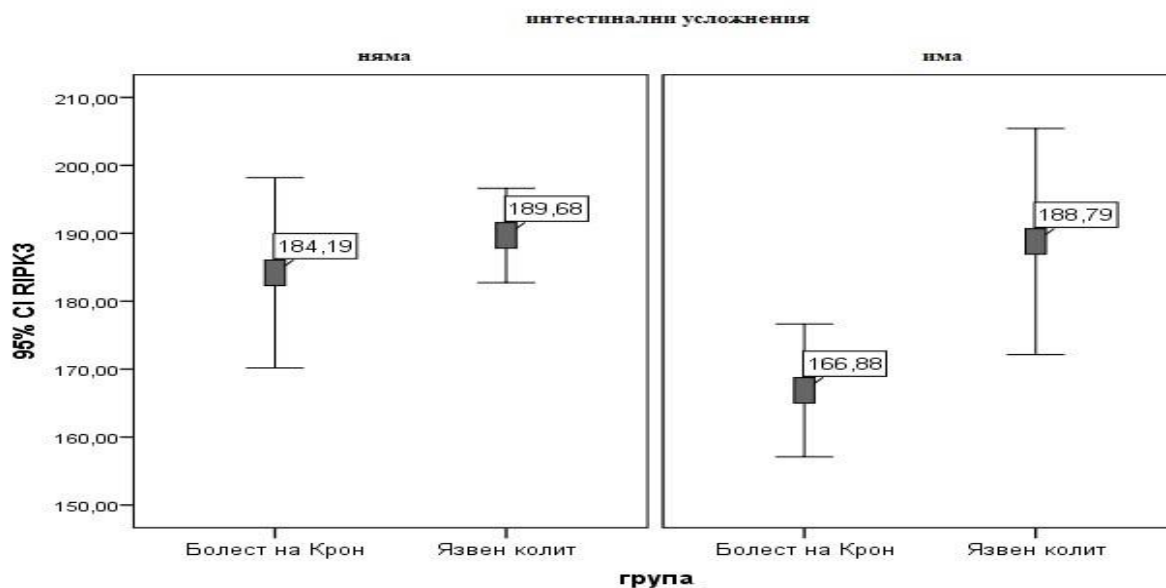


**Фиг. 72. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и наличието на ЕИП**

Изследването на тромбоемболичните усложнения не показва наличието на сигнификантна разлика в експресията на RIPK3 между изследваните групи (Фиг. 73).

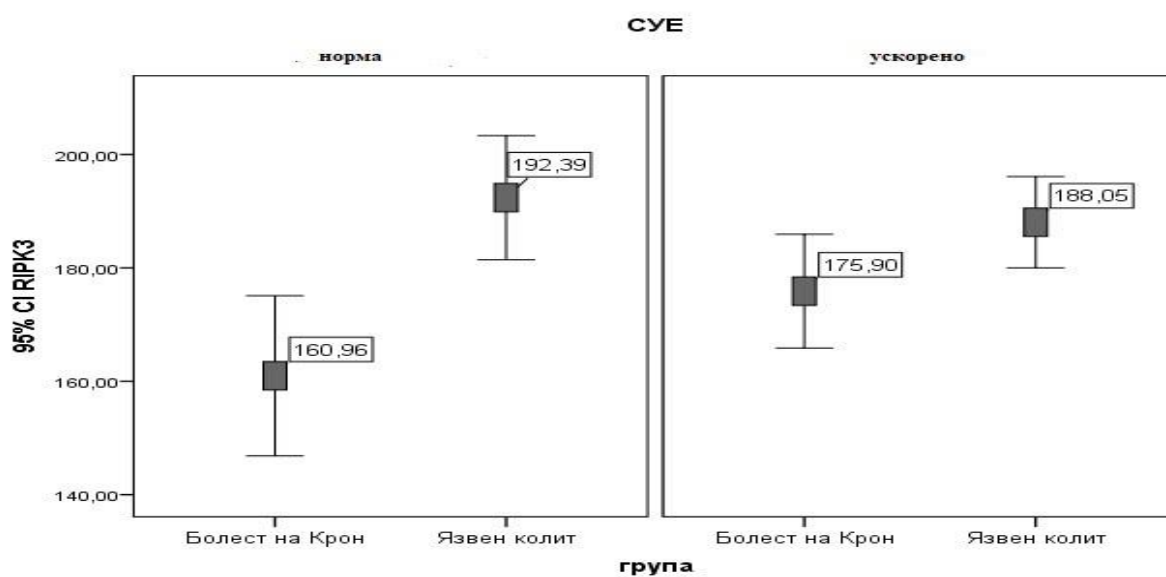


**Фиг. 73. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и наличието на тромбоемболични усложнения**



**Фиг. 74. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и наличието на интестинални усложнения**

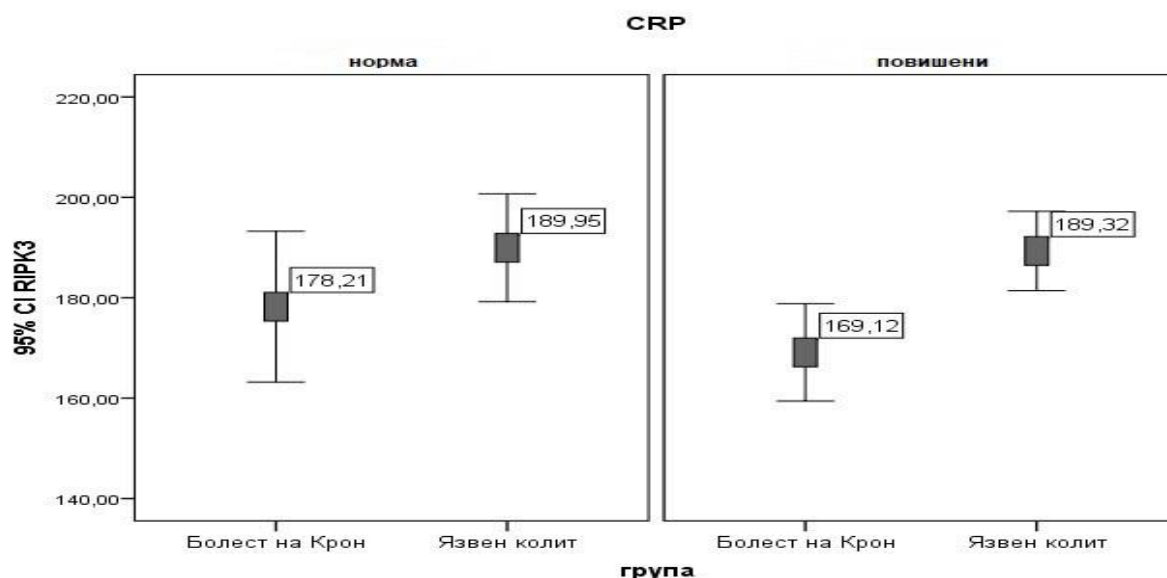
По отношение на интестиналните усложнения се установява съществена разлика в експресията на RIPK3 между пациентите с БК и ЯК ( $p < 0.001$ ) (Фиг.74), като стойностите при втората група пациенти са значително по-високи (съответно 166.88 за БК и 188.79 за ЯК). Тази разлика се дължи на понижаването на експресията на маркера за некроптоза, което се наблюдава при появата на интестинални усложнения при пациентите с БК.



**Фиг. 75. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и серумните нива на СУЕ**

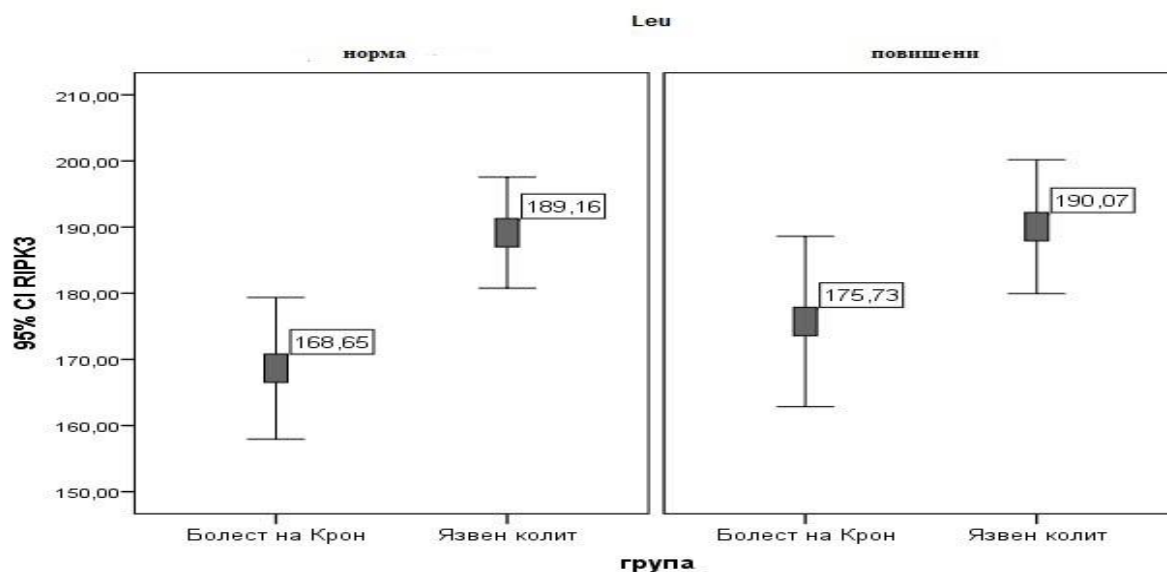
Съществени разлики са установени и по отношение на лабораторните показатели като СУЕ (Фиг. 75). При пациентите, с нормални стойности на СУЕ има съществена разлика в експресията на RIPK3 ( $p < 0.001$ ), като експресията на RIPK3 е значително по-висока при ЯК, спрямо пациентите с БК (съответно 192.39 за ЯК и 160.96 за БК). От друга страна при ускорена СУЕ има висока експресия на RIPK3 в групата на пациентите с БК.

