

lek. dent. Kacper Nijakowski

**Ocena wpływu leczenia biologicznego
nieswoistych chorób zapalnych jelit
na wybrane parametry biochemiczne śliny**

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Anna Surdacka

Klinika Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Kolegium Nauk Medycznych

Poznań 2021

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

Prof. dr hab. Annie Surdackiej

*za ogromną życzliwość, okazane zaufanie i nieocenioną pomoc
w trakcie realizacji niniejszej rozprawy*

oraz

Najbliższym

*za cierpliwą troskę, wyrozumiałe wsparcie
i wszelkie słowa otuchy*

Badanie finansowane ze środków statutowych Kliniki Stomatologii Zachowawczej
i Endodoncji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Spis treści

Wykaz skrótów	6
1. Wstęp	8
1.1. Nieswoiste choroby zapalne jelit	8
1.1.1. Rys historyczny.....	8
1.1.2. Symptomatologia i różnicowanie	9
1.1.3. Zmiany występujące na błonie śluzowej jamy ustnej.....	10
1.1.4. Metody terapeutyczne, z uwzględnieniem leków biologicznych	11
1.2. Ślina jako materiał diagnostyczny	13
1.2.1. Właściwości fizykochemiczne i funkcje śliny	14
1.2.2. Metody pobierania śliny w celach diagnostycznych	15
1.2.3. Potencjał diagnostyczny śliny w chorobach ogólnoustrojowych	16
1.2.4. Ślinowe markery nieswoistych chorób zapalnych jelit.....	18
2. Założenia i cele pracy	24
3. Materiał i metody	25
3.1. Grupa badana	25
3.1.1. Kryteria włączania i wyłączenia	25
3.1.2. Kwalifikacja do leczenia biologicznego	25
3.1.3. Przebieg leczenia biologicznego i stosowane leki	26
3.1.4. Ocena odpowiedzi pacjenta na leczenie indukcyjne.....	27
3.2. Badanie kliniczne jamy ustnej	29
3.2.1. Ocena stanu uzębienia	29
3.2.2. Ocena higieny jamy ustnej.....	29
3.2.3. Ocena stanu przyzębia	30
3.2.4. Ocena błony śluzowej jamy ustnej	31
3.3. Badania laboratoryjne śliny.....	32
3.3.1. Metodyka pobierania próbek śliny	32

3.3.2.	Metodyka oceny parametrów biochemicznych śliny.....	32
3.4.	Analiza statystyczna.....	33
3.4.1.	Statystyki podstawowe	33
3.4.2.	Metody porównania	33
3.4.3.	Metody korelacji	34
3.4.4.	Krzywe ROC.....	34
3.4.5.	Metody regresji logistycznej.....	35
4.	Wyniki	36
4.1.	Charakterystyka grupy badanej.....	36
4.1.1.	Dane demograficzne	37
4.1.2.	Wyniki badania klinicznego choroby podstawowej.....	39
4.1.3.	Wyniki badania klinicznego jamy ustnej.....	41
4.1.4.	Właściwości fizykochemiczne śliny	45
4.2.	Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej	46
4.3.	Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne przed i po terapii indukcyjnej.....	49
4.4.	Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne ..	52
4.5.	Korelacje poziomów wybranych markerów ślinowych – wzajemne oraz ze stopniem zaawansowania choroby i poziomem CRP.....	60
4.6.	Analiza krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych pod kątem wartości predykcyjnej w diagnostyce i prognozowaniu odpowiedzi klinicznej na zastosowane leczenie biologiczne.....	63
4.7.	Budowa modelu regresji logistycznej w celu wyjaśnienia występowania odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne w oparciu o poziomy wybranych markerów ślinowych.....	69

4.8. Podsumowanie wyników	71
5. Dyskusja.....	73
6. Wnioski.....	85
7. Streszczenie	86
8. Summary.....	88
9. Piśmiennictwo.....	90
10. Spis tabel.....	104
11. Spis rycin	107
12. Załączniki.....	109
12.1. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	109
12.2. Wzór karty badania pacjenta	110
13. Aktywność naukowa.....	111

Wykaz skrótów

5-ASA	kwask 5-aminosalicylowy	(ang. <i>5-aminosalicylic acid</i>)
ADA	adalimumab	(ang. <i>adalimumab</i>)
API	aproksymalny wskaźnik płytki nazębnej	(ang. <i>Approximal Plaque Index</i>)
AUC	pole pod krzywą	(ang. <i>area under curve</i>)
BAZO	bazofile	(ang. <i>basophils</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała	(ang. <i>Body Mass Index</i>)
CAT	katalaza	(ang. <i>catalase</i>)
CD	choroba Leśniowskiego-Crohna	(ang. <i>Crohn's disease</i>)
CDAI	skala aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna	(ang. <i>Crohn's disease activity index</i>)
CRP	białko C-reaktywne	(ang. <i>C-reactive protein</i>)
EGF	nabłonkowy czynnik wzrostu	(ang. <i>epidermal growth factor</i>)
EOZ	eozynofile	(ang. <i>eosinophils</i>)
FRAP	antyoksydacyjna zdolność do redukowania jonów żelaza	(ang. <i>ferric reducing antioxidant power</i>)
GI	wskaźnik dziąsłowy	(ang. <i>Gingival Index</i>)
GKS	glikokortykosteroidy	(ang. <i>glucocorticoids</i>)
GSH	glutation zredukowany	(ang. <i>reduced glutathione</i>)
HCT	hematokryt	(ang. <i>haematocrit</i>)
HGB	hemoglobina	(ang. <i>haemoglobin</i>)
IFX	infliksymab	(ang. <i>infliximab</i>)
IgA	immunoglobulina A	(ang. <i>immunoglobulin A</i>)
IL	interleukina	(ang. <i>interleukin</i>)
LIM	limfocyty	(ang. <i>lymphocytes</i>)
MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów 1	(ang. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MCV	wskaźnik średniej objętości erytrocytu	(ang. <i>mean corpuscular volume</i>)
MDA	dialdehyd malonowy	(ang. <i>malondialdehyde</i>)
MMP	metaloproteinaza macierzy	(ang. <i>matrix metalloproteinase</i>)
MON	monocyty	(ang. <i>monocytes</i>)
MPO	mieloperoksydaza	(ang. <i>myeloperoxidase</i>)
NEU	neutrofile	(ang. <i>neutrophils</i>)
NO	tlenek azotu (II)	(ang. <i>nitric oxide</i>)

PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu 1	(ang. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PII	wskaźnik płytki nazębnej	(ang. <i>Plaque Index</i>)
PLT	płytki krwi	(ang. <i>platelets</i>)
PPD	głębokość kieszeni przyzębnej	(ang. <i>probing periodontal depth</i>)
PSMA7	podjednostka proteasomu alfa typ 7	(ang. <i>proteasome subunit alpha type-7</i>)
RBC	erytrocyty	(ang. <i>red blood cells</i>)
RDW-CV	rozpiętość rozkładu wielkości erytrocytów z czynnikiem zmienności	(ang. <i>red blood cell distribution width, coefficient of variation</i>)
SBI	wskaźnik krwawienia z brodawki dziąsłowej	(ang. <i>Sulcus Bleeding Index</i>)
sCD40-L	rozpuszczalny ligand CD40	(ang. <i>soluble CD40 ligand</i>)
SE	błąd standardowy	(ang. <i>standard error</i>)
sICAM-1	rozpuszczalna cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1	(ang. <i>soluble intercellular adhesion molecule-1</i>)
TGF- β 1	transformujący czynnik wzrostu β 1	(ang. <i>transforming growth factor β1</i>)
TNF-R1	receptor 1 dla czynnika martwicy nowotworu	(ang. <i>tumour necrosis factor receptor 1</i>)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworu α	(ang. <i>tumour necrosis factor α</i>)
UC	wrzodziejące zapalenie jelita grubego	(ang. <i>ulcerative colitis</i>)
VZD	wedolizumab	(ang. <i>vedolizumab</i>)
WBC	leukocyty	(ang. <i>white blood cells</i>)

1. Wstęp

1.1. Nieswoiste choroby zapalne jelit

Nieswoiste choroby zapalne jelit (*inflammatory bowel diseases, IBD*) obejmują przewlekłe zaburzenia o charakterze zapalnym, które dotyczą przewodu pokarmowego i dotyczą miliony osób na świecie. Mimo wielu prowadzonych badań, właściwa etiopatogeneza pozostaje wciąż niepoznana. Wśród potencjalnych czynników etiologicznych wymienia się predyspozycję genetyczną, uwarunkowania środowiskowe czy też nieprawidłową odpowiedź immunologiczną. Do głównych form nieswoistych chorób zapalnych jelit należą choroba Leśniowskiego-Crohna (*Crohn's disease, CD*) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis, UC*).

1.1.1. Rys historyczny

Pierwsze źródła historyczne wskazujące na opis symptomatologii nieswoistych chorób zapalnych jelit datuje się na połowę IX wieku. Ówczesne doniesienie dotyczyło króla Anglii Alfreda Wielkiego, który od młodości uskarżał się na bóle brzucha z towarzyszącymi biegunkami oraz utratę apetytu i masy ciała. Jemu współcześni tę chorobę przypisywali rzuconej klątwie lub karze za przewinienia, aczkolwiek prawdopodobnie ich władca cierpiał na chorobę Leśniowskiego-Crohna. Inny europejski władca, francuski król Ludwik XIII, panujący w XVII wieku, zmarł w wieku 42 lat z powodu schorzenia objawiającego się przewlekłymi biegunkami z domieszką krwi, bólami brzucha z towarzyszącą gorączką oraz ropniami okołoodbytniczymi. Na podstawie wyników wykonanej sekcji, w której wykryto owrzodzenia z ropniami i przetokami w obrębie jelita cienkiego i grubego, współcześnie za prawdopodobne rozpoznanie uznano gruźlicę lub właśnie chorobę Leśniowskiego-Crohna [1,2].

Na przestrzeni wieków wielu patologów i lekarzy (W. H. Fabry, G. B. Morgagnini, J. Abercrombie, J. W. Berg, T. K. Dalziel) opisywało przypadki pacjentów manifestujących objawy wskazujące na nieswoiste choroby zapalne jelit [1,3,4]. Mimo to oficjalnie przyjęło się na świecie, że doniesienie B. Crohna, L. Ginzburga i G. Oppenheimera opublikowane w *Journal of American Medical Association* w 1932 roku stanowi pierwszy opis jednej z postaci nieswoistego zapalenia jelit nazwanej „chorobą Crohna”. Autorzy sklasyfikowali przebieg kliniczny choroby wraz z jej symptomatologią [5]. Jednakże pierwsze polskie doniesienie opisujące tę chorobę pochodzi już z 1903 roku [6]. Wówczas polski profesor chirurgii Antoni Leśniowski z Uniwersytetu Warszawskiego zaprezentował przypadek 30-letniej

pacjentki z uporczywymi biegunkami oraz napadowymi bólami brzucha. Z powodu zdiagnozowania guza w części wstępującej okrężnicy wykonano pacjentce częściową resekcję jelita, a materiał pobrano do badania histopatologicznego. Stwierdzono obecność przewlekłego stanu zapalnego w obrębie ściany jelita – z zaczerwienioną i rozpulchnioną błoną śluzową oraz obrzękniętą błoną mięśniową, bez zmian rozrostowych. Dlatego też przy opisywaniu tej jednostki chorobowej w polskim środowisku medycznym przyjęło się określenie „choroba Leśniowskiego-Crohna”, natomiast w piśmiennictwie zagranicznym najczęściej występuje jako „*Crohn's disease*”.

Z kolei pierwsze opisy wrzodziejącego zapalenia jelita grubego przypisuje się Samuelowi Wilkowi z Londynu, który w 1859 i 1875 roku przedstawił przypadki dwóch pacjentek cierpiących na przewlekłe krwiste biegunki wraz z gorączką i zaproponował nazwę schorzenia „*ulcerative colitis*”. Sekcja pierwszej z nich wykazała jednak wrzodziejące zmiany zapalne przechodzące przez całą grubość ściany jelita, co niecałe 100 lat później sklasyfikowano jako „chorobę Crohna” [3].

1.1.2. Symptomatologia i różnicowanie

Choroba Leśniowskiego-Crohna może dotyczyć każdego odcinka przewodu pokarmowego od jamy ustnej aż do odbytnicy, jednakże najczęściej zmiany zapalne lokalizują się w końcowym odcinku jelita krętego oraz w jelicie grubym. Charakterystyczne jest występowanie naprzemiennie odcinków zmienionych zapalnie i zdrowych. Z kolei wrzodziejące zapalenie jelita grubego występuje najczęściej w obrębie odbytnicy i zmiany mogą szerzyć się proksymalnie w sposób ciągły, obejmując okrężnicę, a rzadziej nawet końcowy odcinek jelita krętego. W przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna proces zapalny obejmuje wszystkie warstwy ściany przewodu pokarmowego, natomiast we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego ogranicza się jedynie do błony śluzowej [7].

Aktywne postaci nieswoistych chorób zapalnych jelit manifestują się zazwyczaj takimi objawami jak przewlekła biegunka z możliwą domieszką krwi, bóle brzucha czy utrata masy ciała. Czasem mogą im towarzyszyć powikłania miejscowe, do których zalicza się tworzenie przetok oraz ropni, wystąpienie zwężeń, perforacji, polipowatości zapalnej lub ostrego rozdęcia okrężnicy (*megacolon toxicum*). Wśród najczęstszych powikłań pozajelitowych wymienia się m.in. kamicę żółciową, palce pałeczkowate, kamicę moczową, zapalenie stawów, rumień guzowaty, żylną chorobę zakrzepowo-

-zatorową. Za złoty standard diagnostyczny uważa się badanie endoskopowe z histopatologiczną oceną pobranego wycinka zmienionej zapalnie błony śluzowej przewodu pokarmowego [8].

Podstawowe cechy różnicujące obie najczęstsze formy nieswoistych chorób zapalnych jelit przedstawiono w Tabeli 1 [9].

Tabela 1. Różnicowanie głównych postaci nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Cecha różnicująca	Choroba Leśniowskiego-Crohna	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego
krwawienie	rzadko	bardzo często
ból brzucha	silny, często	niezbyt nasilony
wyczuwalny guz brzucha	dość często	bardzo rzadko
przetoki	znacznie częściej	bardzo rzadko
zajęcie odbytnicy	50%	95%
zmiany okołodbytowe	50–80%	5–18%
polipy rzekome	rzadziej	13–15%
<i>megacolon toxicum</i>	rzadziej	3–4%
wolna perforacja	rzadziej	2–3%
zwężenie jelita	często	rzadko
pANCA	~10%	~60%
ASCA	~60%	~10%

pANCA – przeciwciała przeciwko okołojądrowemu antygenowi granulocytów; ASCA – przeciwciała przeciwko *Saccharomyces cerevisiae*

Co ciekawe, w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego palenie tytoniu predysponuje do wystąpienia łagodniejszej postaci schorzenia, natomiast w chorobie Leśniowskiego-Crohna do zaostrzeń jej objawów [10].

Najczęściej stosowane skale służące do oszacowania aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna – CDAI (*Crohn's disease activity index*) – oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego – zmodyfikowana skala Mayo – zostaną szczegółowo omówione w podrozdziale 3.1.4.

1.1.3. Zmiany występujące na błonie śluzowej jamy ustnej

Zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej występują powszechniej u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna niż z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, zwłaszcza częściej u pacjentów pediatrycznych, z predylekcją do płci męskiej [11]. U dorosłych pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna najczęściej obserwuje się zmiany w jamie ustnej w przypadku postaci choroby obejmującej proksymalny odcinek przewodu pokarmowego i/lub okolicę okołodbytową [12]. Zmiany wewnątrzustne, takie jak nawracające afty, mogą uprzedzać wystąpienie objawów jelitowych nawet w 60% przypadków z chorobą Leśniowskiego-Crohna, stanowiąc pierwszą oznakę choroby [13].

Z kolei u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego występowanie takich objawów jest rzadsze i najczęściej należą do nich aftowe nadżerki [12]. Zmiany w obrębie jamy ustnej mogą być związane z przebiegiem choroby jako manifestacje pozajelitowe, jak również powstawać wskutek niedoborów żywieniowych lub działań niepożądanych stosowanych leków [11].

U pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, zmiany występujące na błonie śluzowej jamy ustnej można podzielić na swoiste i nieswoiste [14]. Podział tych zmian z najczęstszymi przykładami przedstawia Tabela 2.

Tabela 2. Zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej w nieswoistych chorobach zapalnych jelit.

Zmiany swoiste	Zmiany nieswoiste
tzw. „brukowanie” błony śluzowej (ang. <i>cobblestoning</i>) – CD	szczelinowate pęknięcie w obrębie czerwieni wargowej w linii pośrodkowej
ziarniniakowe zapalenie czerwieni wargowej (<i>cheilitis granulomatosa</i>) – CD	zapalenie kątów warg
stwardniałe polipowate zmiany (ang. <i>mucosal tags</i>) – CD	przewlekłe nadżerki i owrzodzenia aftowe
ropne przerostowe zapalenie jamy ustnej (<i>pyostomatitis vegetans</i>) – UC	zanikowe zapalenie języka
	bezobjawowy rozlany obrzęk policzka zapalenie dziąseł kserostomia

1.1.4. Metody terapeutyczne, z uwzględnieniem leków biologicznych

Syntetyczne omówienie zasad leczenia nieswoistych chorób zapalnych jelit oparto na podstawie Wytycznych Grupy Roboczej Konsultanta Krajowego w dziedzinie Gastroenterologii i Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczących postępowania z pacjentem z chorobą Leśniowskiego-Crohna [15] oraz z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego [16], uwzględniających również odpowiednio zmodyfikowane zalecenia *European Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO) [17–20]. Dla obu jednostek chorobowych za podstawowy cel leczenia farmakologicznego uważa się uzyskanie i utrzymanie głębokiej remisji bez konieczności stosowania leków steroidowych. Zarówno u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w farmakoterapii stosuje się podobne grupy leków, ale wykazują one różną skuteczność kliniczną.

W pierwszym rzucie w przypadku łagodnych i umiarkowanych postaci lekami z wyboru są preparaty przeciwzapalne: glikokortykosteroidy (GKS: prednizon, prednizolon) oraz pochodne kwasu aminosalicylowego (5-ASA: mesalazyna

i sulfasalazyna) i budezonid. Pierwsze z nich wskazane są w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna, a we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego jedynie w razie braku odpowiedzi na 5-ASA. Z kolei u pacjentów ze stwierdzoną steroidoopornością, steroidozależnością lub nietolerancją GKS należy zastosować leki immunomodulacyjne (z grupy tiopuryn: azatioprynę lub 6-merkaptopurynę, albo metotreksat). Wymienione preparaty immunomodulacyjne znajdują również zastosowanie w tzw. terapii podtrzymującej – jako pierwszego rzutu w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz drugiego rzutu, po 5-ASA, we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego.

Nie bez znaczenia w osiągnięciu remisji uznaje się także postępowanie ogólne, między innymi szczepienia ochronne, ograniczenie stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, suplementacje niedoborów żywieniowych, unikanie stresu oraz zakaz palenia tytoniu (u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna). Zależnie od sytuacji klinicznej wspomagająco można stosować np. leki przeciwbólowe, leki przeciwbiegunkowe lub antybiotyki (np. metronidazol i/lub ciprofloksacyna w przypadku wystąpienia zmian okołoodbytowych o charakterze ropnym).

Natomiast u pacjentów, u których nie uzyskano odpowiedzi na zastosowane standardowe schematy leczenia albo stwierdzono nietolerancję wobec stosowanych preparatów, można jeszcze wdrożyć terapię stosunkowo nowymi lekami biologicznymi. Należą do nich takie zatwierdzone leki jak inhibitory TNF- α (infliksymb, adalimumab, golimumab), wedolizumab czy też ustekinumab [21]. Pierwsze trzy wymienione preparaty stanowią ludzkie przeciwciała monoklonalne z dużym powinowactwem do czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α). Pozostałe posiadają inny mechanizm działania – wedolizumab jest przeciwciałem monoklonalnym wiążącym się swoiście z integryną $\alpha 4\beta 7$, a ustekinumab z dużą swoistością z podjednostką p40 wspólną dla cytokin IL-12 i IL-23. Dlatego te dwa preparaty znajdują zastosowanie u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na terapię antagonistami TNF- α . Wszystkie omawiane leki biologiczne podaje się drogą dożylną, z wyjątkiem adalimumabu podawanego drogą podskórną oraz kolejnych dawek podskórnych ustekinumabu (po pierwszej dawce dożylny). W momencie prowadzenia badania w Polsce refundowane było leczenie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna infliksymbem i adalimumabem, a z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego infliksymbem i wedolizumabem. Schematy stosowania leków biologicznych dostępnych w ramach Programów Terapeutycznych Narodowego Funduszu Zdrowia przedstawiono w podrozdziale 3.1.3.

Z kolei w przypadku ciężkiej postaci każdej z nieswoistych chorób zapalnych jelit lub w razie wystąpienia powikłań poza hospitalizacją należy rozważyć leczenie chirurgiczne. Do wskazań planowego leczenia operacyjnego należą brak odpowiedzi na leczenie farmakologiczne oraz rak jelita grubego. Natomiast pilne leczenie chirurgiczne jest wskazane u pacjentów z ciężkimi powikłaniami, takimi jak perforacja ściany jelita, masywne krwawienie z przewodu pokarmowego, toksyczne rozdęcie okrężnicy.

W związku z obecną sytuacją epidemiczną, w kwietniu ubiegłego roku opublikowano specjalne Stanowisko Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii i Konsultanta Krajowego w dziedzinie Gastroenterologii, dotyczące postępowania z pacjentem z nieswoistą chorobą zapalną jelit w dobie pandemii COVID-19 [22]. Zaleca się kontynuowanie dotychczasowego leczenia u pacjentów w remisji klinicznej. Sugeruje się przewagę leków biologicznych stosowanych podskórnie ze względu na krótszy czas pobytu w ośrodku i możliwość podawania w domu, dlatego należy brać to pod uwagę przy wdrażaniu nowej terapii. Dodatkowy czynnik wskazujący na adalimumab jako lek anty-TNF- α pierwszego wyboru stanowi mniejsze ryzyko wytworzenia przeciwciał w porównaniu z infliksymabem. Jednakże nie zaleca się zamiany obecnie stosowanego preparatu dożylnego na inny podskórny z powodu zwiększonego ryzyka zaostrzenia przebiegu choroby. Z kolei wedolizumab preferuje się w leczeniu starszych pacjentów, ponieważ w najmniejszym stopniu zwiększa ryzyko wystąpienia infekcji towarzyszących. Ponadto powinno unikać się stosowania wysokich dawek steroidów z rozważeniem redukcji dotychczasowej dawki. Nie ma jednak jednoznacznych dowodów na zwiększanie ryzyka zakażenia SARS-CoV-2 podczas rutynowego przyjmowania leków przez pacjentów.

1.2. Ślina jako materiał diagnostyczny

Ślina, podobnie jak krew, zawiera liczne enzymy, hormony czy przeciwciała – nie stanowi jednak jedynie jej biernego przesączu [23]. Wraz z rozwojem nowoczesnych rozwiązań technologicznych, takich jak diagnostyka molekularna czy nanotechnologia, niewielka objętość pobieranego materiału oraz stosunkowo niskie stężenia badanych parametrów biochemicznych w ślinie przestały być już przeszkodą [24]. Ślinę pobiera się nieinwazyjnie, co eliminuje stres towarzyszący pacjentom często podczas rutynowego pobierania krwi. Pobieranie śliny jest łatwe i bezpieczne nawet dla mniej wykwalifikowanego personelu medycznego oraz nie wymaga aż tak specjalnych

warunków transportu do laboratorium jak krzepnąca krew [25]. Obecnie nowe przyszłościowe techniki molekularne skupiają się na analizie proteomu (białek), jak i transkryptomu (kwasów nukleinowych) zawartych w ślinie [26–28].

1.2.1. Właściwości fizykochemiczne i funkcje śliny

Ślina jest opalizującym płynem biologicznym stanowiącym mieszaninę wydzieliny 3 par dużych gruczołów ślinowych o budowie płacikowej (przyusznicych, podżuchwowych i podjęzykowych) i wielu drobnych gruczołów ślinowych (ok. 5000 położonych w błonie podśluzowej) oraz płynu szczeliny dziąsłowej. Największy udział w wydzielaniu śliny spoczynkowej posiadają ślinianki podżuchwowe (60%) i przyusznicy (26%) [29].

W swoim składzie ślina zawiera średnio około 99% wody, a resztę stanowią substancje organiczne (głównie białka, szczególnie enzymy i immunoglobuliny) i nieorganiczne (jony mikro- i makroelementów, takich jak wapń, fluor). Odczyn śliny spoczynkowej jest zbliżony do obojętnego, jednakże wraz ze stymulacją wytwarzania staje się bardziej zasadowy z powodu zwiększonego wydzielania jonów wodorowęglanowych HCO_3^- [30]. Średnia szybkość wydzielania śliny w spoczynku wynosi 0,2-0,3 ml/min, a stymulacja (np. aktem żucia) może powodować jej wzrost do 1,5-2,3 ml/min – dobową objętość wydzielanej śliny to około 1-1,5 litra. Procesy wydzielnicze gruczołów ślinowych posiadają podwójną regulację autonomiczną. Podczas pobudzenia układu przywspółczulnego następuje obfite wydzielanie wodnistej śliny, natomiast podczas pobudzenia układu współczulnego gęstej śliny obfitującej w białko [31].

Ślina pełni liczne funkcje mające wpływ nie tylko na stan jamy ustnej [32]:

- ochronną, m.in. utrzymanie homeostazy, oczyszczanie i nawilżanie, buforowanie (jony węglanowe i fosforanowe), remineralizacja, udział w procesach gojenia
- trawienną, zawierając enzymy trawienne (amylazę i lipazę) oraz zapewniając odczucie smaku (tylko rozpuszczone substancje pobudzają receptory komórek kubków smakowych)
- obronną poprzez mechanizmy swoiste (immunoglobuliny A i G) i nieswoiste (np. lizozym, laktoferyna, peroksydazy, histatyny, cystatyny)
- diagnostyczną, która staje się coraz częstszym tematem interdyscyplinarnych projektów badawczych.

1.2.2. Metody pobierania śliny w celach diagnostycznych

Wśród czynników mogących wpływać na wydzielanie i skład śliny wymienia się między innymi porę dnia i czas pobierania oraz temperaturę otoczenia, jak również zastosowaną metodę. W celu wyeliminowania wpływu dobowych zmienności pobieranie próbek śliny powinno odbywać się o stałej porze dnia. Za optymalny czas trwania zbiórki śliny uważa się 10-15 minut [33–35]. Dodatkowo uczestnicy badania zobowiązani są do powstrzymania się od spożywania posiłków 1,5-2 godzin przed pobraniem, jak również unikania połykania śliny podczas pobierania [36–38]. Zaleca się przepłukanie jamy ustnej wodą bezpośrednio przed badaniem. Zaobserwowano, że w miesiącach zimowych w przeciwieństwie do letnich wzrasta wydzielanie śliny [39–41].

Najczęściej do celów diagnostycznych wykorzystuje się ślinę mieszaną ze względu na prostotę i nieinwazyjność jej pobierania. W piśmiennictwie opisuje się kilka metod pobrania śliny mieszanej [38]. Pierwsza z nich polega na swobodnym spływaniu śliny spoczynkowej z wargi dolnej pacjenta (zrelaksowanego, pochylonego lekko do przodu) bezpośrednio lub z pomocą lejka do probówki lub innego przygotowanego pojemnika. Kolejny sposób pozwala na pobieranie zarówno śliny niestymulowanej, jak i stymulowanej. Ustala się, że osoba badana splota zebraną w jamie ustnej ślinę w ustalonych interwałach czasowych (np. co 60 sekund) albo gdy zbierze się na dnie jamy ilość zmuszająca do odruchu połykania. Wśród zalecanych czynników stymulujących wydzielanie śliny wymienia się żucie parafiny lub bezcukrowej gumy do żucia oraz aplikację kwasu cytrynowego jako bodźca smakowego. Inna metoda, głównie stosowana do analizy składników śliny, takich jak hormony lub leki, wymaga użycia specjalnych probówek *Salivette* (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) zawierających wewnątrz bawełniany wacik, który pacjent umieszcza w jamie ustnej na określony czas, po czym wypłuka z powrotem do probówki.

W każdej z opisanych metod ilość pobranej śliny można określić dwojako – poprzez odczytanie objętości na skali umieszczonej na probówce lub zważenie pojemnika z zawartą śliną (po uprzedniej ocenie jego masy własnej). Ostatni z wymienionych sposobów pobierania śliny z wykorzystaniem bawełnianych walczków uważa się za najmniej wiarygodny w oznaczeniu ilości wydzielanej śliny. W przypadku śliny spoczynkowej najbardziej polecana jest pierwsza z metod polegająca na zbiorze spływającej swobodnie śliny, natomiast w przypadku śliny stymulowanej metoda z jej cyklicznym odpluwaniem do przygotowanego pojemnika [42].

Trudniej i tym samym rzadziej pobiera się ślinę wydzielaną przez konkretny rodzaj gruczołów ślinowych. W przypadku ślinianek przyusznych lokalizacja ujść przewodów Stenona na błonie śluzowej policzków na wysokości pierwszego lub drugiego zęba trzonowego szczęki umożliwia łatwą dostępność do wykonania kaniulacji lub podłączenia specjalnych kolektorów, które zaprojektowali K. S. Lashley oraz A. J. Carlsson i A. L. Crittenden [33,38]. Ze względu na stosunkowo niskie wydzielanie śliny spoczynkowej częściej wykorzystuje się przyusznicę do pobierania śliny stymulowanej. Z kolei w przypadku ślinianek podżuchwowych i podjęzykowych zazwyczaj trudno o oddzielne pobranie śliny z powodu bliskiego położenia ujść oraz cienkich ścian przewodów, odpowiednio, Whartona i Bartholina [38]. W celu pobrania śliny jednocześnie z obu rodzajów ślinianek znajdują zastosowanie specjalne aparaty opracowane przez L. Schneyera lub A. Wolffa [43,44]. Prostszy sposób polega na zablokowaniu ujść ślinianek przyusznych i odessaniu śliny zbierającej się na dnie jamy ustnej np. strzykawką [38]. Natomiast wydzielanie z drobnych gruczołów ślinowych wargowych lub policzkowych oraz szczelin dziąsłowych można skutecznie ocenić z wykorzystaniem specjalnych pasków metylocelulozowych dedykowanych dla urządzenia pomiarowego nazwanego *Periotron* [45].

Szczegółowy protokół pobierania śliny zastosowany w badaniu opisano w podrozdziale 3.3.1.

1.2.3. Potencjał diagnostyczny śliny w chorobach ogólnoustrojowych

Ślinę jako materiał diagnostyczny wykorzystywano dotąd głównie do monitorowania chorób jamy ustnej (próchnicy czy zapaleń przyzębia), a obecnie jej zastosowanie coraz bardziej rozszerza się do kontrolowania stanu zdrowia całego organizmu. Aktualnie badania śliny jako alternatywy dla krwi i moczu w diagnostyce medycznej skupiają się na poszukiwaniu i wykrywaniu różnorodnych biomarkerów, mogących stać się potencjalnymi czynnikami predykcyjnymi podczas diagnozowania i leczenia wybranych chorób ogólnoustrojowych. Ślina jako materiał biologiczny posiada ogromny wachlarz zastosowań diagnostycznych w wielu dziedzinach medycyny, przykładowo w gastroenterologii, reumatologii, kardiologii, endokrynologii, onkologii czy chorobach zakaźnych. Poniżej zaprezentowano wybrane prace dotyczące konkretnych jednostek chorobowych i ich potencjalnych markerów ślinowych.

Zmiany biochemiczne w ślinie występują między innymi w przebiegu chorób o podłożu autoimmunologicznym. Przykładem jednej z nich jest zespół Sjögrena charakteryzujący się zmniejszeniem sekrecji gruczołów ślinowych i łzowych. W składzie śliny można zaobserwować podwyższone poziomy sodu, IgA, przeciwciał anty-Ro i anty-La, laktoferryny, lizozymu, β 2-mikroglobuliny, prostaglandyny E2, interleukiny 6, α -defensyny 1 czy β -defensyny 2 [46,47], natomiast obniżone w przypadku amylazy i anhydrazy węglanowej VI [48]. Prowadzono więcej badań wśród pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Nagler i wsp. [49] wykazali podwyższone poziomy całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS), dialdehydu malonowego, peroksydazy oraz kwasu moczowego, które dodatkowo korelowały z ostrością choroby. Inni badacze stwierdzili wzrost stężenia kalikreiny i interleukiny-1 β w ślinie chorych z RZS [50,51]. Sikorska i wsp. [52] zaobserwowali, że określanie ślinowego poziomu białka C-reaktywnego (w przeciwieństwie do IL-6) może stanowić użyteczne narzędzie do monitorowania aktywności choroby w trakcie terapii lekami biologicznymi. Z kolei Zalewska i wsp. [53] zaproponowali zwiększone stężenia β -glukuronidazy i izoenzymu A N-acetylo- β -heksozoaminidazy jako zmiany predykcyjne dla wczesnego uszkodzenia gruczołów ślinowych w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów.

