

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**КЛИНИЧЕН ЦЕНТЪР ПО АЛЕРГОЛОГИЯ**

---

**Ръководител: доц. д-р Мария Тончева Стаевска, дм**

**Д-Р АННА ВАЛЕРИЕВА ДИМИТРОВА**  
**АНГИОЕДЕМ И УРТИКАРИЯ:**  
**КЛАСИФИКАЦИЯ, ИМУНОЛОГИЧНА И ГЕНЕТИЧНА**  
**ХАРАКТЕРИСТИКА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**  
**ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА**  
**СТЕПЕН “ДОКТОР”**

**Докторска програма: ИМУНОПАТОЛОГИЯ И АЛЕРГОЛОГИЯ**

**Научни ръководители:**

**Проф. д-р Васил Димитров Димитров, дм**

**Доц. д-р Мария Тончева Стаевска, дм**

**Научен консултант:**

**Проф. д-р Марко Чикарди**

**София, 2018**



Кандидат за ОНС „Доктор“: Д-р Анна Валериева Димитрова

- **Област на висше образование:** 7. Здравеопазване и спорт
- **Професионално направление:** 7.1. Медицина
- **Научна специалност:** “Имунопатология и алергология”
- **Катедра:** Клиничен център по алергология
- **Факултет:** Медицински Факултет
- **Тема на дисертационния труд:** „Ангиоедем и уртикария: класификация, имунологична и генетична характеристика”
- **Научен ръководител:**

1. Проф. д-р Васил Димитров Димитров, дм
2. Доц. д-р Мария Тончева Стаевска, дм

- **Научно жури:**

**Председател:**

1. Акад. проф. д-р Богдан Николов Петрунов, дмн – външен член за МУ-София, Българска академия на науките

**Членове:**

2. Проф. д-р Алексей Славков Савов, дбм – вътрешен член за МУ-София, Катедра по акушерство и гинекология на Медицински факултет при МУ-София
3. Доц. д-р Жана Стоянова Казанджиева, дм – вътрешен член за МУ-София, Катедра по дерматология и венерология на Медицински факултет при МУ-София
4. Доц. д-р Дора Николова Попова, дм – външен член за МУ-София, Военномедицинска Академия - София
5. Доц. д-р Ваня Маринова Цветкова – Вичева, дм – външен член за МУ-София, Медицински университет - Плевен

**Резервни членове:**

6. Доц. д-р Гриша Стефанов Матеев, дм – вътрешен резервен член за МУ-София, Катедра по дерматология и венерология на Медицински факултет при МУ-София
7. Доц. д-р Георги Стоянов Николов, дм – външен резервен член за МУ-София, Национален център по заразни и паразитни болести - София

- **Рецензенти:**

1. Проф. д-р Алексей Славков Савов, дбм
2. Доц. д-р Дора Николова Попова, дм

- **Дата и час на защитата:** 24. 01. 2019г., 12:00 часа;

**Място:** Аула “Максима” при УМБАЛ “Света Екатерина” – София;

Адрес: бул. “Пенчо Славейков”, 52А, 1431 София

## і. Съкращения

<b>AAE</b>	Придобит ангиоедем
<b>ACEI</b>	Ангиотензин-конвертиращ ензим инхибитор
<b>ACEI-AAE</b>	Придобит ангиоедем асоцииран с ACE-инхибитори
<b>AH</b>	Антихистамини
<b>ANGPT</b>	Ангиопоетин
<b>Anti-C1-INH Abs</b>	Антитела срещу C1 инхибитора
<b>ARB</b>	Ангиотензин рецепторен блокер
<b>B1R</b>	Брадикинин рецептор 1
<b>B2R</b>	Брадикинин рецептор 2
<b>C1-INH</b>	C1 инхибитор естераза
<b>C1-INH-AAE</b>	Ангиоедем с придобит C1 инхибиторен дефицит
<b>C1-INH-HAE</b>	Наследствен ангиоедем с вроден C1 инхибиторен дефицит
<b>C1q</b>	Комплемент протеин C1q
<b>CLS</b>	Синдром на капилярно изтичане
<b>CSU</b>	Хронична спонтанна уртикария
<b>DPP-4</b>	Дипептидил-пептидаза-4
<b>DPU</b>	Забавена уртикария от натиск
<b>DRESS</b>	Drug-related eosinophilia and systemic symptoms
<b>F12</b>	Коагулационен Фактор 12
<b>FcεRI</b>	Високо-афинитетен рецептор за IgE
<b>GLP-1</b>	Глюкагон-подобен пептид-1
<b>HAE</b>	Наследствен ангиоедем
<b>HAWK</b>	Международна работна група за наследствен ангиоедем
<b>HMWK</b>	Кининоген с високо молекулно тегло
<b>hsCRP</b>	Сисоко-сензитивен C реактивен протеин
<b>HSP-90</b>	Heat shock protein-90
<b>IgE</b>	Имуноглобулин E
<b>IgG</b>	Имуноглобулин G
<b>IH-AAE</b>	Идиопатичен хистаминергичен придобит ангиоедем