При пациентите с ЯК експресията на RIPK3 е повишена независимо от нивата на CRP. При пациентите с БК се установява съществена разлика ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 76), като експресията на маркера е значително по-ниска при пациентите с БК не само в групата на пациентите с нормални нива на CRP (съответно 178.21 за БК и 189.95 за ЯК), но и в групата на пациентите с повишени серумни нива на CRP (съответно 169.12 за БК и 189.32 за ЯК). Тази разлика става още по-значима с понижаването на експресията на RIPK3 при пациентите с БК с високи серумните нива на CRP.

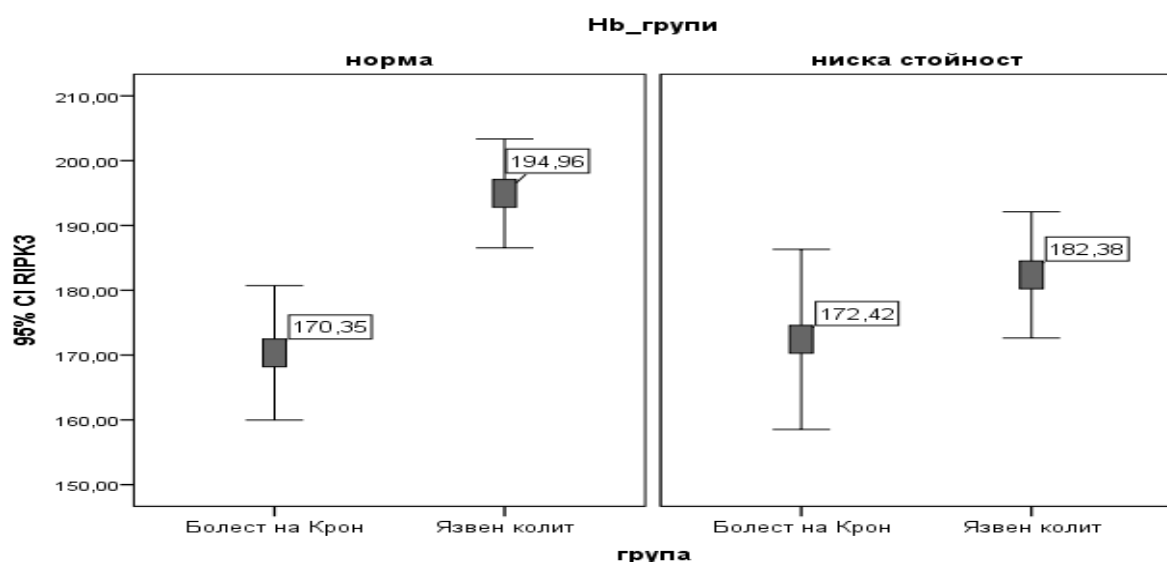


**Фиг. 76. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и серумните нива на CRP**

Изследването на експресията на RIPK3 според серумните нива на левкоцитите (Leu) показва, че съществена разлика се наблюдава, както в групата на пациентите в нормален брой (норма) ( $p < 0.05$ ), така и на тези с повишени нива на левкоцитите ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 77). И при двете групи пациенти се наблюдава висока експресия на маркера при висок брой левкоцити, но при пациентите с БК експресията на RIPK3 е по-ниска в сравнение с тази при пациентите с ЯК.



**Фиг. 77. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и серумните нива на левкоцитите**



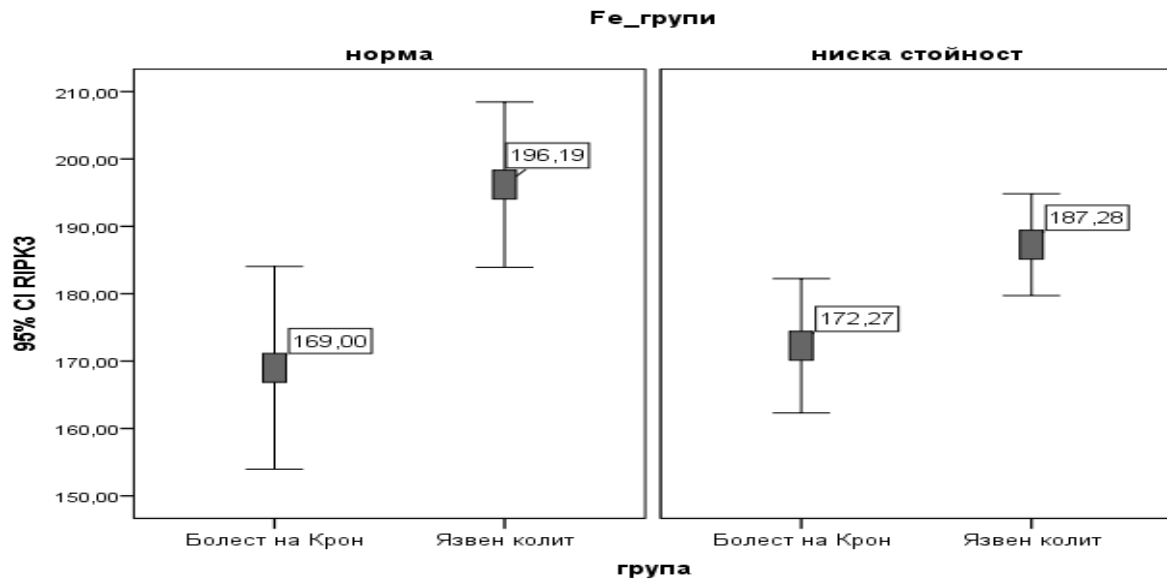
**Фиг. 78. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и серумните нива на хемоглобина**

Изследването на експресията на RIPK3 според серумните нива на хемоглобина (Hb) разкрива съществена разлика, както в групата на пациентите в норма ( $p < 0.05$ ), така и на тези с ниски нива на хемоглобина ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 78). При пациентите с БК експресията на RIPK3 е висока при ниски серумни нива на хемоглобина, като при сравнение с тази при пациентите с ЯК, тя е по-ниска.

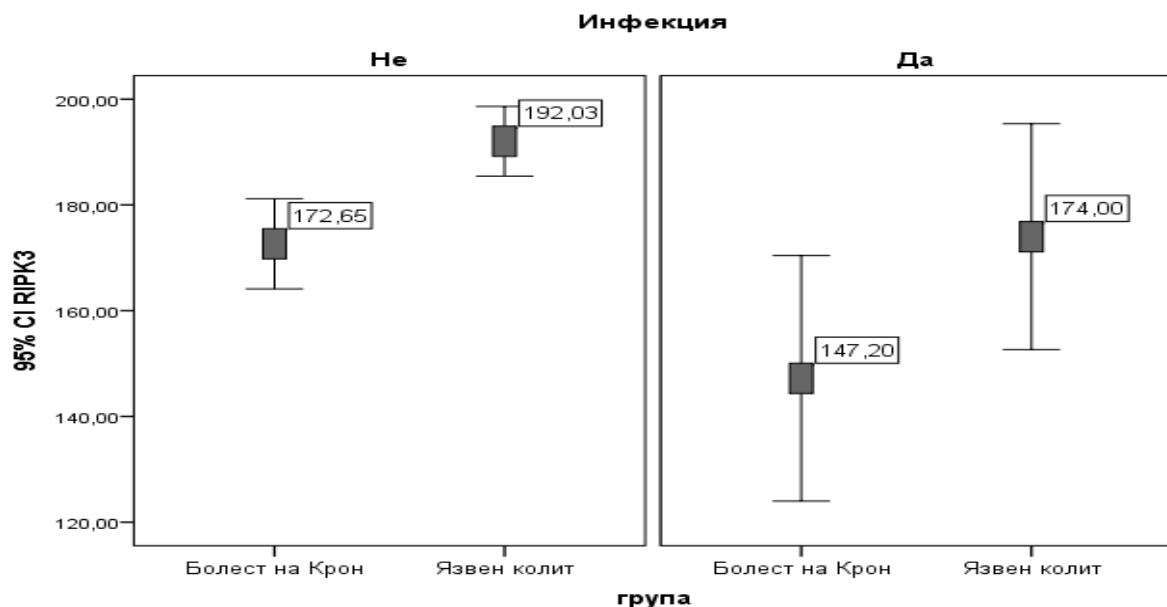
Друг показател, при който се установява същата тенденция, както при серумните нива на хемоглобина, е серумното желязо (Fe), като съществена разлика се наблюдава,



както в групата на пациентите в норма ( $p < 0.05$ ), така и на тези с понижени нива на серумното желязо ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 79). При пациенти с БК се наблюдава висока експресията на маркера при ниски серумните нива на желязото, но при тях експресията на RIPK3 остава по-ниска в сравнение с тази при пациентите с ЯК.