Natomiast Miller i wsp. [54] określili poziomy markerów niedokrwienia i martwicy mięśnia serca w ślinie pacjentów w ciągu 48 godzin od zawału. Stężenia mioglobiny, CRP, TNF- α , metaloproteinazy 9 (MMP-9), mieloperoxydazy (MPO), rozpuszczalnej cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (sICAM-1) były zwiększone, a rozpuszczalnego ligandu CD40 (sCD40-L) obniżone. Podobnie, Foley i wsp. [55] ocenili jako istotne w martwicy mięśnia sercowego następujące markery ślinowe: IL-6, MMP-9, sICAM-1, sCD40-L, CRP, troponinę 1 i adiponektynę. Ponadto, sugeruje się, że wzrost poziomu interleukiny 15 (IL-15), pentraksyny 3 (PTX-3), białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1), sICAM-1 oraz receptorów 1 i 2 dla TNF- α , jak również spadek sCD40-L w ślinie mogą stanowić czynniki prognostyczne w przebiegu otyłości [56]. Dodatkowo, wzrost stężenia endotelialnego inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) w ślinie może mieć związek z wystąpieniem ostrego zespołu wieńcowego [57].

Wśród schorzeń endokrynologicznych ważny problem stanowi cukrzyca. Ze względu na rosnącą zachorowalność przesiewowe badania śliny mogłyby umożliwić szybkie rozpoznanie tej choroby. U dzieci chorych na cukrzycę insulinozależną Harrison

i wsp. [58] stwierdzili zmniejszone wydzielanie śliny (hiposaliwację) wraz ze zwiększonym wydzielaniem minutowym glukozy oraz wzrostem stężenia laktoferyny i IgA, a Cabras i wsp. [59] podwyższone poziomy α -defensyn 1, 2 i 4 oraz prozapalnego mediatora S100A9*, jak również obniżone poziomy stateryny, białek bogatych w prolinę oraz histatyn. Natomiast Reznick i wsp. [60] wykryli wzrost poziomów peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej oraz całkowitego statusu antyoksydacyjnego u dorosłych pacjentów z cukrzycą typu 1, co korelowało z ostrością przebiegu choroby. Podobnie, u pacjentów z cukrzycą typu 2, Trivedi i wsp. [61] określili istotnie podwyższone stężenia dialdehydu malonowego, będącego produktem peroksydacji lipidów. Co więcej, u kobiet ciężarnych z cukrzycą przedciężową obniżone poziomy całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, kwasu moczowego oraz dysmutazy ponadtlenkowej także wskazały na spadek aktywności antyoksydacyjnej śliny w okresie ciąży [62].

Ponadto, ślina znajduje szerokie zastosowanie w diagnozowaniu zakażeń wirusowych, jak i bakteryjnych. W tym celu wykrywa się przeciwciała, antygeny bądź też kwasy nukleinowe zawarte w ślinie osoby zakażonej [63–65]. W przypadku zakażenia *Helicobacter pylori*, stanowiącego czynnik ryzyka choroby wrzodowej i gruczolakoraka żołądka, można stwierdzić w ślinie przeciwciała i DNA patogenu, jak również podwyższone stężenia mucyn MUC5B i MUC7 będących bakteryjnymi glikoproteinowymi receptorami [66]. Z kolei w przypadku kandydozy, poza wykryciem *Candida albicans*, w ślinie można zaobserwować dodatkowo wzrost poziomów immunoglobulin, kalprotektyny, histatyn, mucyn, białek bogatych w prolinę (PRPs), Hsp70 oraz peroksydaz [67,68]. W świetle najnowszych badań, ślina może także odgrywać istotną rolę w diagnostyce zakażeń SARS-CoV-2, umożliwiając szybkie i nieinwazyjne wykrycie obecności koronawirusa [69,70].

1.2.4. Ślinowe markery nieswoistych chorób zapalnych jelit

W zeszłym roku przeprowadzono przegląd systematyczny zgodnie z wytycznymi PRISMA, który opublikowano w *International Journal of Molecular Sciences* [71]. Jego celem była próba odpowiedzi na pytanie, czy ślinowe markery mogą być wiarygodne w diagnostyce nieswoistych chorób zapalnych jelit. Selekcji artykułów dokonano wśród prac oryginalnych opublikowanych w języku angielskim po 2000 roku, które zostały zaindeksowane w bazach *PubMed*, *Scopus* i *Web of Science*. Tabela 3 zawiera podstawowe informacje o włączonych pracach, uwzględniając charakterystykę

grupy badanej i kontrolnej, stosowane leczenie oraz markery ślino we, które wykazały istotność statystyczną.

Tabela 3. Charakterystyki badań włączonych do przeglądu systematycznego.

Wybrane badanie	Grupa badana (K/M)	Grupa kontrolna (K/M)	Leczenie farmakologiczne	Biomarkery ślino we
Jahanshahi i wsp., 2004, Iran [72]	16 (8/8) CD, 16 (8/8) UC	16 (8/8)	BD	CD: MDA, EGF, NO, FRAP↓; UC: NO
Majster i wsp., 2019, Szwecja [73]	23 (9/14): 12 CD, 11 UC	15 (9/6)	glikokortykosteroidy 13; anty-TNF / biologiczne 6; tiopuryny 5; 5-ASA 3; brak 2	kalprotektyna
Nielsen i wsp., 2005, Dania [74]	15 (10/5) CD, 7 (4/3) UC	19 (15/4)	5-ASA 10/6 (CD/UC); prednizolon 2/0; budezonid 1/2; azatiopryna 4/0; brak 2/1	IL-6
Rezaie i wsp., 2006, Iran [75]	28 (17/11) CD	20 (8/12)	5-ASA 28; kortykosteroidy 6; azatiopryna 10	TGF-β1, NO, MDA, FRAP↓, albuminy↓, kwas moczowy↓
Rezaie i wsp., 2007, Iran [76]	37 (23/14) UC	15 (sparowane płcią)	5-ASA 36; kortykosteroidy 14; azatiopryna 13	TGF-β1, NO
Said i wsp., 2014, Japonia [77]	14 CD, 10 UC	15	BD	IL-1β, lizozym↓, IgA, LL37; CD: TNF-α; UC: IL-6, IL-8, MCP-1
Schaefer i wsp., 2015, USA [78]	5 CD, 5 UC	5	BD	CD: miR-101; UC: miR-21, miR- 31, miR-142-3p, miR-142-5p↓
Szczeklik i wsp., 2012, Polska [79]	52 (16/36) aktywna CD, 43 (14/29) nieaktywna CD	45 (17/28)	mesalazyna i azatiopryna	IL-1β, IL-6, TNF-α
Szczeklik i wsp., 2018, Polska [80]	32 (13/19) aktywna CD, 26 (9/17) nieaktywna CD	26 (12/14)	mesalazyna i azatiopryna	MDA, GSH↓, CAT↓
Xu i wsp., 2018, Chiny [81]	35 (18/17) UC	32 (15/17)	BD	α-amylaza
Zheng i wsp., 2017, Chiny [82]	11 CD, 37 UC	10	BD	PSMA7

Legenda: CD, choroba Leśniowskiego-Crohna; UC, wrzodziejące zapalenie jelita grubego; K, kobiety; M, mężczyźni; BD, brak danych; 5-ASA, kwas 5-aminosalicylowy; MDA, dialdehyd malonowy; EGF, nabłonkowy czynnik wzrostu; NO, tlenek azotu (II); FRAP, antyoksydacyjna zdolność do redukowania jonów żelaza; IL, interleukina; TGF-β1, transformujący czynnik wzrostu β1; TNF-α, czynnik martwicy guza α; MCP-1, białko chemotaktyczne monocytów 1; miR, microRNA; GSH, glutation; CAT, katalaza; PSMA7, podjednostka proteasomu alfa typ 7; ↓, obniżony poziom.

We wszystkich analizowanych badaniach podstawowy materiał diagnostyczny stanowiła ślina spoczynkowa; jedynie w przypadku kalprotektyny i α -amylazy dodatkowo uwzględniono ślinę stymulowaną. Ze względu na heterogeniczność wybranych badań potencjalne biomarkery podzielono w omówieniu na 4 podgrupy: markery stanu oksydacyjnego, cytokiny zapalne, miRNA oraz inne markery.

Stres oksydacyjny odzwierciedla zaburzenie równowagi pomiędzy nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu a niewystarczającą aktywnością antyoksydantów, co prowadzi do niszczenia komórek i tkanek. Wśród głównych antyoksydantów w ślinie wymienia się kwas moczowy, albuminy oraz transferynę, jak również wewnątrzkomórkowe białka, takie jak dysmutazę ponadtlenkową (SOD), glutation (GSH) czy też katalazę (CAT) [83,84]. Ich kluczową rolę stanowi zmiatanie wolnych rodników tlenowych (np. peroksyłowych lub hydroksyłowych) lub wiązanie jonów jak żelazo i miedź, które promują procesy oksydacyjne [85]. Do nośników wolnych rodników zalicza się też tlenek azotu (II), produkowany z L-argininy przy udziale syntazy NO. Jego niskie poziomy uważa się za fizjologiczne i ochronne, jednakże wysokie jako prozapalne i szkodliwe [86]. Dotychczas u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna nadprodukcję rodników tlenowych oraz tlenku azotu, jak i jednocześnie niższe stężenia antyoksydantów, stwierdzono głównie w biopsjach śluzówki jelita oraz w surowicy krwi [87–92].

Badania skupiające się na chorobach jamy ustnej (np. zapalenia przyzębia, liszaj płaski czy nowotwory) prezentowały w ślinie podwyższone poziomy wybranych prozapalnych cytokin zależnych od jądrowego czynnika κ B, takich jak interleukina 1 β (IL-1 β), interleukina 6 (IL-6), czynnik martwicy guza α (TNF- α) [93–95]. Wszystkie z nich odgrywają istotną rolę w promowaniu procesów zapalnych. Do tej pory obserwowano wyższe poziomy cytokin między innymi w ślinie pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, łuszczycą czy też otyłością [51,96,97]. Natomiast ślinowe markery prozapalne w nieswoistych chorobach zapalnych jelit były rzadziej badane. Może to mieć związek z przewlekłym stosowaniem przez pacjentów leków przeciwzapalnych (takich jak aminosalicylany, tiopuryny lub glikokortykosteroidy), mogących wpływać na stężenia cytokin.

Jednakże w biopsjach zmienionej zapalnie śluzówki jelita grubego pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit obserwowano podwyższone poziomy

interleukiny 6, nieoceniane wcześniej w ślinie [98,99]. IL-6 jest produkowana głównie przez makrofagi i monocyty oraz w mniejszym stopniu przez komórki endotelium, fibroblasty i limfocyty. Ta wielofunkcyjna cytokina odpowiada za regulację procesów zapalnych, odpowiedź immunologiczną, odpowiedź ostrej fazy, jak również stymulację hematopoezy i trombopoezy [100].

Co więcej, określano też ślinowe stężenia czynników wzrostu – transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) oraz nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF). Pierwszy z nich, TGF- $\beta 1$ odgrywa kluczową przeciwzapalną rolę, konkurując z TNF- α [101–103]. Może to tłumaczyć podwyższenie poziomów czynnika w związku z obronną stymulacją różnicowania komórek nabłonkowych oraz promowaniem naprawy uszkodzonej błony śluzowej. Z kolei EGF, produkowany przez gruczoły ślinowe podżuchwowe oraz gruczoły Brunnera w dwunastnicy [104], stymuluje proliferację komórek nabłonkowych i nienabłonkowych przewodu pokarmowego, ekspresję enzymów rąbka szczoteczki, transportu elektrolitów i substancji odżywczych w enterocytach, jak również procesy gojenia błony śluzowej jelita [105,106].

Kolejnym diagnostycznym markerem może być ślinowa α -amylaza. Jej wydzielanie jest głównie regulowane poprzez współczulny układ nerwowy przy udziale aktywacji β -adrenergicznych receptorów komórek pęcherzykowych gruczołów ślinowych [107–109]. U pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego opisano istotnie podwyższone stężenia α -amylazy w ślinie, zarówno przed, jak i po stymulacji smakowej [81]. Z kolei nie zaobserwowano znaczących różnic w wydzielaniu śliny spoczynkowej i stymulowanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Wcześniejsze badania sugerują, że nadaktywność układu sympatycznego może mieć związek ze stymulacją stanu zapalnego w obrębie jelita grubego u pacjentów w tej chorobie, natomiast aktywacja układu przywspółczulnego może wykazywać działania ochronne [110–112].

Główną immunoglobuliną wydzielaną przez gruczoły ślinowe jest tzw. wydzielnicza (sekrecyjna) immunoglobulina A występująca w formie dimerów. Pełni rolę obronną poprzez opsonizację i aglutynację bakterii oraz zapobieganie ich adhezji do nabłonka błony śluzowej przewodu pokarmowego, w tym jamy ustnej [113,114]. Jej wydzielanie podlega regulacji autonomicznego układu nerwowego i ulega zmianom m.in. pod wpływem czynników stresowych [115–117]. Sugeruje się,

że obniżone poziomy IgA mogą predysponować do inwazji bakteryjnej w głąb błony śluzowej, przyczyniając się do rozwoju nadżerek i owrzodzeń [118].

Kalprotektyna, określana też jako białko związane z czynnikiem hamującym migrację 8/14 lub S100A8/A9, jest białkiem wiążącym wapń, produkowanym głównie przez granulocyty obojętnochłonne, monocyty, makrofagi oraz keratynocyty [119]. Jako białko ostrej fazy, posiada liczne funkcje, takie jak regulacja procesów pomiędzy cytoszkieletem a cytoplazmą oraz homeostazy neutrofilów, jak również stymulacja procesu zapalnego m.in. poprzez endogenną aktywację receptorów dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji lub Toll-like typu 4 [120–123]. Do tej pory w celu wykrywania i monitorowania przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit stosowano oznaczenia kalprotektyny w kale [124,125]. Natomiast ślinową kalprotektynę jako marker wykorzystywano w diagnostyce chorób przyzębia oraz zespołu Sjögrena [126,127].

Do bardziej innowacyjnych markerów diagnostycznych zalicza się miRNA, będące jednoniciowym RNA, składającym się z 19-25 nukleotydów. Te niekodujące cząsteczki biorą udział w regulacji potranskrypcyjnej ekspresji genów oraz degradacji mRNA, jak również procesów komórkowych takich jak różnicowanie, proliferacja, apoptoza, metabolizm czy onkogeneza [128–130]. W dotychczasowych badaniach zaburzoną ekspresję miRNA stwierdzono między innymi w chorobach nowotworowych i autoimmunologicznych [131–133], jak i w nieswoistych chorobach zapalnych jelit (głównie w biopsjach śluzówki jelita oraz we krwi) [134–138].

Z kolei w pierwszym i dotąd jedynym badaniu dotyczącym ślinowych miRNA u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, Schaefer i wsp. [78] podjęli próbę identyfikacji specyficznych miRNA mogących różnicować obie postaci choroby oraz osób zdrowych, na podstawie analizy próbek śluzówki jelita grubego, krwi i śliny. W ślinie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna zaobserwowano znacząco podwyższoną ekspresję miR-101, natomiast u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego podwyższoną ekspresję miR-21, miR-31 i miR-142-3p oraz obniżoną miR-142-5p względem grupy kontrolnej. Autorzy wskazali, że miR-101 o właściwościach antyproliferacyjnych może stanowić kluczowy czynnik regulacyjny w nieswoistych chorobach zapalnych jelit ze względu na wzmożoną ekspresję we wszystkich trzech rodzajach badanych tkanek u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-

-Crohna oraz dwóch z trzech u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Sugeruje się, że markery w ślinie i krwi mogą efektywnie odzwierciedlać stan zapalny w obrębie tkanki jelita, tym samym wspierając wczesną diagnostykę nieswoistych chorób zapalnych jelit bez konieczności wykonania biopsji podczas kolonoskopii.

Innym rodzajem oznaczanych cząsteczek mogą być egzosomy, będące małymi sferycznymi pęcherzykami o średnicy 40-120 nm, zawierającymi białka (w tym enzymy), lipidy lub RNA (w tym miRNA) [139–141]. W związku ze swoją zawartością i dużą stabilnością pełnią różnorodne funkcje transportowe oraz regulacyjne [142,143]. Zheng i wsp. [82] po screeningu białek egzosomalnych w ślinie wybrali osiem obecnych jedynie u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, z czego tylko PSMA-7 wykazało znacząco podwyższone poziomy w porównaniu do osób zdrowych, które ulegały zmniejszeniu w przypadku remisji choroby. Ze względu na zdolność egzosomów do dalekiego “wędrowania” możliwe, że część z nich wykrytych w ślinie może pochodzić bezpośrednio z innych komórek, np. śluzówki jelita.

W tej części przedstawiono głównie charakterystyki określonych markerów wykrywanych w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Szczegółowe zależności pomiędzy daną jednostką chorobową a stężeniami markerów stanu oksydacyjnego, cytokin prozapalnych czy też kalprotektyny zostaną dokładniej omówione w dyskusji nad wynikami uzyskanymi we własnym badaniu, które jest przedmiotem niniejszej rozprawy.

Fragmenty rozdziału 1 niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane w:

1. Nijakowski K, Surdacka A. Ślina jako płyn biologiczny w diagnostyce chorób ogólnoustrojowych - przegląd piśmiennictwa. *Dental Forum*. 2018;46(2):225–33.

2. Nijakowski K, Surdacka A. Salivary Biomarkers for Diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7477.

2. Założenia i cele pracy

W pracy zostanie oceniony wpływ leków biologicznych stosowanych w terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit na zmiany wybranych parametrów biochemicznych śliny. W piśmiennictwie stwierdza się m.in. podwyższone poziomy markerów stanu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z aktywnymi formami tych chorób, korelujące dodatkowo z objawami na błonie śluzowej jamy ustnej. Dotychczas nie opublikowano jednak badań dotyczących wpływu terapii biologicznej na zmiany parametrów biochemicznych śliny pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.

Cele pracy:

- a) Określenie związku pomiędzy odpowiedzią kliniczną na leczenie biologiczne a stężeniami wybranych mediatorów stanu zapalnego i wykładników stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.
- b) Określenie związku pomiędzy postacią choroby a stężeniami wybranych mediatorów stanu zapalnego i wykładników stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.
- c) Określenie związku pomiędzy stopniem zaawansowania choroby a stężeniami wybranych mediatorów stanu zapalnego i wykładników stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.
- d) Wyznaczenie ślinowego markera predykcyjnego dla rokowania przebiegu leczenia biologicznego pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.
- e) Wyznaczenie ślinowego markera predykcyjnego dla diagnostyki pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.
- f) Ocena stanu zdrowia jamy ustnej pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zakwalifikowanych do leczenia biologicznego.

3. Materiał i metody

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu – Uchwała nr 1266/18 z dnia 6 grudnia 2018 r. (Załącznik 12.1).

3.1. Grupa badana

3.1.1. Kryteria włączania i wyłączenia

Do grupy badanej włączano pełnoletnich pacjentów obojga płci, z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, zakwalifikowanych do leczenia biologicznego w Klinice Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w okresie od stycznia 2019 roku do marca 2020 roku. Kontynuacja dalszych kwalifikacji pacjentów do badania została uniemożliwiona poprzez wybuch pandemii COVID-19 wiosną 2020 roku.

Wśród kryteriów wykluczenia z badania uwzględniono: towarzyszące choroby autoimmunologiczne (w tym cukrzyca), otyłość, ciążę, stosowanie leków wpływających na wydzielanie śliny, choroby przyzębia i inne aktywne ogniska zapalne w jamie ustnej, jak również palenie tytoniu (w przypadku oznaczeń markerów stresu oksydacyjnego).

Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe sparowane co do wieku, płci oraz wskaźnika masy ciała (BMI). W związku z pandemią osoby te wyselekcjonowano z bazy próbek śliny pacjentów Kliniki Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji.

3.1.2. Kwalifikacja do leczenia biologicznego

Diagnoza każdego pacjenta była postawiona na podstawie stwierdzonych objawów klinicznych oraz wyników przeprowadzonych badań dodatkowych, takich jak badanie endoskopowe lub enterografia rezonansu magnetycznego.

Do tej formy leczenia kwalifikowano pacjentów z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej postacią choroby, nieodpowiadającą na standardową terapię uwzględniającą pełne dawki leków lub wykazujących nietolerancję takiego leczenia (np. reakcje alergiczne). Poprzez leczenie standardowe rozumie się steroidoterapię, leczenie immunosupresyjne (azatiopryna lub 6-merkaptopuryna, albo metotreksat), a w przypadku okołodbytowej postaci choroby Leśniowskiego-Crohna także antybiotykoterapię. Podczas kwalifikacji poza wyczerpaniem możliwości skutecznego leczenia farmakologicznego uwzględniano brak konieczności podjęcia leczenia operacyjnego.

W trakcie kwalifikacji do terapii pacjentów poddawano rutynowej ocenie klinicznej z oszacowaniem aktywności choroby, stężenia markerów zapalnych (jak CRP, odczyn Biernackiego, morfologia krwi obwodowej) oraz ocenie aktywności zmian endoskopowych. Wykonywano również rutynowe badania w kierunku szeregu chorób infekcyjnych (ocena w kierunku gruźlicy, HBV, HCV czy HIV), które mogłyby być przeciwwskazaniem do wdrożenia leczenia biologicznego.

W momencie włączenia do programu leczenia biologicznego każdy z pacjentów był leczony stałymi maksymalnymi dawkami tolerowanych leków. Dopuszczalne było stosowanie przez pacjentów wcześniej leków biologicznych, jednakże w okresie co najmniej 18 miesięcy od obecnej kwalifikacji.

3.1.3. Przebieg leczenia biologicznego i stosowane leki

Do leków biologicznych rutynowo stosowanych w ramach Programów Terapeutycznych Narodowego Funduszu Zdrowia zalicza się grupę przeciwciał monoklonalnych neutralizujących TNF- α – infliksymab i adalimumab – oraz lek o innym mechanizmie działania – wedolizumab, który jest przeciwciałem wiążącym integrynę $\alpha 4\beta 7$ na limfocytach obecnych w świetle naczyń przewodu pokarmowego.

W przypadku choroby Leśniowskiego-Crohna leczenie biologiczne obejmuje w tak zwanej terapii indukcyjnej:

- infliksymab (IFX) w dawce 5 mg/kg masy ciała w tygodniu 0–2–6 albo
- adalimumab (ADA) w dawce 160 mg w tygodniu 0, 80 mg w tygodniu 2 i 40 mg co dwa tygodnie do 7 dawek.

Następnie w przypadku satysfakcjonującej odpowiedzi klinicznej terapię kontynuuje się do 2 lat, stosując IFX co 8 tygodni albo ADA co 2 tygodnie (w przypadku niesatysfakcjonującej odpowiedzi istnieje możliwość skrócenia odstępów między podaniami leku).

Natomiast w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego podczas terapii indukcyjnej wykorzystuje się:

- infliksymab (IFX) w dawce 5 mg/kg masy ciała w tygodniu 0–2–6 albo
- wedolizumab (VDZ) w dawce 300 mg w tygodniu 0–2–6.

Następnie w przypadku uzyskania odpowiedzi klinicznej terapia jest kontynuowana do roku, z podaniem leku (IFX albo VDZ) co 8 tygodni.

3.1.4. Ocena odpowiedzi pacjenta na leczenie indukcyjne

W trakcie leczenia indukcyjnego pacjenci pozostawali pod ścisłym nadzorem zespołu zajmującego się leczeniem biologicznym w Klinice Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych. Następnej kompleksowej ocenie pacjentów poddawano po zakończeniu fazy indukcyjnej, czyli między 10. a 14. tygodniem od rozpoczęcia terapii. Wówczas podejmowano decyzję o ewentualnej kontynuacji terapii albo jej zaprzestaniu. W pozostałych punktach czasowych (tj. przy kolejnych podaniach leku) wykonywano okresowo podstawowe badania laboratoryjne oraz oszacowywano aktywność kliniczną choroby.

Do oszacowania aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna służy skala *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) lub skala *Harvey Bradshaw Index* [144]. Pierwszą z nich, opracowaną przez Besta i wsp. [145], przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Skala *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI).

Oceniany parametr	Punktacja	Współczynnik
Liczba luźnych wypróżnień na dzień	suma z 7 dni	x2
Ból brzucha	brak – 0 łagodny – 1 umiarkowany – 2 silny – 3	suma z 7 dni x5
Ogólne samopoczucie	dobrze – 0 nieco obniżone – 1 obniżone – 2 znacznie obniżone – 3 fatalne – 4	suma z 7 dni x7
Objawy towarzyszące	zapalenie/ból stawów zapalenie tęczówki/naczyniówki oka rumień guzowaty zgorzelinowe zapalenie skóry aftowe zapalenie jamy ustnej szczelina/przetoka/ropień okołoodbytowy inna przetoka temperatura ciała > 37,8°C <i>przyznaje się po 1 punkcie za każdy objaw</i>	x20
Stosowanie leków przeciwbiegunkowych	nie – 0 tak – 1	x30
Wyczuwalny guz w jamie brzusznej	nie – 0 wątpliwe – 2 pewne – 5	x10
Różnica między HCT badanym a HCT należnym	♀ 42 – badany HCT [%] ♂ 47 – badany HCT [%]	x6
Masa ciała badana w stosunku do masy należnej dla płci i wzrostu	$\left(1 - \frac{\text{masa badana}}{\text{masa należna}}\right) \times 100$ <i>nie uwzględnia się, jeśli mniejsze niż -10</i>	x1

Uzyskanie wyniku powyżej 450 punktów świadczy o ciężkim przebiegu choroby, pomiędzy 220 a 450 o umiarkowanym przebiegu, pomiędzy 150 a 220 o łagodnym przebiegu, natomiast poniżej 150 punktów o remisji choroby [146].

Z kolei w przypadku oszacowania aktywności klinicznej wrzodziejącego zapalenia jelita grubego wykorzystuje się zmodyfikowaną skalę Mayo [147], którą zaprezentowano w Tabeli 5.

Tabela 5. Zmodyfikowana skala Mayo.

Oceniany parametr	Punktacja			
	0	1	2	3
Częstość wypróżnień	norma ustalona dla danego pacjenta	1-2 wypróżnień na dobę powyżej ustalonej normy	3-4 wypróżnienia na dobę powyżej ustalonej normy	5 i więcej wypróżnień na dobę powyżej ustalonej normy
Krwawienie z jelita grubego	krwawienie niewidoczne	ślady krwi w mniej niż połowie wypróżnień	krwawienie w większości wypróżnień	wypróżnienia głównie krwawe
Endoskopowy obraz błony śluzowej jelita grubego	prawidłowy	niewielkie zatarcie siatki naczyń i kruchość śluzówki	brak siatki naczyń, nadżerki, znaczna kruchość śluzówki	samoistne krwawienie, owrzodzenia
Ogólna ocena lekarska (w tym bóle brzucha, samopoczucie)	stan prawidłowy	łagodna postać choroby	umiarkowana postać choroby	ciężka postać choroby

Otrzymałą sumę interpretuje się następująco: powyżej 10 punktów ciężki przebieg zapalenia, pomiędzy 6 a 9 umiarkowany, pomiędzy 3 a 5 łagodny, a poniżej 2 punktów remisja (uwzględniając, że żaden z parametrów nie wyższy od 1) [148].

Za warunek stwierdzenia pozytywnej odpowiedzi na leczenie przyjęto uzyskanie remisji klinicznej w poszczególnych skalach albo spadek aktywności choroby o minimum 100 punktów w przypadku pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna lub 3 punktów w przypadku pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego [149,150].

Pacjentów, którzy odpowiedzieli na terapię indukcyjną, kwalifikowano do tzw. leczenia podtrzymującego, które obejmuje kolejne podania leków zgodnie z przyjętymi schematami przedstawionymi w podrozdziale powyżej.

3.2. Badanie kliniczne jamy ustnej

Przed rozpoczęciem leczenia biologicznego u wszystkich pacjentów przeprowadzono kliniczne badanie stomatologiczne. Ocenie poddano stan uzębienia, higieny jamy ustnej oraz przyzębia, a także błony śluzowej jamy ustnej. Badanie wykonano przy użyciu jednorazowych sterylnych zestawów diagnostycznych złożonych z lusterka i zgłębnika stomatologicznego oraz sterylnych sond periodontologicznych WHO 621 Hu-Friedy, w oświetleniu sztucznym (lampa czołówka). Wyniki badania oznaczano na autorskiej karcie badania z częścią ankietową dotyczącą nawyków higienicznych pacjentów (Załącznik 12.2).

3.2.1. Ocena stanu uzębienia

Stan zębów (zachorowalność na próchnicę) określono za pomocą wskaźników PUW-z i PUW-p. Liczba PUW-z oznacza sumę zębów dotkniętych próchnicą, gdzie P oznacza sumę zębów z aktywną próchnicą pierwotną lub wtórną; U – usuniętych z powodu próchnicy, a W – wypełnionych z powodu próchnicy. Wskaźnik ten analogicznie odnosi się do ich powierzchni (PUW-p).

3.2.2. Ocena higieny jamy ustnej

Do oceny stanu higieny jamy ustnej wykorzystano: wskaźnik płytki nazębnej *Plaque Index* (PII) według Silnessa i Løe [151,152] oraz aproksymalny wskaźnik płytki nazębnej *Approximal Plaque Index* (API) według Lange i wsp. [153].

Wskaźnik płytki służy do oceny grubości miękkich złogów umiejscowionych w okolicy szyjki zębów. Badanie przeprowadza się na 4 powierzchniach: bliższej, dalszej, wargowej/policzkowej i podniebiennej/językowej następujących zębów: 16, 11, 24, 36, 31, 44. Kryteria oceny są następujące:

- 0 – brak płytki nazębnej w okolicy dziąsłowej,
- 1 – cienka warstwa płytki nazębnej w okolicy brzegu dziąsłowego, niewidoczna gołym okiem, wykrywana za pomocą zgłębnika,
- 2 – umiarkowane nagromadzenie miękkich złogów nazębnych wzdłuż brzegu dziąsłowego i w okolicy szyjki zęba, rozpoznawane gołym okiem,
- 3 – obfite nagromadzenie miękkich złogów nazębnych wzdłuż brzegu dziąsłowym, w okolicy szyjki zęba oraz w przestrzeniach międzyzębowych.

Wartości uzyskane ze wszystkich powierzchni zęba sumuje się i dzieli przez 4 w celu uzyskania wyniku.

API informuje o obecności płytki nazębnej w przestrzeniach międzyzębowych. Dla zębów w I i III kwadrancie ocenia się jej obecność w przestrzeniach międzyzębowych od strony jamy ustnej właściwej, a w II i IV kwadrancie od strony przedSIONKOWEJ. Wskaźnik oblicza się według wzoru:

$$API = \frac{\text{suma przestrzeni międzyzębowych z płytką nazębną}}{\text{suma wszystkich badanych przestrzeni międzyzębowych}} \times 100\%.$$

Tabela 6 przedstawia interpretację uzyskanych wartości wskaźników płytki nazębnej [154,155].

Tabela 6. Interpretacja wskaźników płytki nazębnej.

Stan higieny jamy ustnej	Plaque Index	Approximal Plaque Index
optymalna	0-0,1	< 25%
dobra	0,1-1,0	25-40%
dostateczna	1,0-2,0	40-70%
niewłaściwa	2,0-3,0	> 70%

Dodatkowo pacjentów poproszono o odpowiedź na kilka pytań (typu „tak”/”nie”) odnośnie ich nawyków dotyczących higieny jamy ustnej, m.in. częstości szczotkowania zębów, mycia języka czy nitkowania (treść pytań dostępna w Załączniku 12.2).

3.2.3. Ocena stanu przyzębia

Do oceny stanu dziąseł zastosowano: wskaźnik dziąsłowy *Gingival Index* (GI) według Løe i Silnessa (analogiczny do PII) [152,156] oraz wskaźnik krwawienia z brodawki dziąsłowej *Sulcus Bleeding Index* (SBI) według Mühlemanna (analogiczny do API) [157]. Kryteria oceny wskaźnika GI opierają się na zmianach jakościowych w dziąśle:

- 0 – zdrowe bladoróżowe dziąsło bez oznak stanu zapalnego,
- 1 – niewielka zmiana zabarwienia i lekki obrzęk, brak krwawienia,
- 2 – umiarkowane zaczerwienienie, obrzęk i połyskliwość dziąsła, krwawienie podczas sondowania i na skutek ucisku,
- 3 – wyraźne zaczerwienienie i obrzęk dziąsła, tendencja do samoistnego krwawienia, ewentualnie owrzodzenia.