<b>IL-</b>	Интерлевкин-
<b>InH-AAE</b>	Идиопатичен нехистаминергичен придобит ангиоедем
<b>MGUS</b>	Моноклонална гамапатия с неизвестна значимост
<b>NGS</b>	Секвениране от ново поколение
<b>nIC1-INH-HAE</b>	Наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитор
<b>NO</b>	Азотен оксид
<b>nsAH</b>	Неседативни антихистамини
<b>PAF</b>	Фактор активиращ тромбоцитите
<b>pdC1-INH</b>	C1 инхибитор добит от човешка плазма
<b>PLG</b>	Плазминоген
<b>rhC1-INH</b>	рекомбинантен човешки C1 инхибитор
<b>U-HAE</b>	Наследствен ангиоедем с неизвестна мутация
<b>VE-cadherine</b>	Vascular endothelial cadherine
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>AA</b>	Атенюирани андрогени
<b>AE</b>	Ангиоедем
<b>ACE</b>	Ангиотензин-конвертиращ ензим
<b>BK</b>	Брадикинин
<b>ДКК</b>	Диференциална кръвна картина
<b>ДНК</b>	Дезоксирибонуклеинова киселина
<b>ЕМ</b>	Еритема маргинатум
<b>МАС</b>	Мембрано-атакуващ комплекс
<b>НСПВС / NSAIDs</b>	Нестероидни противовъзпалителни средства
<b>ПКК</b>	Пълна кръвна картина
<b>С3</b>	Комплемент протеин С3
<b>С4</b>	Комплемент протеин С4
<b>СУЕ</b>	Скорост на утаяване на еритроцитите
<b>ХСУ</b>	Хронична спонтанна уртикария
<b>ХУ</b>	Хронична уртикария



## ii. Съдържание

<b>1. ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>7</b>
<b>3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	<b>8</b>
ЦЕЛ .....	8
ЗАДАЧИ.....	8
<b>4. МАТЕРИЛИ И МЕТОДИ</b> .....	<b>9</b>
МАТЕРИАЛИ .....	9
Брадикинин-медиран ангиоедем .....	10
Хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария.....	10
МЕТОДИ .....	10
Документален метод .....	10
Клинични методи .....	11
Лабораторни изследвания .....	11
Имунологични изследвания .....	11
Измерване на C1-INH (концентрация).....	12
Измерване на C1-INH (функция).....	12
Измерване на C4 .....	12
Измерване на C1q .....	12
Измерване на плазменния кининоген с високо-молекулно тегло (HMWK) .....	12
Имуноензимен метод (ELISA) за определяне на антитела срещу C1-INH.....	13
Имуноензимен метод (ELISA) за измерване интерлевкин IL-6 .....	14
Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на интерлевкин IL-10 .....	15
Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на интерлевкин IL-33 .....	15
Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на химиокин CCL2/MCP-1 .....	15
Генетични изследвания.....	15
СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ.....	17
<b>5. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>19</b>
ГЛАВА 1.....	19
ПРЕДЛАГАНЕ НА СЪВРЕМЕННА КЛИНИЧНА И ПАТОФИЗИОЛОГИЧНА КЛАСИФИКАЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С АНГИОЕДЕМ ..	19
ГЛАВА 2.....	21
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПАЦИЕНТИ С ПРОЯВИ НА ХИСТАМИНЕРГИЧЕН АНГИОЕДЕМ И ХРОНИЧНА УРТИКАРИЯ ЧРЕЗ ОЦЕНКА	
ПОКАЗАТЕЛИ ЗА МИНИМАЛНО-ПЕРСИСТИРАЩО СИСТЕМНО ВЪЗПАЛЕНИЕ .....	21
ГЛАВА 3.....	28
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ С ПРОЯВИ НА РЕДКИ ФОРМИ НА БРАДИКИНИН-МЕДИИРАН АНГИОЕДЕМ, ЧРЕЗ ОЦЕНКА НА	
ТЕХНИТЕ ДЕМОГРАФСКИ, КЛИНИЧНИ И ИМУНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ.....	28
<b>Период 1971-2012</b> .....	28
Демографска характеристика .....	29
Смъртни случаи.....	29
<b>Период 2013-2018</b> .....	32
Демографска характеристика .....	33
Смъртни случаи.....	35
Клинични прояви на НАЕ.....	37
Инвазивни процедури .....	38
Клинична тежест на НАЕ .....	39
Терапевтично поведение при пациентите с НАЕ .....	42
Тригери на НАЕ .....	43
Продроми на НАЕ.....	44
Съпътстващи заболявания .....	45
Лабораторни изследвания .....	46
ГЛАВА 4.....	50
СЪЗДАВАНЕ НА КАРТА НА ПАЦИЕНТИТЕ С РЕДКИ ФОРМИ НА АНГИОЕДЕМ (C1-INH-НАЕ) НА ТЕРИТОРИЯТА НА Р.	
БЪЛГАРИЯ И ИЗЧИСЛЯВАНЕ ЧЕСТОТАТА НА ДИАГНОЗАТА В РАЗЛИЧНИТЕ АДМИНИСТРАТИВНИ ОБЛАСТИ НА СТРАНАТА ..	50
Честота на НАЕ .....	50