**Фиг. 79. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и серумните нива на серумно желязо**

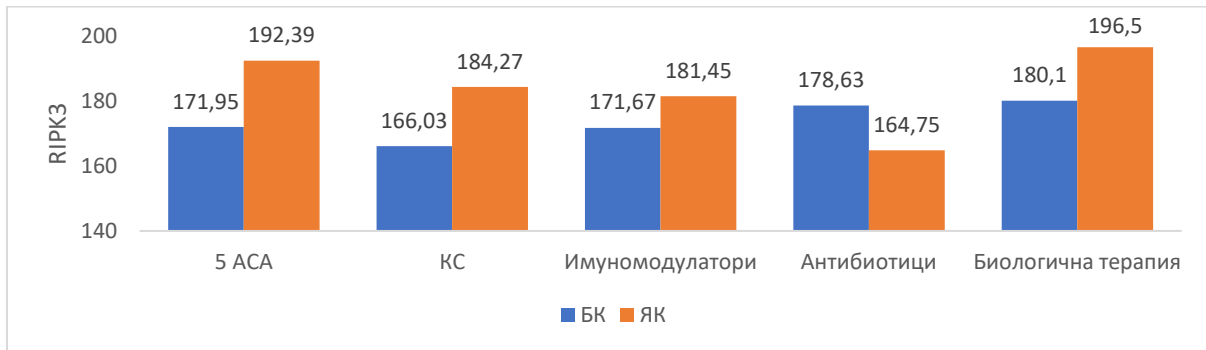


**Фиг. 80. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и наличието на инфекция с Cl. Difficile**

Наличието на инфекция с Cl. Difficile и при двете групи пациенти е свързано с ниска експресия на RIPK3 ( $p < 0.01$ ), която е по-значима при пациентите с БК (Фиг. 80).

Както в групата на пациентите без инфекция, така и в групата на пациентите с инфекция се установява сигнификантна разлика в експресията на маркера за некроптоза ( $p < 0.001$ ).

Възможно е това се дължи на факта, че възпалението, свързано с некроптозата е имуномедирано, с което се различава от възпалението, предизвикано от инфекцията с *Cl. Difficile*. Различните молекулни механизми на двата вида възпаление може да обясни ниските стойности на RIPK3 при *Cl. Difficile* инфекцията.



**Фиг. 81. Средни стойности на експресията на RIPK3 според изследваните групи пациенти и вида на провежданото лечение**

От гледна точка на провежданото лечение се наблюдава съществена разлика в експресията на RIPK3 при всички видове лечение ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 81). При лечението с 5-АСА, кортикостероиди, имуномодулатори и биологичната терапия се установява повишена експресия на маркера при пациентите с ЯК. Най-ниски стойности на експресия на RIPK3 се срещат при пациентите с БК на лечение с кортикостероиди и при пациентите с ЯК на лечение с антибиотици, като в тези групи експресията е близка до тази на здрави на контроли.

#### **4.6. Установяване потенциала на нивата на RIPK3 като прогностичен маркер за прогресиране и развитие на тежка болест при пациенти с ВЧЗ**

За установяване на потенциала на ядрената експресия на RIPK3 като прогностичен маркер за прогресия и развитие на тежка болест при пациенти с ВЧЗ, се извършен рисков анализ, както при пациентите с БК (табл. 15), така и при пациентите с ЯК (табл. 16)

**Табл. 15. Оценка на високата експресия на RIPK3 при пациентите с БК като рисков фактор**

Показател	HR (95% CI)	P value
Хоспитализации	1.056 (0.994-1.121)	0.046
Хематохезия	2.123 (0.404-4.539)	< 0.001
Интестинални усложнения	3.831 (2.335-6.287)	< 0.001
Придружаващи заболявания	2.349 (1.451-3.802)	0.001
Операция	2.158 (1.347-3.456)	0.001

Според резултатите представени на табл. 15 може да се каже, че високата експресия на маркера за некроптоза е свързана с повишен риск за настъпването на интестинални усложнения при пациентите с БК (HR = 3.831).

Пациентите с ЯК и висока експресия на RIPK3 имат повишен риск от висока активност на заболяването (HR = 21.470), както и клинична изява с хематохезия (HR = 5.00) (Табл. 16).

**Табл. 16. Оценка на високата експресия на RIPK3 при пациентите с ЯК като рисков фактор**

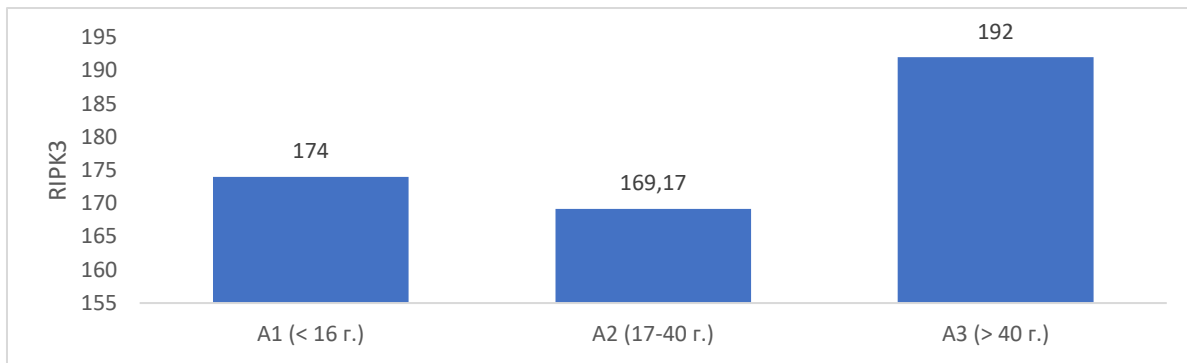
Показател	HR (95% CI)	P value
Хематохезия	5.00 (1.313-19.046)	< 0.001
Брой диарични изхождания	1.411 (1.131-1.759)	0.002
Операция	1.829 (0.512-3.567)	0.002
Инфекция	2.851 (1.533-5.304)	0.001
Активност на болестта	21.470 (0.010-46201.564)	< 0.001

При пациенти с БК, умерената и тежка активност (CDAI>220) се свързват с повишена експресия на RIPK3 при лица над 40 г. (192.0) (p=0.035) (Фиг. 82).

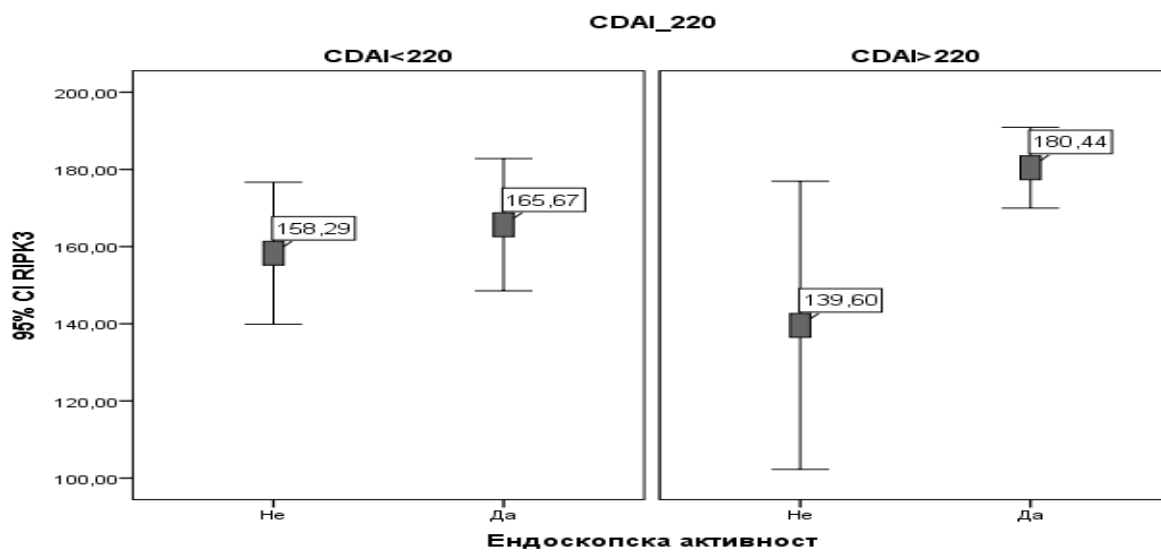
Висока експресия на маркера за некроптоза се установява и при пациенти с тежка БК, които са претърпели оперативна интервенция (180.42 към 153.66; p<0.05).