Podobnie do API, wartości uzyskane ze wszystkich powierzchni zęba sumuje się i dzieli przez 4 w celu uzyskania wyniku.

SBI świadczy o występowaniu krwawienia po ok. 15 sekundach od wprowadzenia sondy periodontologicznej do szczeliny dziąsłowej bez ucisku na jej dno. Wskaźnik oblicza się według wzoru:

$$SBI = \frac{\text{suma przestrzeni międzyzębowych krwawiących}}{\text{suma wszystkich badanych przestrzeni międzyzębowych}} \times 100\%.$$

Tabela 7 prezentuje interpretację otrzymanych wartości wskaźników stanu dziąseł [154,155].

Tabela 7. Interpretacja wskaźników stanu dziąseł.

Stan kliniczny dziąseł	<i>Gingival Index</i>	<i>Sulcus Bleeding Index</i>
zdrowe	0-0,1	< 10%
łagodne zapalenie	0,1-1,0	10-20%
umiarkowane zapalenie	1,0-2,0	20-50%
intensywne zapalenie	2,0-3,0	> 50%

Do oceny stanu przyzębia wykonano pomiar klinicznej głębokości kieszeni przyzębnych – PPD (ang. *probing periodontal depth*) oraz CAL (ang. *clinical attachment level*). Pomiarów dokonano na 4 powierzchniach zębów 16, 11, 24, 36, 31, 44 z zastosowaniem sondy periodontologicznej WHO 621 Hu-Friedy (z wyskalowaną częścią pomiarową 3,5, 5,5, 8,5 i 11,5 mm, zakończoną kulką o średnicy 0,5 mm). Podczas badania sondę wprowadza się równolegle do długiej osi zęba, przesuując jej wierzchołek w ciągłym kontakcie z zębem aż do dna – w ten sposób odczytuje się wartości głębokości szczeliny i poziomu przyczepu nabłonkowego przy powierzchniach badanych zębów.

Obecność kieszeni przyzębnych równych lub głębszych niż 4 mm stwierdzonych w co najmniej dwóch niesąsiadujących przestrzeniach międzyzębowych pozwala na postawienie rozpoznania choroby przyzębia [158].

3.2.4. Ocena błony śluzowej jamy ustnej

Na błonie śluzowej jamy ustnej określano obecność takich zmian jak stwardniałe polipowate struktury w regionie trójkąta zatrzonowcowego, tzw. brukowanie błony śluzowej, rozlany bezobjawowy obrzęk policzka, zapalenie dziąseł, zapalenie kątów ust, zanikowe zapalenie języka czy też nadżerki aftowe.

3.3. Badania laboratoryjne śliny

3.3.1. *Metodyka pobierania próbek śliny*

Materiał do badań laboratoryjnych stanowiła niestymulowana ślina mieszana. Zbiórek śliny dokonywano zawsze o jednakowej porze dnia w godzinach przedpołudniowych. Wszystkie osoby poddane badaniu musiały być przynajmniej 2 godziny po posiłku. Podczas pobierania śliny pacjenci znajdowali się w zrelaksowanej pozycji siedzącej, z tułowiem lekko pochylonym w kierunku kolan, aby ślina mogła swobodnie spływać do pojemnika przeznaczonego do zbiórki śliny (tj. próbówki wirówkowej typu Falcon o pojemności 50 ml). W trakcie badania pacjentów poproszono o niepołykanie śliny. Próbki śliny pobierano przez 20 minut, a ilość jej wydzielania określano w ml/min. Od momentu rozpoczęcia zbiórki śliny, aż do jej odwirowania, próbki spoczywały w pojemniku z lodem dostarczonym bezpośrednio do laboratorium.

Próbki śliny pobierano od pacjentów dwukrotnie: przed rozpoczęciem leczenia biologicznego oraz po tzw. terapii indukcyjnej.

3.3.2. *Metodyka oceny parametrów biochemicznych śliny*

Analizę biochemiczną śliny wykonano w laboratorium Zakładu Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Pomiaru pH śliny dokonywano bezpośrednio po jej pobraniu z wykorzystaniem pH-metru CG 840 (Schott, Moguncja, Niemcy). Następnie próbki śliny odwirowywano przez 10 minut przy prędkości 3000 obrotów/min przy użyciu wirówki Centrifuge MPW-223e (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska), rozdzielano do kilku probówek typu Eppendorf i zamrażano w temperaturze - 80°C do chwili wykonania oznaczeń.

Stężenia wybranych markerów (TNF-R1, PAI-1, kalprotektyna, MPO i IgA) w ślinie określono przy zastosowaniu metody immunoenzymatycznej ELISA z użyciem odpowiednich zestawów (Tabela 8) na podstawie wyznaczonych wzorcowych krzywych absorbancji. Do odczytu spektrofotometrycznego wykorzystano czytnik Varioscan LUX (Thermo Scientific, Waltham, USA) i oceniono intensywność zabarwienia produktów końcowych dla długości fali 450 i 540 nm.

Aktywność katalazy oznaczono metodą kolorymetryczną z pomiarem absorbancji światła o długości fali 540 nm z wykorzystaniem odpowiedniego zestawu diagnostycznego (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA – 707002).

Tabela 8. Zastosowane zestawy diagnostyczne ELISA.

Marker	Producent	Nr katalogowy
TNF-R1		DY225
PAI-1	R&D Systems	DY1786
kalprotektyna	(Minneapolis, USA)	DY8226
MPO		DY3174
IgA	Demeditec Diagnostics (Kilonia, Niemcy)	DEXK276

Do określenia poziomu białka całkowitego wykorzystano metodę Bradforda [159] w modyfikacji własnej – do 100 μ l próbek dodawano 100 μ l odczynnika Bradforda (Merck, Darmstadt, Niemcy – B6916). Wzorcową krzywą absorbancji wyznaczono dla albuminy (Merck, Darmstadt, Niemcy – A788), a odczytu dokonywano dla długości fali 595 nm.

3.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono samodzielnie przy użyciu programu Statistica 13.3 (licencja uczelniana) [160,161]. Dla wszystkich analiz ustalono poziom istotności $\alpha=0,05$.

3.4.1. Statystyki podstawowe

Zgodność rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Zmienne w skali interwałowej (ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym) oraz w skali porządkowej opisano za pomocą median oraz rozstępu kwartylowego (złożonego z kwartyli dolnego i górnego, odpowiadających 25. i 75. percentylowi), jak również graficznie w formie wykresów ramka-wąsy. Natomiast zmienne jakościowe w skali nominalnej przedstawiono w postaci tabel liczości oraz tabel wielodzzielczych.

3.4.2. Metody porównania

W związku z brakiem zgodności rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym, niezależnie od skali, dla zmiennych ilościowych stosowano testy nieparametryczne – odpowiednio w celu porównania:

- dwóch grup niepowiązanych – test Manna-Whitney’a
- dwóch grup powiązanych – test Wilcoxona
- więcej niż dwóch grup niepowiązanych – test Kruskala-Wallisa.

W przypadku porównywania zmiennych jakościowych, w zależności od liczebności i struktury tabeli, wykorzystywano test dokładny Fishera dwustronny lub test chi-kwadrat z odpowiednimi poprawkami.

3.4.3. Metody korelacji

Korelację pomiędzy zmiennymi oceniano za pomocą współczynnika korelacji Spearmana. Przyjęto następującą interpretację jego wartości:

- równy zero – brak korelacji,
- w przedziale (0-0,1) – nikła,
- w przedziale [0,1-0,3) – słaba,
- w przedziale [0,3-0,5) – przeciętna,
- w przedziale [0,5-0,7) – wysoka,
- w przedziale [0,7-0,9) – bardzo wysoka,
- w przedziale [0,9-1) – prawie pełna.

Należy pamiętać, że to narzędzie pomocnicze i najpierw konieczne jest stwierdzenie istotności badanej korelacji.

3.4.4. Krzywe ROC

Analiza krzywych ROC (*Receiver Operating Characteristics*) pozwala na określenie wartości predykcyjnej badanego parametru dla modelowanego zjawiska. Im większa wielkość pola pod krzywą określanego jako AUC (ang. *area under curve*), tym większa wartość diagnostyczna wybranego markeru. Linia odniesienia dla AUC=0,5 oznacza prawdopodobieństwo równe rzutowi monetą. Pola pod krzywymi porównano metodą DeLong, aby ocenić istotność różnic pomiędzy nimi.

Dla badanych markerów zaproponowano również punkty odcięcia z wykorzystaniem indeksu Youdena. W przypadku parametrów będących stymulantami punktem odcięcia określa się stężenie, powyżej którego rośnie prawdopodobieństwo zaklasyfikowania do modelowanej grupy (np. osób z daną jednostką chorobową), a w przypadku tych będących destymulantami stężenie, poniżej którego rośnie takie prawdopodobieństwo.

W celu ułatwienia interpretacji krzywych ROC na każdym z wykresów konkretny marker ślinowy oznaczono tym samym kolorem.

3.4.5. Metody regresji logistycznej

Regresja logistyczna stanowi odmianę metod regresyjnych, w której zmienna zależna (wyjaśniana) wyrażona jest w skali dychotomicznej, czyli przyjmuje tylko dwie wartości. Natomiast zmienne niezależne (predyktory) mogą zawierać zmienne ilościowe, jak i jakościowe.

Przed próbą skonstruowania odpowiedniej jakości modelu regresji logistycznej wykonywano oceny jednoczynnikowe potencjalnych predyktorów spośród wybranych markerów. Do dalszych analiz uwzględniano te parametry, które na tym etapie osiągnęły p -value co najwyżej równe 0,1 w teście ilorazu wiarygodności. W celu budowy modeli i wprowadzania kolejnych zmiennych niezależnych wykorzystywano metodę krokową postępującą. Walidacji konstruowanych modeli dokonywano poprzez V -krotną ocenę krzyżową, porównując uzyskane krzywe ROC dla zbioru treningowego i testowego. Tym lepsze dopasowanie modelu do badanego zjawiska, im wyższe wartości AUC i mniejsza różnica pomiędzy polami wyznaczonymi dla obu prób. Dodatkowo dobroć dopasowania danego modelu do zmiennych oczekiwanych sprawdzano testem Hosmera-Lemeshowa, weryfikującym hipotezę o równości wartości obserwowanych i przewidywanych. Dlatego pożądane jest uzyskanie braku dowodów na występowanie istotnych różnic dla tego testu, czyli p -value powyżej założonego poziomu istotności.

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka grupy badanej

W okresie od stycznia 2019 roku do marca 2020 roku włączono do badania 61 pacjentów kwalifikowanych do leczenia biologicznego w Klinice Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Kontrolne próbki śliny po fazie terapii indukcyjnej pozyskano od 51 pacjentów – 10 pacjentów nie zostało ostatecznie zakwalifikowanych do leczenia ze względu na inne problemy zdrowotne lub wykazało brak tolerancji na zastosowane leki biologiczne. Spośród nich u 27 pacjentów zdiagnozowano chorobę Leśniowskiego-Crohna (CD), a u 24 pacjentów wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC). Wszyscy pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przyjmowali leki o działaniu immunosupresyjnym, z czego połowa skojarzoną terapię metyloprednizolonem z azatiopryną lub merkaptopuryną. Wśród pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna jedynie u ¼ stosowano podwójną immunosupresję. W Tabelach 9-13 przedstawiono licznosci pacjentów w podgrupach w zależności od przebiegu choroby oraz zastosowanego leku biologicznego oraz odpowiednio odsetki pacjentów, u których stwierdzono pozytywną odpowiedź kliniczną na wdrożone leczenie biologiczne.

Tabela 9. Licznosci pacjentów w zależności od przebiegu choroby przed terapią indukcyjną.

	CD	UC	ogółem
łagodny	9	0	9
umiarkowany	18	13	31
ciężki	0	11	11
ogółem	27	24	51

Tabela 10. Odsetek stwierdzonych pozytywnych odpowiedzi klinicznych na terapię indukcyjną w zależności od przebiegu choroby (%).

	CD	UC	ogółem
łagodny	88,89	-	88,89
umiarkowany	83,33	53,85	70,97
ciężki	-	90,91	90,91
ogółem	85,19	70,83	78,43

Tabela 11. Licznosci pacjentów w zależności od przebiegu choroby po terapii indukcyjnej.

	CD	UC	ogółem
remisja	17	11	28
łagodny	5	3	8
umiarkowany	4	8	12
ciężki	1	2	3

W podgrupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, niezależnie od przebiegu choroby stwierdzono wysoki odsetek pozytywnych odpowiedzi klinicznych na zastosowaną terapię indukcyjną. Pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego gorzej zareagowali na fazę indukcji leczenia biologicznego, zwłaszcza w podgrupie osób o umiarkowanym przebiegu choroby. Natomiast sumarycznie, po terapii indukcyjnej ponad połowa badanych pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit uzyskała remisję choroby. Częściej remisję kliniczną uzyskiwali jednak pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

Tabela 12. Liczności pacjentów w zależności od zastosowanego leku biologicznego.

	CD	UC	ogółem
IFX	16	15	31
ADA	10	0	10
VDZ	1	9	10

Tabela 13. Odsetek stwierdzonych pozytywnych odpowiedzi klinicznych na terapię indukcyjną w zależności od zastosowanego leku biologicznego (%).

	CD	UC	ogółem
IFX	75,00	66,67	70,97
ADA	100,00	-	100,00
VDZ	100,00	77,78	80,00
ogółem	85,19	70,83	78,43

Największą liczbę pacjentów, niezależnie od postaci choroby, zakwalifikowano do leczenia biologicznego z wykorzystaniem infliksymabu. Podczas stosowania tego leku satysfakcjonującą odpowiedź kliniczną zaobserwowano u $\frac{3}{4}$ pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i u $\frac{2}{3}$ pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Z kolei pozostałe preparaty biologiczne adalimumab oraz wedolizumab w przypadku choroby Leśniowskiego-Crohna wykazały 100% skuteczność kliniczną.

4.1.1. Dane demograficzne

W Tabelach 14 i 15 przedstawiono podstawowe dane demograficzne charakteryzujące grupę badaną. Określono parametry takie jak struktura płci, wiek, masa przed i po fazie indukcyjnej leczenia biologicznego, BMI przed i po terapii indukcyjnej oraz odsetek osób palących tytoń. Porównano te dane pomiędzy podgrupami utworzonymi ze względu na postać nieswoistej choroby zapalnej jelit, jak i przebieg kliniczny w odniesieniu do odpowiednich skali aktywności.

Tabela 14. Podstawowe parametry opisujące grupę badaną z podziałem na postać choroby (M [Q1-Q3] / %).

Parametr	ogółem n=51	CD n=27	UC n=24	p-value
pleć (kobiety)	33,33	37,04	29,17	0,767
wiek	34 [27-43]	34 [28-48]	32 [24-40,5]	0,171
masa ₁ [kg]	70 [58-78]	70 [57-75]	71 [61-81]	0,427
masa ₂ [kg]	70 [60-84]	70 [60-79]	71 [62,5-86]	0,479
BMI ₁ [kg/m ²]	22,22 [19,59-25,18]	22,09 [19,59-24,49]	22,64 [19,67-25,70]	0,597
BMI ₂ [kg/m ²]	22,23 [20,07-25,64]	22,22 [20,24-25,36]	22,74 [19,87-26,54]	0,770
palenie tytoniu	15,69	25,93	4,17	0,053

Legenda: 1 – przed fazą indukcji, 2 – po fazie indukcji

Tabela 15. Podstawowe parametry opisujące grupę badaną z podziałem na przebieg choroby (M [Q1-Q3] / %).

Parametr	łagodny n=9	umiarkowany n=31	ciężki n=11	p-value
pleć (kobiety)	22,22	35,48	36,36	0,724
wiek	30 [27-39]	35 [28-48]	32 [21-43]	0,302
masa ₁ [kg]	72 [60-84]	72 [57-79]	69 [63-73]	0,832
masa ₂ [kg]	72 [62-85]	71 [58-84]	70 [63-78]	0,768
BMI ₁ [kg/m ²]	22,22 [20,08-23,45]	22,72 [19,27-25,65]	21,30 [18,43-24,02]	0,598
BMI ₂ [kg/m ²]	22,31 [19,94-29,35]	22,41 [19,84-25,99]	21,60 [19,66-24,62]	0,554
palenie tytoniu	33,33	12,90	9,09	0,315

Legenda: 1 – przed fazą indukcji, 2 – po fazie indukcji

W podgrupie z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego udział procentowy kobiet był nieznacznie niższy w porównaniu do podgrupy z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Pod względem wieku, masy ciała (przed i po terapii indukcyjnej) oraz wartości wskaźnika BMI (przed i po terapii indukcyjnej) obie podgrupy nie różniły się. Grupę badaną stanowiły w większości osoby stosunkowo młode (w trzeciej i czwartej dekadzie życia), z prawidłową masą ciała (BMI pomiędzy 18,5 a 25). Podobnie nie stwierdzono istotnych różnic w tych parametrach, opisując grupę badaną z podziałem na przebieg choroby. Natomiast po fazie indukcji leczenia biologicznego można zaobserwować nieznaczny wzrost masy i tym samym wartości BMI pacjentów.

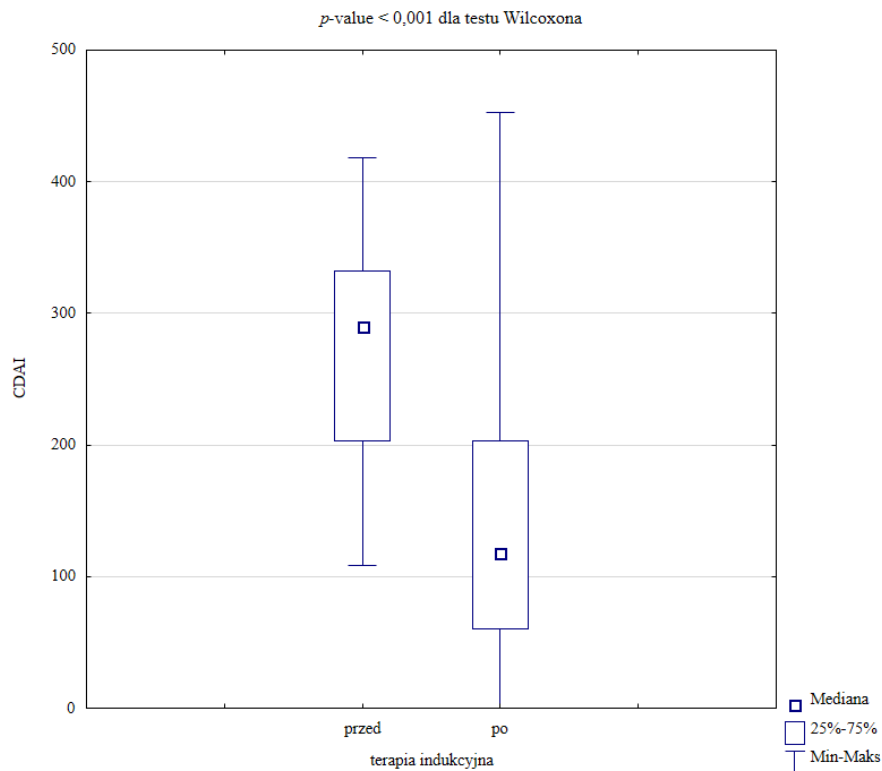
Tabela 16 prezentuje podstawowe parametry opisujące grupę kontrolną sparowaną względem płci, wieku i BMI, wraz z utworzonymi podgrupami oddzielnymi dla każdej z postaci choroby – dla choroby Leśniowskiego-Crohna oraz dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (oznaczone odpowiednio jako k-CD i k-UC). Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy pacjentami i osobami zdrowymi w przypadku żadnego z analizowanych parametrów.

Tabela 16. Podstawowe parametry opisujące grupę kontrolną (M [Q1-Q3] / %).

Parametr	ogółem n=51	k-CD n=27	k-UC n=24
pleć (kobiety)	33,33	37,04	29,17
wiek	32 [26-40]	32 [27-41]	31 [23-37]
BMI [kg/m ²]	23,39 [21,70-25,00]	23,20 [21,60-24,7]	23,50 [21,90-25,70]

4.1.2. Wyniki badania klinicznego choroby podstawowej

Porównano stopnie zaawansowania choroby przed i po fazie indukcji leczenia biologicznego oddzielnie dla pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, odpowiednio w skali CDAI i zmodyfikowanej skali Mayo (Ryciny 1 i 2). Oceniono również zmiany w podstawowych parametrach morfologicznych krwi oraz poziomie CRP pod wpływem zastosowanej terapii indukcyjnej (Tabele 17 i 18).



Rycina 1. Stopień aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna przed i po terapii indukcyjnej.

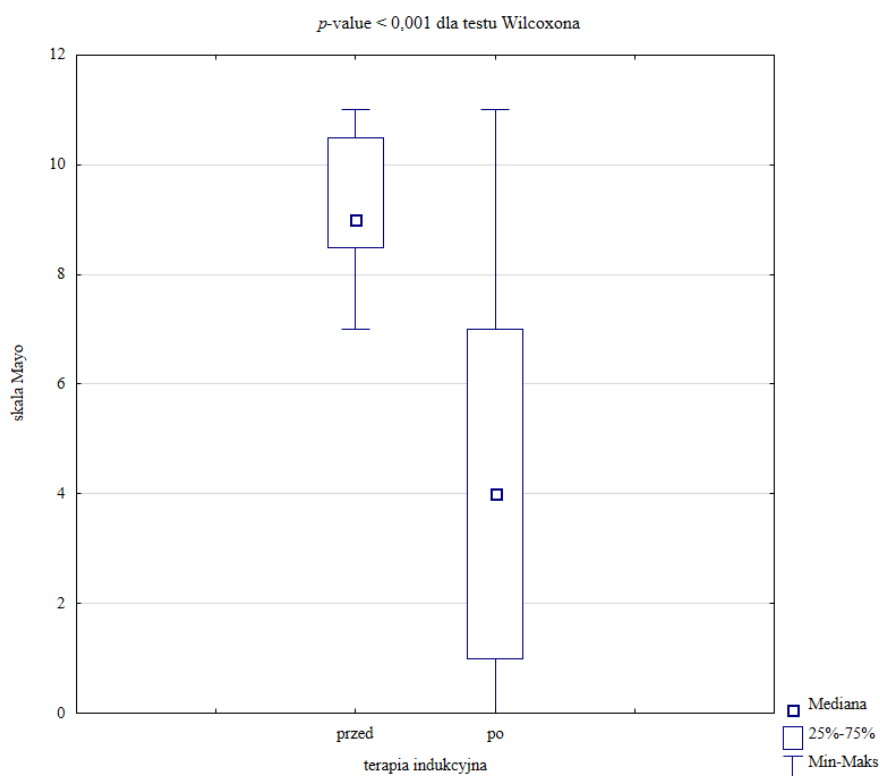
Tabela 17. Parametry badania morfologii krwi u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna przed i po fazie indukcji.

Parametr	przed fazą indukcji M [Q1-Q3]	po fazie indukcji M [Q1-Q3]	<i>p</i> -value
CRP [mg/l]	13,3 [3,6-25,8]	6,1 [1,2-16,3]	0,144
WBC [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	7,53 [5,98-11,65]	7,27 [5,28-8,79]	0,058
NEU [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	5,06 [3,88-7,37]	3,99 [3,16-6,25]	0,170

LIM [x10³/μl]	1,26 [0,83-1,85]	1,72 [0,98-1,95]	0,523
MON [x10³/μl]	0,62 [0,53-0,69]	0,62 [0,51-0,77]	0,629
EOZ [x10³/μl]	0,16 [0,10-0,27]	0,15 [0,08-0,24]	0,868
BAZO [x10³/μl]	0,05 [0,03-0,06]	0,04 [0,03-0,06]	0,900
RBC [x10⁶/μl]	4,71 [3,93-4,86]	4,68 [4,38-4,99]	0,133
HGB [g/dl]	12,2 [10,3-14,2]	13,7 [12,4-14,8]	0,003*
HCT [%]	38,0 [33,6-42,9]	41,2 [38,1-44,2]	0,009*
MCV [fl]	87,4 [76,4-89,9]	89,1 [85,5-91,0]	0,062
RDW-CV [%]	14,6 [13,3-15,9]	13,3 [12,9-15,5]	0,144
PLT [x10³/μl]	340 [297-436]	300 [246-358]	0,006*

**p*-value < 0,05 dla testu Wilcoxona

Na skutek terapii indukcyjnej leczenia biologicznego u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna znacząco spadła aktywność kliniczna choroby. Zaobserwowano tendencję do spadku stężenia CRP oraz leukocytów (szczególnie neutrofilów), jak również do wzrostu wskaźnika średniej objętości krwinek czerwonych. Ponadto stwierdzono istotnie zwiększone poziomy hemoglobiny i hematokrytu oraz zmniejszone płytek krwi.



Rycina 2. Stopień aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.

Tabela 18. Parametry badania morfologii krwi u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po fazie indukcji.

Parametr	przed fazą indukcji M [Q1-Q3]	po fazie indukcji M [Q1-Q3]	p-value
CRP [mg/l]	5,1 [1,6-12,3]	2,8 [1,1-6,9]	0,391
WBC [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	9,75 [7,20-10,77]	6,28 [5,56-7,78]	0,001*
NEU [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	7,58 [4,53-8,90]	3,49 [2,79-4,26]	0,004*
LIM [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	1,60 [0,73-3,00]	1,64 [1,39-2,41]	0,397
MON [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	0,66 [0,44-1,04]	0,62 [0,51-0,80]	0,675
EOZ [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	0,07 [0,02-0,23]	0,13 [0,08-0,22]	0,196
BAZO [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	0,06 [0,04-0,08]	0,05 [0,03-0,06]	0,203
RBC [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	4,45 [3,54-5,03]	4,82 [4,17-5,19]	0,011*
HGB [g/dl]	13,0 [9,5-13,8]	13,5 [12,0-15,0]	0,003*
HCT [%]	39,4 [30,0-42,4]	40,1 [35,9-44,3]	0,016*
MCV [fl]	85,5 [84,1-89,1]	86,0 [84,0-88,8]	0,830
RDW-CV [%]	14,4 [13,5-16,4]	13,6 [13,2-15,4]	0,301
PLT [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	378 [304-460]	335 [263-372]	0,209

*p-value < 0,05 dla testu Wilcoxona

Podobnie u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego pod wpływem fazy indukcji leczenia biologicznego uzyskano znaczący spadek aktywności klinicznej choroby. W badaniu krwi stwierdzono istotny wzrost poziomów erytrocytów, hemoglobiny i hematokrytu oraz znaczny spadek leukocytów, szczególnie neutrofilów. Ponadto zauważono tendencję do obniżonych stężeń CRP i płytek krwi.

4.1.3. Wyniki badania klinicznego jamy ustnej

Tabele 19-24 prezentują wyniki badania stomatologicznego grupy badanej z podziałem na postać nieswoistej choroby zapalnej jelit oraz jej przebiegiem.

Tabela 19. Stan uzębienia z podziałem na postać choroby (M [Q1-Q3]).

Parametr	ogółem n=50	CD n=26	UC n=24	p-value
liczba zębów	28 [25-29]	27 [23-28]	28,5 [27-30]	0,030*
P-z	1 [0-2]	1 [0-2]	1 [0-2,5]	0,810
U-z	2 [0-4]	3 [0-8]	2 [0-2,5]	0,190
W-z	7 [3-10]	5 [3-8]	8,5 [5-11,5]	0,027*
PUW-z	12,5 [7-17]	10,5 [8-16]	13,5 [7-17,5]	0,800
P-p	1 [0-3]	1 [0-3]	1 [0-2,5]	0,841
U-p	10 [0-20]	15 [0-40]	10 [0-12,5]	0,190
W-p	10 [4-17]	8 [3-13]	11 [6-22,5]	0,074
PUW-p	28 [13-43]	31 [13-43]	25,5 [13-38,5]	0,443
wskaźnik leczenia	0,86 [0,69-1]	0,83 [0,67-1]	0,86 [0,74-1]	0,662

*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a

Tabela 20. Stan uzębienia z podziałem na przebieg choroby (M [Q1-Q3]).

Parametr	łagodny n=8	umiarkowany n=31	ciężki n=11	p-value
liczba zębów	28 [27-30,5]	27 [22-29]	28 [27-30]	0,184
P-z	1,5 [1-4,5]	1 [0-2]	1 [1-2]	0,210
U-z	0,5 [0-1,5]	3 [0-8]	2 [0-2]	0,086
W-z	6,5 [1,5-8,5]	6 [3-11]	8 [4-11]	0,524
PUW-z	8,5 [4,5-12,5]	15 [9-18]	13 [7-14]	0,168
P-p	1,5 [1-4,5]	1 [0-3]	1 [1-2]	0,239
U-p	2,5 [0-7,5]	15 [0-40]	10 [0-10]	0,086
W-p	8 [1,5-18]	10 [4-21]	10 [6-17]	0,683
PUW-p	14,5 [6-27,5]	33 [13-53]	23 [14-33]	0,079
wskaźnik leczenia	0,69 [0,58-0,83]	0,91 [0,73-1]	0,83 [0,67-0,92]	0,107

Zachorowalność na próchnicę w badanej grupie była niewysoka – mediana obecnych aktywnych ubytków próchnicowych wynosiła jedynie 1. Ponadto wskaźniki leczenia próchnicy posiadały wysokie wartości, niezależnie od postaci nieswoistej choroby zapalnej jelit. U pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego zaobserwowano istotnie więcej zębów z założonymi wypełnieniami. Istotna statystycznie różnica dotyczyła też liczby zębów posiadanych przez pacjentów, aczkolwiek wiązała się z obecnością lub brakiem trzecich zębów trzonowych. Większość badanych pacjentów posiadała pełne łuki zębowe, z co najwyżej pojedynczymi brakami. Podobnie nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy stanem uzębienia a aktywnością choroby w dniu badania.

Tabela 21. Stan higieny jamy ustnej z podziałem na postać choroby (M [Q1-Q3] / %).

Parametr	ogółem n=50	CD n=26	UC n=24	p-value
API [%]	30,4 [15,0-42,9]	23,7 [11,5-37,5]	36,8 [22,3-47,4]	0,145
PII	0,38 [0,17-0,50]	0,33 [0,17-0,38]	0,44 [0,23-0,58]	0,189
kamień nazębny	46,00	42,31	50,00	0,777

Tabela 22. Stan higieny jamy ustnej z podziałem na przebieg choroby (M [Q1-Q3] / %).

Parametr	łagodny n=8	umiarkowany n=31	ciężki n=11	p-value
API [%]	38,8 [25,0-44,4]	24,1 [7,7-45,8]	30,8 [21,4-40,0]	0,346
PII	0,38 [0,33-0,52]	0,33 [0,17-0,58]	0,38 [0,13-0,46]	0,612
kamień nazębny	75,00	38,71	45,45	0,177

Badana grupa reprezentowała dobry stan higieny jamy ustnej i nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy ustalonymi podgrupami. Niższe wartości wskaźników świadczące o lepszym stanie higieny jamy ustnej stwierdzono u pacjentów z chorobą

Leśniowskiego-Crohna. Uwzględniając przebieg choroby, najniższe wartości posiadały osoby o umiarkowanej aktywności choroby. Obecne złoże kamienia nazębnego ograniczały się u większości pacjentów jedynie do niewielkiego pasma w okolicy przydziąsłowej siekaczy żuchwy lub przestrzeni międzyzębowych w tym odcinku.

Tabela 23. Stan przyzębia z podziałem na postać choroby (M [Q1-Q3]).

Parametr	ogółem n=50	CD n=26	UC n=24	p-value
SBI [%]	0,0 [0,0-3,7]	0,0 [0,0-0,0]	0,0 [0,0-4,1]	0,242
GI	0,29 [0,17-0,38]	0,25 [0,17-0,29]	0,33 [0,21-0,46]	0,054
PPD [mm]	1,42 [1,15-1,58]	1,33 [1,15-1,58]	1,42 [1,18-1,52]	0,624

Tabela 24. Stan przyzębia z podziałem na przebieg choroby (M [Q1-Q3]).

Parametr	łagodny n=8	umiarkowany n=31	ciężki n=11	p-value
SBI [%]	0,0 [0,0-7,8]	0,0 [0,0-0,0]	0,0 [0,0-4,2]	0,645
GI	0,29 [0,25-0,35]	0,29 [0,17-0,42]	0,33 [0,13-0,42]	0,810
PPD [mm]	1,23 [1,12-1,56]	1,45 [1,29-1,58]	1,25 [1,06-1,42]	0,195

Wszyscy pacjenci manifestowali zdrowy stan przyzębia, z co najwyżej łagodnym zlokalizowanym zapaleniem dziąseł. Pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego posiadali wyższe wartości wskaźnika *Gingival Index*, bliskie istotności statystycznej. Natomiast nie zaobserwowano istotnych różnic w stanie przyzębia w podgrupach o różnym przebiegu choroby.