Честотата на диагнозата, според административните райони на Р. България и карта на C1-INH-НАЕ.....	51
ГЛАВА 5.....	53
ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИНОСИТЕ НА ГЕНЕТИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ И БИОБАНКИРАНЕТО ПРИ ПАЦИЕНТИ С АНГИОЕДЕМ .....	53
ГЛАВА 6.....	58
ПРЕДЛАГАНЕ НА КЛИНИЧЕН АЛГОРИТЪМ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ И ПОВЕДЕНИЕ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С ПРОЯВИ НА АНГИОЕДЕМ.....	58
<b>7. ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>60</b>
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 1 .....	60
ПРЕДЛАГАНЕ НА СЪВРЕМЕННА КЛИНИЧНА И ПАТОФИЗИОЛОГИЧНА КЛАСИФИКАЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С АНГИОЕДЕМ ..	60
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 2 .....	61
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПАЦИЕНТИ С ПРОЯВИ НА ХИСТАМИНЕРГИЧЕН АНГИОЕДЕМ И ХРОНИЧНА УРТИКАРИЯ ЧРЕЗ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛИ ЗА МИНИМАЛНО-ПЕРСИСТИРАЩО СИСТЕМНО ВЪЗПАЛЕНИЕ .....	61
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 3 .....	63
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ С ПРОЯВИ НА РЕДКИ ФОРМИ НА БРАДИКИНИН-МЕДИИРАН АНГИОЕДЕМ, ЧРЕЗ ОЦЕНКА НА ТЕХНИТЕ ДЕМОГРАФСКИ, КЛИНИЧНИ И ИМУНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ.....	63
<b>Период 1971-2012.....</b>	<b>63</b>
Демографска характеристика .....	64
<b>Период 2013-2018.....</b>	<b>66</b>
Демографска характеристика .....	66
Смъртни случаи.....	67
Клинични прояви на НАЕ.....	68
Инвазивни процедури .....	68
Клинична тежест на НАЕ .....	69
Терапевтично поведение при пациентите с НАЕ .....	70
Тригери на НАЕ .....	70
Продроми на НАЕ.....	71
Съпътстващи заболявания .....	72
Лабораторни изследвания .....	72
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 4 .....	75
СЪЗДАВАНЕ НА КАРТА НА ПАЦИЕНТИТЕ С РЕДКИ ФОРМИ НА АНГИОЕДЕМ (C1-INH-НАЕ) НА ТЕРИТОРИЯТА НА Р. БЪЛГАРИЯ И ИЗЧИСЛЯВАНЕ ЧЕСТОТАТА НА ДИАГНОЗАТА В РАЗЛИЧНИТЕ АДМИНИСТРАТИВНИ ОБЛАСТИ НА СТРАНАТА ..	75
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 5 .....	76
ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИНОСИТЕ НА ГЕНЕТИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ И БИОБАНКИРАНЕТО ПРИ ПАЦИЕНТИ С АНГИОЕДЕМ .....	76
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 6 .....	79
ПРЕДЛАГАНЕ НА КЛИНИЧЕН АЛГОРИТЪМ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ И ПОВЕДЕНИЕ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С ПРОЯВИ НА АНГИОЕДЕМ.....	79
<b>8. ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ.....</b>	<b>80</b>
Изводи .....	80
Препоръки.....	80
<b>9. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>81</b>
Оригинални приноси .....	81
Потвърдителни приноси.....	81
<b>10. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ.....</b>	<b>82</b>
Публикации .....	82
Научни съобщения.....	82