Високата експресия на изследвания маркер при пациентите с БК се свързва с чести релапси и тежка активност на заболяването (184.04 към 169.41; p=0.048).

По отношение на ендоскопската активност, тежестта на БК и експресията на RIPK3 се установяват противоречиви резултати. При пациентите с CDAI <220 не се установява съществена разлика в експресията на маркера по отношение на ендоскопската активност. Докато при пациентите с CDAI >220 експресията на RIPK3 е значително по-висока при пациентите с ендоскопска активност (p=0.027) (Фиг. 83).



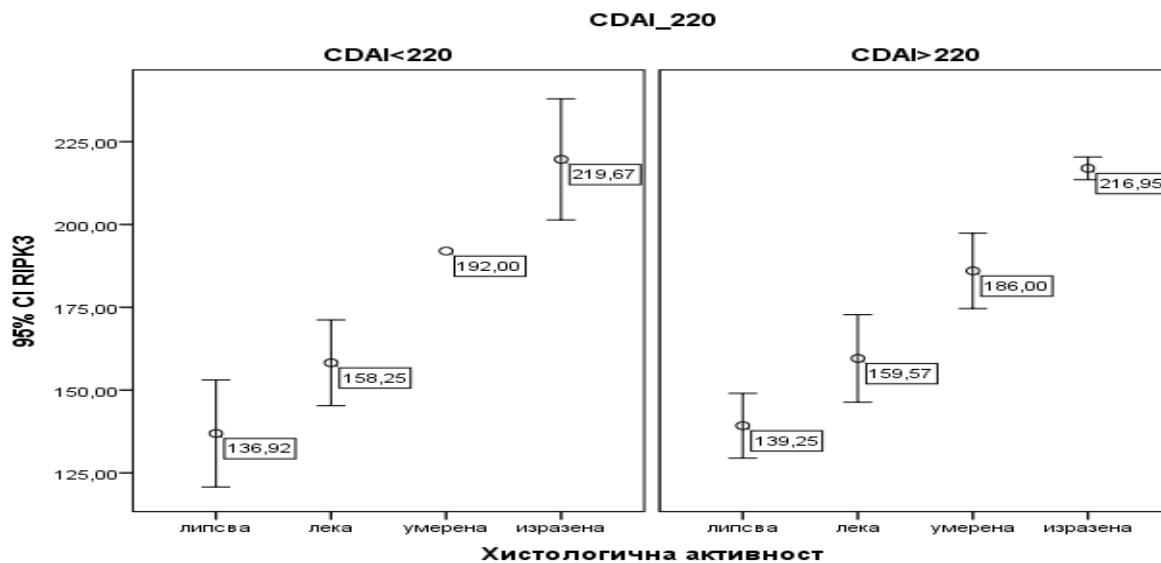
**Фиг. 82. Средна стойност на експресията на RIPK3 при пациенти с тежка болест според възрастта при дебют**



**Фиг. 83. Средна стойност на експресията на RIPK3 според тежестта на заболяването и ендоскопската активност**

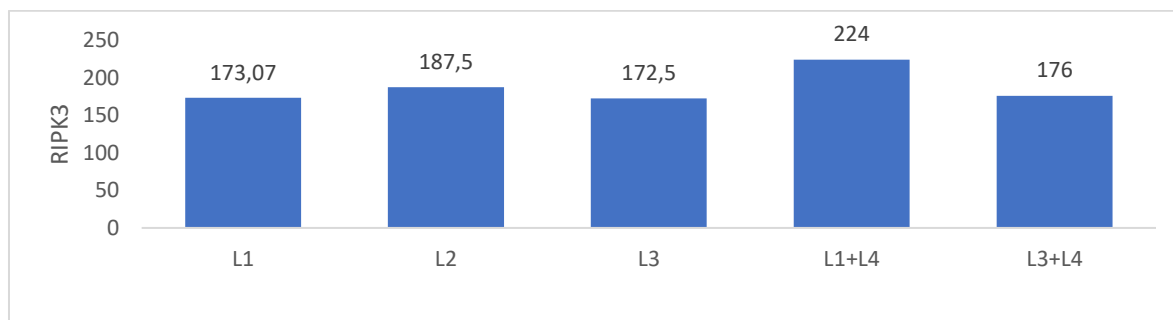
Анализът на експресията на маркера за некроптоза според клиничната и хистологична активност показва една и съща тенденция. Експресията нараства с увеличаване на активността ( $p=0.035$ ) (Фиг. 84).

При тежка клинична активност на БК високата експресия на маркера за некроптоза се свързва с екстензивен обхват - илеална локализация със засягане на горен ГИТ (L1+L4) (Фиг. 85) ( $p=0.045$ ).



**Фиг. 84. Средна стойност на експресията на RIPK3 според тежестта на заболяването и хистологичната активност**

Въпреки, че не се установява съществена разлика, най-висока експресия на RIPK3 имат пациентите с тежка клинична активност, стриктурираща с фистулизираща форма на протичане (B2+ B3) (180.38), както и тези с възпалителна форма на протичане (B1) (174.92). При изолирано засягане, не се установява разлика при стриктуриращата (162.15) и фистулизиращата форма (163.25).



**Фиг. 85. Средна стойност на експресията на RIPK3 при CDAI > 220 и според локализацията**

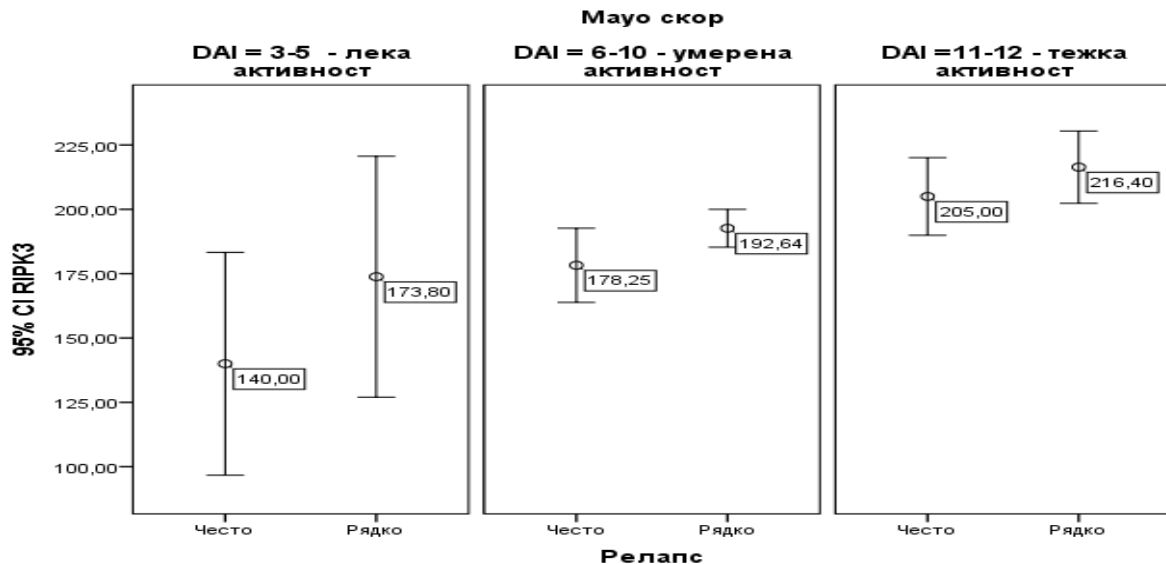
При оценката на експресията на маркера за некроптоза според лабораторните показатели и тежката активност на БК се установи повишена експресия на RIPK3 при ниски нива на албумина (съответно 192.57 към 123.50;  $p < 0.01$ ), ниски нива на хемоглобина (съответно 174.79 към 166.11) и повишени нива на CRP (съответно 174.23 към 158.91;  $p < 0.05$ ).