Zależności pomiędzy wartościami parametrów stanu higieny jamy ustnej i parametrów stanu przyzębia zaprezentowano w Tabeli 25.

Tabela 25. Korelacje pomiędzy parametrami stanu higieny jamy ustnej i stanu przyzębia.

	SBI	PII	GI
API	0,574*	0,853*	0,837*
SBI		0,526*	0,503*
PII			0,931*

*p-value < 0,05 dla testu istotności współczynnika korelacji Spearmana

Uzyskane wartości wskaźników stanu higieny jamy ustnej bardzo silnie korelowały ze wskaźnikami stanu przyzębia, szczególnie z *Gingival Index*. Stwierdzono również bardzo silną korelację pomiędzy oboma oznaczonymi wskaźnikami stanu higieny jamy ustnej.

Wyniki badania ankietowego dotyczącego nawyków związanych z higieną jamy ustnej zawarto w Tabelach 26-27.

Tabela 26. Nawyki higieniczne z podziałem na postać choroby (%).

Parametr	ogółem n=50	CD n=26	UC n=24	p-value
mycie zębów 2-3 min	86,00	88,46	83,33	0,697
mycie zębów 2x dziennie	78,00	76,92	79,17	>0,999
mycie języka	36,00	57,69	12,50	0,001*
wymiana szczoteczki co 2-3 miesiące	84,00	76,92	91,67	0,250
nitkowanie	16,00	15,38	16,67	>0,999
stosowanie płukanek	14,00	15,38	12,50	>0,999
regularne przeglądy	60,00	53,85	66,67	0,399

*p-value < 0,05 dla testu dokładnego Fishera dwustronnego

Tabela 27. Nawyki higieniczne z podziałem na przebieg choroby (%).

Parametr	łagodny n=8	umiarkowany n=31	ciężki n=11	p-value
mycie zębów 2-3 min	87,50	87,10	81,82	0,907
mycie zębów 2x dziennie	50,00	80,65	90,91	0,109
mycie języka	50,00	38,71	18,18	0,295
wymiana szczoteczki co 2-3 miesiące	75,00	80,65	100,00	0,105
nitkowanie	12,50	12,90	27,27	0,547
stosowanie płukanek	25,00	12,90	9,09	0,620
regularne przeglądy	75,00	58,06	54,55	0,612

Respondenci deklarowali poprawne nawyki dotyczące higieny jamy ustnej, niezależnie od postaci i przebiegu choroby. Większość z nich szczotkowała zęby 2 razy dziennie przez 2-3 minuty i wymieniała szczoteczkę co 2-3 miesiące. Istotne różnice zauważono w przypadku nawyku oczyszczania języka – pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego blisko pięciokrotnie rzadziej pamiętali o myciu powierzchni języka w porównaniu do pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Jedynie mniej niż 1/3 ankietowanych systematycznie nitkowała przestrzeń międzyzębowe i stosowała płukanek do jamy ustnej. Ponadto na regularne przeglądy stomatologiczne zgłaszało się niecałe 2/3 badanych.

Częstość występowania zmian na błonie śluzowej jamy ustnej oraz suchości jamy ustnej przedstawiono w Tabelach 28-29.

Tabela 28. Stan błony śluzowej jamy ustnej z podziałem na postać choroby (%).

Parametr	ogółem n=50	CD n=26	UC n=24	p-value
zmiany na błonie śluzowej	32,00	23,08	41,67	0,227
suchość jamy ustnej	6,00	7,69	4,17	>0,999

Tabela 29. Stan błony śluzowej jamy ustnej z podziałem na przebieg choroby (%).

Parametr	łagodny n=8	umiarkowany n=31	ciężki n=11	p-value
zmiany na błonie śluzowej	25,00	29,03	45,45	0,554
suchość jamy ustnej	0,00	9,68	0,00	0,225

Zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej obserwowano częściej w podgrupie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Z kolei ze względu na przebieg choroby zmiany najczęściej występowały w podgrupie o jej największej aktywności. Obie zależności nie wykazywały jednak istotności statystycznej. Wśród ocenianych zmian głównie zauważano te o charakterze nieswoistym, takie jak nadżerki aftowe czy zapalenie kątów warg. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna nie stwierdzono obecności zmian swoistych na błonie śluzowej jamy ustnej. Niewielki odsetek pacjentów uskarżał się na uczucie suchości w jamie ustnej – dotyczyło ono osób z umiarkowanym przebiegiem obu postaci nieswoistych chorób zapalnych jelit.

4.1.4. Właściwości fizykochemiczne śliny

Zmiany określonych właściwości fizykochemicznych śliny, takich jak pH i minutowe wydzielanie, pod wpływem terapii indukcyjnej leczenia biologicznego opisano w Tabelach 30-31.

Tabela 30. Parametry fizykochemiczne śliny u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna przed i po fazie indukcji.

Parametr	przed fazą indukcji M [Q1-Q3]	po fazie indukcji M [Q1-Q3]	p-value
pH	6,84 [6,53-7,01]	6,95 [6,71-7,06]	0,307
wydzielanie [ml/min]	0,38 [0,25-0,50]	0,50 [0,33-0,67]	0,091

Tabela 31. Parametry fizykochemiczne śliny u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po fazie indukcji.

Parametr	przed fazą indukcji M [Q1-Q3]	po fazie indukcji M [Q1-Q3]	p-value
pH	6,87 [6,54-7,02]	6,83 [6,65-7,18]	0,028*
wydzielanie [ml/min]	0,25 [0,25-0,44]	0,33 [0,33-0,50]	0,236

*p-value < 0,05 dla testu Wilcoxona

Po terapii indukcyjnej w obu podgrupach pacjentów, zarówno z chorobą Leśniowskiego-Crohna i z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, ślina spoczynkowa posiadała wyższe pH (istotnie w drugiej podgrupie) oraz zwiększone wydzielanie minutowe (bliskie istotnemu w pierwszej podgrupie).

4.2. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej

W Tabelach 32 i 33 przedstawiono wyniki porównania poziomów wybranych markerów ślinowych pomiędzy pacjentami z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, zarówno przed i jak po terapii indukcyjnej leczenia biologicznego (niezależnie od odpowiedzi klinicznej). Odniesiono również stężenia tych markerów względem grupy kontrolnej. W związku z istotną różnicą w poziomie białka całkowitego w ślinie między podgrupami badanymi a grupą kontrolną poza porównaniem bezpośrednich poziomów markerów oznaczanych w ślinie dokonano porównania ich poziomów po standaryzacji w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego. Dla każdej z analiz przygotowano po dwie tabele – pierwszą zawierającą bezwzględne stężenia badanych markerów oraz drugą z wartościami stężeń przeliczonych względem zawartości białka całkowitego w ślinie.

Tabela 32. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.

Parametr		przed fazą indukcyjną (A)	po fazie indukcyjnej (B)	grupa kontrolna (C)	p-value		
		M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	A vs. B	A vs. C	B vs. C
TNF-R1 [pg/ml]	CD	255,3 [6,2-611,9]	249,4 [124,8-454,6]	393,1 [140,7-798,7]	0,810	0,111	0,095
	UC	45,2 [4,3-173,1]	318,0 [68,8-648,8]	223,6 [117,6-402,8]	0,030 [^]	0,001*	0,563
	p-value	0,036*	0,401				
IgA [µg/ml]	CD	52,1 [0,4-175,2]	112,3 [8,3-151,4]	167,9 [89,3-425,4]	0,381	0,005*	0,024*
	UC	10,9 [0,1-77,5]	80,1 [1,9-344,2]	236,5 [86,7-447,7]	0,021 [^]	<0,001*	0,056
	p-value	0,153	0,895				
kalprotektyna [ng/ml]	CD	1240,1 [3,2-3042,0]	1824,0 [1,2-6423,5]	5095,9 [2315,0-10779,4]	0,280	<0,001*	0,012*
	UC	2,7 [0,7-1297,9]	826,6 [1,0-6455,5]	1994,5 [1010,2-9435,8]	0,171	<0,001*	0,097
	p-value	0,042*	0,591				
PAI-1 [pg/ml]	CD	78,2 [0,0-119,2]	60,4 [28,4-225,6]	71,1 [30,5-120,9]	0,218	0,445	0,876
	UC	82,1 [0,0-161,8]	105,8 [17,7-320,6]	73,8 [25,0-105,2]	0,045 [^]	0,910	0,756
	p-value	0,738	0,608				

MPO [ng/ml]	CD	57,2 [4,9-110,6]	78,1 [7,2-195,2]	283,8 [86,0-400,0]	0,773	<0,001*	0,004*
	UC	9,0 [3,2-28,0]	55,4 [2,1-187,1]	67,7 [45,4-400,0]	0,030^	<0,001*	0,103
	<i>p</i> -value	0,021*	0,584				
CAT [nmol/min/ml]	CD	0,098 [0,061-0,190]	0,102 [0,070-0,204]	0,130 [0,084-0,217]	0,683	0,253	0,359
	UC	0,064 [0,060-0,076]	0,103 [0,057-0,197]	0,118 [0,083-0,141]	0,086	0,001*	0,749
	<i>p</i> -value	0,034*	0,565				
białko całkowite [μg/ml]	CD	254,0 [131,6-559,0]	358,4 [132,5-507,5]	716,5 [476,0-1398,0]	0,981	<0,001*	<0,001*
	UC	294,0 [181,6-406,4]	210,7 [59,0-383,7]	578,5 [313,6-1171,5]	0,627	0,011*	0,009*
	<i>p</i> -value	0,777	0,350				

**p*-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a; ^*p*-value < 0,05 dla testu Wilcozona

Przed fazą indukcyjną leczenia biologicznego w porównaniu do pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego charakteryzowali się istotnie niższymi poziomami takich markerów ślinowych jak TNF-R1, kalprotektyna, mieloperoksydaza i katalaza. Podobnie względem grupy kontrolnej poza wymienionymi już markerami dodatkowo IgA oraz białko całkowite wykazało znacznie obniżone stężenia w tej podgrupie pacjentów. Z kolei w podgrupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna zaobserwowano istotnie niższe stężenia IgA, kalprotektyny, mieloperoksydazy oraz białka całkowitego względem grupy kontrolnej, zarówno przed, jak i po terapii indukcyjnej. Po fazie indukcyjnej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego jedynie białko całkowite posiadało znacznie obniżony poziom względem osób zdrowych.

Na skutek terapii indukcyjnej stwierdzono istotny wzrost stężeń kilku markerów ślinowych jedynie u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Należały do nich TNF-R1, IgA, PAI-1 i MPO. Nie uwzględniono jednak podziału na pacjentów, którzy wykazali odpowiedź kliniczną na leczenie biologiczne lub też nie – zostanie to przedstawione w dalszej części rozdziału.

Tabela 33. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) pomiędzy podgrupami pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.

Parametr		przed fazą indukcyjną (A)	po fazie indukcyjnej (B)	grupa kontrolna (C)	p-value		
		M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	A vs. B	A vs. C	B vs. C
TNF-R1 [pg/μg białka]	CD	0,608 [0,264-1,720]	0,510 [0,300-1,586]	0,540 [0,235-1,018]	0,755	0,291	0,691
	UC	0,199 [0,033-0,526]	0,896 [0,159-4,278]	0,395 [0,243-1,142]	0,009 [^]	0,068	0,212
	p-value	0,024*	0,509				
IgA [μg/μg białka]	CD	0,233 [0,001-0,965]	0,254 [0,043-0,693]	0,242 [0,119-0,401]	0,732	0,545	0,959
	UC	0,047 [0,001-0,188]	0,392 [0,047-0,745]	0,454 [0,163-1,047]	0,007 [^]	<0,001*	0,317
	p-value	0,118	0,902				
kalprotektyna [ng/μg białka]	CD	4,755 [0,036-9,369]	4,307 [0,025-11,235]	6,944 [2,919-16,513]	0,532	0,156	0,146
	UC	0,019 [0,004-2,838]	2,806 [0,027-14,898]	4,798 [1,789-10,856]	0,059	<0,001*	0,197
	p-value	0,003*	0,699				
PAI-1 [pg/μg białka]	CD	0,185 [0,000-0,899]	0,140 [0,036-0,852]	0,101 [0,042-0,288]	0,534	0,488	0,166
	UC	0,222 [0,000-0,687]	0,550 [0,024-1,173]	0,132 [0,056-0,178]	0,627	0,439	0,078
	p-value	0,977	0,432				
MPO [ng/μg białka]	CD	0,167 [0,046-0,577]	0,196 [0,070-0,654]	0,290 [0,144-0,685]	0,848	0,200	0,341
	UC	0,055 [0,011-0,124]	0,192 [0,028-0,828]	0,178 [0,048-0,657]	0,028 [^]	0,003*	0,592
	p-value	0,007*	0,734				

*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a; [^]p-value < 0,05 dla testu Wilcoxon

Po wystandaryzowaniu stężeń wybranych markerów ślinowych w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego zaobserwowano mniej znaczących różnic pomiędzy pacjentami a grupą kontrolną. Jedynie przed fazą indukcyjną leczenia pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego posiadali obniżone stężenia IgA, kalprotektyny i MPO. Podobnie jak wcześniej pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wykazali istotnie niższe poziomy TNF-R1, kalprotektyny i MPO w porównaniu do pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Pod wpływem terapii indukcyjnej wzrostowi uległy stężenia TNF-R1, IgA oraz MPO tylko w podgrupie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Natomiast u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna nie stwierdzono żadnych istotnych zmian w poziomach markerów na skutek fazy indukcyjnej, jak również względem grupy kontrolnej.

4.3. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne przed i po terapii indukcyjnej

Porównano stężenia wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią kliniczną na zastosowane leczenie biologiczne i bez niej, osobno przed i po fazie indukcyjnej. Wyniki zawarto w Tabelach 34-37.

Tabela 34. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne przed terapią indukcyjną.

Parametr		odpowieź kliniczna (A)	brak odpowiedzi klinicznej (B)	grupa kontrolna (C)	p-value		
		M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	A vs. B	A vs. C	B vs. C
TNF-R1 [pg/ml]	CD	370,2 [6,2-617,8]	234,0 [10,8-352,0]	393,1 [140,7-798,7]	0,247	0,409	0,040*
	UC	30,1 [4,3-107,7]	150,5 [36,9-800,0]	223,6 [117,6-402,8]	0,162	<0,001*	0,493
IgA [µg/ml]	CD	59,3 [0,4-170,7]	45,1 [6,2-175,2]	167,9 [89,3-425,4]	0,776	0,019*	0,026*
	UC	6,2 [0,2-46,4]	59,8 [0,1-90,7]	236,5 [86,7-447,7]	0,294	<0,001*	0,017*
kalprotektyna [ng/ml]	CD	1525,2 [356,7-3510,9]	759,7 [3,2-1626,8]	5095,9 [2315,0-10779,4]	0,341	0,002*	0,002*
	UC	1,0 [0,6-752,9]	1214,2 [2,1-1875,7]	1994,5 [1010,2-9435,8]	0,066	<0,001*	0,102
PAI-1 [pg/ml]	CD	65,9 [0,0-97,9]	95,2 [31,6-119,2]	71,1 [30,5-120,9]	0,695	0,371	0,855
	UC	97,0 [13,4-162,4]	61,4 [0,0-161,1]	73,8 [25,0-105,2]	0,585	0,672	0,636
MPO [ng/ml]	CD	69,0 [8,7-103,1]	57,2 [1,8-115,3]	283,8 [86,0-400,0]	0,817	<0,001*	0,016*
	UC	4,0 [3,1-16,5]	23,9 [7,6-177,3]	67,7 [45,4-400,0]	0,162	<0,001*	0,037*
CAT [nmol/min/ml]	CD	0,126 [0,077-0,243]	0,081 [0,061-0,092]	0,130 [0,084-0,217]	0,143	0,899	0,028*
	UC	0,063 [0,060-0,068]	0,078 [0,064-0,304]	0,118 [0,083-0,141]	0,086	<0,001*	0,832
białko całkowite [µg/ml]	CD	337,7 [208,2-563,0]	181,5 [34,7-199,9]	716,5 [476,0-1398,0]	0,060	<0,001*	<0,001*
	UC	220,8 [140,0-336,0]	817,0 [298,0-1050,0]	578,5 [313,6-1171,5]	0,004*	<0,001*	0,759

*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a

Przed wprowadzeniem leczenia biologicznego jedyną istotną różnicę pomiędzy pacjentami, którzy odpowiedzieli na terapię indukcyjną i tymi, którzy nie odpowiedzieli, zaobserwowano w podgrupie z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego dla ślinowego poziomu białka całkowitego. W porównaniu do grupy kontrolnej, bez względu na postać choroby, jak również stwierdzenie odpowiedzi klinicznej bądź nie, pacjenci włączeni do badania wykazywali istotne różnice w stężeniach wybranych markerów ślinowych,

za wyjątkiem PAI-1. Znaczące obniżenie ślinowych poziomów zarówno dla pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak i z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niezależnie od uzyskania odpowiedzi klinicznej lub nie, występowało w przypadku takich markerów ślinowych jak IgA i MPO.

Tabela 35. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne przed terapią indukcyjną.

Parametr		odpowiedź kliniczna (A)	brak odpowiedzi klinicznej (B)	grupa kontrolna (C)	p-value		
		M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	A vs. B	A vs. C	B vs. C
TNF-R1 [pg/μg białka]	CD	0,594 [0,264-1,421]	1,198 [0,369-2,675]	0,540 [0,235-1,018]	0,662	0,424	0,342
	UC	0,181 [0,032-0,377]	0,335 [0,045-0,762]	0,395 [0,243-1,142]	0,568	0,046*	0,555
IgA [μg/μg białka]	CD	0,191 [0,001-0,482]	0,922 [0,004-1,098]	0,242 [0,119-0,401]	0,394	0,313	0,770
	UC	0,031 [0,002-0,160]	0,070 [0,000-0,216]	0,454 [0,163-1,047]	0,726	<0,001*	0,006*
kalprotektyna [ng/μg białka]	CD	4,066 [0,581-9,369]	5,773 [0,024-9,313]	6,944 [2,919-16,513]	0,700	0,129	0,559
	UC	0,015 [0,004-2,068]	1,414 [0,003-4,468]	4,798 [1,789-10,856]	0,611	<0,001*	0,045*
PAI-1 [pg/μg białka]	CD	0,135 [0,000-0,621]	0,213 [0,057-3,433]	0,101 [0,042-0,288]	0,450	0,844	0,257
	UC	0,386 [0,061-1,109]	0,038 [0,000-0,311]	0,132 [0,056-0,178]	0,095	0,128	0,357
MPO [ng/μg białka]	CD	0,160 [0,046-0,343]	0,315 [0,052-0,758]	0,290 [0,144-0,685]	0,456	0,084	>0,999
	UC	0,055 [0,012-0,093]	0,089 [0,009-0,206]	0,178 [0,048-0,657]	0,657	0,003*	0,103

*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a

Ponownie po przeliczeniu poziomów wybranych markerów ślinowych na mikrogram białka całkowitego uległa zniwelowaniu większość wcześniejszych różnic pomiędzy podgrupami pacjentów a grupą kontrolną. Stwierdzono jedynie znaczące różnice dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. W przypadku osób, które wykazały odpowiedź kliniczną na zastosowane leczenie biologiczne, obserwowano istotnie obniżone stężenia TNF-R1, IgA, kalprotektyny i MPO, a w przypadku osób, które nie odpowiedziały na terapię indukcyjną tylko IgA i kalprotektyny. Potwierdzono też brak znaczących różnic pomiędzy pacjentami z odpowiedzią kliniczną i bez niej przed wprowadzeniem leczenia biologicznego, niezależnie od postaci choroby.

Tabela 36. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne po terapii indukcyjnej.

Parametr		odpowiedź kliniczna (A)	brak odpowiedzi klinicznej (B)	grupa kontrolna (C)	p-value		
		M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	A vs. B	A vs. C	B vs. C
TNF-R1 [pg/ml]	CD	185,4 [124,8-344,4]	454,6 [375,8-546,7]	393,1 [140,7-798,7]	0,085	0,032*	0,898
	UC	317,4 [108,6-642,2]	439,5 [4,0-655,3]	223,6 [117,6-402,8]	0,949	0,587	0,741
IgA [µg/ml]	CD	110,9 [8,3-149,5]	124,3 [46,7-151,4]	167,9 [89,3-425,4]	0,959	0,034*	0,159
	UC	147,0 [33,4-367,8]	3,0 [0,2-315,7]	236,5 [86,7-447,7]	0,323	0,199	0,039*
kalprotektyna [ng/ml]	CD	1599,4 [2,7-3440,1]	1824,0 [1,2-8031,3]	5095,9 [2315,0-10779,4]	0,758	0,007*	0,289
	UC	741,2 [1,6-6100,7]	912,0 [0,4-7131,5]	1994,5 [1010,2-9435,8]	0,799	0,165	0,194
PAI-1 [pg/ml]	CD	68,7 [33,0-244,0]	39,0 [0,0-116,4]	71,1 [30,5-120,9]	0,326	0,754	0,401
	UC	130,4 [17,1-304,4]	66,7 [18,2-379,0]	73,8 [25,0-105,2]	0,798	0,791	0,831
MPO [ng/ml]	CD	74,2 [12,5-175,6]	123,2 [3,9-305,5]	283,8 [86,0-400,0]	0,777	0,005*	0,079
	UC	175,0 [11,8-199,7]	8,1 [1,8-89,6]	67,7 [45,4-400,0]	0,143	0,548	0,008*
CAT [nmol/min/ml]	CD	0,097 [0,070-0,201]	0,109 [0,089-0,294]	0,130 [0,084-0,217]	0,455	0,207	0,971
	UC	0,151 [0,078-0,163]	0,057 [0,050-0,231]	0,118 [0,083-0,141]	0,144	0,662	0,125
białko całkowite [µg/ml]	CD	364,2 [236,0-501,0]	296,7 [91,0-611,5]	716,5 [476,0-1398,0]	0,837	<0,001*	0,017*
	UC	187,0 [36,0-377,0]	351,0 [81,9-922,0]	578,5 [313,6-1171,5]	0,465	0,007*	0,267

*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a

Z kolei porównując poziomy wybranych markerów ślinowych po fazie indukcyjnej leczenia biologicznego u pacjentów, którzy uzyskali odpowiedź kliniczną lub nie, podobnie nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy tymi podgrupami zarówno z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Jednakże w przypadku większości markerów ich stężenia uległy wzrostowi na skutek terapii indukcyjnej i w związku z tym zaobserwowano mniej znaczących różnic pomiędzy podgrupami badanymi a grupą kontrolną. Pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna, mimo wykazanej odpowiedzi klinicznej na leczenie, nadal charakteryzowali się znacznie niższymi poziomami IgA, kalprotektyny, MPO i białka całkowitego oraz dodatkowo TNF-R1. Natomiast wśród pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego pacjenci z odpowiedzią kliniczną wciąż posiadali istotnie obniżone stężenia

białka całkowitego, a pacjenci bez odpowiedzi obniżone poziomy takich markerów jak IgA i MPO.

Tabela 37. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne po terapii indukcyjnej.

Parametr		odpowieź kliniczna (A)	brak odpowiedzi klinicznej (B)	grupa kontrolna (C)	p-value		
		M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	M [Q1-Q3]	A vs. B	A vs. C	B vs. C
TNF-R1 [pg/μg białka]	CD	0,499 [0,300-0,721]	0,893 [0,317-3,163]	0,540 [0,235-1,018]	0,341	0,880	0,273
	UC	0,925 [0,203-4,278]	0,868 [0,021-6,310]	0,395 [0,243-1,142]	0,849	0,181	0,654
IgA [μg/μg białka]	CD	0,242 [0,044-0,459]	0,545 [0,043-1,143]	0,242 [0,119-0,401]	0,537	0,754	0,715
	UC	0,570 [0,113-0,859]	0,094 [0,001-0,342]	0,454 [0,163-1,047]	0,060	0,905	0,011*
kalprotektyna [ng/μg białka]	CD	4,153 [0,025-7,205]	6,783 [0,025-19,446]	6,944 [2,919-16,513]	0,487	0,098	0,661
	UC	3,093 [0,046-17,449]	0,989 [0,003-12,348]	4,798 [1,789-10,856]	0,611	0,361	0,194
PAI-1 [pg/μg białka]	CD	0,313 [0,079-0,852]	0,090 [0,000-0,844]	0,101 [0,042-0,288]	0,501	0,065	>0,999
	UC	0,690 [0,010-2,311]	0,411 [0,190-1,072]	0,132 [0,056-0,178]	0,949	0,209	0,076
MPO [ng/μg białka]	CD	0,214 [0,070-0,367]	0,155 [0,115-0,654]	0,290 [0,144-0,685]	0,898	0,385	0,535
	UC	0,299 [0,050-0,936]	0,034 [0,007-0,282]	0,178 [0,048-0,657]	0,127	0,691	0,050*

*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a

Uwzględniając standaryzację stężeń wybranych markerów ślinowych po terapii indukcyjnej względem poziomu białka całkowitego, również nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy pacjentami z odpowiedzią kliniczną i bez niej. Ponadto, porównując z grupą kontrolną, stwierdzono jedynie różnice pomiędzy pacjentami z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, którzy nie wykazali odpowiedzi klinicznej, w przypadku stężeń IgA oraz MPO.

4.4. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne

Kluczowe porównania dotyczą obecności zmian w poziomach wybranych markerów ślinowych na skutek wdrożonej terapii indukcyjnej zarówno u pacjentów z wykazaną odpowiedzią kliniczną na leczenie biologiczne, jak i bez niej. Tabele 38-41 przedstawiają szczegółowe wyniki. Ryciny 3-10 prezentują jedynie porównania stężeń

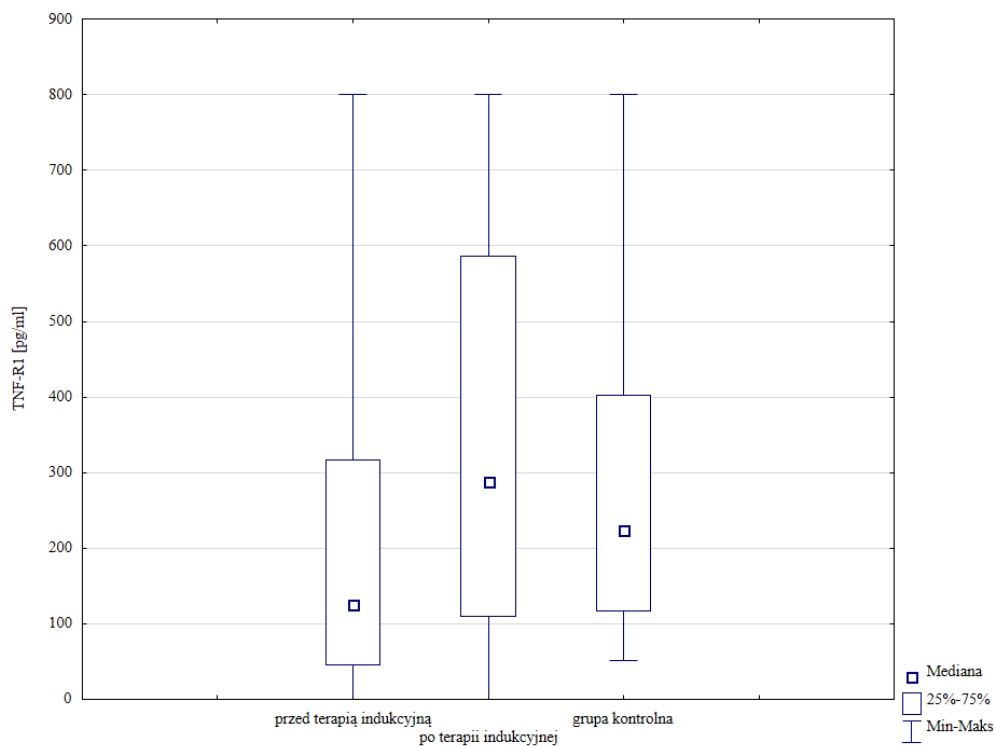
markerów, które wykazały istotność statystyczną na skutek fazy indukcyjnej, dodatkowo w odniesieniu do grupy kontrolnej celem lepszej wizualizacji zależności.

Tabela 38. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów z odpowiedzią kliniczną na leczenie biologiczne.

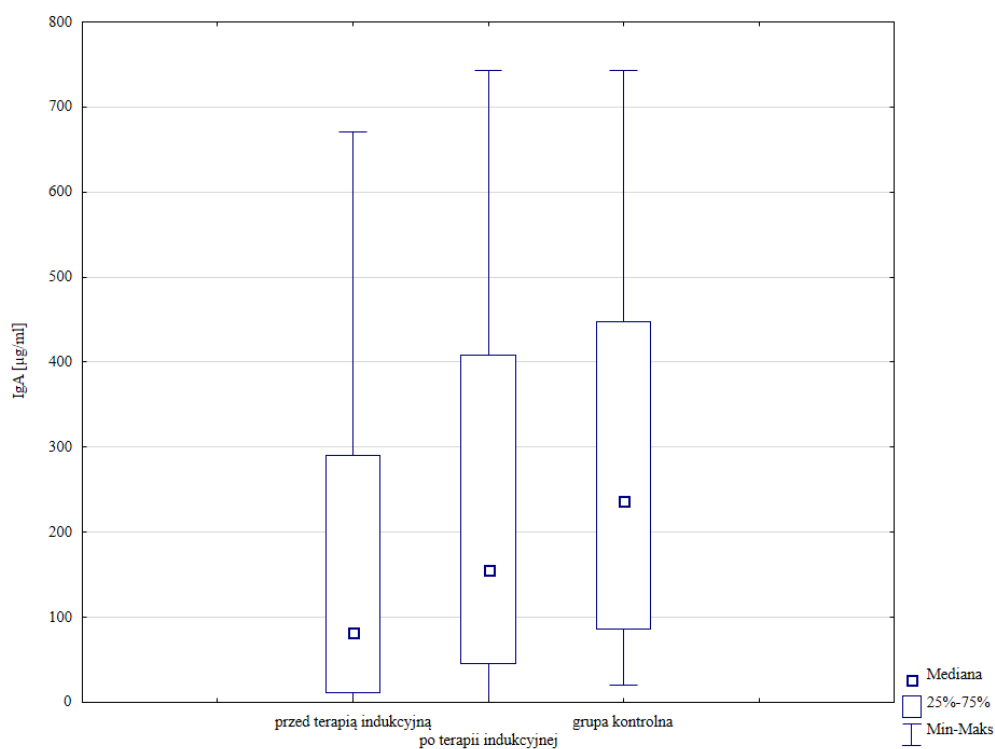
Parametr		przed fazą indukcyjną M [Q1-Q3]	po fazie indukcyjnej M [Q1-Q3]	p-value
TNF-R1 [pg/ml]	CD	370,2 [6,2-617,8]	185,4 [124,8-344,4]	0,133
	UC	30,1 [4,3-107,7]	317,4 [108,6-642,2]	0,015[^]
	p-value	0,007*	0,241	
IgA [µg/ml]	CD	59,3 [0,4-170,7]	110,9 [8,3-149,5]	0,831
	UC	6,2 [0,2-46,4]	147,0 [33,4-367,8]	0,009[^]
	p-value	0,123	0,428	
kalprotektyna [ng/ml]	CD	1525,2 [356,7-3510,9]	1599,4 [2,7-3440,1]	0,586
	UC	1,0 [0,6-752,9]	741,2 [1,6-6100,7]	0,079
	p-value	0,013*	0,830	
PAI-1 [pg/ml]	CD	65,9 [0,0-97,9]	68,7 [33,0-244,0]	0,157
	UC	97,0 [13,4-162,4]	130,4 [17,1-304,4]	0,109
	p-value	0,628	>0,999	
MPO [ng/ml]	CD	69,0 [8,7-103,1]	74,2 [12,5-175,6]	0,948
	UC	4,0 [3,1-16,5]	175,0 [11,8-199,7]	0,004[^]
	p-value	0,006*	0,643	
CAT [nmol/min/ml]	CD	0,126 [0,077-0,243]	0,097 [0,070-0,201]	0,679
	UC	0,063 [0,060-0,068]	0,151 [0,078-0,163]	0,007[^]
	p-value	0,003*	0,729	
białko całkowite [µg/ml]	CD	337,7 [208,2-563,0]	364,2 [236,0-501,0]	0,711
	UC	220,8 [140,0-336,0]	187,0 [36,0-377,0]	0,523
	p-value	0,077	0,204	

*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a; [^]p-value < 0,05 dla testu Wilcoxona

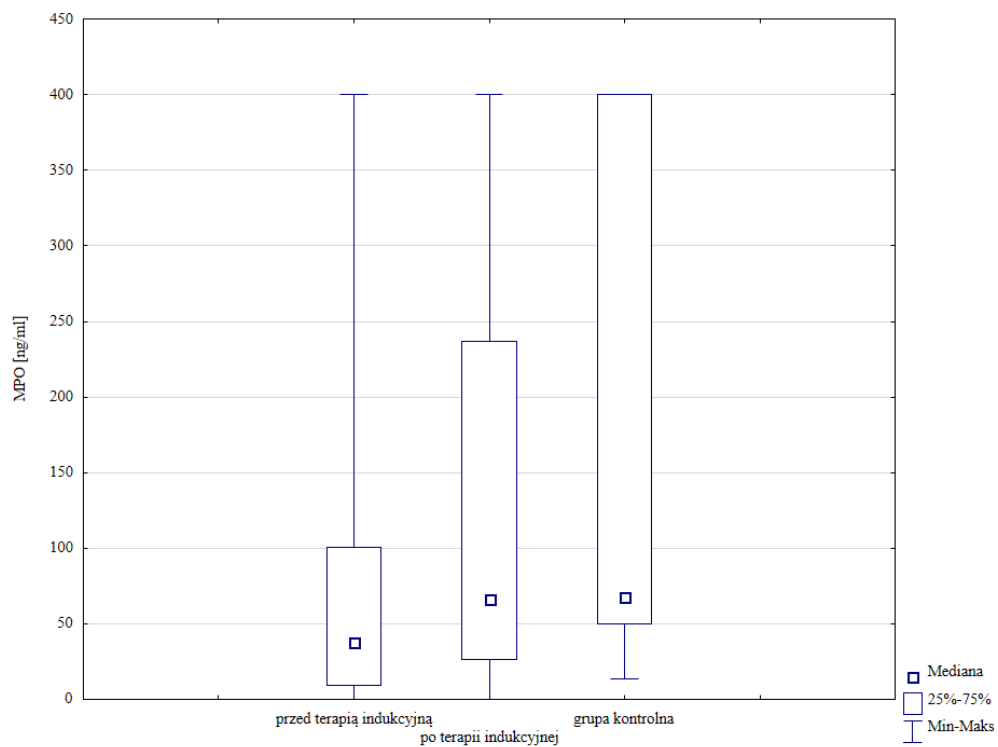
W podgrupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna ze stwierdzoną odpowiedzią kliniczną nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomach wybranych markerów ślinowych pod wpływem zastosowanej terapii indukcyjnej leczenia biologicznego. Z kolei w przypadku pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego stwierdzono istotne zwiększenie stężeń takich markerów jak TNF-R1, IgA, mieloperoksydaza i katalaza. Co więcej, w podgrupie pacjentów z odpowiedzią kliniczną osoby z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego charakteryzowały się znacznie niższymi poziomami TNF-R1, kalprotektyny, MPO i CAT przed fazą indukcyjną względem osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Na skutek wprowadzonego leczenia biologicznego po kilkunastu tygodniach nie zauważano już tych zależności.