## 1. Въведение

Ангиоедемът е остро настъпил оток на дълбоките слоеве на кожата или лигавицата в резултат на преходно повишаване на съдовата пропускливост. Той може да възникне при отсъствие или при наличие на уртикария, да бъде наследствен или придобит и да бъде причинен от различни вазоактивни медиатори, включително хистамин и брадикинин. Рецидивиращият ангиоедем (АЕ) без уртикария се възприема все повече като отделна нозологична единица (първичен ангиоедем) и често срещана причина за спешно посещение при лекар. Съвременните познания за ангиоедема позволяват на клиничните специалисти да преодолеят объркването, което по традиция доминира в тази тема още от първото описание на болестта ("ангионевротичен" оток) по времето на Quinke (1882) и Osler (1888).

Съвременната класификация разграничава наследствени и придобити форми на ангиоедем, свързани или независими от дефицита на C1 инхибитора. Напоследък се описват и допълнителни механизми в патогенезата на ангиоедема, включително неконтролираното активиране на фактор XII, генерирането на вазоактивни медиатори на плазмените каскадни системи, които причиняват дисрегулация на ендотелните клетки, както и съпътстващо взаимодействие между медиаторите, получени от активирането на мастоцитите и плазмената контактна система.

Всички тези конкурентни механизми могат да доведат до проявата на различни клинични фенотипове на заболяването. Честотата, тежестта и локализацията на пристъпите са различни сред различните пациенти, както и при един и същ пациент в различни периоди на живота му. Тежестта на клиничния фенотип силно влияе върху качеството на живот на пациентите. Независимо от големия напредък в познанието за механизмите на рецидивиращия ангиоедем, все още остават редица нерешени въпроси, които са причина за неудовлетворените нужди на пациентите и техните близки.

Уртикарията е състояние, характеризиращо се с развитие на уртики, ангиоедем или и двете. Хроничната спонтанна уртикария (ХСУ) е често и трудно за преодоляване заболяване в алергологичната практика. Клинично болестта се изразява с рецидивиращи, бързопреходни, сърбящи обриви (уртики) по кожата, които се наблюдават от 6 или повече седмици. Спектърът на клиничните прояви на различните типове уртикария (остра или хронична, индуцируема или спонтанна) и ангиоедем е много широк. Освен това, могат да съществуват два или повече различни подтипа уртикария и ангиоедем при всеки отделен пациент.

Настоящият труд е фокусиран върху патофизиологията, методите за диагностика, клиничните, лабораторните и генетичните характеристики на различните фенотипове ангиоедем, както и съвременните средства за лечение и профилактика на това хетерогенно заболяване.



### 3. Цел и задачи

#### Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се характеризират пациенти с прояви на ангиоедем в българската популация като се проучат техните клинични, имунологични и генетични особености.

#### Задачи

За постигане на целта на дисертационния труд бяха поставени следните задачи:

1. Да се предложи съвременна клинична и патофизиологична класификация при пациентите с ангиоедем.
2. Да се характеризират пациенти с прояви на хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария като се изследват показатели за минимално-персистиращо системно възпаление.
3. Да се характеризират пациенти с прояви на редки форми на брадикинин-медиран ангиоедем, в това число пациенти с наследствен и придобит С1-инхибиторен дефицит в българската популация като се изследват техните клинични, демографски и имунологични показатели.
4. Да се създаде карта на пациентите с редки форми на ангиоедем на територията на Р. България и да се изследва честотата на диагнозата в различните административни области на страната.
5. Да се оценят приносите на генетичното изследване и биобанкирането при пациентите с ангиоедем.
6. Да се предложи клиничен алгоритъм за диагностициране и поведение при пациенти с прояви на ангиоедем.

## 4. Материли и методи

### Материали

Изследвани са пациенти с прояви на ангиоедем, диагностицирани, проследявани и лекувани в Клиниката по алергология: ретроспективно за периода 1972-2012 г (за групата на C1-INH-НАЕ) и проспективно за двете групи за периода 2013-2018 година. За целите на дисертацията са използвани демографски и клинични данни, биологични, и генетични проби, за което пациентите дадоха информирано съгласие. Проведените лабораторни изследванията са одобрени от Комисията по етика на научните изследвания в Медицински университет – София (КЕНИМУС). Уведомена бе Етичната комисия при УМБАЛ “Александровска” относно обработването на пациентските данни за целите на научните изследвания. Писмено информирано съгласие се съхранява и в новосъздадената генетична биобанка към Центъра по молекулярна медицина към МУ-София, съпровождаща всяка проба, съхранена за целите на биобанкирането.