В литературата често се описва, че апендектомия в миналото се явява протективен фактор за развитието на ЯК, а в настоящото проучване се установи, че при пациентите с ЯК оперативната намеса (апендектомия в миналото) се свързва с умерена и тежка болест и повишена експресия на RIPK3 ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 86).



**Фиг. 86. Средна стойност на експресията на RIPK3 според DAI и оперативната намеса**

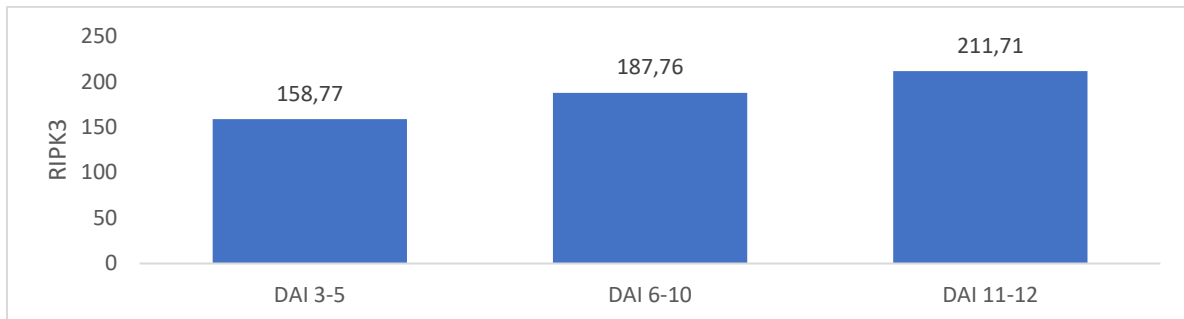
За разлика от БК, при пациентите с ЯК повишената експресия на маркера за некроптоза е свързана с повишена болестна активност и редки релапси ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 87).



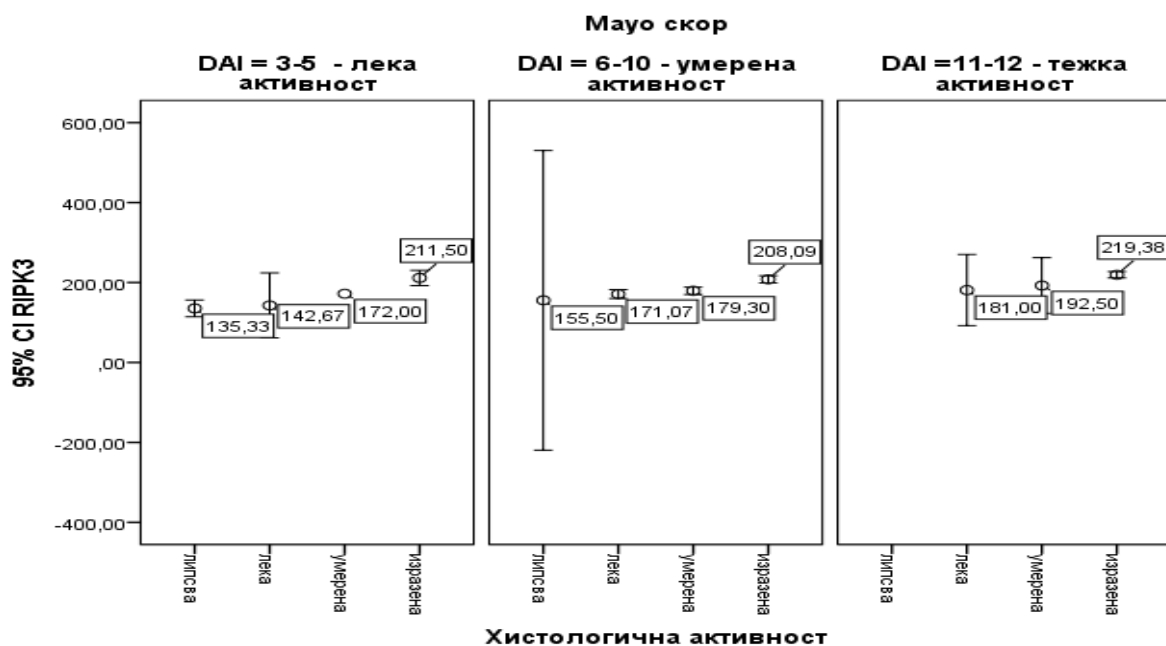
**Фиг. 87. Средна стойност на експресията на RIPK3 според DAI и честотата на релапсите**

По отношение на ендоскопската активност също се установява правопрпорционална зависимост между активността на заболяването и експресията на маркера за некроптоза ( $r = 0.481$ ;  $p < 0.001$ ) (Фиг. 88).

Правопропорционална умерена зависимост се установи и по отношение на хистологичната активност и експресията на RIPK3 според болестната активност (DAI) при ЯК ( $r=0.482$ ;  $p<0.001$ ) (Фиг. 89).



**Фиг. 88. Средна стойност на експресията на RIPK3 според DAI и ендоскопската активност**



**Фиг. 89. Средна стойност на експресията на RIPK3 според DAI и хистологичната активност**

Съществена разлика се установява и по отношение на експресията на RIPK3 според активността на ЯК и ниските нива на албумина ( $p<0.001$ ), като тежката болест се свързва с ниски нива на албумина и висока експресия на маркера за некроптоза (съответно 208.17 към 129.00). Подобни резултати се отчитат и при анализа на ЖДА,

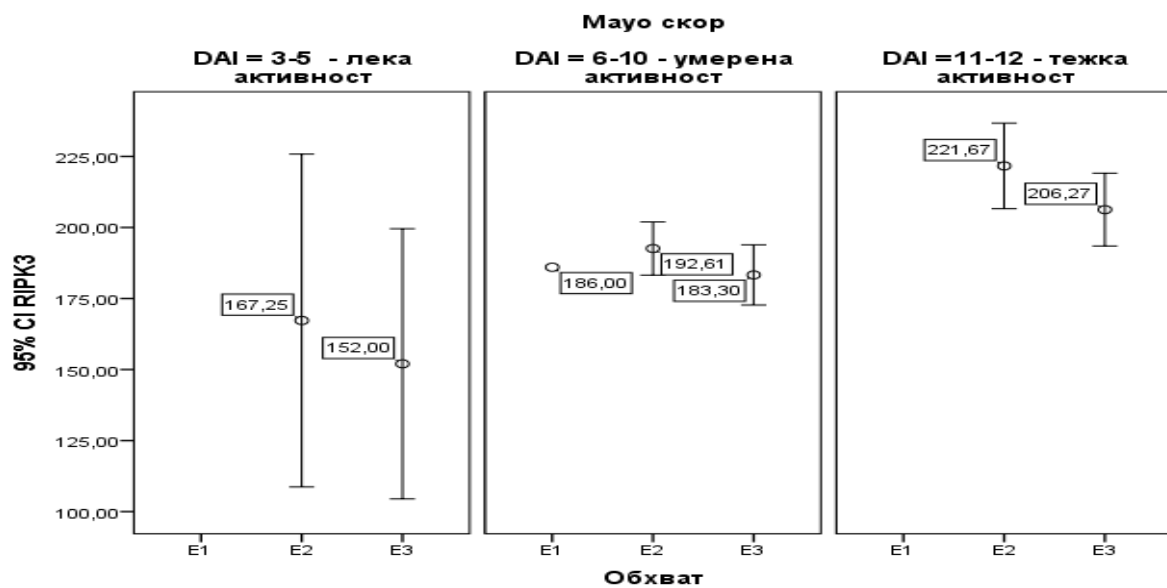
където тежката болест отново се свързва с наличието на ЖДА и висока експресия на RIPK3 (съответно 203.71 към 137.80;  $p < 0.001$ ).

Ниските нива на хемоглобина при пациентите с ЯК се свързват с тежка болест (DAI 11-12) и висока експресия на RIPK3 (съответно 203.71 към 158.77;  $p < 0.001$ ).

Тежката активност на ЯК е свързана единствено с повишени нива на CRP и свръхекспресия на маркера за некроптоза (211.71).

Свръхекспресията на RIPK3 при пациентите с ЯК може да се приеме като рисков фактор за тежка болест и развитието на интестинални усложнения (съответно 215.80 към 155.57;  $p < 0.001$ ).

Едно от най-честите интестинални усложнения при пациентите с ЯК е псевдополипозата, която се свързва с умерена и тежка активност (съответно 180.66 и 226.25) и се характеризира с висока експресия на RIPK3.



**Фиг. 90. Средна стойност на експресията на RIPK3 според DAI и обхвата на ЯК**

От гледна точка на обхвата се установява повишена експресия на маркера за некроптоза при обхват (E2), както при умерена, така и при тежка активност на ЯК (Фиг. 90).