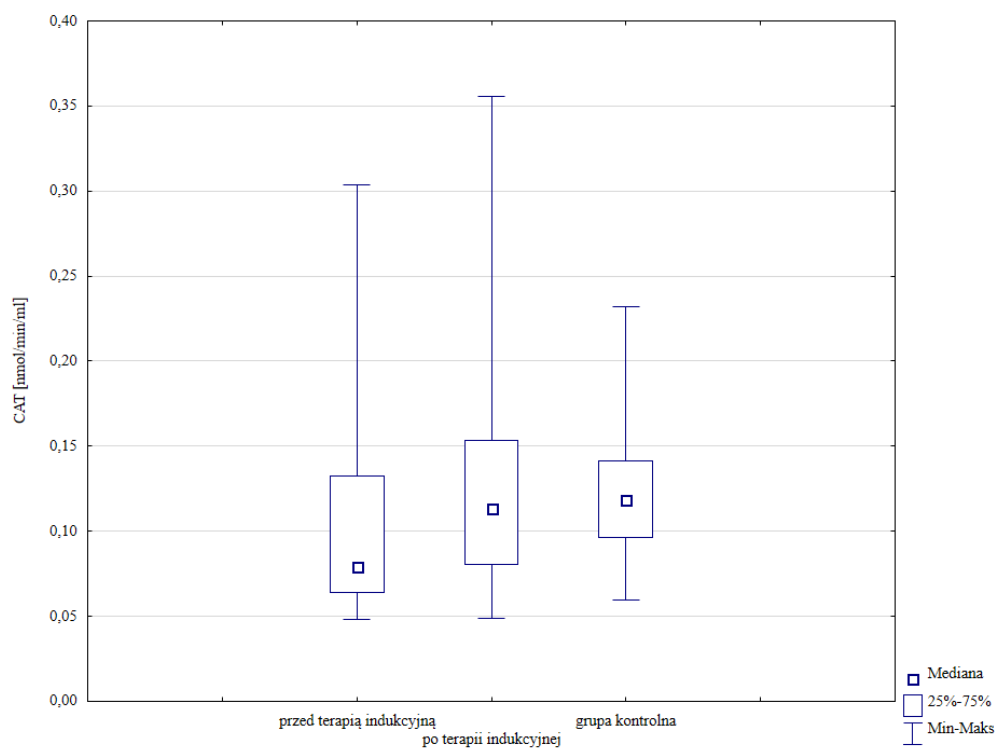
Rycina 3. Stężenie TNF-R1 w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.



Rycina 4. Stężenie IgA w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.



Rycina 5. Stężenie mieloperoksydazy w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.



Rycina 6. Aktywność katalazy w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.

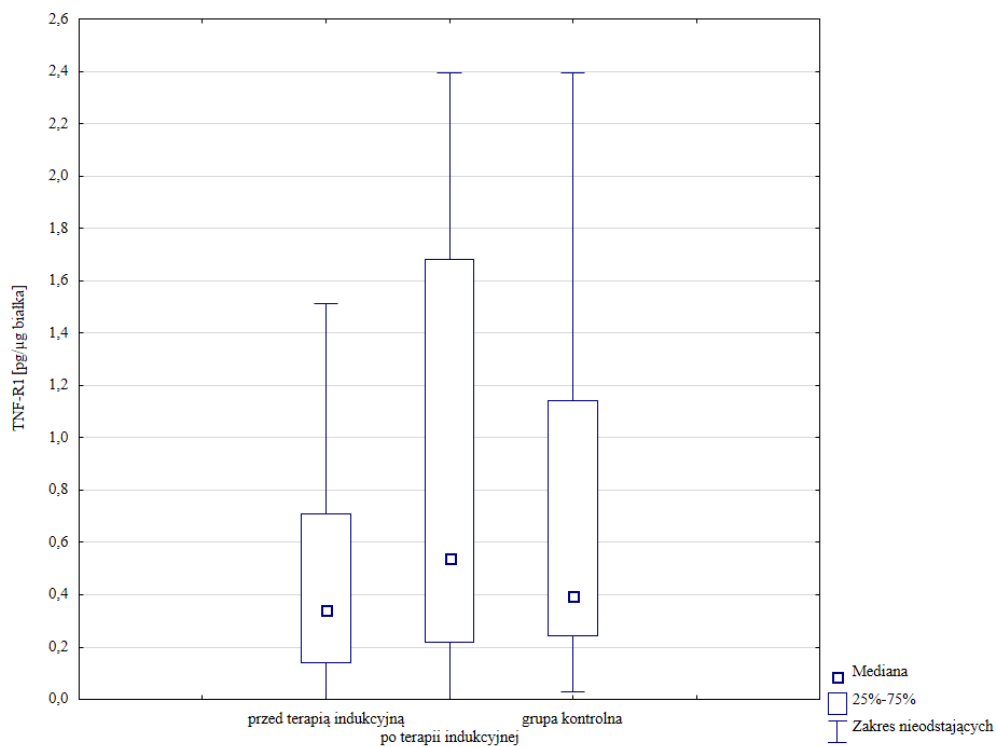
Tabela 39. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów z odpowiedzią kliniczną na leczenie biologiczne.

Parametr		przed fazą indukcyjną M [Q1-Q3]	po fazie indukcyjnej M [Q1-Q3]	p-value
TNF-R1 [pg/μg białka]	CD	0,594 [0,264-1,421]	0,499 [0,300-0,721]	0,231
	UC	0,181 [0,032-0,377]	0,925 [0,203-4,278]	0,013 [^]
	p-value	0,031*	0,241	
IgA [μg/μg białka]	CD	0,191 [0,001-0,482]	0,242 [0,044-0,459]	0,981
	UC	0,031 [0,002-0,160]	0,570 [0,113-0,859]	0,009 [^]
	p-value	0,267	0,186	
kalprotektyna [ng/μg białka]	CD	4,066 [0,581-9,369]	4,153 [0,025-7,205]	0,679
	UC	0,015 [0,004-2,068]	3,093 [0,046-17,449]	0,049 [^]
	p-value	0,009*	0,908	
PAI-1 [pg/μg białka]	CD	0,135 [0,000-0,621]	0,313 [0,079-0,852]	0,267
	UC	0,386 [0,061-1,109]	0,690 [0,010-2,311]	0,836
	p-value	0,341	0,753	
MPO [ng/μg białka]	CD	0,160 [0,046-0,343]	0,214 [0,070-0,367]	0,845
	UC	0,055 [0,012-0,093]	0,299 [0,050-0,936]	0,011 [^]
	p-value	0,014*	0,597	

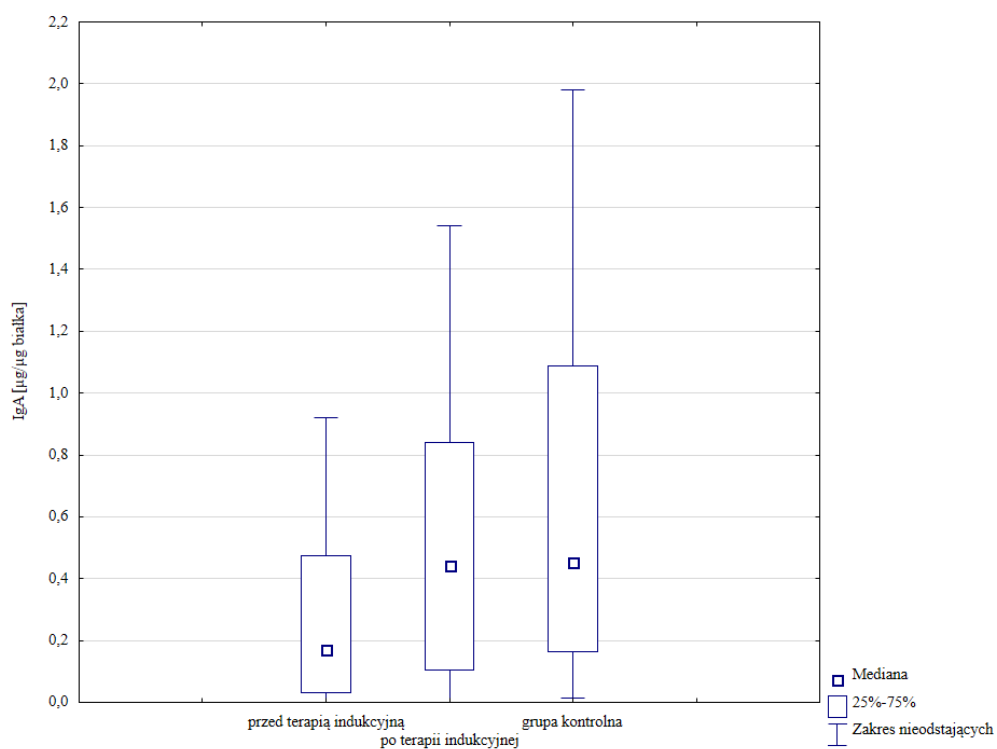
*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a; [^]p-value < 0,05 dla testu Wilcoxona

Po uwzględnieniu przeliczenia stężeń wybranych markerów na białko całkowite potwierdzono istotne podwyższenie poziomów TNF-R1, IgA i MPO u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita, którzy wykazali odpowiedź kliniczną na zastosowane leczenie biologiczne. Dodatkowo znacznie wzrosło stężenie kalprotektyny w tej podgrupie. Ponownie stwierdzono te same zależności pomiędzy pacjentami z chorobą Leśniowskiego-Crohna i pacjentami z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

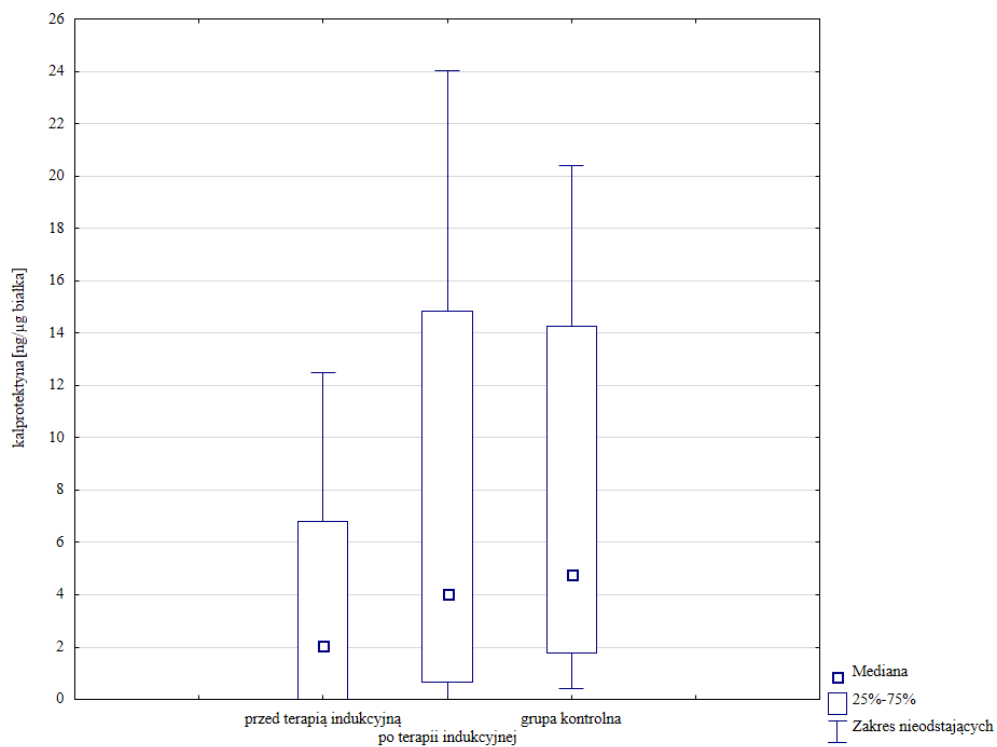
Wykresy ramka-wąsy zaprezentowane na kolejnych stronach odzwierciedlają wzrostową tendencję zmian stężeń wybranych markerów ślinowych u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego ze stwierdzoną odpowiedzią kliniczną pod wpływem przeprowadzonej terapii indukcyjnej. Można zauważyć, że poziomy tych markerów wystandaryzowane względem poziomu białka całkowitego, którym różniły się grupa badana i kontrolna, na skutek leczenia wyraźnie wzrastają do poziomów porównywalnych dla osób zdrowych.



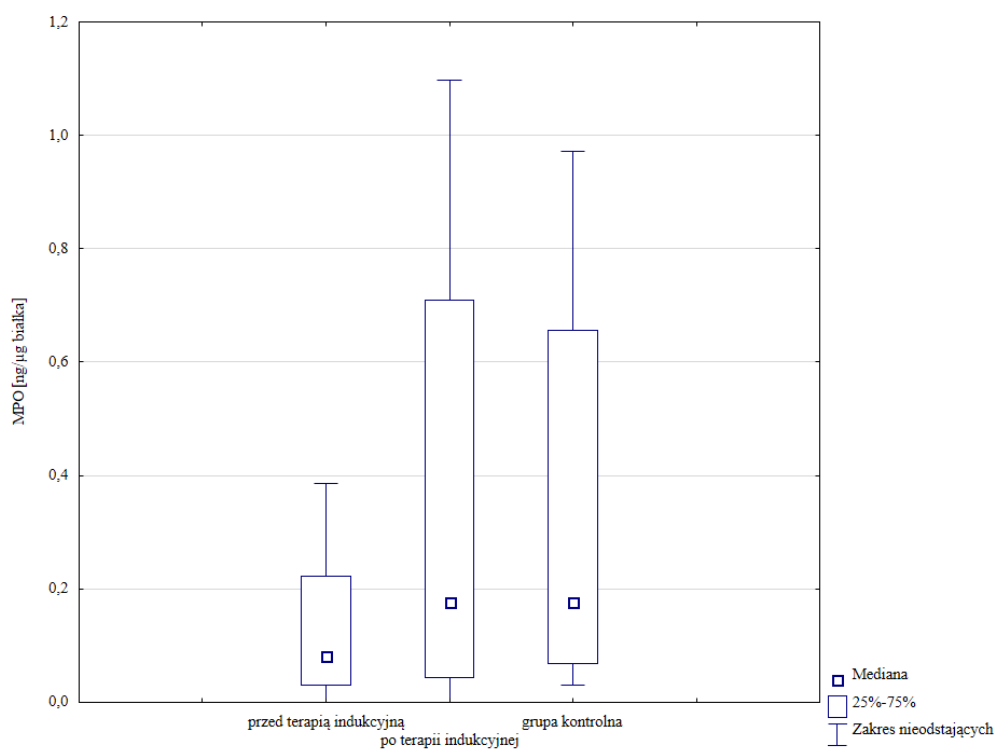
Rycina 7. Stężenie TNF-R1 w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.



Rycina 8. Stężenie IgA w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.



Rycina 9. Stężenie kalprotektyny w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.



Rycina 10. Stężenie mieloperoksydazy w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.

Tabela 40. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów bez odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne.

Parametr		przed fazą indukcyjną M [Q1-Q3]	po fazie indukcyjnej M [Q1-Q3]	p-value
TNF-R1 [pg/ml]	CD	234,0 [10,8-352,0]	454,6 [375,8-546,7]	0,139
	UC	150,5 [36,9-800,0]	439,5 [4,0-655,3]	0,866
	p-value	0,874	0,874	
IgA [µg/ml]	CD	45,1 [6,2-175,2]	124,3 [46,7-151,4]	0,314
	UC	59,8 [0,1-90,7]	3,0 [0,2-315,7]	0,917
	p-value	0,915	0,396	
kalprotektyna [ng/ml]	CD	759,7 [3,2-1626,8]	1824,0 [1,2-8031,3]	0,260
	UC	1214,2 [2,1-1875,7]	912,0 [0,4-7131,5]	0,735
	p-value	0,751	0,491	
PAI-1 [pg/ml]	CD	95,2 [31,6-119,2]	39,0 [0,0-116,4]	>0,999
	UC	61,4 [0,0-161,1]	66,7 [18,2-379,0]	0,176
	p-value	0,747	0,339	
MPO [ng/ml]	CD	57,2 [1,8-115,3]	123,2 [3,9-305,5]	0,678
	UC	23,9 [7,6-177,3]	8,1 [1,8-89,6]	0,499
	p-value	0,832	0,112	
CAT [nmol/min/ml]	CD	0,081 [0,061-0,092]	0,109 [0,089-0,294]	0,214
	UC	0,078 [0,064-0,304]	0,057 [0,050-0,231]	0,310
	p-value	0,596	0,204	
białko całkowite [µg/ml]	CD	181,5 [34,7-199,9]	296,7 [91,0-611,5]	0,594
	UC	817,0 [298,0-1050,0]	351,0 [81,9-922,0]	0,063
	p-value	0,015*	0,916	

*p-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a; ^p-value < 0,05 dla testu Wilcoxona

Natomiast wśród pacjentów, u których nie wykazano odpowiedzi klinicznej po fazie indukcyjnej leczenia biologicznego, nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniach wybranych markerów ślinowych pod wpływem terapii. Zaobserwowano jedynie u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego bez odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne znacznie podwyższone stężenia białka całkowitego w porównaniu do pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

Tabela 41. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów bez odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne.

Parametr		przed fazą indukcyjną M [Q1-Q3]	po fazie indukcyjnej M [Q1-Q3]	p-value
TNF-R1 [pg/µg białka]	CD	1,198 [0,369-2,675]	0,893 [0,317-3,163]	0,441
	UC	0,335 [0,045-0,762]	0,868 [0,021-6,310]	0,310
	p-value	0,266	0,751	

IgA [µg/µg białka]	CD	0,922 [0,004-1,098]	0,545 [0,043-1,143]	0,594
	UC	0,070 [0,000-0,216]	0,094 [0,001-0,342]	0,600
	<i>p</i> -value	0,288	0,153	
kalprotektyna [ng/µg białka]	CD	5,773 [0,024-9,313]	6,783 [0,025-19,446]	0,515
	UC	1,414 [0,003-4,468]	0,989 [0,003-12,348]	0,735
	<i>p</i> -value	0,204	0,341	
PAI-1 [pg/µg białka]	CD	0,213 [0,057-3,433]	0,090 [0,000-0,844]	0,674
	UC	0,038 [0,000-0,311]	0,411 [0,190-1,072]	0,091
	<i>p</i> -value	0,197	0,396	
MPO [ng/µg białka]	CD	0,315 [0,052-0,758]	0,155 [0,115-0,654]	0,859
	UC	0,089 [0,009-0,206]	0,034 [0,007-0,282]	0,866
	<i>p</i> -value	0,204	0,138	

**p*-value < 0,05 dla testu Manna-Whitney'a; ^*p*-value < 0,05 dla testu Wilcoxona

Podobnie po standaryzacji stężeń markerów względem zawartości białka całkowitego w ślinie nie zauważono istotnych różnic w ich poziomach przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów bez odpowiedzi klinicznej, niezależnie od postaci nieswoistej choroby zapalnej jelit.

4.5. Korelacje poziomów wybranych markerów ślinowych – wzajemne oraz ze stopniem zaawansowania choroby i poziomem CRP

Określono występowanie korelacji wyjściowych poziomów wybranych markerów ślinowych między sobą oraz ze stopniem zaawansowania choroby określonym w odpowiednich skalach i poziomem CRP (podstawowym parametrem surowicy krwi monitorującym przebieg i skuteczność terapii), które wyznaczono osobno dla pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, niezależnie od stwierdzonej odpowiedzi klinicznej na zastosowane leczenie biologiczne. Wyniki przeprowadzonych analiz wraz ze współczynnikami korelacji Spearmana przedstawiono w Tabelach 42-47.

Tabela 42. Współczynniki korelacji Spearmana dla korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych a stopniem aktywności choroby i poziomem CRP.

Parametr		aktywność choroby [skala CDAI lub Mayo]	CRP [mg/l]
TNF-R1 [pg/ml]	CD	-0,148	0,366
	UC	-0,111	0,132
IgA [µg/ml]	CD	-0,268	-0,037
	UC	0,133	0,052
kalprotektyna [ng/ml]	CD	0,099	0,336
	UC	-0,125	0,328

PAI-1 [pg/ml]	CD	0,226	-0,076
	UC	-0,141	-0,026
MPO [ng/ml]	CD	0,023	0,063
	UC	-0,175	0,084
CAT [nmol/min/ml]	CD	-0,031	0,206
	UC	-0,056	0,168
białko całkowite [µg/ml]	CD	-0,187	0,237
	UC	-0,057	-0,150

Tabela 43. Współczynniki korelacji Spearmana dla korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) a stopniem aktywności choroby i poziomem CRP.

Parametr		aktywność choroby [skala CDAI lub Mayo]	CRP [mg/l]
TNF-R1 [pg/µg białka]	CD	-0,070	0,320
	UC	-0,137	0,234
IgA [µg/µg białka]	CD	-0,181	0,016
	UC	0,221	0,046
kalprotektyna [ng/µg białka]	CD	0,166	0,316
	UC	-0,058	0,410*
PAI-1 [pg/µg białka]	CD	0,280	-0,233
	UC	-0,008	-0,099
MPO [ng/µg białka]	CD	0,148	0,008
	UC	-0,140	0,164

**p*-value < 0,05 dla testu istotności współczynnika korelacji Spearmana

Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy poziomami wybranych markerów ślinowych a stopniem aktywności choroby zarówno dla pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak i z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. W przypadku zależności z poziomem CRP w surowicy krwi zaobserwowano jedynie istotną pozytywną korelację o przeciętnej sile dla ślinowego stężenia kalprotektyny (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

Wśród pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna zauważono liczne istotne statystycznie korelacje pomiędzy poziomami wybranymi markerami ślinowymi. Najsilniejsze z nich stwierdzono pomiędzy stężeniami katalazy a TNF-R1, mieloperoksydazy a kalprotektyny oraz katalazy i mieloperoksydazy. Jedynie jedną istotną zależność wykazywał poziom PAI-1 względem kalprotektyny (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) – negatywną o przeciętnej sile.

Tabela 44. Współczynniki korelacji Spearmana dla wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

	IgA [µg/ml]	kalprotektyna [ng/ml]	PAI-1 [pg/ml]	MPO [ng/ml]	CAT [nmol/min/ml]	białko całkowite [µg/ml]
TNF-R1 [pg/ml]	0,485*	0,508*	0,026	0,470*	0,634*	0,400*
IgA [µg/ml]		0,317*	0,041	0,273*	0,443*	0,386*
kalprotektyna [ng/ml]			-0,237	0,599*	0,512*	0,574*
PAI-1 [pg/ml]				0,055	-0,062	-0,015
MPO [ng/ml]					0,576*	0,380*
CAT [nmol/min/ml]						0,325*

**p*-value < 0,05 dla testu istotności współczynnika korelacji Spearmana

Tabela 45. Współczynniki korelacji Spearmana dla wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

	IgA [µg/µg białka]	kalprotektyna [ng/µg białka]	PAI-1 [pg/µg białka]	MPO [ng/µg białka]
TNF-R1 [pg/µg białka]	0,498*	0,437*	-0,015	0,493*
IgA [µg/µg białka]		0,292*	-0,030	0,333*
kalprotektyna [ng/µg białka]			-0,363*	0,533*
PAI-1 [pg/µg białka]				0,143

**p*-value < 0,05 dla testu istotności współczynnika korelacji Spearmana

Tabela 46. Współczynniki korelacji Spearmana dla wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

	IgA [µg/ml]	kalprotektyna [ng/ml]	PAI-1 [pg/ml]	MPO [ng/ml]	CAT [nmol/min/ml]	białko całkowite [µg/ml]
TNF-R1 [pg/ml]	0,715*	0,740*	-0,370*	0,662*	0,701*	0,414*
IgA [µg/ml]		0,796*	-0,296*	0,715*	0,622*	0,499*
kalprotektyna [ng/ml]			-0,307*	0,769*	0,723*	0,491*
PAI-1 [pg/ml]				-0,194	-0,357*	-0,101
MPO [ng/ml]					0,839*	0,391*
CAT [nmol/min/ml]						0,359*

**p*-value < 0,05 dla testu istotności współczynnika korelacji Spearmana

Tabela 47. Współczynniki korelacji Spearmana dla wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

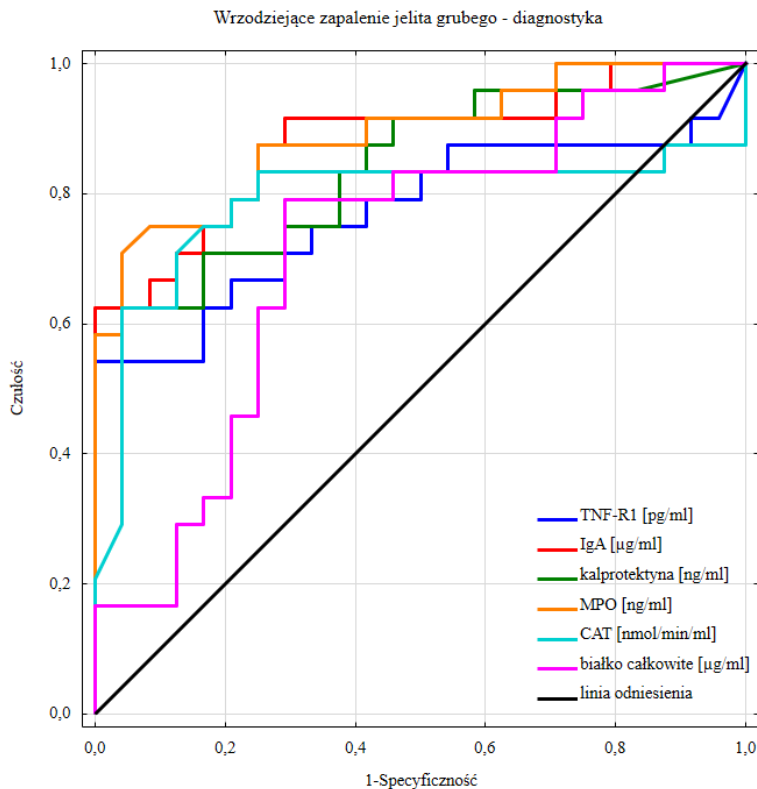
	IgA [µg/µg białka]	kalprotektyna [ng/µg białka]	PAI-1 [pg/µg białka]	MPO [ng/µg białka]
TNF-R1 [pg/µg białka]	0,602*	0,668*	-0,134	0,580*
IgA [µg/µg białka]		0,721*	-0,173	0,605*
kalprotektyna [ng/µg białka]			-0,213	0,689*
PAI-1 [pg/µg białka]				-0,007

**p*-value < 0,05 dla testu istotności współczynnika korelacji Spearmana

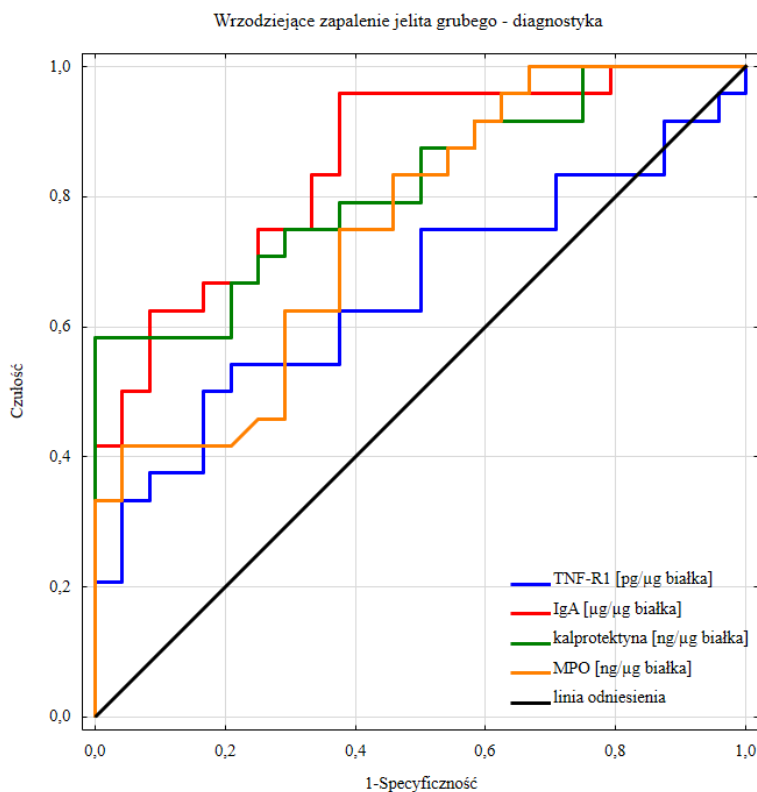
Podobnie stężenia markerów ślinowych u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego charakteryzowały się licznymi znaczącymi wzajemnymi zależnościami. Do najsilniejszych korelacji należały pomiędzy poziomami katalazy i mieloperoksydazy, kalprotektyny i immunoglobuliny A oraz mieloperoksydazy i kalprotektyny. Ponownie stężenia PAI-1 posiadały najmniej istotnych korelacji – tym razem wykazano cztery negatywne korelacje o przeciętnej sile ze stężeniami TNF-R1, IgA, kalprotektyny i mieloperoksydazy. Nie znalazły jednak potwierdzenia w korelacjach poziomów tych markerów w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego.