В дисертационния труд са включени ретроспективни и проспективни данни като се изследваха пациенти преминали през стационара и амбулаторната практика на Клиниката по алергология на УМБАЛ “Александровска”, София. Пациентите са разделени в две групи според предполагаемата патогенеза на състоянието: 1) брадикинин-медиран ангиоедем и 2) рецидивиращ хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария.

#### ➤ Пациенти с брадикинин-медиран ангиоедем

Пациентите са разделени в четири групи според наследствения характер на заболяването и наличието или отсъствието на C1-инхибиторен дефицит, използвайки номенклатурата на HAWK групата (Cicardi, Aberer et al. 2014):

- наследствен ангиоедем (НАЕ), дължащ се на C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-НАЕ)
- наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитор (nC1-INH-НАЕ)
- придобит ангиоедем, дължащ се на C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-AAE)
- придобит идиопатичен не-хистаминергичен ангиоедем (InH-AAE)

Таблица 1

	C1-INH дефицит	C1-INH нормален
Наследствен	C1-INH-НАЕ	nC1-INH-НАЕ
Придобит	C1-INH-AAE	InH-AAE

#### ➤ Пациенти с рецидивиращ хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария

Пациентите са разделени в две групи според тежестта на заболяването: 1) *лека до средно тежка* и 2) *тежка до много тежка* форми, като те са дефинирани спрямо терапевтичния отговор на съвременната терапия, препоръчана според международните гайдлайни за лечение на хронична уртикария (Zuberbier, Aberer et al. 2018):

Таблица 2

Група	Доза неседативен антихистамин (поддържащо лечение)	Омализумаб (поддържащо лечение)	Перорален кортикостероид (поддържащо лечение)
Лека-средно тежка	1 – 2	-	-
Тежка-много тежка	3 – 4	+/-	+/-

Всяка от описаните две групи - брадикинин-медиран ангиоедем и хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария, бяха подложени на отделни селектиращи критерии, предвид хетерогенността на състоянието.

### *Брадикинин-медиран ангиоедем*

Включващи критерии:

- Лица с количествен и/или функционален дефицит на С1 инхибитора, +/- понижена плазмена концентрация на С4
- Лица с клинично доказана диагноза НАЕ (положителна фамилна анамнеза за ангиоедем)
- Лица с рецидивиращ ангиоедем, неповлияващ се от конвенционална противоалергична терапия с антихистамини, кортикостероиди и/или адреналин
- Лица с рецидивиращ ангиоедем с обичайно "бавна" еволюция (развиващ се в продължение на часове и претърпяващ бавно обратно развитие за > 72-96 часа)
- Лица с рецидивиращ ангиоедем при липса на разпознаваем причинен фактор за появата на симптомите (прием на лекарства, експозиция на алергени)

Исключващи критерии

- Лица, неспособни да предоставят съгласие за участие в изследването
- Лица с прояви на хистаминергичен ангиоедем

### *Хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария*

Включващи критерии

- Лица с прояви на хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария (давност >6 седмици)
- Лица с нормални стойности на С1 инхибитора
- Лица с хистаминергичен ангиоедем и уртикария при липса на разпознаваем причинен фактор за появата на симптомите (прием на лекарства, експозиция на алергени)

Исключващи критерии

- Лица, неспособни да предоставят съгласие за участие в изследването
- Лица с прояви на брадикинин-медиран ангиоедем (отговарящ на описанието в предходната група)

## **Методи**

За провеждането на изследванията бяха използвани следните методи:

### *Документален метод*

Изследванията в групата на брадикинин-медиран ангиоедем са структурирани като ретроспективно-проспективно проучване. Ретроспективно са анализирани и обобщени данните за пациенти, лекувани и проследявани в Клиниката по алергология на УМБАЛ "Александровска" за периода 1972-2012 г. Използваните пациентски данни са част от Регистъра за НАЕ, създаден от поставянето на първата диагноза в България на брадикинин-медиран ангиоедем (С1-INH-НАЕ) от проф. д-р Божко Божков (Фамилия 1, 1972 г).

За пациентите, лекувани след 2013 година, са използвани следните методи:

### *Клинични методи*

#### **а) Анамнеза**

Анамнестичните данни са снети щателно при всеки пациент. Обърнато е внимание на актуалните оплаквания, съпътстващите заболявания и терапия, здравословните проблеми в миналото, фамилната анамнеза, факторите, които влияят на оплакванията, както и продромите, предхождащи проявите на ангиоедем.

#### **б) Медицински статус**

На всички пациенти е снет пълен медицински статус: оглед, перкусия, палпация, аускултация. Изследвани са техните основни витални показатели (сърдечна честота, артериално налягане, дихателна честота, телесна температура).