Според представените резултати за експресията на RIPK3 при пациентите с ЯК и БК може да се каже, че има известни вариации, но се запазва основната тенденция, а именно, че повишена експресия на маркера за некроптоза се свързва с тежката болест и риск от прогресиране на заболяването.



## ОБСЪЖДАНЕ

Въпреки напредъка в медицината все още патогенезата на ВЧЗ не е напълно ясна.

Няколко проучвания през последните години докладват, че некроптозата в чревния епител е важен фактор, който допринася за неконтролираното възпаление и дефекти в чревната бариера при ВЧЗ. (Günther C et al., 2013; Negroni A et al., 2015, Pasparakis M, Vandenabeele P, 2015). RIPK3 протеинът е идентифициран като ключова молекула необходима за изпълнение на некроптозния път, като експресията му корелира с чувствителността на клетките да претърпяват некроптоза (He S et al., 2009).

Малко са данните в научната литература относно ролята на некроптозата при ВЧЗ при хората. Повечето проучвания изследват експресията на RIPK3 при експериментални модели на животни, което затруднява сравняването на резултатите. Въпреки нарастващият брой публикации, които изследват експресията на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ, не се откриват съобщения за установени и валидирани прагови стойности на RIPK3 при пациенти с ЯК и БК. Единствените насоки при изследвания на пациенти с ВЧЗ, е определяне на повишена или понижена експресия в ендоскопски чревни биоптати взети от възпалени и невъзпалени участъци, и сравняването им със здрави контроли (Günther C et al., 2013, Negroni A et al., 2017, Pierdomenico M et al., 2014, Wu T et al., 2019, Zhou M et al., 2021). Други ограничения при сравняване на резултатите са различните методи за анализ и малките извадки.

Въз основа на посочените ограничения се определиха праговите стойности, точността на RIPK3 за разграничаване на пациенти с ВЧЗ от здрави контроли, както и за разграничаване на БК от ЯК, специфичността, чувствителността и позитивната и негативната предсказваща стойност.

При определянето на праговата стойност на ядрената експресия на RIPK3 за разграничаване на здравите контроли от пациентите с ВЧЗ установихме cut-off - 163.5, а за разграничаване на пациентите с ЯК от пациентите с БК се установи cut-off - 185.5.

При сравняване на тъканната експресия на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ и здрави контроли в настоящето проучване се установиха повишени стойностите при пациентите с ВЧЗ. Резултатите кореспондират с подобни съобщения в научната литература (Günther C et al., 2013, Negroni A et al., 2017, Pierdomenico M et al., 2014, Wu T et al., 2019, Zhou M

al.,2021), като авторите не дават конкретни прагови стойности или средни стойности на измерваните показатели.

При изследване на експресията RIPK3 при пациенти с БК се установи, че стойностите във възпалените участъци са сигнификантно по-високи в сравнение със здравите контроли. Нашите резултати кореспондират с тези на Günther C et al. (Günther C et al., 2011). През 2011г екипът посредством експериментални проучвания при миши модели установява повишена експресия на RIPK3 във възпалителни лезии от терминален илеум. In vivo резултатите са потвърдени и при анализ на хистологични проби от терминален илеум при пациенти с активна БК, като се установява висока експресия на RIPK3 във възпалените участъци в сравнение със здравите контроли.

Подобни резултати съобщават и Pierdomenico et al. (Pierdomenico M et al., 2014). През 2014 г екипът проучва 63 деца с ВЧЗ – болест на Крон (33) и язвен колит (30) в активност, както и 20 деца с функционални стомашно-чревни нарушения, нормална ендоскопия и хистология, които служат като здрави контроли. Те изследват ендоскопски биоптати от възпалени и не възпалени участъци при БК и ЯК и установяват, че при Western blots нивата на RIPK3 и MLKL в ендоскопски активните зони са значително увеличени в сравнение със здрави контроли и не възпалените участъци, като при последните нивата на маркерите са сравними с тези на здравите контроли. Допълнително подлагат на анализ биоптатите, като изследват каспаза- 8, за която е установено, че инхибирането ѝ води до некроптоза при TNF стимулация. Резултатите разкриват значимо намаляване на каспаза-8 ( $p < 0,05$ ) във възпаления илеум при БК в сравнение с контролите. Намалена експресия наблюдават и във възпалените участъци от колон при БК и ЯК. За да анализират връзката между некроптоза и възпаление при БК и ЯК, изследват генната експресия на IL-8, надежден маркер за чревно възпаление. Резултатите установяват, че IL-8 е значително повишен във възпалените участъци при децата с ВЧЗ в сравнение с не възпалените участъци и здравите контроли, потвърждавайки, че некроптозата и възпалението в чревния епител са строго свързани събития. В своето проучване те не установяват корелация между експресията на RIPK3 и болестната активност, както и връзка с прилаганите терапии.

Това е в контраст с анализите от настоящето проучване, които разкриват правопрпорционална зависимост между експресията на RIPK3 и клиничната активност (оценена чрез CDAI). Подобна тенденция има и при сравняване на маркера с

ендоскопската и хистологична активност, като свръхекспресията на маркера е свързана с тежка клинична, ендоскопска и хистологична активност на БК.

Установи се и правопрпорционална зависимост между броя на хоспитализациите при пациентите с БК и експресията на RIPK3. Освен това пациентите с чести релапси имат значително по-висока експресия на маркера спрямо тези, които са рядко релапсиращи.

В достъпната научна литература няма данни за промените в експресията на RIPK3 според локализацията, формата на протичане и приложеното лечение при БК.

В настоящото проучване се установи, че най-висока експресия на маркера има в илеум (L1) и колон (L2) при екстензивен обхват на заболяването със засягане и на горен ГИТ (L4) – L1+L4 и L2 + L4. От друга страна изолираното засягане на терминален илеум (L1) се откроява с най-ниска експресия на маркера, докато колонната локализация (L2) запазва позицията си на локализация, характеризираща се с висока експресия на RIPK3.

Няколко проучвания съобщават, че засягането на горен ГИТ при БК е свързано с лоша прогноза, чести рецидиви и необходимост от операция (Cosnes J et al., 2002, Crocco S et al., 2012, Kim OZ et al., 2018, Moon JS et al., 2020, Sun XW et al., 2019). Chow et al. (Chow DK et al., 2019) разкриват, че при анализ на азиатска популация, пациентите с БК, със засягане на горен ГИТ имат по-тежък ход на заболяването, включващо стриктури, фистули и риск от по-продължителна хоспитализация. Това предполага, че фенотип L4 е предиктор за тежко заболяване и изисква по-агресивно лечение в сравнение с тези без засягане на горен ГИТ (Cosnes J et al., 2002). Въпреки това съществуват противоречия относно връзката между засягането на горен ГИТ и лошата прогноза (Greuter T et al., 2018), което най-вероятно е свързано с липсата на стандартизирана дефиниция, както и ниската честота на скринингова фиброгастродуоденоскопия в миналото (Greuter T et al., 2018).

В тази връзка, допълнителният анализ в настоящето проучване установи, че независимо каква е интестиналната локализация, пациентите с придружаващ НР (-) гастрит, които нямат общоизвестните критерии, за да се приеме засягане на горен ГИТ (L4), имат висока експресия на RIPK3. Това предполага, че наличието на НР (-) гастрит, може да бъде индикатор за тежест на промените в долните отдели на ГИТ при БК, което може да послужи за промяна в подхода при лечение на пациентите, евентуално включване на допълнителна терапия като част от персонализирания подход.

По отношение на формата на протичане се установи, че най-висока експресия на маркера има при пациентите с фенотип В2 +В3 - стриктурираща с фистулизираща форма, следвана от възпалителната форма (В1). В научната литература многократно е изтъквано, че наличието на фистулизираща и стенозираща болест предсказват по-тежко протичане, като пациентите с В3 фенотип имат слаб отговор към имуномодулатори (Lecomte T et al., 2003, Papi C et al., 2007).

В настоящото проучване допълнително се установи, че пациентите със съпътстваща перианална болест се характеризират със свръхекспресия на RIPK3. Beaugerie et al съобщават, че пациентите с БК, които имат перианално заболяване при дебют имат значителен риск от усложнен ход на заболяването през следващите 5 години (Beaugerie L et al., 2005). Друго изследване потвърждава тези резултати, като добавя, че стриктуриращата форма е маркер за лоша прогноза (Loly C et al., 2008).

Предвид гореизложените резултати, може да се заключи, че високата експресия на RIPK3 има предиктивна стойност при БК по отношение на повишен риск от усложнен ход - развитие на перианална болест, стриктурираща и фистулизираща болест, и тежка активност.