4.6. Analiza krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych pod kątem wartości predykcyjnej w diagnostyce i prognozowaniu odpowiedzi klinicznej na zastosowane leczenie biologiczne

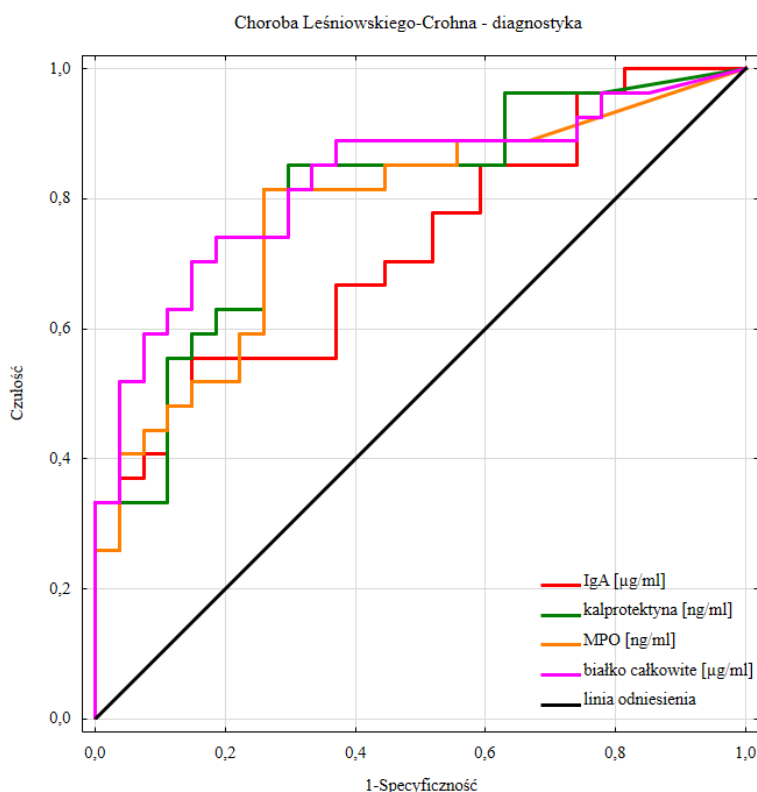
Krzywe ROC dla wybranych markerów ślinowych potencjalnie predykcyjnych w diagnostyce pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit kwalifikowanych do leczenia biologicznego przedstawiono na Rycinach 11-15, a szczegółowe parametry statystyczne tych krzywych w Tabelach 48-49. Analizy wykonano osobno dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz chorobą Leśniowskiego-Crohna ze względu na odmienne wyniki dotychczasowego porównywania poziomów markerów pomiędzy obiema postaciami choroby, jak również przeprowadzono próbę zróżnicowania tych postaci z wykorzystaniem ślinowych markerów.



Rycina 11. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w diagnostyce wrzodziejącego zapalenia jelita grubego – część 1.



Rycina 12. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w diagnostyce wrzodziejącego zapalenia jelita grubego – część 2.



Rycina 13. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w diagnostyce choroby Leśniowskiego-Crohna.

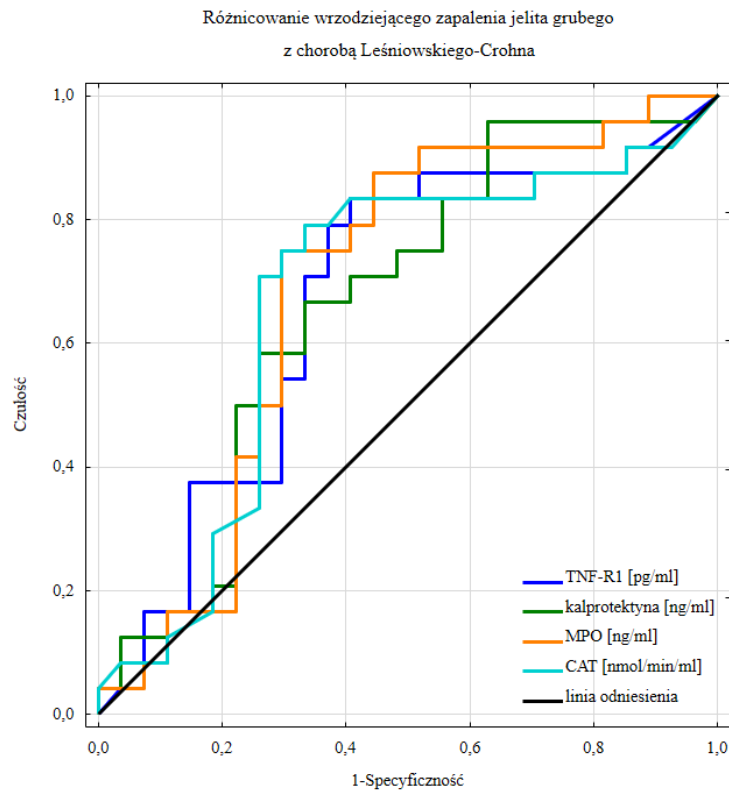
Tabela 48. Parametry krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w diagnostyce pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.

marker	choroba	rodzaj wpływu	AUC	SE	p-value	optimalny punkt odcięcia
TNF-R1 [pg/ml]	UC	destymulanta	0,771	0,072	<0,001*	50,6
IgA [µg/ml]	CD	destymulanta	0,724	0,069	0,001*	66,6
	UC	destymulanta	0,880	0,050	<0,001*	16,3
kalprotektyna [ng/ml]	CD	destymulanta	0,798	0,061	<0,001*	4000,4
	UC	destymulanta	0,842	0,057	<0,001*	3,9
MPO [ng/ml]	CD	destymulanta	0,778	0,064	<0,001*	115,3
	UC	destymulanta	0,890	0,047	<0,001*	16,7
CAT [nmol/min/ml]	UC	destymulanta	0,787	0,076	<0,001*	0,070
białko całkowite [µg/ml]	CD	destymulanta	0,827	0,058	<0,001*	366,0
	UC	destymulanta	0,715	0,076	0,005*	419,9
TNF-R1 [pg/µg białka]	UC	destymulanta	0,655	0,081	0,056	0,180
IgA [µg/µg białka]	UC	destymulanta	0,851	0,054	<0,001*	0,380
kalprotektyna [ng/µg białka]	UC	destymulanta	0,816	0,061	<0,001*	0,050
MPO [ng/µg białka]	UC	destymulanta	0,753	0,069	<0,001*	0,030

*p-value < 0,05 dla testu porównującego krzywą ROC danego predyktora z linią odniesienia

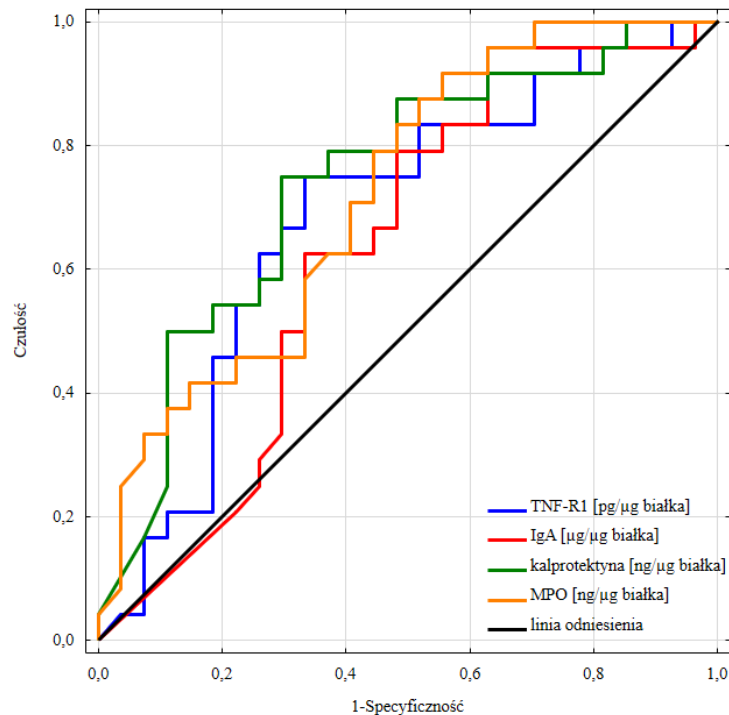
W przypadku diagnostycznego klasyfikowania pacjentów zakwalifikowanych do leczenia biologicznego i tym samym nieodpowiadających na żadną ze standardowych terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit wszystkie markery ślinowe, które wykazały potencjalnie istotną wartość predykcyjną, miały charakter destymulant, czyli im niższe stężenia, tym większe prawdopodobieństwo znalezienia się w tej grupie. Dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wśród trzech najbardziej obiecujących markerów charakteryzujących się najwyższymi wartościami AUC należy wymienić mieloperoksydazę, IgA oraz kalprotektynę. Trzeba zaznaczyć, że ta wartość diagnostyczna została również potwierdzona w przypadku analizy stężeń tych markerów w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego. Natomiast wśród pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna największy potencjał diagnostyczny zaobserwowano dla białka całkowitego, mieloperoksydazy, kalprotektyny i immunoglobuliny A.

Na poniższych wykresach oraz w tabeli przedstawiono efekty próby różnicowania wrzodziejącego zapalenia jelita grubego z chorobą Leśniowskiego-Crohna na podstawie zmian w poziomach wybranych markerów stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów.



Rycina 14. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w różnicowaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego od choroby Leśniowskiego-Crohna – część 1.

Różnicowanie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego
z chorobą Leśniowskiego-Crohna

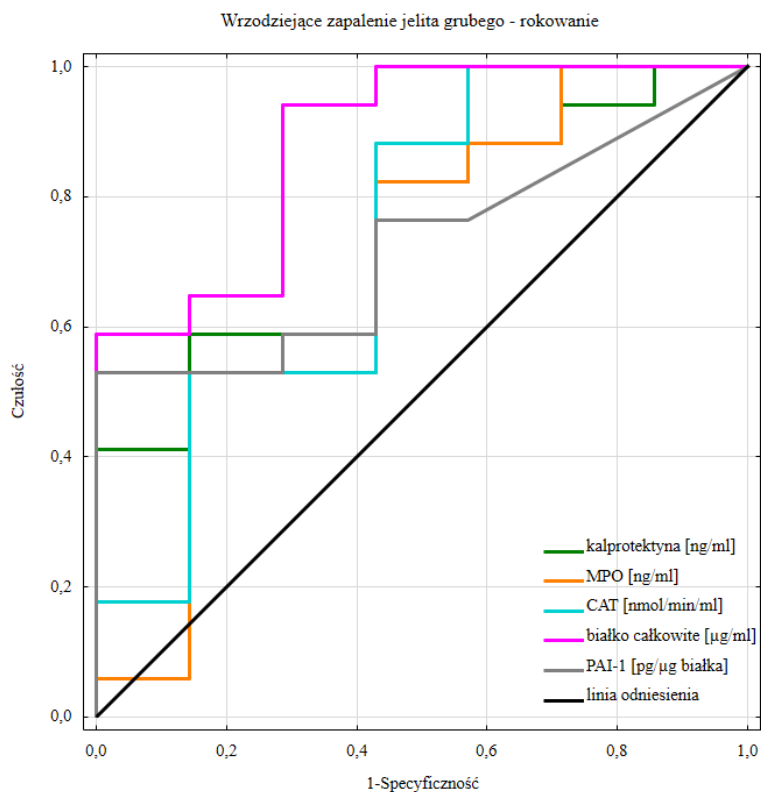


Rycina 15. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w różnicowaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego od choroby Leśniowskiego-Crohna – część 2.

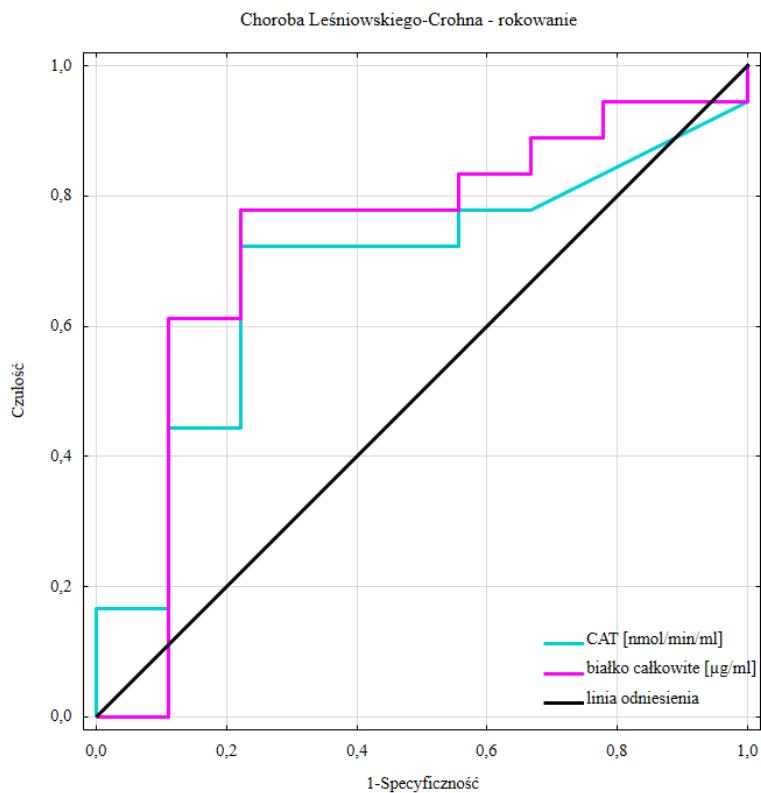
Tabela 49. Parametry krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w różnicowaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego od choroby Leśniowskiego-Crohna.

marker	rodzaj wpływu	AUC	SE	p-value	optymalny punkt odcięcia
TNF-R1 [pg/ml]	destymulanta	0,672	0,078	0,028*	219,6
kalprotektyna [ng/ml]	destymulanta	0,667	0,077	0,030*	752,9
MPO [ng/ml]	destymulanta	0,690	0,077	0,014*	23,9
CAT [nmol/min/ml]	destymulanta	0,671	0,080	0,033*	0,080
TNF-R1 [pg/ug bialka]	destymulanta	0,686	0,076	0,015*	0,400
IgA [ug/ug bialka]	destymulanta	0,633	0,080	0,095	0,380
kalprotektyna [ng/ug bialka]	destymulanta	0,741	0,070	<0,001*	2,070
MPO [ng/ug bialka]	destymulanta	0,720	0,071	0,002*	0,210

Z kolei krzywe ROC dla markerów ślinowych o potencjalnej wartości predykcyjnej dla rokowania przebiegu leczenia biologicznego tych pacjentów zaprezentowano na Rycinach 16 i 17 (analogicznie do wcześniejszych z podziałem na postać choroby), a specyficzne cechy tych krzywych w Tabeli 50.



Rycina 16. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w prognozowaniu rokowania terapii indukcyjnej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.



Rycina 17. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w prognozowaniu rokowania terapii indukcyjnej u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

Tabela 50. Parametry krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w prognozowaniu rokowania pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zakwalifikowanych do leczenia biologicznego.

marker	choroba	rodzaj wpływu	AUC	SE	p-value	optymalny punkt odcięcia
kalprotektyna [ng/ml]	UC	destymulanta	0,748	0,105	0,018*	1,5
MPO [ng/ml]	UC	destymulanta	0,689	0,132	0,153	16,7
CAT [nmol/min/ml]	CD	stymulanta	0,682	0,108	0,092	0,100
	UC	destymulanta	0,731	0,125	0,065	0,070
białko całkowite [µg/ml]	CD	stymulanta	0,728	0,113	0,043*	208,2
	UC	destymulanta	0,882	0,076	<0,001*	393,0
PAI-1 [pg/µg białka]	UC	stymulanta	0,723	0,104	0,032*	0,390

*p-value < 0,05 dla testu porównującego krzywą ROC danego predyktora z linią odniesienia

W celu prognozowania wystąpienia odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego można potencjalnie wykorzystać ślinowe stężenia białka całkowitego i kalprotektyny (jako destymulanty), jak również PAI-1 w przeliczeniu na mikrogram białka (jako stymulantę), które wykazały istotność statystyczną. Blisko ustalonego poziomu istotności znalazły się również mieloperoksydaza i katalaza. Natomiast dla pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna istotny predyktor rokowniczy stanowiło jedynie białko całkowite w ślinie, a katalazie niewiele zabrakło do osiągnięcia poziomu istotności.

4.7. Budowa modelu regresji logistycznej w celu wyjaśnienia występowania odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne w oparciu o poziomy wybranych markerów ślinowych

Po wstępnej ocenie jednoczynnikowej poziomów wybranych markerów ślinowych podjęto decyzję o próbie skonstruowania modelu regresji logistycznej wyjaśniającego odpowiedź kliniczną pacjentów jedynie dla podgrupy z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. W podgrupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna żaden z parametrów ślinowych nie uzyskał wystarczającej istotności statystycznej.

Wśród analizowanych predyktorów znalazły się poziomy takich markerów ślinowych jak TNF-R1, kalprotektyna, mieloperoksydaza, katalaza i białko całkowite. Stosując metodę krokową postępującą, nie uzyskano wieloczynnikowego modelu regresji logistycznej, a jedynie jednoczynnikowy model zawierający stężenie białka całkowitego. Szczegółowe parametry tego modelu zawarto w Tabeli 51. Włączone do modelu białko

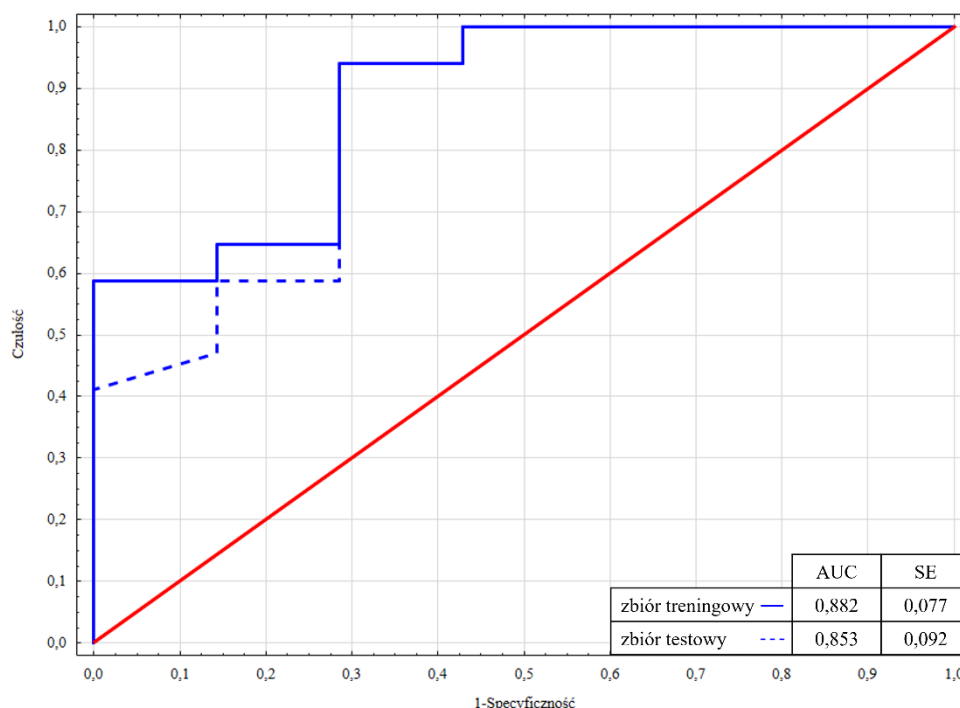
całkowite jako jedyne wykazywało istotne różnice w wyjściowych poziomach w ślinie pomiędzy pacjentami z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego z odpowiedzią kliniczną i bez niej.

Tabela 51. Parametry predyktorów włączonych do modelu regresji logistycznej.

	β	SE	test Walda	<i>p</i> -value	Odds Ratio	OR -95%	OR 95%
wyraz wolny	3,908	1,468	7,088	0,008*	49,807	2,804	884,820
białko całkowite [μg/ml]	-0,008	0,004	4,385	0,036*	0,992	0,985	0,999

Wzrost ślinowego stężenia białka całkowitego (będącego predyktorem interwałowym) o jedną jednostkę (μg/ml) teoretycznie powoduje spadek szansy na uzyskanie odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne przez pacjenta z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego o 0,8%.

Wybrany model regresji logistycznej uzyskał wysoką dobroć dopasowania do wyjaśnianego zjawiska, potwierdzoną wysokimi wartościami AUC w V-krotnej ocenie krzyżowej (Rycina 18), jak również brakiem odrzucenia hipotezy zerowej testu Hosmera-Lemeshowa (*p*-value=0,674).



Rycina 18. V-krotna walidacja krzyżowa – porównanie krzywych ROC dla skonstruowanego modelu regresji logistycznej.

4.8. Podsumowanie wyników

Nie można jednoznacznie określić związku pomiędzy odpowiedzią kliniczną na leczenie biologiczne a stężeniami wybranych mediatorów stanu zapalnego i wykładników stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Na skutek terapii indukcyjnej jedynie u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego stwierdzono istotny wzrost stężeń markerów oznaczonych w ślinie (TNF-R1, IgA, kalprotektyny, mieloperoksydazy i katalazy) do poziomów porównywalnych dla grupy kontrolnej. W przypadku pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak również pacjentów z brakiem odpowiedzi klinicznej znaczące zmiany w poziomach oznaczanych markerów ślinowych nie występowały.

Przed fazą indukcyjną leczenia biologicznego pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wykazywali znacznie niższe stężenia wybranych markerów ślinowych takich jak TNF-R1, kalprotektyna, mieloperoksydaza oraz katalaza, w porównaniu do pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Natomiast po fazie indukcyjnej nie obserwowano już istotnych różnic pomiędzy poziomami tych markerów w podgrupach z obiema postaciami nieswoistych chorób zapalnych jelit, co można wiązać z silniejszą immunosupresją farmakologiczną w pierwszej podgrupie pacjentów.

Nie określono związku pomiędzy stopniem zaawansowania choroby a stężeniami wybranych mediatorów stanu zapalnego i wykładników stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Jedynie u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wystąpiła pozytywna korelacja o przeciętnej sile pomiędzy poziomem ślinowej kalprotektyny (przeliczonym na mikrogram białka całkowitego) a stężeniem CRP w surowicy krwi.

W kwestii prognozowania rokowania przebiegu leczenia biologicznego pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit trudno wskazać uniwersalny ślinowy marker o potencjalnie wysokiej predykcji. Szczególnie u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego takim ewentualnym markerem wydaje się być białko całkowite. Z kolei w przypadku klasyfikowania diagnostycznego pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit dobrą moc predykcyjną posiadało kilka ślinowych markerów. Szczególną uwagę zwracała mieloperoksydaza, która uzyskała wysokie wartości predykcji zarówno dla pacjentów z wrzodziejącym

zapaleniem jelita grubego, jak i z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz w diagnostyce różnicowej tych dwóch postaci choroby.

Pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zakwalifikowani do leczenia biologicznego charakteryzowali się dobrym stanem uzębienia i przyzębia, jak również dobrym poziomem higieny jamy ustnej powiązany z deklarowanymi poprawnymi nawykami. Ponadto, żaden z pacjentów nie prezentował obecności swoistych zmian na błonie śluzowej jamy ustnej. Co najwyżej obserwowano nieswoiste zmiany takie jak nadżerki aftowe, nieznacznie częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, zwłaszcza z ciężkim przebiegiem choroby.

5. Dyskusja

Przeprowadzone badanie wskazało na potencjalne występowanie związku pomiędzy ślinowymi poziomami wybranych markerów stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego a odpowiedzią na fazę indukcyjną leczenia biologicznego u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zależnie od zdiagnozowanej postaci choroby. Najwięcej zależności obserwowano dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, szczególnie z wykazaną odpowiedzią kliniczną na terapię indukcyjną. Natomiast wśród pacjentów, u których nie określono odpowiedzi na wdrożone leczenie, nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniach wybranych markerów, bez względu na postać choroby.

Markery stanu oksydacyjnego

W badaniu oceniono nie tyle bezpośrednio poziom stresu oksydacyjnego, co stężenia ślinowych enzymów antyoksydacyjnych. Dotychczasowe dane literaturowe, które zostaną przytoczone poniżej, dotyczyły głównie parametrów stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Wyniki własne wykazały jedynie istotnie obniżone stężenia mieloperoksydazy w tej podgrupie pacjentów względem grupy kontrolnej, zarówno przed, jak i po terapii indukcyjnej leczenia biologicznego. Natomiast u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oba badane markery – katalaza i mieloperoksydaza – posiadały znacznie niższe poziomy względem pierwszej podgrupy pacjentów oraz sparowanych osób zdrowych. Na skutek stosowania leków biologicznych doszło do znaczących kompensacyjnych wzrostów tych enzymów o działaniu antyoksydacyjnym. Ponadto początkowe stężenia obu antyoksydantów w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego silnie korelowały pomiędzy sobą.

Co więcej, mieloperoksydazę cechowała potencjalnie wysoka wartość predykcyjna w odniesieniu do różnicowania pacjentów z obiema postaciami nieswoistych chorób zapalnych jelit z osobami zdrowymi, jak również tych pacjentów między sobą. Ta ostatnia zdolność do zróżnicowania obu postaci wydaje się szczególnie interesująca, zwłaszcza podczas trudności postawienia jednoznacznego rozpoznania w praktyce klinicznej. W przypadku prognozowania przebiegu leczenia i tym samym wystąpienia odpowiedzi klinicznej katalaza zdawała się posiadać większy potencjał predykcji dla pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i z wrzodziejącym zapaleniem jelita

grubego, aczkolwiek wyniki znalazły się tuż powyżej przyjętego poziomu istotności statystycznej.

Jahanshahi i wsp. [72] jako pierwsi oceniali parametry stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna stwierdzono istotnie obniżoną zdolność antyoksydacyjną (w oparciu o antyoksydacyjną zdolność do redukcji jonów żelaza – FRAP) oraz podwyższone poziomy dialdehydu malonowego (MDA), produktu peroksydacji lipidów. W przeciwieństwie do tej grupy pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego nie wykazywali podobnych zmian. Autorzy tłumaczyli taką zależność faktem, że w przypadku drugiej postaci choroby błona śluzowa jamy ustnej oraz ślinianki nie są objęte przewlekłym stanem zapalnym. Dodatkowo, oznaczono istotny wzrost stężenia tlenu azotu (II) zarówno w ślinie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu do grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki mogą sugerować związek pomiędzy zwiększoną produkcją NO a uszkodzeniami nabłonka błony śluzowej przewodu pokarmowego.

Podobne badania przeprowadzili Rezaie i wsp. [75,76], jednakże z uwzględnieniem stopnia aktywności choroby – dla choroby Leśniowskiego-Crohna określili ślinowe poziomy antyoksydantów i tlenu azotu (II), a dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego tylko ten drugi parametr. W przypadku markerów stresu oksydacyjnego stwierdzono znacznie obniżone poziomy FRAP, kwasu moczowego oraz albumin, jak i w mniejszym stopniu transferryny i grup tiolowych. Ponadto, stężenia dialdehydu malonowego i NO wzrosły odpowiednio pięć- i czterokrotnie względem osób zdrowych. Aktywność choroby w skali CDAI silnie pozytywnie korelowała z interakcją pomiędzy MDA i FRAP. Ciekawe zależności uzyskano właśnie pomiędzy aktywnością kliniczną a całkowitą zdolnością antyoksydacyjną śliny. Pacjenci z normalnym lub niskim statusem antyoksydacyjnym charakteryzowali się najniższymi lub najwyższymi wartościami w skali CDAI. Natomiast pacjenci z umiarkowanym przebiegiem prezentowali wysokie FRAP i MDA, co autorzy tłumaczyli zwiększoną obroną organizmu przed nadmierną produkcją wolnych rodników. Z kolei, u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego obserwowano blisko czterokrotne podwyższenie poziomu NO w ślinie, jednakże niezależnie od stopnia aktywności choroby. W związku z powyższym autorzy sugerowali, że stres oksydacyjny może

odgrywać rolę w etiopatogenezie nieswoistych chorób zapalnych jelit, zwłaszcza choroby Leśniowskiego-Crohna.

W innym badaniu, Szczeklik i wsp. [80] oceniali użyteczność diagnostyczną wybranych markerów stresu oksydacyjnego w ślinie i surowicy krwi pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna z podziałem na postać aktywną i nieaktywną choroby. W standardowym badaniu krwi obniżone stężenie hemoglobiny oraz podwyższone poziomy płytek krwi i CRP charakteryzowały osoby z aktywnym przebiegiem choroby. Obserwowano istotny wzrost stężenia MDA w ślinie i w surowicy (wyższy w przypadku śliny), jak również spadek zredukowanej formy glutationu. Podobnie zauważono znacznie zredukowaną aktywność katalazy, co było zgodne z wcześniej przypuszczaną przez autorów tendencją dla dysmutazy ponadtlenkowej [162]. Z kolei, stwierdzono silną pozytywną korelację pomiędzy stężeniami MDA (niezależnie od rodzaju pobranego materiału diagnostycznego) a aktywnością kliniczną choroby określaną w skali CDAI. Miało to odzwierciedlenie w istotnych korelacjach poziomów MDA z CRP i płytek krwi (obie pozytywne) oraz hemoglobiny (negatywna). Również w przypadku ślinowych poziomów FRAP i GSH odnotowano obecność dodatniej korelacji z uzyskanymi na podstawie badania klinicznego wartościami CDAI. Przedstawione powyżej zależności pomiędzy podwyższonymi stężeniami MDA w ślinie a zaostrzeniem objawów klinicznych choroby mogą sugerować jego przydatność przy wczesnej diagnostyce. W celu potwierdzenia wartości diagnostycznej wybranych markerów autorzy przeprowadzili analizę krzywych ROC. Jej wyniki pokazały wyższą użyteczność poziomów MDA w porównaniu do CRP, uznawanego za jeden z lepszych markerów do monitorowania przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna, w różnicowaniu postaci aktywnej choroby od nieaktywnej (ocenianej na podstawie wartości CDAI). W związku z tym zaproponowano, że ślinowe markery (jak przykładowo dialdehyd malonowy) mogą być stosowane do oceny stresu oksydacyjnego u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, niezależnie od przebiegu choroby.

Janšáková i wsp. [163] poddali analizie ślinowe markery stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Stwierdzono istotnie obniżone wydzielanie śliny w porównaniu do grupy kontrolnej. W pobranej ślinie spoczynkowej pacjentów zaobserwowano istotne zmiany w stężeniach badanych parametrów – wzrost poziomu IgA oraz spadek laktoferryiny. W przypadku mieloperoksydazy nie określono różnic pomiędzy grupami. Poziomy markerów stresu

oksydacyjnego, takich jak produkty zaawansowanego utleniania białek oraz produkty końcowe zaawansowanej glikacji, były znacznie podwyższone u pacjentów z chorobą Leśniowskiego Crohna. Natomiast FRAP uległo znaczącemu obniżeniu względem osób zdrowych.

Markery stanu zapalnego

W przypadku zmian stężenia mediatorów stanu zapalnego, odzwierciedlały one głównie stopień immunosupresji badanych pacjentów, a nie tylko aktywność procesów zapalnych w przebiegu danej choroby. Jak wspomniano przy charakterystyce grupy badanej pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego częściej mieli wdrożoną skojarzoną terapię immunosupresyjną, co niewątpliwie rzutuje na uzyskane wyniki. W przypadku wszystkich określanych markerów ich poziomy wzrastały podczas wdrożenia leków biologicznych. Drugim czynnikiem sugerującym potwierdzenie takiego wyjaśnienia jest fakt stosunkowo rzadkiego występowania u pacjentów jakichkolwiek zmian na błonie śluzowej jamy ustnej, co nie wpływało na podwyższenie miejscowej produkcji mediatorów zapalenia w ślinie. Należy też podkreślić, że ze względu na znaczące obniżenie poziomu białka całkowitego w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit w porównaniu do grupy kontrolnej stężenia wszystkich oznaczonych białek dodatkowo standaryzowano względem tego poziomu. Co więcej, obniżone początkowe stężenie białka całkowitego w ślinie wykazywało związek z podwyższoną szansą na odpowiedź kliniczną u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego zakwalifikowanych do leczenia biologicznego.

W związku z powyższym omawiane wyniki z piśmiennictwa będą prezentowały zupełnie odmienne zależności i tendencje w kwestii ślinowych markerów stanu zapalnego. Przywoływane poniżej prace odnoszą się do zmian profilu cytokin prozapalnych w ślinie w kontekście oceny aktywności przebiegu choroby bez konieczności uwzględnienia wpływu silnej immunosupresji typowej dla pacjentów kwalifikowanych do leczenia biologicznego, zwłaszcza ze zdiagnozowanym wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Ponadto w badaniu własnym nie stwierdzono istotnych korelacji wybranych markerów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego z aktywnością choroby ocenianą w dniu pobierania próbek śliny. Niekiedy pacjenci posiadali zaostrzenia choroby podczas kwalifikacji, a w dniu włączenia do badania cechowali się złagodzonymi objawami klinicznymi. Warto też zaznaczyć,

że wykorzystane skale posiadają komponenty subiektywne, które znacząco mogą wpływać na sumaryczną ocenę punktową i odpowiadający jej stopień zaawansowania choroby, w szczególności w przypadku skali CDAI.

Nielsen i wsp. [74] jako pierwsi ocenili poziomy wybranej cytokiny prozapalnej w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Zaobserwowali istotnie podwyższone stężenia ślinowej interleukiny 6 u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. W surowicy krwi wzrost poziomu IL-6 stwierdzono w obu postaciach choroby. Natomiast w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego stężenia IL-6 silnie korelowały z jej poziomami we krwi oraz aktywnością choroby określonej w skali Seo. W żadnej z grup nie wykazano korelacji zmian ślinowego markera ze stężeniami CRP. Autorzy sugerowali potencjalną wartość prognostyczną ślinowej IL-6 w nieinwazyjnym monitorowaniu pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.