### *Лабораторни изследвания*

За целите на изследванията бе взета венозна кръв от периферен венозен съд (най-често кубитална вена, 10-20 мл), извършено според стандартите за извършване на процедурата в Р. България.

Извършени бяха лабораторни изследвания на: пълна кръвна картина (ПКК), диференциално кръвно броене (ДКК), биохимия, щитовидна функция, С-реактивен протеин. Последното изследване бе насочено към оценка наличието на минимално-персистиращо системно възпаление при пациентската група с хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария. Избран за целта бе високо-специфичен С-реактивен протеин (hsCRP – Cobas), използван рутинно в клиничната практика и стандартен инструмент за определяне актоvnостта на възпалението. Маркерът бе изследван според стандартната лабораторна практика при взета според изискванията периферна венозна кръв и при спазени инструкциите на производителя на разработената методика. За референтни граници бяха приети стойностите от 0 – 5 mg/l.

### *Имунологични изследвания*

Част от изследванията са извършени с участието на докторанта (изследването на С1 инхибитора /количество и функция/, С1q, С4, HMWK cleavage /разграждане на кининогена с високо молекулно тегло/, anti-C1-INH антитела) при обучението ѝ в Лабораторията за изучаване на Комплекта, ръководена от Prof. Marco Cicardi, Университет на Милано, Италия. Част от изследванията са сравнени с такива, извършени от независима лаборатория, в която стандартно се провежда проследяването на пациентите с НАЕ. Имуноензимните методи за измерване на цитокини и химиокини (IL-6, -10, -33 и CCL2/MCP-1) бяха извършени в Лабораторията по клинична имунология на Университетска болница “Св. Иван Рилски”, София. Генетичните изследвания (таргетна NGS) при пациентите с брадикинин-медиран ангиоедем бяха извършени в Центъра по клетъчна и молекулна приложна имунология (CeMIA) към Катедрата по Имунология и клетъчна съвместимост, Медицински факултет на Университета на Тесалия, Лариса, Гърция.

Изолирането на ДНК материал за целите на биобанкирането при групата хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария беше извършено в Центъра по молекулна медицина към МУ-София.

### Измерване на C1-INH (концентрация)

Концентрацията на C1-INH (както и за C4 и C1q) са измервани с помощта на два метода: чрез нефелометричен метод (използван, според инструкциите на производителя) или радиална имунодифузи чрез имунодифузионни плаки (според описанието на производителя). Нефелометричният метод измерва прозрачността на пробата, предизвикана от образуването на неразтворими имунни комплекси, когато към пробата се добави анти тяло насочено към C1-INH. Пробата, съдържаща C1-INH предварително се инкубира с буфер и контролно се измерва нейната прозрачност преди прибавянето на анти-C1-INH анти тялото. В присъствието на достатъчно анти тяло в излишък, концентрацията на C1-INH се измерва като функция на мътноста.

Радиалната имунодифузия определя концентрацията на серумните протеини (C1-INH) чрез еднократна плака. Количество серум се поставя в агароза, съдържащо моно-специфично анти тяло. Серумът се разпространява в агарозата и плазменият антиген образува имунен комплекс с анти тялото. Наблюдава се пръстен, чийто размер е пропорционален на концентрацията на протеин в серума. За отчитане на концентрацията на протеина се измерва диаметъра на пробата на утаяване спрямо таблица с референтната стойност.

### Измерване на C1-INH (функция)

#### Предназначение

Диагностика на наследствен ангиоедем (HAE): C1-естеразният инхибитор (C1-INH) е регулаторен протеин, който функционира като инхибитор на няколко серинови протеази в системата на комплемента, каликреин-кининовата система, коагулационната каскада и фибринолизата.

#### Принцип на изследването

Методът е стандартизиран количествен метод за *in vitro* измерване на активността на човешки C1-INH. Принципът е илюстриран със следната диаграма:



### Измерване на C4

### Измерване на C1q

Описани по-горе, както при C1-INH (количество).

### Измерване на плазмения кининоген с високо-молекулно тегло (HMWK)

Брадикининът е вазоактивен възпалителен медиатор, който играе ключова роля в наследствения ангиоедем (HAE). Той се освобождава от неговия прекурсорен кининоген с висока молекулна маса (HMWK) от плазмения каликреин, като HMWK се разцепва (сHMWK) като страничен продукт. Прякото определяне на брадикинина е доказано полезно, но е технически сложно поради нестабилността и малкия размер на нанопептида. За целта на доказване производството на сHMWK ние използвахме методика на Western blotting, която подкрепя неговата потенциална стойност като клиничен биомаркер за брадикинин-медирана патология.