Анализът на резултатите от това проучване не установи зависимост между експресията на RIPK3 и нивата на CRP при пациентите с БК и тези с ЯК. Известно е, че серумните нива на CRP не винаги корелират с активността на ВЧЗ, като може да има нормални стойности, както при активна БК, така и при ЯК (Denis MA et al., 2007, Florin TH et al., 2006, Lewis JD, 2011, Vermeire S et al., 2006).

Клинични и популационни проучвания показват, че пациентите с БК, с дебют в по-млада възраст имат по-обширен обхват и усложнен ход, които се свързват с по-висок риск от развитие на фистули и кортикостероидна зависимост (Gupta N et al., 2006, Solberg IC et al., 2007). Etchevers et al. докладват, че дебюта в по-млада възраст е независим предиктор за агресивно заболяване (Etchevers MJ et al., 2009). В настоящото проучване се установи, че пациентите с БК с дебют в най-ниската възрастова група (А1 < 16 г) имат по-високи нива на експресията на маркера в сравнение с останалите, което е свързано с висока активност на заболяването. С това нашите резултати потвърждават консенсусните мнения, че младата възраст е предиктор за тежка болест при БК.

Повишена експресия на RIPK3 във възпалените тъкани при ЯК, подобно на екипа на Pierdomenico (Pierdomenico M et al., 2014), е докладвана и в няколко други проучвания.

През 2019 г Wu et al. анализират ендоскопски биоптати от възпалени и невъзпалени участъци при 22 пациенти с активен ЯК и 19 здрави контроли. Имунохистохимичният анализ разкрива, че експресията на RIP3 и MLKL е увеличена във възпалените участъци на пациенти с ЯК, в сравнение с невъзпалените и здрави контроли. Освен това нивата на RIP3 и MLKL във възпалените зони са значимо положително свързани с активността, включително болестната (Mayo скор) и ендоскопска активност (Modified Baron score) (Wu T et al.,2019).

Анализът от настоящето проучване показва аналогична динамика. При изследване на експресията на RIPK3 в ендоскопски променените участъци при ЯК се установи съществена разлика в експресията в сравнение със здрави контроли, като пациентите с ЯК имат свръхекспресия на маркера (189.4), а при лицата от контролната група се наблюдава ниска експресия (158.9).

Подобно на Wu et al., установихме правопрпорционална зависимост между експресията на RIPK3 и тежестта на болестта, оценена чрез общия Mayo скор, както и чрез Монреалската класификация, като тежката болест се характеризира със свръхекспресия на маркера.

Друго проучване потвърждава настоящите резултатите и тези на Wu et al. Lee et al през 2020 г изследват експресията на RIPK3 и MLKL при 11 пациента с ЯК и установяват, че експресията на двата маркера, както и IL-17A са силно повишени в ендоскопски променените участъци на дебелото черво в сравнение с незасегнатите. Освен това в експерименталния модел на DSS- индуциран (dextran sulfate sodium) колит при мишки, има свръхекспресия на RIPK3 и MLKL в сравнение с контролната група (Lee S. H. et al.,2020).

Друга група учени анализират експресията на каспаза-8, RIPK1, RIPK3 и MLKL в биоптати от пациенти с ВЧЗ, а също и в експерименталния модел на DSS- индуциран колит при мишки. Резултатите показват значително намаляване на каспаза-8 и значително увеличение на RIPK1, RIPK3 и MLKL във възпалените тъкани на дебелото черво в сравнение с нивата в съседните невъзпалени тъкани (Zhou M al.,2021). В настоящето проучване при пациенти с ВЧЗ, експресията на RIPK3 в засегнатите тъкани показва подобни резултати.

Duan et al., при изследване на пациенти с активен ЯК установяват, че нивата на експресията на RIPK3 в дебелото черво са правопрпорционални на тежестта на ЯК.

Имунохистохимичният анализ показва, че нивото на експресия на RIP3 в чревната тъкан на пациенти с тежък ЯК е по-високо от това при пациенти с умерен ЯК ( $P < 0,01$ ). Впоследствие Duan et al., установяват, че прилагането на некростатин (Nec-1), инхибитор на некроптозата, може да облекчи чревната патология и хистологичната активност при мишки с DSS-индуциран колит. Освен това генетичният дефицит на RIP3 инхибира секрецията на възпалителни цитокини (IL-16, IL-17 и IFN- $\gamma$ ) и производството на ROS, индуцирано от TNF- $\alpha$  (Duan, C et al.,2022).

И настоящето проучване разкри правопрпорционална умерена зависимост между тежестта на ЯК, оценена чрез общия Mayo скор и експресията на RIPK3 ( $r=0.481$ ;  $p<0.001$ ). Същата тенденция се наблюдава и при сравняване на имунохистохимичният анализ за некроптоза с ендоскопската и хистологична активност на ЯК. Установи се правопрпорционална умерена зависимост между експресията на RIPK3 и степента на ендоскопска активност оценена чрез ендоскопския Mayo скор ( $r=0.363$ ;  $p=0.001$ ). При сравняване на експресията на RIPK3 с хистологичната активност се намери силна правопрпорционална зависимост ( $r=0.735$ ;  $p<0.001$ ), като стойностите на експресията на маркера за некроптоза са значително по-високи при пациентите с ЯК с изразена хистологична активност в сравнение с тези без активност (съответно 212.13 към 143.40).

При допълнителен анализ на експресията на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ и здрави контроли се установи, че високата експресия на маркера корелира с наличието на ВЧЗ спрямо здравите контроли ( $r=0.398$ ;  $p<0.001$ ) и е свързана до 4.14 пъти по-висок риск за висока активност на ВЧЗ (RR=4.15 (2.01-8.57);  $p<0.001$ ).

Подобно на цитираните автори и в това проучване се наблюдава повишената експресия на RIPK3 при ВЧЗ в сравнение с експресията при здрави контроли. Това доказва, че независимо от начина на подбор на изследваните лица, периода на изследване и различната популация на пациенти, повишена експресия на RIPK3 се наблюдава и при българските пациенти, което дава основания повишената експресия на RIPK3 да влезе в профила на пациентите с активна ВЧЗ.

При анализ на пациентите с ВЧЗ и придружаваща инфекция с *Cl. Difficile* се установи, че наличието на инфекция с *Cl. Difficile* при БК и ЯК е свързано с ниска експресия на RIPK3 ( $p<0.01$ ), която е по-значима при пациентите с БК. Възможно е, това да се дължи на факта, че възпалението, свързано с некроптозата е имуномедирано, с което се различава от възпалението предизвикано от инфекцията с *Cl. Difficile*. Различните молекулни механизми на двата вида възпаление може да обясни ниските

стойности на RIPK3 при *Cl. Difficile* инфекцията. Необходими са допълнителни проучвания в тази област за установяване на потенциала на RIPK3 като маркер за разграничаване на ВЧЗ от инфекциозен ентероколит.

За първи път в световен мащаб бяха сравнени нивата на експресия на RIPK3 между пациентите с БК и ЯК, които показаха съществена разлика ( $p=0.001$ ), като пациентите с ЯК имат по-високи нива на експресия в сравнение с пациентите с БК. При оценката за разграничаване на пациентите с БК от пациентите с ЯК според експресията на RIPK3, се установи, че високата експресия се свързва с над 2 пъти по-голяма вероятност пациентите с ВЧЗ да имат ЯК ( $RR=2.61$  ( $1.41-4.85$ );  $p<0.05$ ). От представените резултати може да се заключи, че тъканната експресия на RIPK3 може да се използва като маркер за разграничаване на БК от ЯК.

След проведените анализи за експресията на RIPK3 при пациентите с ВЧЗ, се установи, че RIPK3 е един комплексен важен маркер за оценка на възпалението при ВЧЗ, както и рисков фактор за тежка клинична активност, свързана с хематохезия (ЯК > БК), увеличен брой диарийни изхождания (ЯК), инфекциозни усложнения (ЯК), интестинални усложнения (БК > ЯК) и оперативни интервенции (БК > ЯК).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите от анализа на съвременната медицинска литература показват, че все повече започва да се изследва ролята на RIPK3 като маркер за некроптоза в хода на възпалителните заболявания. В литературата съществуват малко данни за ролята на RIPK3 при ВЧЗ, които са ограничени до единични изследвания при пациенти с ВЧЗ, като резултатите от тези изследвания са насочени предимно в доказването на връзката между експресията на маркера за некроптоза и наличието на възпалителна активност.

Поради липсата на валидирани стойности на експресията на маркера за некроптоза и по-добрата оценка на прогностичната роля на маркера бяха определени праговите стойности за разграничаване на пациентите с ВЧЗ от здрави контроли, както и на пациентите с БК и ЯК. Тези резултати послужиха като ориентир за посоката и интензитета на експресията според разглежданите характеристики и показатели в изследваните групи. Така според установените прагови стойности се доказва, че пациентите с ВЧЗ имат повишена експресия спрямо здравите контроли, а пациентите с ЯК се характеризират със свръхекспресия на маркера.