Inni badacze, Szczeklik i wsp. [79] podjęli próbę określenia związku między poziomami trzech wybranych cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6 i TNF- α) a aktywnością choroby Leśniowskiego-Crohna i występowaniem zmian na błonie śluzowej jamy ustnej w tej grupie. Pacjenci z aktywnym przebiegiem choroby charakteryzowali się istotnie niższymi wartościami BMI. Ponadto w badaniu morfologicznym krwi zaobserwowano obniżone poziomy erytrocytów i hemoglobiny oraz podwyższone płytek krwi i CRP. Wydzielanie śliny nie różniło się pomiędzy badanymi grupami. W ślinie stwierdzono istotne podwyższenie oznaczanych cytokin prozapalnych u pacjentów z aktywną chorobą. Wyższe poziomy dwóch z nich, IL-6 oraz TNF- α , korelowały z występowaniem specyficznych zmian na błonie śluzowej jamy ustnej. Brak korelacji dla IL-1 β autorzy tłumaczyli możliwym działaniem antagonistycznym stosowanych leków. Zaburzona produkcja cytokin znajduje odzwierciedlenie w poziomach cytokin prozapalnych w ślinie.

Said i wsp. [77] badali związek pomiędzy dysbiozą w jamie ustnej a zmianami w wybranych parametrach biochemicznych śliny u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Stwierdzono istotnie wyższe stężenia IL-1 β , IgA i LL37 (katelicydyny) niezależnie od postaci choroby. Dodatkowo w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego obserwowano istotne podwyższenie poziomów IL-6, IL-8 i MCP-1, a z chorobą Leśniowskiego-Crohna TNF- α . Z kolei poziomy ślinowego lizozymu uległy znacznemu obniżeniu. Zmiany w profilu cytokin zapalnych silnie

korelowały z obecnością w jamie ustnej rodzajów bakterii takich jak *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* i *Haemophilus*.

W badaniu własnym oznaczono zamiast TNF- α jeden z receptorów dla tego czynnika – TNF-R1. Przed rozpoczęciem terapii indukcyjnej pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wykazali istotne obniżenie stężenia TNF-R1 w ślinie, które uległo znacznemu wzrostowi pod wpływem skutecznego włączenia leczenia biologicznego. Z kolei u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, którzy odpowiedzieli na zastosowane leczenie biologiczne, ślinowy poziom TNF-R1 znacząco spadł do poziomu istotnie niższego od grupy kontrolnej. Na podstawie stężeń w ślinie wybrany receptor TNF-R1 posiadał też potencjalną zdolność do klasyfikowania pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego zarówno względem osób zdrowych, jak i pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

Owczarek i wsp. [166] wskazywali, że receptory dla TNF- α jako markery stanu zapalnego w surowicy krwi charakteryzowały się większą czułością w ocenie aktywności klinicznej choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Poziomy receptorów wykazywały pozytywne korelacje ze wskaźnikami aktywności choroby, szczególnie wysoką TNF-R1 w przypadku pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Podobne rezultaty osiągnęli Spoettl i wsp. [167], którzy zaobserwowali istotnie wyższe stężenia TNF-R1 w obu postaciach choroby w porównaniu do osób zdrowych. Tym samym sugerowali, że TNF-R1 może stanowić marker aktywności choroby, a TNF-R2, istotniej podwyższony w surowicy pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, dodatkowy parametr dyskryminujący obie postaci nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Poziomy immunoglobuliny A w ślinie pacjentów zakwalifikowanych do leczenia biologicznego stwierdzono istotnie niższe tylko w podgrupie z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed terapią indukcyjną względem grupy kontrolnej. Podgrupa tych pacjentów charakteryzowała się częstszą podwójną immunosupresją farmakologiczną przed rozpoczęciem fazy indukcyjnej leczenia biologicznego. Zależność tę obserwowano jedynie w podgrupie pacjentów, u których wykazano odpowiedź kliniczną; u pacjentów bez odpowiedzi nie występowały znaczące różnice. Na skutek wprowadzonego leczenia biologicznego stężenia te wzrosły

do porównywalnych do osób zdrowych. Różnice w poziomach IgA zostały potwierdzone również po przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego.

Warner i wsp. [164] zaobserwowali zwiększone wydzielanie sekrecyjnej IgA u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit w porównaniu do pacjentów z celiakią oraz osób zdrowych. Natomiast Savage i wsp. [165] postulowali, że podwyższone poziomy IgA w surowicy krwi związane są ze stanami zapalnymi w obrębie błony śluzowej całego przewodu pokarmowego, a w ślinie głównie jamy ustnej. Takie wnioski znalazły odzwierciedlenie w wynikach uzyskanych przez tych badaczy. Wyższe stężenia ślinowej IgA stwierdzono w grupach pacjentów z izolowaną ziarniniakowatością ustno-twarzową, jak i towarzyszącą chorobie Leśniowskiego-Crohna z manifestacjami jelitowymi, ale nie u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna bez manifestacji w postaci zmian na błonie śluzowej jamy ustnej.

Kolejny oznaczany w ślinie parametr stanu zapalnego stanowiła kalprotektyna. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych markerów wyjściowe stężenia w grupie badanej były znacznie obniżone w porównaniu do grupy kontrolnej na skutek wzmożonej immunosupresji farmakologicznej. Zmiany dotyczyły zarówno pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak i z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, z czego w drugiej podgrupie poziom kalprotektyny był istotnie niższy niż w pierwszej. Na skutek terapii indukcyjnej leczenia biologicznego stężenia wzrastały do wartości nieróżniących się znacznie od osób zdrowych. W przypadku pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego poziom kalprotektyny (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) jako jedyny wykazał istotną pozytywną korelację z poziomem CRP w surowicy krwi. Dodatkowo ślinowa kalprotektyna posiadała dobrą wartość predykcyjną do różnicowania pacjentów z obiema postaciami nieswoistych chorób zapalnych jelit kwalifikowanych do leczenia biologicznego z osobami zdrowymi oraz między sobą, jak również do klasyfikowania pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego pod kątem przewidywania satysfakcjonującej odpowiedzi klinicznej po terapii indukcyjnej. Ogólnie oznaczone poziomy kalprotektyny w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit były znacznie niższych rzędów od poziomów w innych pracach z piśmiennictwa.

W nowszych badaniach Majster i wsp. [73] porównywali poziomy kalprotektyny w ślinie spoczynkowej i stymulowanej pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi

jelit przed i po zastosowanej terapii. Ogólnie znacznie wyższe stężenia kalprotektyny zaobserwowano w ślinie stymulowanej w porównaniu do niestymulowanej, niezależnie od płci pacjenta i okresu powstrzymywania się od spożywania posiłków. Porównując z grupą kontrolną, istotne podwyższenie poziomu kalprotektyny stwierdzono w ślinie spoczynkowej i stymulowanej pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz jedynie w ślinie stymulowanej pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Co więcej, w pierwszej grupie pacjentów zauważono tendencję do wyższych stężeń kalprotektyny w ślinie stymulowanej względem drugiej grupy. Bez względu na sposób pobierania śliny, nie określono istotnych różnic w poziomach kalprotektyny na skutek wprowadzonego leczenia trwającego 10-12 tygodni. Dla odmiany w przypadku surowicy krwi obserwowano ponad trzykrotny spadek stężenia kalprotektyny na wizycie kontrolnej. Ponadto, autorzy zasugerowali, że oznaczanie ślinowej kalprotektyny może pozwolić na różnicowanie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit z osobami zdrowymi. W ich badaniu na podstawie porównania krzywych ROC wyższą zdolność predykcyjną wykazywała ślina spoczynkowa. Wśród ograniczeń należy podkreślić brak przeprowadzonego badania klinicznego jamy ustnej, jak również nieuwzględnianie wystandaryzowanych wskaźników aktywności choroby podstawowej.

Warto podkreślić, że poziomy kalprotektyny w kale pacjentów, podobnie jak CRP w surowicy krwi obecnie uważa się za najbardziej wiarygodne markery diagnostyczne w monitorowaniu procesów gojenia się błony śluzowej przewodu pokarmowego w przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit [168]. Ponadto powszechnie znajdują zastosowanie w kontrolowaniu efektywności leczenia biologicznego w tej grupie pacjentów [169].

Majster i wsp. [170] w kolejnym badaniu określili profil cytokin zapalnych zarówno w ślinie, jak i surowicy krwi, poszukując związku z aktywnością choroby oraz wpływu prowadzonej terapii. Poddano analizie panel dziewięćdziesięciu dwóch białek, z czego 80 zostało wykrytych w surowicy, 72 w ślinie spoczynkowej i 69 w ślinie stymulowanej. W surowicy krwi 21 białek miało znacznie podwyższone poziomy, a 4 białka obniżone u pacjentów z aktywną postacią choroby. Z kolei w ślinie stymulowanej jedynie stężenia dwóch białek – IL-6 oraz MMP-10 – uległy istotnemu wzrostowi, podczas gdy dla śliny spoczynkowej nie stwierdzono istotnych zmian dla żadnego z wykrytych białek. W analizie krzywych ROC oba białka (IL-6 i MMP-10) prezentowały wysokie wartości AUC, pozwalające sugerować dobrą jakość predykcyjną

tych ślinowych markerów w odróżnianiu pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit od osób zdrowych. Korelację z endoskopowym wskaźnikiem aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna wykazywała jedynie MMP-10, natomiast IL-6 nie korelowało z żadnym z klinicznych parametrów aktywności choroby. Badacze u 15 pacjentów ocenili poziomy wykrytych białek również po 10-12 tygodniach zastosowanego leczenia (u większości pacjentów stosowano glikokortykosteroidy – jako monoterapię lub terapię skojarzoną – a jedynie u trzech inhibitory TNF- α). Mimo istotnego obniżenia klinicznych parametrów aktywności choroby oraz stężenia CRP, nie obserwowano znaczących zmian w poziomach albumin, leukocytów ani kalprotektyny w kale. Co więcej, na skutek przeprowadzonej terapii żadne z badanych białek prozapalnych nie uzyskało istotnych różnic w swoich stężeniach zarówno w ślinie, jak i w surowicy krwi. Dla IL-6 wykryto jedynie obecność korelacji pomiędzy zmianami w ekspresji dla wszystkich trzech pobranych materiałów biologicznych.

W przypadku badanej grupy pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zakwalifikowanymi do leczenia biologicznego PAI-1 jako jedyny z wybranych markerów wykazał tylko istotny wzrost w ślinie na skutek terapii indukcyjnej w podgrupie z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego bez podziału na osoby z odpowiedzią kliniczną i bez niej, jednakże stężenia te nie różniły się od osób zdrowych z grupy kontrolnej. Początkowo obniżony poziom PAI-1 prawdopodobnie miał związek z zastosowaną u tych pacjentów immunosupresją farmakologiczną. W badaniu własnym nie stwierdzono więcej znaczących zależności dla tego markera. Podczas poszukiwania potencjalnych predyktorów rokowniczych dla przewidywania odpowiedzi klinicznej po terapii indukcyjnej PAI-1 jako stymulanta cechował się dobrą wartością predykcyjną dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

Koutroubakis i wsp. [171] zasugerowali występowanie zaburzonej równowagi w procesach fibrynolizy u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi. Swoje wnioski oparli na podstawie istotnie zwiększonych stężeń PAI-1 w surowicy krwi pacjentów zarówno z chorobą Leśniowskiego-Crohna, jak i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Szczególnie znaczne wzrosty poziomów PAI-1 zaobserwowano w przypadku aktywnego przebiegu obu postaci choroby.

Kaiko i wsp. [172] poszukiwali związku pomiędzy ścieżkami transkrypcji genów odpowiedzialnych za koagulację a aktywnością nieswoistych chorób zapalnych jelit.

W biopsjach z jelita grubego odkryli znacznie podwyższoną ekspresję genu kodującego białko PAI-1 w grupie pacjentów z aktywnym przebiegiem choroby, którzy nie odpowiadali na terapię inhibitorami TNF- α . Wzrost PAI-1 zaostrza procesy zapalne i destrukcję w obrębie błony śluzowej jelita w związku z działaniem blokującym tkankowy aktywator plazminogenu i tym samym mediowaną przez ten czynnik aktywację przeciwzapalnego TGF- β . Autorzy identyfikują agresywniejsze postaci choroby z nadmierną produkcją PAI-1 zaburzającą procesy gojenia śluzówki jelita.

Stan zdrowia jamy ustnej

Włączeni do badania pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, którzy zostali zakwalifikowani do leczenia biologicznego, charakteryzowali się zarówno dobrym stanem uzębienia, jak również dobrym stanem przyzębia, niezależnie od postaci i przebiegu choroby. Opisywana grupa wykazywała dobry stan higieny jamy ustnej, który silnie korelował z dobrym stanem dziąseł, z co najwyżej łagodnym ich zapaleniem. Ankietowani prezentowali zazwyczaj poprawne nawyki dotyczące higieny jamy ustnej, z niestety niskim odsetkiem osób regularnie nitkujących przestrzenie międzyzębowe oraz oczyszczających powierzchnię grzbietową języka. Względnie systematycznie zgłaszali się także na wizyty kontrolne, co dodatkowo potwierdzają nieliczne aktywne ubytki próchnicowe i tym samym wysokie wskaźniki leczenia próchnicy.

W piśmiennictwie można spotkać doniesienia o związku pomiędzy nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit a predyspozycją do rozwoju chorób zapalnych przyzębia. W badaniu Brito i wsp. [173] zaobserwowano większą częstość występowania chorób przyzębia oraz wyższą zachorowalność na próchnicę u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, uwzględniając palenie tytoniu jako istotny czynnik modyfikujący stan zdrowia jamy ustnej. W grupie palaczy, pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego manifestowali znacznie częściej choroby przyzębia i tym samym większe wartości PPD, a pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna wyższe wartości PUW-z względem osób zdrowych. W przypadku osób niepalących te zależności były odwrotne – pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna posiadali istotnie głębsze kieszenie przyzębne, a pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego większą zachorowalność na próchnicę. Analogicznie wyniki badania Koutsochristou i wsp. [174] przedstawiły zwiększoną zachorowalność na próchnicę oraz choroby dziąseł i przyzębia

u dzieci i młodzieży z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, mimo wskaźników higieny jamy ustnej porównywalnych do grupy kontrolnej.

Habashneh i wsp. [175] również wnioskowali o częstszym występowaniu chorób przyzębia o większym zaawansowaniu i zasięgu u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Dodatkowo w grupie z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego znacznie częściej zauważano głębokie owrzodzenia w obrębie błony śluzowej jamy ustnej. Ponadto Vavricka i wsp. [176] zasugerowali, że do czynników predysponujących do wystąpienia chorób przyzębia należy aktywna postać choroby Leśniowskiego-Crohna z towarzyszącymi zmianami okołodbytowymi. Co więcej, na podstawie metaanalizy Papageorgiou i wsp. [177] ocenili, że w przypadku pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit szansa wystąpienia chorób przyzębia jest ponad czterokrotnie większa niż w populacji osób zdrowych.

Z kolei, Grössner-Schreiber i wsp. [178] nie zaobserwowali istotnych różnic we wskaźnikach zachorowalności na próchnicę i wskaźnikach stanu przyzębia pomiędzy pacjentami z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit oraz osobami zdrowymi, mimo wyznaczenia wyższych wartości wskaźników płytki nazębnej w grupie badanej. Podobnie Ślebioda i wsp. [179] nie stwierdzili znaczących różnic w poziomie higieny jamy ustnej, jak również w stanie uzębienia i przyzębia u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit w porównaniu do grupy kontrolnej. W kwestii występowania zmian na błonie śluzowej jamy ustnej nawracające afty obserwowano z porównywalną częstością w obu postaciach choroby (u 27,1% pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i 32% z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego), jednakże znacznie częściej niż u osób zdrowych (8,6%). Porównując opisywanych pacjentów z powyższego doniesienia z 2011 roku z własną grupą badaną, można wysnuć obserwację o obecnie lepszym stanie uzębienia i przyzębia u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit leczonych w ośrodku poznańskim.

Uczestnicy badania również rzadko manifestowali zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej. Najczęściej zaobserwowano zmiany nieswoiste, takie jak nadżerki aftowe, w grupie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego o cięższym przebiegu choroby. Zervou i wsp. [180] określili częstość występowania zmian na błonie śluzowej pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. W porównaniu do grupy kontrolnej istotnie częściej u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna odnotowywano

owrzodzenia, zapalenie kątów warg, język włochaty, zapalenia dziąseł i przyzębia, brukowanie błony śluzowej, polipowate zmiany, urazy błony śluzowej policzka oraz obrzęki warg. Natomiast pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita znacznie częściej wykazywali obecność zapalenia kątów warg oraz urazów błony śluzowej policzka. W badaniu własnym w grupie pacjentów zakwalifikowanych do leczenia biologicznego nie stwierdzono tak szerokiego spektrum zmian na błonie śluzowej jamy ustnej.

Mocne strony i ograniczenia badania

Wśród mocnych stron należy wymienić zastosowany model badania eksperymentalnego z interwencją terapeutyczną (faza indukcyjna leczenia biologicznego) przy stosunkowo homogennej grupie badanej. Do tej pory w piśmiennictwie nie spotkano analogicznego badania podejmującego próbę znalezienia markerów ślinowych pozwalających na predykcję rokowania przebiegu leczenia biologicznego. W dotychczas opublikowanych badaniach pacjenci przyjmowali różne rodzaje leków (rzadko leki biologiczne) lub brakowało w ogóle informacji na temat stosowanego leczenia. W grupie badanej przeprowadzono badanie kliniczne jamy ustnej i nie stwierdzono widocznych potencjalnych ognisk zapalnych, mogących rzutować na profil biochemiczny pobieranej śliny. Ponadto podgrupy pacjentów z obiema postaciami nieswoistych chorób zapalnych jelit zostały precyzyjnie sparowane z grupą kontrolną pod względem płci, wieku i BMI.

Do ograniczeń badania można zaliczyć brak bezpośredniego nadzoru nad pacjentami w trakcie pobierania próbek śliny po terapii indukcyjnej podczas pierwszej fali pandemii COVID-19, jak również brak dostępnych wyników badania klinicznego jamy ustnej grupy kontrolnej. Kwalifikacja kolejnych pacjentów do badania została przerwana przez wybuch pandemii, a wizyty kontrolne niektórych pacjentów uległy opóźnieniu. Ze względu na podział pacjentów na dwie podgrupy na podstawie postaci choroby, większa liczebność próby byłaby wskazana w przypadku dalszych badań w celu potwierdzenia otrzymanych zależności. Co więcej, warto byłoby skorelować poziomy markerów oznaczone w ślinie spoczynkowej z ich poziomami w surowicy krwi czy też w ślinie stymulowanej.

6. Wnioski

1. W wyniku fazy indukcyjnej leczenia biologicznego jedynie u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego uzyskano istotny wzrost stężeń markerów ślinowych (TNF-R1, IgA, kalprotektyny, MPO i CAT) do poziomów porównywalnych z osobami zdrowymi.
2. W ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu do pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna zaobserwowano znacznie obniżone tylko wyjściowe poziomy TNF-R1, kalprotektyny, mieloperoksydazy i katalazy.
3. Nie wykazano związku pomiędzy stopniem zaawansowania choroby a stężeniami wybranych mediatorów stanu zapalnego i wykładników stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.
4. Białko całkowite w ślinie wydaje się być potencjalnym predyktorem dla wystąpienia odpowiedzi klinicznej po terapii indukcyjnej, zwłaszcza wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.
5. Ślinowa mieloperoksydaza wykazała dobrą wartość predykcyjną w diagnostyce różnicowej choroby Leśniowskiego-Crohna z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.
6. Pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zakwalifikowani do leczenia biologicznego cechowali się dobrym stanem zdrowia jamy ustnej.

7. Streszczenie

Nieswoiste choroby zapalne jelit obejmują przewlekłe zaburzenia o charakterze zapalnym, które dotyczą przewodu pokarmowego. Do głównych postaci należą choroba Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Aktywne formy mogą manifestować się zmianami na błonie śluzowej jamy ustnej o charakterze swoistym lub nieswoistym. U pacjentów, u których nie uzyskano odpowiedzi na zastosowane standardowe schematy leczenia albo stwierdzono nietolerancję wobec stosowanych preparatów, wdraża się terapię lekami biologicznymi. Ślinę jako materiał diagnostyczny wykorzystywano dotąd głównie do kontrolowania stanu zdrowia jamy ustnej, a obecnie coraz bardziej rozszerza się jej zastosowanie do oceny stanu zdrowia całego organizmu. Aktualnie badania śliny jako alternatywy w diagnostyce medycznej skupiają się na poszukiwaniu i wykrywaniu markerów potencjalnie predykcyjnych podczas diagnozowania i monitorowania leczenia wybranych chorób ogólnoustrojowych.

W pracy określono wpływ leków biologicznych stosowanych w terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit na zmiany poziomów wybranych mediatorów stanu zapalnego i wykładników stresu oksydacyjnego w ślinie zależnie od stwierdzenia odpowiedzi klinicznej na fazę indukcyjną oraz postaci choroby, jak również stopnia jej zaawansowania. Ponadto podjęto próbę wyznaczenia ślinowych markerów predykcyjnych dla rokowania przebiegu leczenia biologicznego, jak i dla diagnostyki pacjentów. Poddano ocenie również stan zdrowia jamy ustnej pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zakwalifikowanych do leczenia biologicznego.

Do grupy badanej włączono 51 pełnoletnich pacjentów obojga płci, z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, zakwalifikowanych do leczenia biologicznego w Klinice Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w okresie od stycznia 2019 roku do marca 2020 roku. U 27 pacjentów zdiagnozowano chorobę Leśniowskiego-Crohna, a u 24 pacjentów wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Kontynuacja kwalifikacji pacjentów do badania została uniemożliwiona poprzez wybuch pandemii COVID-19 wiosną 2020 roku. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe sparowane co do wieku, płci oraz BMI. Przed rozpoczęciem leczenia biologicznego u wszystkich pacjentów przeprowadzono kliniczne badanie stomatologiczne. Oceniono stan uzębienia, higieny jamy ustnej oraz przyzębia, a także błony śluzowej jamy ustnej w celu eliminacji potencjalnych ognisk zapalnych w obrębie jamy ustnej. Materiał do badań laboratoryjnych stanowiła

niestymulowana ślina mieszana, pobierana przez 20 minut, zawsze o jednakowej porze dnia w godzinach przedpołudniowych. Próbkę śliny pobierano od pacjentów dwukrotnie: przed rozpoczęciem leczenia biologicznego oraz po tzw. terapii indukcyjnej. Stężenia wybranych markerów (TNF-R1, PAI-1, kalprotektyna, mieloperoksydaza i IgA) w ślinie określono metodą ELISA, a aktywność katalazy oznaczono metodą kolorymetryczną z użyciem odpowiednich zestawów diagnostycznych. Do oceny poziomu białka całkowitego wykorzystano metodę Bradforda w modyfikacji własnej. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono samodzielnie przy użyciu programu Statistica 13.3 z ustalonym poziomem istotności $\alpha=0,05$.

Pod wpływem fazy indukcyjnej leczenia biologicznego tylko w podgrupie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego z odpowiedzią kliniczną zaobserwowano znaczny wzrost poziomów wybranych markerów ślinowych, takich jak TNF-R1, IgA, kalprotektyna, mieloperoksydaza czy katalaza, osiągając wartości porównywalne do grupy kontrolnej. Co więcej, przed rozpoczęciem leczenia biologicznego u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wyjściowe stężenia markerów w ślinie (TNF-R1, kalprotektyny, mieloperoksydazy i katalazy) były istotnie niższe niż u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Natomiast po terapii indukcyjnej tych różnic nie potwierdzono. Jedynie u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego stwierdzono pozytywną korelację o przeciętnej sile pomiędzy stężeniem kalprotektyny w ślinie (przeliczonym na mikrogram białka całkowitego) a stężeniem CRP w surowicy krwi. Mieloperoksydaza wykazała potencjalnie wysoką wartość predykcyjną dla diagnozowania obu postaci nieswoistych chorób zapalnych jelit oraz ich diagnostyki różnicowej pomiędzy sobą. Z kolei możliwym markerem rokowniczym o dobrej predykcji dla oceny przebiegu leczenia biologicznego mogłoby być białko całkowite, ale tylko dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

Nie można jednoznacznie ocenić związku pomiędzy odpowiedzią kliniczną na terapię indukcyjną a ślinowymi poziomami wybranych markerów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. Niższe początkowe stężenia wybranych markerów w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego należy wiązać z podwójną immunosupresją farmakologiczną. Ponadto, nie określono zależności pomiędzy stopniem aktywności choroby a stężeniami wybranych markerów ślinowych. Pacjenci włączeni do badania charakteryzowali się dobrym stanem zdrowia jamy ustnej bez obecności swoistych zmian na błonie śluzowej.

8. Summary

Inflammatory bowel diseases are chronic inflammatory disorders that affect the gastrointestinal tract. The main forms include Crohn's disease and ulcerative colitis. Active forms can manifest with changes on the oral mucosa of a specific or non-specific nature. Biologic therapy is implemented in patients who have not responded to standard treatment regimens or have been found to be intolerant to the preparations used. Saliva as a diagnostic material has been used mainly to control oral health, and nowadays, its use is increasingly expanding to assess the health status of the whole organism. Currently, saliva research as an alternative to medical diagnosis focuses on finding and detecting potentially predictive markers when diagnosing and monitoring the treatment of selected systemic diseases.

The thesis determined the effect of biological drugs used in the treatment of inflammatory bowel diseases on changes in the levels of selected inflammatory mediators and exponents of oxidative stress in saliva, depending on the finding of clinical response to the induction phase and the form of the disease, as well as its stage. In addition, an attempt was made to designate salivary markers for the prognosis of the course of biological treatment as well as for the diagnosis of inflammatory bowel diseases. The oral health in patients with inflammatory bowel diseases qualified for biological treatment was also evaluated.

The study group included 51 adult patients of both sexes, with inflammatory bowel diseases, qualified for biological treatment at the Department of Gastroenterology, Dietetics and Internal Diseases of the Poznan University of Medical Sciences between January 2019 and March 2020. Amount of 27 patients were diagnosed with Crohn's disease, and 24 patients had ulcerative colitis. Continued qualification of patients for the study was prevented by the outbreak of the COVID-19 pandemic in spring 2020. The control group consisted of healthy people paired in age, gender and BMI. A clinical dental examination was performed in all patients prior to initiation of biological treatment. Dentition, oral hygiene and periodontal health, as well as oral mucosa, were assessed to eliminate potential foci of inflammation in the oral cavity. The laboratory material was unstimulated mixed saliva, taken for 20 minutes, and always at the same time of day in the morning. Saliva samples were twice taken from patients: before starting biological therapy and after so-called induction therapy. The concentrations of selected markers (TNF-R1, PAI-1, calprotectin, myeloperoxidase and IgA) in saliva were

determined through an ELISA test and catalase activity was determined through colorimetric method using appropriate diagnostic kits. Bradford's method of self-modification was used to assess total protein levels. The statistical analysis of the results was carried out independently using Statistica 13.3 with a significant level of $\alpha=0.05$.

Under the influence of the inductive phase of biological therapy, only a subset of patients with ulcerative colitis with a clinical response presented a significant increase in levels of selected salivary markers, such as TNF-R1, IgA, calprotectin, myeloperoxidase or catalase, which achieved values comparable to the control group. Moreover, before starting biological treatment in patients with ulcerative colitis, baseline saliva marker concentrations (TNF-R1, calprotectin, myeloperoxidase and catalase) were significantly lower than in patients with Crohn's disease. However, after induction therapy, these differences were not confirmed. Furthermore, only patients with ulcerative colitis positively correlated average strength between calprotectin in saliva (converted into a microgram of total protein) and serum CRP. Myeloperoxidase has shown a potentially high predictive value for diagnosing both forms of inflammatory bowel diseases and their differential diagnosis. On the other hand, a possible prognostic marker with a good prediction for evaluating the course of biological treatment could be a total protein, but only for patients with ulcerative colitis.

The relationship between the clinical response to induction therapy and the salivary levels of selected markers of oxidative stress and inflammation cannot be clearly assessed. Lower initial concentrations of selected markers in the saliva of patients with ulcerative colitis should be associated with double pharmacological immunosuppression. In addition, no relationship was found between the degree of activity of the disease and the concentrations of selected salivary markers. Patients included in the study maintained good oral health without the presence of specific lesions on the mucous membrane.

9. Piśmiennictwo

1. Zawadzka P. Nieswoiste zapalenia jelit - wczoraj i dziś. *Nowiny Lekarskie* 2006;75:480–5.
2. Baron JH. Inflammatory bowel disease up to 1932. *Mt Sinai J Med* 2000;67:174–89.
3. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175–84.
4. Dalziel TK. Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. *Dis Colon Rectum* 1989;32:1076–8.
5. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932;99:1323–9.
6. Swora E, Ślebioda Z, Grzymisławski M, Szponar E. Rozwój badań nad nieswoistymi zmianami zapalnymi w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna ze szczególnym uwzględnieniem jamy ustnej. *Nowiny Lekarskie* 2018;77:6.
7. Kmiec Z. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 1998;46:143–55.
8. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* 2010;4:28–62.
9. Bartnik W. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego. W: *Kompendium Choroby wewnętrzne na podstawie Interny Szczeklika*. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2013. strona 479–85.
10. Kornbluth A, Sachar DB, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2010;105:501–23; quiz 524.
11. Muhvić-Urek M, Tomac-Stojmenović M, Mijandrušić-Sinčić B. Oral pathology in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2016;22:5655–67.
12. Katsanos KH, Torres J, Roda G, Brygo A, Delaporte E, Colombel J-F. Review article: non-malignant oral manifestations in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;42:40–60.
13. Rehberger A, Püspök A, Stallmeister T, Jurecka W, Wolf K. Crohn's disease masquerading as aphthous ulcers. *Eur J Dermatol* 1998;8:274–6.
14. Lauritano D, Boccalari E, Di Stasio D, Della Vella F, Carinci F, Lucchese A, et al. Prevalence of Oral Lesions and Correlation with Intestinal Symptoms of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Diagnostics (Basel)* 2019;9:77.

15. Łodyga M, Eder P, Bartnik W, Gonciarz M, Kłopočka M, Linke K, et al. Guidelines for the management of Crohn's disease. Recommendations of the Working Group of the Polish National Consultant in Gastroenterology and the Polish Society of Gastroenterology. *Gastroenterology Rev* 2013;7:317–38.
16. Eder P, Łodyga M, Łykowska-Szuber L, Bartnik W, Durlík M, Gonciarz M, et al. Guidelines for the management of ulcerative colitis. Recommendations of the Working Group of the Polish National Consultant in Gastroenterology and the Polish Society of Gastroenterology. *Gastroenterology Rev* 2013;8:1–20.
17. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis* 2017;11:649–70.
18. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, Karmiris K, Katsanos K, Kopylov U, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J Crohns Colitis* 2017;11:769–84.
19. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017;11:3–25.
20. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, Magro Dias FJ, Rogler G, Lakatos PL, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis* 2017;11:135–49.
21. Łodyga M, Eder P, Bartnik W, Gonciarz M, Kłopočka M, Linke K, et al. New pharmaceuticals in inflammatory bowel disease. *Prz Gastroenterol* 2015;10:57–60.
22. Łodyga M, Eder P, Dobrowolska A, Reguła J, Rydzewska G. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii i Konsultanta Krajowego w Dziedzinie Gastroenterologii, dotyczące postępowania z pacjentem z nieswoistą chorobą zapalną jelit w dobie pandemii COVID [Internet]. 2020; dostępne: <http://www.ptg-e.org.pl/>
23. Rehak NN, Cecco SA, Csako G. Biochemical composition and electrolyte balance of „unstimulated” whole human saliva. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000;38:335–43.
24. Lee Y-H, Wong DT. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent* 2009;22:241–8.
25. Segal A, Wong DT. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *Eur J Dent Educ* 2008;12:22–9.
26. Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, et al. The Proteomes of Human Parotid and Submandibular/Sublingual Gland Salivas Collected as the Ductal Secretions. *J Proteome Res* 2008;7:1994–2006.