Разцепването на HMWK беше оценено чрез електрофореза с натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел (SDS-PAGE) и имуноблот анализ (модификация на метода) (Berrettini, Lammle et al. 1986). След електрофоретично разделяне и трансфера на протеини от гела към поливинилидна дифлуоридна мембрана (Immobilon, EMD Millipore Corp, Billerica, MA, САЩ), сHMWK се идентифицира като се използва поликлонална anti-HMWK light chain антитяло от коза (Nordic, Tilburg, Холандия) и се визуализира с използване на биотинилирано анти-козе антитяло от заек (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, САЩ). Видимите молекулни маси на протеините се оценяват чрез сравняване с маркерите за нативен HMWK (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Използвайки този метод, нативният HMWK се явява като единична ивица с Mr от 130 000, но при максималното му разцепване той постепенно се заменя с две ивици с Mr стойности от 107 000 и 98 000. Плътноста на лентите се измерва като се използва биодензитометър GS800. Плазмата инкубирана с каолин се използва в електрофорезата като контролна проба. Количеството на разцепените HMWK (с Mr от 107 000 и 98 000) се изразява като процент от общия HMWK (сумата от трите ленти) (Cugno, Cicardi et al. 1994).

#### *Имуноензимен метод (ELISA) за определяне на антитела срещу C1-INH*

Методът служи за определяне на антитела срещу C1-INH от клас IgG, IgA и IgM, установени с помощта на предварително определени силно положителни контроли. Изследвахме наличието или отсъствието на неутрализиращите anti-C1-INH антитела в пациентски серум по метод на ELISA, дизайнерски модифициран вариант на Alsenz et al. (Alsenz, Bork et al. 1987, Cicardi, Beretta et al. 1996).

#### **Предварителна подготовка на реагентите**

1. От предната вечер се подготвя плака, предварително натоварена с човешки C1 инхибитор (Berinert, CSL Behring)
2. Миещият разтвор се приготвя чрез разреждане 1:40
3. Пациентските серуми се разреждат 1:50.
4. Контролите се разреждат по същия начин, както пациентските серуми.

#### **Протокол**

1. Реагентите се темперират на стайна температура за 30 минути.
2. Накапват се по 100 µl от контролите – отрицателна контрола; ниско положителната и високо положителна контрола; и разредените серуми, в определените ямки.
3. Плаката се инкубира 30 минути на стайна температура.
4. Трикратно се измиват ямките с по 300 мкл от предварително разредения миещ буфер, като ямките се подсушават върху филтърна хартия.
5. Добавят се по 100 µl от Конюгата във всяка ямка.
6. Инкубира се 30 минути на стайна температура.
7. Трикратно се измиват ямките с по 300 мкл предварително разредения Миещ буфер, като ямките се подсушават върху филтърна хартия.
8. Добавят се по 100 µl от Субстратния разтвор за няколко минути до получаване на цветна реакция в контролните гнезда.
9. Добавя се по 100 µl от Стопиращия разтвор във всяко гнездо.

Отчита се на ELISA четец на 450/630 nm.

### Имуноензимен метод (ELISA) за измерване интерлевкин IL-6

За определяне на IL-6 в серум използвахме Human Quantikine ELISA (R&D systems, USA). Прилагаме протокола за измерване на IL-6, който е представителен и за протоколите, следваните при останалите интерлевкини и химиокин.

#### Принцип на метода:

Методът представлява количествен „сандвич“ имуноензимен метод (ELISA) за *in vitro* определяне на човешки IL-6 в биологични материали. Гнездата на микротитърната плака са натоварени с високоспецифични антитела срещу човешки IL-6. По време на първия инкубационен период се извършва свързване на IL-6, ако присъства в биологичния материал, към фиксираните върху гнездата на плаката антитела. След измиване на всички несвързани субстанции, се добавя второ поликлонално антитяло, насочено срещу IL-6 и конюгирано с ензим. След инкубацията излишъкът от несвързани субстанции се измива. Ензимната реакция се осъществява посредством добавяне на субстрат и образуване на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е правопропорционален на първоначалното количество IL-6 в биологичната проба.

По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за IL-6 е 0.70 pg/ml.

#### Използвани реагенти, предоставени в кита:

96-гнездова микротитърна плака, лиофилизиран стандарт, конюгат, разреждател за стандарта RD6F за серумни/плазмени проби, разреждател за стандарта RD5T за проби от клетъчни супернатанти, разреждател за процедурата RD1W, цветен реагент А и реагент В, миеш разтвор 25x концентриран, стоп разтвор, адхезивни ленти.