Резултатите от проведените анализи ни дават основание да приемем хипотеза 1, а именно, че се установява съществена разлика в експресията на RIPK3 при пациентите с ВЧЗ, при което изследваният показател може да се използва като маркер за разграничаването на БК от ЯК и като прогностичен маркер за развитие на тежка болест и прогресия.

При пациентите с ВЧЗ се установява повишена експресия на RIPK3, която се дължи на активния възпалителен процес и независимо от прилаганото лечение към момента на проследяването на пациентите се установи, че при нито един не е достигната средната стойност на експресията на маркера при здрави контроли.

Различават се различни профили на пациентите с БК и ЯК относно експресията на RIPK3. При пациентите с БК високата експресия на маркера за некроптоза корелира с младата възраст при дебют (<16 г), повишеният брой хоспитализации, екстензивния обхват (горен ГИТ с илеум/колон), стриктурираща с фистулизираща форма на заболяването (B2+B3), наличието на перианална болест, умерената и тежка клинична активност (CDAI >220), чести релапси, наличието на ендоскопска и хистологична активност, и спиране на лечението ( конвенционално и биологично).



При пациентите с ЯК повишената експресия на RIPK3 корелира с начало на заболяването над 40 г, дебюта на заболяването, тежката клинична и хистологична активност, редките релапси и наличие на хематохезия.

Анализът на експресията на RIPK3 при различни терапевтични режими, разкри, че на фона на лечение не се наблюдават нива на маркера за некроптоза близки до тези при ремисия или здрави контроли, което може да бъде предпоставка за оптимизиране на лечебната стратегия като първа стъпка към персонализиран подход при пациентите с ВЧЗ.

Поради уникалния си характер настоящото проучване има и някои ограничения свързани с малкия брой пациенти, моментната оценка, липсата на валидирани стойности и доказани методики, които да направят съпоставими резултатите с други проучвания. За валидиране на получените резултати е необходимо провеждането на обширно проучване сред пациентите с ВЧЗ и тяхното проследяване във времето.

## ИЗВОДИ

1. При пациентите с ВЧЗ се установява висока експресия на RIPK3 във възпалените тъкани спрямо здрави контроли.
2. Експресията на RIPK3 се различава съществено при пациентите с БК и ЯК и здрави контроли, като най-висока експресия на маркера се установява при пациентите с ЯК.
3. Високата експресия на RIPK3 при пациентите с БК се свързва с възрастта при дебют до 16 г (A1), повишеният брой на хоспитализациите, засягането на горен ГИТ в комбинация с колонно (L2) или илеално засягане (L1), стриктуриращата с фистулизираща форма на заболяването (B2+B3), съпътстваща перианална болест, клиничната активност на заболяването (CDAI > 220), честите релапси, наличието на хематохезия, висока ендоскопска и хистологична активност, спиране на конвенционалното и биологично лечение.
4. Високата експресия на RIPK3 при пациентите с ЯК се свързва с дебют, начало на заболяването над 40 годишна възраст, редки релапси, наличието на хематохезия, тежката активност на болестта, оценена чрез Монреалската класификация и общия Mayo скор, изразена ендоскопска и хистологична активност.
5. Сравнителният анализ на експресията на RIPK3 между пациентите с ВЧЗ и здрави контроли показва, че маркерът за некроптоза е повишен повече при мъже, при пациенти с изразена възпалителна активност и при провеждане на лечение с 5-АСА или биологична терапия.
6. Липсата на съществена разлика в експресията на RIPK3 между пациентите с ВЧЗ с дебют и тези с известно заболяване, както и липсата на разлика между честите и редки релапси показва, че експресията на маркера основно се влияе от наличието на възпаление.
7. Сравнителният анализ на експресията на RIPK3 между пациенти с БК и ЯК показва, че експресията при ЯК е значително по-висока по отношение на пола, дебюта, клиничната активност, броя на изхожданията, хематохезията, коремната болка и тромбоемболичните усложнения.
8. Посоката на експресията на RIPK3 се различава между пациентите с БК и ЯК по отношение на възрастта на пациента, честотата на релапсите, загубата на тегло, наличието на ЕИП, ускореното СУЕ, наличието на ЖДА, понижените нивата на серумното желязо.

9. Повишената експресия на RIPK3 при пациентите с БК е прогностичен фактор за предвиждане на честотата на релапсите, клинична изява с хематохезия, настъпването на интестинални усложнения, придружаващи заболявания и бъдещи оперативни интервенции.
10. Повишената експресия на RIPK3 при пациентите с ЯК е прогностичен фактор, който предвижда клинична изява с хематохезия, повишена честотата на диарични изхождания, бъдещи оперативни интервенции, висока честотата на инфекции и висока активност на болестта.
11. При пациентите с ВЧЗ високата експресия на маркера за некроптоза ( RIPK3) се свързва с тежка болест, изявена клинична, ендоскопска и хистологична активност, липса на отговор към провежданото лечение и лоша прогноза, свързано с усложнения и оперативни интервенции.

## **ПРИНОСИ**

### **Приноси с теоретичен характер**

1. За първи път в България е направен подробен и изчерпателен преглед на научната литература относно приложението на RIPK3 като маркер за ВЧЗ.
2. Направен е подробен анализ на наличните и достъпни литературни данни относно ролята на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ.
3. Направен е задълбочен анализ на експресията на RIPK3 според характеристиките на пациентите с БК и ЯК, като са отразени разликите между двете групи пациенти.

### **Приноси с практико-приложен характер**

1. Определени са праговите стойности за разграничаване на експресията на RIPK3 между здрави контроли и пациенти с ВЧЗ, както и между пациенти с БК и ЯК.
2. Извършен е подробен анализ на експресията на RIPK3 при пациентите с БК и ЯК, като са установени специфичните за всяка група пациенти характеристики на маркера.

### **Приноси с оригинален характер**

1. За първи път в национален мащаб е направено изследване на ядрената експресия на RIPK3 при пациенти с ВЧЗ.
2. За първи път в национален и световен мащаб е доказана зависимостта между експресията RIPK3 и клиничната и ендоскопска активност на пациентите с ВЧЗ.
3. За първи път в национален и световен мащаб е изследвана ролята на експресията на RIPK3 като маркер за разграничаване на пациентите с ВЧЗ.
4. За първи път в национален и световен мащаб е оценена експресията на RIPK3 като прогностичен маркер за развитие на тежка болест и прогресия.

## ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Панайотова Е., Атанасова А. Ролята на RIPK3 експресията в чревната лигавица при възпалителните чревни заболявания. IV национална конференция с международно участие -„Иновации в общественото здраве“, София, 17-18 септ.2020г, сборник резюмета стр. 70, ISBN 978-619-7452-10-5
2. Panayotova E., Atanassova A., Programed necrosis and inflammatory bowel disease. Folia Medical I 2020 Vol.62 I Suppl.1 ISSN 0204-8043
3. Панайотова Е., Атанасова А. Некроптозата – възможен пусков механизъм за възникване на възпалителните чревни заболявания. Варненски медицински форум, т.11, 2022.
4. Панайотова Е., Атанасова А. Некроптозата – възпалителен модел на клетъчна смърт. Варненски медицински форум, т.11, 2022.
5. Панайотова Е., Атанасова А. Експресия на RIPK3 сред група от български пациенти с хронични възпалителни заболявания на червата. Варненски медицински форум, т.11, 2022.

### Участия в научни форуми:

1. Панайотова Е., Атанасова А. Ролята на RIPK3 експресията в чревната лигавица при възпалителните чревни заболявания. IV национална конференция с международно участие -„Иновации в общественото здраве“, София, 17-18 септ.2020, постерна сесия.
2. Панайотова Е., Атанасова А. Програмирана некроза и ВЧЗ. Юбилейна научна конференция „Медицина на бъдещето“, Пловдив, 29-31.10.2020, постерна сесия.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Отправлям думи на благодарност и признание към:

- Доц. д-р Антония Атанасова, д.м.н. – на моя научен ръководител изразявам специални благодарности за всеотдайната подкрепа, ценните съвети и вярата в осъществяването на този проект
- Проф. д-р Силва Андонова, д.м.н. – без чието съдействие не би било възможно реализирането на това проучване
- Проф. д-р Валентин Игнатов, д.м. – за съдействието при провеждане на изследването
- Доц. д-р Мария Димова, д.м. – за подкрепата в преодоляването на трудностите при реализиране на изследването

И най-голяма благодарност изказвам към моето семейство за проявените търпение, обич и разбиране.