27. Li Y, Zhou X, St John M a. R, Wong DTW. RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. *J. Dent. Res.* 2004;83:199–203.
28. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. *Clin Cancer Res* 2009;15:5473–7.
29. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. *J Oral Rehabil* 2018;45:730–46.
30. Nijakowski K, Surdacka A. Ślina jako płyn biologiczny w diagnostyce chorób ogólnoustrojowych - przegląd piśmiennictwa. *Dental Forum* 2018;46:225–33.
31. Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci* 2007;133:3–18.
32. Knychalska-Karwan Z. Fizjologia i patologia błony śluzowej jamy ustnej. Lublin: Czelej; 2009.
33. Burlage FR, Pijpe J, Coppes RP, Hemels MEW, Meertens H, Canrinus A, et al. Variability of flow rate when collecting stimulated human parotid saliva. *Eur J Oral Sci* 2005;113:386–90.
34. Vissink A, Spijkervet FK, Van Nieuw Amerongen A. Aging and saliva: a review of the literature. *Spec Care Dentist* 1996;16:95–103.
35. Wu AJ, Baum BJ, Ship JA. Extended stimulated parotid and submandibular secretion in a healthy young and old population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995;50A:M45-48.
36. Lee S-K, Lee S-W, Chung S-C, Kim Y-K, Kho H-S. Analysis of residual saliva and minor salivary gland secretions in patients with dry mouth. *Arch Oral Biol* 2002;47:637–41.
37. Márton K, Boros I, Fejérdy P, Madléna M. Evaluation of unstimulated flow rates of whole and palatal saliva in healthy patients wearing complete dentures and in patients with Sjogren's syndrome. *J Prosthet Dent* 2004;91:577–81.
38. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694:72–7.
39. Kavanagh DA, O'Mullane DM, Smeeton N. Variation of salivary flow rate in adolescents. *Arch Oral Biol* 1998;43:347–52.
40. Louridis O, Demetriou N, Bazopoulou-Kyrkanides E. Environmental temperature effect on the secretion rate of „resting” and stimulated human mixed saliva. *J Dent Res* 1970;49:1136–40.
41. Shannon IL. Climatological effects on human parotid gland function. *Arch Oral Biol* 1966;11:451–3.
42. Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982;61:1158–62.

43. Wolff A, Begleiter A, Moskona D. A novel system of human submandibular/sublingual saliva collection. *J Dent Res* 1997;76:1782–6.
44. Schneyer LH. Method for the collection of separate submaxillary and sublingual salivas in man. *J Dent Res* 1955;34:257–61.
45. Nijakowski K, Surdacka A. Diagnostyka płynu dziąsłowego z wykorzystaniem urządzenia Periotron 8000. W: *Biofizyka a medycyna*. T. 8. Poznań: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu; 2019. strona 170–80.
46. Tishler M, Yaron I, Shirazi I, Yaron M. Saliva: an additional diagnostic tool in Sjögren's syndrome. *Semin. Arthritis Rheum.* 1997;27:173–9.
47. Peluso G, Santis MD, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Messana I, et al. Proteomic study of salivary peptides and proteins in patients with Sjögren's syndrome before and after pilocarpine treatment. *Arthritis & Rheumatism* 2007;56:2216–22.
48. Ryu OH, Atkinson JC, Hoehn GT, Illei GG, Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1077–86.
49. Nagler RM, Salameh F, Reznick AZ, Livshits V, Nahir AM. Salivary gland involvement in rheumatoid arthritis and its relationship to induced oxidative stress. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:1234–41.
50. Hernández CCC, Donadi EA, Reis ML. Kallikreins and kininogens in saliva and plasma of patients presenting with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 2002;31:38–40.
51. Mirrieles J, Crofford LJ, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR, Ebersole JL, et al. Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 2010;37:1068–74.
52. Sikorska D, Orzechowska Z, Rutkowski R, Prymas A, Mrall-Wechta M, Bednarek-Hatlińska D, Roszak M, Surdacka A, Samborski W, Witowski J. Diagnostic value of salivary CRP and IL-6 in patients undergoing anti-TNF-alpha therapy for rheumatic disease. *Inflammopharmacology* 2018;26:1183–8.
53. Zalewska A, Szulimowska J, Waszkiewicz N, Waszkiel D, Zwierz K, Knaś M. Salivary exoglycosidases in the detection of early onset of salivary gland involvement in rheumatoid arthritis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2013;67:1182–8.
54. Miller CS, Foley JD, Floriano PN, Christodoulides N, Ebersole JL, Campbell CL, et al. Utility of salivary biomarkers for demonstrating acute myocardial infarction. *J Dent Res* 2014;93:72S-79S.
55. Foley JD, Sneed JD, Steinhubl SR, Kolasa J, Ebersole JL, Lin Y, et al. Oral fluids that detect cardiovascular disease biomarkers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114:207–14.

56. Lehmann AP, Nijakowski K, Swora-Cwynar E, Łuczak J, Czepulis N, Surdacka A. Characteristics of salivary inflammation in obesity. *Pol Arch Med Wewn* 2020;130:297–303.
57. Bujak R, Sinkiewicz W, Błażejowski J, Żekanowska JB i E. Tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) i jego inhibitor typu 1 (PAI-1) u chorych z ostrym zawałem serca. *Cardiology Journal* 2002;9:311–8.
58. Harrison R, Bowen WH. Flow rate and organic constituents of whole saliva in insulin-dependent diabetic children and adolescents. *Pediatr Dent* 1987;9:287–91.
59. Cabras T, Pisano E, Mastinu A, Denotti G, Pusceddu PP, Inzitari R, et al. Alterations of the Salivary Secretory Peptidome Profile in Children Affected by Type 1 Diabetes. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:2099–108.
60. Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Arch. Oral Biol.* 2006;51:640–8.
61. Trivedi S, Lal N, Mahdi AA, Mittal M, Singh B, Pandey S. Evaluation of antioxidant enzymes activity and malondialdehyde levels in patients with chronic periodontitis and diabetes mellitus. *J. Periodontol.* 2014;85:713–20.
62. Surdacka A, Ciężka E, Pioruńska-Stolzmann M, Wender-Ożegowska E, Korybalska K, Kawka E, Kaczmarek E, Witowski J. Relation of salivary antioxidant status and cytokine levels to clinical parameters of oral health in pregnant women with diabetes. *Arch. Oral Biol.* 2011;56:428–36.
63. Malamud D, Rodriguez-Chavez IR. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent Clin North Am* 2011;55:159–78.
64. Formenty P, Leroy EM, Epelboin A, Libama F, Lenzi M, Sudeck H, et al. Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo. *Clin. Infect. Dis.* 2006;42:1521–6.
65. Lawrence HP. Salivary Markers of Systemic Disease: Noninvasive Diagnosis of Disease and Monitoring of General Health. *Journal of the Canadian Dental Association* 2002;68:5.
66. Silva DG, Stevens RH, Macedo JMB, Hirata R, Pinto AC, Alves LM, et al. Higher levels of salivary MUC5B and MUC7 in individuals with gastric diseases who harbor *Helicobacter pylori*. *Arch. Oral Biol.* 2009;54:86–90.
67. Malathi N, Mythili S, Vasanthi HR. Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dent* 2014;2014:158786.
68. Liguori G, Lucariello A, Colella G, De Luca A, Marinelli P. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol* 2007;60:1035–9.
69. Chen L, Zhao J, Peng J, Li X, Deng X, Geng Z, et al. Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. *Cell Prolif* 2020;53:e12923.

70. Medeiros da Silva RC, Nogueira Marinho LC, de Araújo Silva DN, Costa de Lima K, Pirih FQ, Luz de Aquino Martins AR. Saliva as a possible tool for the SARS-CoV-2 detection: A review. *Travel Med Infect Dis* 2020;38:101920.
71. Nijakowski K, Surdacka A. Salivary Biomarkers for Diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 2020;21:7477.
72. Jahanshahi G, Motavasel V, Rezaie A, Hashtroudi AA, Daryani NE, Abdollahi M. Alterations in antioxidant power and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in saliva of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis. Sci.* 2004;49:1752–7.
73. Majster M, Almer S, Boström EA. Salivary calprotectin is elevated in patients with active inflammatory bowel disease. *Arch. Oral Biol.* 2019;107:104528.
74. Nielsen AA, Nielsen JN, Schmedes A, Brandslund I, Hey H. Saliva Interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2005;40:1444–8.
75. Rezaie A, Ghorbani F, Eshgortk A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B, et al. Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1091:110–22.
76. Rezaie A, Khalaj S, Shabihkhani M, Nikfar S, Zamani MJ, Mohammadirad A, et al. Study on the correlations among disease activity index and salivary transforming growth factor-beta 1 and nitric oxide in ulcerative colitis patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1095:305–14.
77. Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, et al. Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res.* 2014;21:15–25.
78. Schaefer JS, Attumi T, Opekun AR, Abraham B, Hou J, Shelby H, et al. MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC Immunol.* 2015;16:5.
79. Szczeklik K, Owczarek D, Pytko-Polończyk J, Kęsek B, Mach TH. Proinflammatory cytokines in the saliva of patients with active and non-active Crohn's disease. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2012;122:200–8.
80. Szczeklik K, Krzyściak W, Cibor D, Domagała-Rodacka R, Pytko-Polończyk J, Mach T, et al. Markers of lipid peroxidation and antioxidant status in the serum and saliva of patients with active Crohn disease. *Polish Archives of Internal Medicine* 2018;128:362–70.
81. Xu Z, Wei B, Qiu Y, Zhang T. Altered Salivary Alpha-Amylase Secretion in Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Res Pract* 2018;2018:4203737.
82. Zheng X, Chen F, Zhang Q, Liu Y, You P, Sun S, et al. Salivary exosomal PSMA7: a promising biomarker of inflammatory bowel disease. *Protein Cell* 2017;8:686–95.

83. Alzoghaibi MA, Al-Mofleh IA, Al-Jebreen AM. Antioxidant activities for superoxide dismutase in patients with Crohn's disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2014;25:59–62.
84. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CBHW, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J. Pathol.* 2003;201:28–36.
85. Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic. Res.* 1994;21:417–25.
86. Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2003;9:179–89.
87. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 1996;41:2078–86.
88. Pinto MAS, Lopes MS-MS, Bastos STO, Reigada CLL, Dantas RF, Neto JCB, et al. Does active Crohn's disease have decreased intestinal antioxidant capacity? *J Crohns Colitis* 2013;7:e358-366.
89. Mohammadi E, Qujeq D, Taheri H, Hajian-Tilaki K. Evaluation of Serum Trace Element Levels and Superoxide Dismutase Activity in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Translating Basic Research into Clinical Application. *Biol Trace Elem Res* 2017;177:235–40.
90. Rachmilewitz D, Stampler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1995;36:718–23.
91. Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrier J, Steinhart AH, Wolman SL, et al. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001;74:259–64.
92. Ardite E, Sans M, Panés J, Romero FJ, Piqué JM, Fernández-Checa JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab. Invest.* 2000;80:735–44.
93. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Bowles W, Ho V, Ondrey F. A comparison of the pro-inflammatory, NF-kappaB-dependent cytokines: TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clin. Immunol.* 2005;114:278–83.
94. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J. Periodont. Res.* 2009;44:411–7.
95. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect. Prev.* 2005;29:42–5.

96. Ganzetti G, Campanati A, Santarelli A, Pozzi V, Molinelli E, Minnetti I, et al. Involvement of the oral cavity in psoriasis: results of a clinical study. *Br. J. Dermatol.* 2015;172:282–5.
97. Nijakowski K, Lehmann A, Rutkowski R, Korybalska K, Witowski J, Surdacka A. Poor Oral Hygiene and High Levels of Inflammatory Cytokines in Saliva Predict the Risk of Overweight and Obesity. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:6310.
98. Grottrup-Wolfers E, Moeller J, Karbach U, Muller-Lissner S, Endres S. Elevated cell-associated levels of interleukin 1beta and interleukin 6 in inflamed mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 1996;26:115–22.
99. Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1993;94:174–81.
100. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* 1998;16:249–84.
101. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:46–53.
102. Lúdvíksson BR, Gunnlaugsdóttir B. Transforming growth factor-beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand. J. Immunol.* 2003;58:129–38.
103. Bartolomé RA, Sanz-Rodríguez F, Robledo MM, Hidalgo A, Teixidó J. Rapid up-regulation of alpha4 integrin-mediated leukocyte adhesion by transforming growth factor-beta1. *Mol. Biol. Cell* 2003;14:54–66.
104. Playford RJ. Peptides and gastrointestinal mucosal integrity. *Gut* 1995;37:595–7.
105. Opleta-Madsen K, Hardin J, Gall DG. Epidermal growth factor upregulates intestinal electrolyte and nutrient transport. *Am. J. Physiol.* 1991;260:G807-814.
106. Riegler M, Sedivy R, Sogukoglu T, Cosentini E, Bischof G, Teleky B, et al. Epidermal growth factor promotes rapid response to epithelial injury in rabbit duodenum in vitro. *Gastroenterology* 1996;111:28–36.
107. Castle D, Castle A. Intracellular transport and secretion of salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1998;9:4–22.
108. Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Skowronski MT, Pan Y, Ishida H. Water channels and zymogen granules in salivary glands. *J. Pharmacol. Sci.* 2006;100:495–512.
109. Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:486–96.

110. Boissé L, Chisholm SP, Lukewich MK, Lomax AE. Clinical and experimental evidence of sympathetic neural dysfunction during inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2009;36:1026–33.
111. Pellissier S, Dantzer C, Mondillon L, Trocme C, Gauchez A-S, Ducros V, et al. Relationship between vagal tone, cortisol, TNF-alpha, epinephrine and negative affects in Crohn's disease and irritable bowel syndrome. *PLoS ONE* 2014;9:e105328.
112. Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Härle P, Schölmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut* 2006;55:1640–9.
113. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005;11:S45-53.
114. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:71–109.
115. Guo Z-Q, Otsuki T, Ishi Y, Inagaki A, Kawakami Y, Hisano Y, et al. Perturbation of secretory Ig A in saliva and its daily variation by academic stress. *Environ Health Prev Med* 2002;6:268–72.
116. Bishop NC, Gleeson M. Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:4444–56.
117. Tauler P, Martinez S, Moreno C, Martínez P, Aguilo A. Changes in salivary hormones, immunoglobulin A, and C-reactive protein in response to ultra-endurance exercises. *Appl Physiol Nutr Metab* 2014;39:560–5.
118. Finamore A, Peluso I, Cauli O. Salivary Stress/Immunological Markers in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Int J Mol Sci* 2020;21:8562.
119. Voganatsi A, Panyutich A, Miyasaki KT, Murthy RK. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J. Leukoc. Biol.* 2001;70:130–4.
120. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 2003;170:3233–42.
121. Sopalla C, Leukert N, Sorg C, Kerkhoff C. Evidence for the involvement of the unique C-tail of S100A9 in the binding of arachidonic acid to the heterocomplex S100A8/A9. *Biol. Chem.* 2002;383:1895–905.
122. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, et al. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2008;29:2035–43.
123. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MAD, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 2007;13:1042–9.

124. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2012;18:2218–24.
125. Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;119:15–22.
126. Cuida M, Halse AK, Johannessen AC, Tynning T, Jonsson R. Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur. J. Oral Sci.* 1997;105:228–33.
127. Haririan H, Andrukhov O, Pablik E, Neuhofer M, Moritz A, Rausch-Fan X. Comparative Analysis of Calcium-Binding Myeloid-Related Protein-8/14 in Saliva and Serum of Patients With Periodontitis and Healthy Individuals. *J. Periodontol.* 2016;87:184–92.
128. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15–20.
129. Papagiannakopoulos T, Kosik KS. MicroRNAs: regulators of oncogenesis and stemness. *BMC Med* 2008;6:15.
130. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007;8:166.
131. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* 2008;10:R101.
132. Dai Y, Huang Y-S, Tang M, Lv T-Y, Hu C-X, Tan Y-H, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2007;16:939–46.
133. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105:10513–8.
134. Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, et al. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010;16:1729–38.
135. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011;17:241–50.
136. Coskun M, Bjerrum JT, Seidelin JB, Nielsen OH. MicroRNAs in inflammatory bowel disease--pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *World J. Gastroenterol.* 2012;18:4629–34.

137. Duttagupta R, DiRienzo S, Jiang R, Bowers J, Gollub J, Kao J, et al. Genome-wide maps of circulating miRNA biomarkers for ulcerative colitis. *PLoS ONE* 2012;7:e31241.
138. Lin J, Welker NC, Zhao Z, Li Y, Zhang J, Reuss SA, et al. Novel specific microRNA biomarkers in idiopathic inflammatory bowel disease unrelated to disease activity. *Mod. Pathol.* 2014;27:602–8.
139. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1820:940–8.
140. Bach D-H, Hong J-Y, Park HJ, Lee SK. The role of exosomes and miRNAs in drug-resistance of cancer cells. *Int. J. Cancer* 2017;141:220–30.
141. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009;6:267–83.
142. Ritchie AJ, Crawford DM, Ferguson DJP, Burthem J, Roberts DJ. Normal prion protein is expressed on exosomes isolated from human plasma. *Br. J. Haematol.* 2013;163:678–80.
143. Zheng X, Chen F, Zhang J, Zhang Q, Lin J. Exosome analysis: a promising biomarker system with special attention to saliva. *J. Membr. Biol.* 2014;247:1129–36.
144. Best WR. Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:304–10.
145. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439–44.
146. Chen M, Shen B. Chapter 1 - Overview of Diagnosis and Medical Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. W: Shen B, redaktor. *Interventional Inflammatory Bowel Disease: Endoscopic Management and Treatment of Complications.* Academic Press; 2018. strona 1–15.
147. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;317:1625–9.
148. Walsh AJ, Ghosh A, Brain AO, Buchel O, Burger D, Thomas S, et al. Comparing disease activity indices in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2014;8:318–25.
149. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007;132:763–86.
150. Peyrin-Biroulet L, Panés J, Sandborn WJ, Vermeire S, Danese S, Feagan BG, et al. Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:348–354.e17.

151. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121–35.
152. Løe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 1967;38:Suppl:610-616.
153. Lange DE, Plagmann HC, Eenboom A, Promesberger A. [Clinical methods for the objective evaluation of oral hygiene]. *Dtsch Zahnärztl Z* 1977;32:44–7.
154. Banach J. Rozdział 4 - Badanie kliniczne przyzębia. W: *Periodontologia współczesna*. Med Tour Press; 2013. strona 100–19.
155. Nayak D, Uppoor A, CP M. Chapter 7 - Epidemiology of periodontal diseases. W: *Textbook of Periodontology and Oral Implantology*. Elsevier India; 2015. strona 41–51.
156. Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963;21:533–51.
157. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta* 1971;15:107–13.
158. Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2012;83:1449–54.
159. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
160. Stanisław A. *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny*. Kraków: StatSoft Polska; 2007.
161. Moczko J, Bręborowicz G. *Nie samą biostatystyką...* Poznań: Ośrodek Wydawnictw Naukowych ICB PAN; 2010.
162. Szczeklik K, Krzysciak W, Domagała-Rodacka R, Mach P, Darczuk D, Cibor D, et al. Alterations in glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in plasma and saliva in relation to disease activity in patients with Crohn's disease. *J. Physiol. Pharmacol.* 2016;67:709–15.
163. Janšáková K, Escudier M, Tóthová L, Proctor G. Salivary changes in oxidative stress related to inflammation in oral and gastrointestinal diseases. *Oral Dis* 2021;27:280–9.
164. Warner RH, Stevens FM, McCarthy CF. Salivary SIgA and SIgA 1 in coeliac disease, inflammatory bowel disease and controls. *Ir J Med Sci* 1999;168:33–5.
165. Savage NW, Barnard K, Shirlaw PJ, Rahman D, Mistry M, Escudier MP, et al. Serum and salivary IgA antibody responses to *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in orofacial granulomatosis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2004;135:483–9.

166. Owczarek D, Cibor D, Głowacki MK, Cieśla A, Mach P. TNF- α and soluble forms of TNF receptors 1 and 2 in the serum of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Pol Arch Med Wewn* 2012;122:616–23.
167. Spoettl T, Hausmann M, Klebl F, Dirmeier A, Klump B, Hoffmann J, et al. Serum soluble TNF receptor I and II levels correlate with disease activity in IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:727–32.
168. State M, Negreanu L, Voiosu T, Voiosu A, Balanescu P, Mateescu RB. Surrogate markers of mucosal healing in inflammatory bowel disease: A systematic review. *World J Gastroenterol* 2021;27:1828–40.
169. Cui G, Fan Q, Li Z, Goll R, Florholmen J. Evaluation of anti-TNF therapeutic response in patients with inflammatory bowel disease: Current and novel biomarkers. *EBioMedicine* 2021;66:103329.
170. Majster M, Lira-Junior R, Höög CM, Almer S, Boström EA. Salivary and Serum Inflammatory Profiles Reflect Different Aspects of Inflammatory Bowel Disease Activity. *Inflamm Bowel Dis* 2020;26:1588–96.
171. Koutroubakis IE, Sfiridaki A, Tsiolakidou G, Coucoutsis C, Theodoropoulou A, Kouroumalis EA. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 levels in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:912–6.
172. Kaiko GE, Chen F, Lai C-W, Chiang I-L, Perrigoue J, Stojmirović A, et al. PAI-1 augments mucosal damage in colitis. *Sci Transl Med* 2019;11.
173. Brito F, de Barros FC, Zaltman C, Carvalho ATP, Carneiro AJ de V, Fischer RG, et al. Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Periodontol* 2008;35:555–60.
174. Koutsochristou V, Zellos A, Dimakou K, Panayotou I, Sihanidou S, Roma-Giannikou E, et al. Dental Caries and Periodontal Disease in Children and Adolescents with Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Study. *Inflamm. Bowel Dis*. 2015;21:1839–46.
175. Habashneh RA, Khader YS, Alhumouz MK, Jadallah K, Ajlouni Y. The association between inflammatory bowel disease and periodontitis among Jordanians: a case-control study. *J Periodontol Res* 2012;47:293–8.
176. Vavricka SR, Manser CN, Hediger S, Vögelin M, Scharl M, Biedermann L, et al. Periodontitis and gingivitis in inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:2768–77.
177. Papageorgiou SN, Hagner M, Nogueira AVB, Franke A, Jäger A, Deschner J. Inflammatory bowel disease and oral health: systematic review and a meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2017;44:382–93.
178. Grössner-Schreiber B, Fetter T, Hedderich J, Kocher T, Schreiber S, Jepsen S. Prevalence of dental caries and periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease: a case-control study. *J. Clin. Periodontol.* 2006;33:478–84.

179. Ślebioda Z, Szponar E, Linke K. Comparative analysis of the oral cavity status in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Stomatology* 2011;64:212–24.
180. Zervou F, Gikas A, Merikas E, Peros G, Sklavaina M, Loukopoulos J, et al. Oral manifestations of patients with inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology* 2004;17:395–401.

10. Spis tabel

Tabela 1. Różnicowanie głównych postaci nieswoistych chorób zapalnych jelit.	10
Tabela 2. Zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej w nieswoistych chorobach zapalnych jelit.	11
Tabela 3. Charakterystyki badań włączonych do przeglądu systematycznego.	19
Tabela 4. Skala <i>Crohn's Disease Activity Index</i> (CDAI).	27
Tabela 5. Zmodyfikowana skala Mayo.	28
Tabela 6. Interpretacja wskaźników płytki nazębnej.	30
Tabela 7. Interpretacja wskaźników stanu dziąseł.	31
Tabela 8. Zastosowane zestawy diagnostyczne ELISA.	33
Tabela 9. Liczności pacjentów w zależności od przebiegu choroby przed terapią indukcyjną.	36
Tabela 10. Odsetek stwierdzonych pozytywnych odpowiedzi klinicznych na terapię indukcyjną w zależności od przebiegu choroby (%).	36
Tabela 11. Liczności pacjentów w zależności od przebiegu choroby po terapii indukcyjnej.	36
Tabela 12. Liczności pacjentów w zależności od zastosowanego leku biologicznego. .	37
Tabela 13. Odsetek stwierdzonych pozytywnych odpowiedzi klinicznych na terapię indukcyjną w zależności od zastosowanego leku biologicznego (%).	37
Tabela 14. Podstawowe parametry opisujące grupę badaną z podziałem na postać choroby (M [Q1-Q3] / %).	38
Tabela 15. Podstawowe parametry opisujące grupę badaną z podziałem na przebieg choroby (M [Q1-Q3] / %).	38
Tabela 16. Podstawowe parametry opisujące grupę kontrolną (M [Q1-Q3] / %).	39
Tabela 17. Parametry badania morfologii krwi u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna przed i po fazie indukcji.	39
Tabela 18. Parametry badania morfologii krwi u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po fazie indukcji.	41
Tabela 19. Stan uzębienia z podziałem na postać choroby (M [Q1-Q3]).	41
Tabela 20. Stan uzębienia z podziałem na przebieg choroby (M [Q1-Q3]).	42
Tabela 21. Stan higieny jamy ustnej z podziałem na postać choroby (M [Q1-Q3] / %).	42
Tabela 22. Stan higieny jamy ustnej z podziałem na przebieg choroby (M [Q1-Q3] / %).	42

Tabela 23. Stan przyzębia z podziałem na postać choroby (M [Q1-Q3]).	43
Tabela 24. Stan przyzębia z podziałem na przebieg choroby (M [Q1-Q3]).	43
Tabela 25. Korelacje pomiędzy parametrami stanu higieny jamy ustnej i stanu przyzębia.	43
Tabela 26. Nawyki higieniczne z podziałem na postać choroby (%).	44
Tabela 27. Nawyki higieniczne z podziałem na przebieg choroby (%).	44
Tabela 28. Stan błony śluzowej jamy ustnej z podziałem na postać choroby (%).	44
Tabela 29. Stan błony śluzowej jamy ustnej z podziałem na przebieg choroby (%).	45
Tabela 30. Parametry fizykochemiczne śliny u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna przed i po fazie indukcji.	45
Tabela 31. Parametry fizykochemiczne śliny u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po fazie indukcji.	45
Tabela 32. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.	46
Tabela 33. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) pomiędzy podgrupami pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.	48
Tabela 34. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne przed terapią indukcyjną.	49
Tabela 35. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne przed terapią indukcyjną.	50
Tabela 36. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne po terapii indukcyjnej.	51
Tabela 37. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) pomiędzy podgrupami pacjentów z odpowiedzią i bez odpowiedzi na leczenie biologiczne po terapii indukcyjnej.	52
Tabela 38. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów z odpowiedzią kliniczną na leczenie biologiczne.	53

Tabela 39. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów z odpowiedzią kliniczną na leczenie biologiczne.	56
Tabela 40. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów bez odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne.	59
Tabela 41. Porównanie stężeń wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) przed i po terapii indukcyjnej u pacjentów bez odpowiedzi klinicznej na leczenie biologiczne.	59
Tabela 42. Współczynniki korelacji Spearmana dla korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych a stopniem aktywności choroby i poziomem CRP.	60
Tabela 43. Współczynniki korelacji Spearmana dla korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) a stopniem aktywności choroby i poziomem CRP.	61
Tabela 44. Współczynniki korelacji Spearmana dla wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.	62
Tabela 45. Współczynniki korelacji Spearmana dla wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.	62
Tabela 46. Współczynniki korelacji Spearmana dla wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.	62
Tabela 47. Współczynniki korelacji Spearmana dla wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami wybranych markerów ślinowych (w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego) u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.	63
Tabela 48. Parametry krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w diagnostyce pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.	65
Tabela 49. Parametry krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w różnicowaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego od choroby Leśniowskiego-Crohna.	67
Tabela 50. Parametry krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w prognozowaniu rokowania pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zakwalifikowanych do leczenia biologicznego.	69
Tabela 51. Parametry predyktorów włączonych do modelu regresji logistycznej.	70

11. Spis rycin

Rycina 1. Stopień aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna przed i po terapii indukcyjnej.....	39
Rycina 2. Stopień aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.....	40
Rycina 3. Stężenie TNF-R1 w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.	54
Rycina 4. Stężenie IgA w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.	54
Rycina 5. Stężenie mieloperoksydazy w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.	55
Rycina 6. Aktywność katalazy w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.	55
Rycina 7. Stężenie TNF-R1 w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.	57
Rycina 8. Stężenie IgA w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.	57
Rycina 9. Stężenie kalprotektyny w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.....	58
Rycina 10. Stężenie mieloperoksydazy w przeliczeniu na mikrogram białka całkowitego w ślinie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przed i po terapii indukcyjnej.....	58
Rycina 11. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w diagnostyce wrzodziejącego zapalenia jelita grubego – część 1.	64
Rycina 12. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w diagnostyce wrzodziejącego zapalenia jelita grubego – część 2.	64
Rycina 13. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w diagnostyce choroby Leśniowskiego-Crohna.	65
Rycina 14. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w różnicowaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego od choroby Leśniowskiego-Crohna – część 1.....	66

Rycina 15. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w różnicowaniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego od choroby Leśniowskiego-Crohna – część 2.....	67
Rycina 16. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w prognozowaniu rokowania terapii indukcyjnej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.	68
Rycina 17. Porównanie krzywych ROC dla wybranych markerów ślinowych w prognozowaniu rokowania terapii indukcyjnej u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.	68
Rycina 18. V-krotna walidacja krzyżowa – porównanie krzywych ROC dla skonstruowanego modelu regresji logistycznej.	70

12. Załączniki

12.1. Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 1266/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. I w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 06 grudnia 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownicy projektu: prof. dr hab. n. med. Anna Surdacka

Miejsce prowadzenia badań:

**Klinika Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji oraz Klinika
Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. dent. Kacper Nijakowski

Członkowie zespołu


**badawczego: prof. dr hab. n. med. Janusz Witowski
dr hab. n. med. Piotr Eder
lek. dent. Zofia Strojny**

Temat badań:

**„Ocena wpływu leczenia biologicznego nieswoistych chorób zapalnych
jelit na wybrane parametry biochemiczne śliny”.**

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji


prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

12.2. Wzór karty badania pacjenta

Nr karty:

Data badania: 20... r.

Karta badania stomatologicznego

Inicjały:

Wiek: lat

Płeć: K/M

IBD: CD/UC

SBI																	
API																	
	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	
API																	
SBI																	

PUW-z: + + =

PUW-p: + + =

wskaźnik leczenia = $W/(P+W)$ =

Stan higieny - plaque index =

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
<input type="checkbox"/>	16	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	11	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	24	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	36	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	31	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	44	<input type="checkbox"/>	...
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Stan dziąseł - gingival index =

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
<input type="checkbox"/>	16	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	11	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	24	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	36	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	31	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	44	<input type="checkbox"/>	...
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Stan przyzębia – periodontal pocket depth

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
<input type="checkbox"/>	16	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	11	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	24	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	36	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	31	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	44	<input type="checkbox"/>	...
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Stan przyzębia – clinical attachment level

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
<input type="checkbox"/>	16	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	11	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	24	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	36	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	31	<input type="checkbox"/>	...	<input type="checkbox"/>	44	<input type="checkbox"/>	...
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Obecność kamienia nazębnego: NIE/TAK, przy zębach:

Zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej: NIE/TAK, jakie? stwardniałe polipowate zmiany w regionie trójkąta zatrzonowcowego/tzw. brukowanie błony śluzowej/rozłany bezobjawowy obrzęk policzka/zapalenie dziąseł/zapalenie kątów ust/zanikowe zapalenie języka/nadżerki aftowe/inne (jakie?

Inne uwagi (np. zaburzenia wydzielania śliny, recesje dziąseł, bruksizm):

.....

	tak	nie
Czy zawsze Pan(i) myje zęby 2-3 minuty?		
Czy zawsze Pan(i) myje zęby co najmniej 2 razy dziennie?		
Czy zawsze Pan(i) myje również język?		
Czy regularnie Pan(i) wymienia szczoteczkę (końcówkę szczoteczki) co 2-3 miesiące?		
Czy regularnie Pan(i) nitkuje zęby?		
Czy regularnie Pan(i) używa płukanek do jamy ustnej?		
Czy systematycznie (co pół roku) Pan(i) chodzi na przeglądy do dentysty?		

13. Aktywność naukowa

Łączna liczba opublikowanych prac naukowych: 80 (stan na 5 sierpnia 2021 r.), w tym:

- artykuły w polskich czasopismach: 24
- artykuły w zagranicznych czasopismach: 9
- polskie rozdziały w monografiach: 6
- streszczenia konferencyjne: 41, w tym 7 nagród na konferencjach (w sesjach ustnych lub plakatowych).

Liczba prac z IF: 10

Łączna wartość punktacji IF: 36,414

Łączna wartość punktacji MEiN: 1276, w tym:

- do 2018 roku: 76
- od 2019 roku: 1200

Ukończone studia podyplomowe:

- Elementy metodologii badań empirycznych w medycynie i zastosowania statystyki w badaniach biomedycznych (Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2019-2020, ocena bardzo dobra)
- Prawo medyczne i Bioetyka (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, 2017-2018, ocena bardzo dobra).

Ukończone szkolenie specjalizacyjne w trybie rezydenckim w dziedzinie stomatologii zachowawczej z endodoncją i uzyskanie tytułu specjalisty (2017-2020).

Opieka nad Studenckim Kołem Naukowym przy Klinice Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji – realizacja 5 grantów Komisji ds. Studenckich Badań Naukowych.