#### Използвана апаратура:

ELISA четец Stat fax 2100

#### Изпълнение на метода:

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита. Прилагаме Работен протокол за извършване на метода:

Предварителна подготовка на реагентите:

- Възстановяване на стандарта с 5.00 ml разреждател за стандарт RD6F. Получава се работна концентрация (сток) от 300 pg/ml и така приготвеният стандарт е необходимо да престои поне 15 минути. Приготвят се падащи разреждания на стандарта с концентрация: 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 pg/ml. Първото разреждане се приготвя чрез смесване на 333 µl от сток стандарта към 667 µl от разреждателя за стандарта. Разреждателят за стандарта се използва като нулев стандарт.
- Приготвяне на миеш разтвор от 20 ml концентрат с 480 ml дестилирана вода за получаване на 500 ml работен миеш разтвор.
- Субстратният разтвор се приготвя 15 минути преди употреба чрез смесване на цветен реагент А и В.
- Пробите на пациентите се разреждат 1:2 с разреждател за процедурата директно в плаката.

#### Интерпретация на резултатите:

Резултатите се отчитат на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо се преизчисляват като концентрация на IL-6 в тестваните проби в pg/ml, съгласно построената калибрационна крива. Концентрацията на пробите се преизчисляват като се умножат по фактор на разреждане 2.

*Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на интерлевкин IL-10*

*Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на интерлевкин IL-33*

*Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на химиокин CCL2/MCP-1*

Приложеният протокол за измерване на IL-6, е представителен и за протоколите, следваните при останалите интерлевкини IL-10, IL-33 и химиокина CCL2/MCP-1.

### *Генетични изследвания*

#### **Изолиране на ДНК от ядрени кръвни клетки за целите на биобанкирането**

Изолирана беше високомолекулна ДНК от ядрени кръвни клетки от 20 пациенти (групата с тежка – много тежка ХСУ) и съхранена в генетична биобанка. Екстракцията и съхранението на ДНК пробите се осъществи в Центъра по молекулярна медицина към МУ – София. Изолирането на високомолекулната ДНК се извърши чрез автоматизирана магнитна сепарация, като в това изследване се използва предвиденият по проекта Chemagen® кит чрез Chemagen® magnetic separation station.

Основни компоненти на системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagena подвижен модул и магнитна глава. Върху подвижния модул се поставят: контейнер с чисти крайници, епруветки с проби и епруветки с поредица от буфери. Магнитната глава носи метални пръчици (родове), които имат способността да се намагнитизират. За изолиране на ДНК се използва специален набор от реактиви, който включва различни буфери, както и магнитни частици (M–PVA Magnetic Beads).

#### **Използвана апаратура:**

- Хладилна центрофуга Centrifuge 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване – Vortex - Press-to-mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (EcoCell).
- Системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)

Принцип: Отделянето на ДНК молекулите от останалите клетъчни компоненти става с помощта на магнитни частици. Магнитните частици се свързват с ДНК молекулите в пробата. При включване на електромагнитна на апарата, родовете се намагнитизират и привличат магнитните частици от разтвора. Всеки от тях е снабден с крайник и магнитните частици (заедно с ДНК молекулите) полепват по външната им страна. Принципът на действие на магнитните частици е следният: магнитните частици съдържат матрица от поливинилов алкохол, който в следствие се карбоксилира, за да може лесно да свързва белтъци, нуклеинови киселини и други аминокиселини-лиганди. Магнитните частици с –COOH групи могат да се свързват с полимерни или неполимерни молекули, които съдържат аминокиселини групи. Първо задължително условие е активирането на –COOH матрицата. За тази активация рН на средата трябва да бъде между 4.7 и 6. Средата с рН>7.5 е необходимо да бъде избягвана.

Намагнитизираните родове прехвърлят магнитните частици (и свързаните с тях ДНК молекули) през различни промиващи буфери. При потапяне в определен буфер, електромагнитът се изключва, при което магнитните частици се отделят от крайниците. След това се включва електромоторът, родовете започват да се въртят и по този начин магнитните частици (заедно с ДНК) се диспергират в целия обем на разтвора. След това електромоторът се изключва, а електромагнитът се включва и магнитните частици (заедно с ДНК) отново полепват по външната страна на крайника. По този начин свързаната с магнитните частици ДНК се промива в няколко промиващи буфери, след което започва етапа на елуиране на ДНК.



Елуирането протича по следния начин: по време на въртенето на металните родове ДНК молекулите се отделят от магнитните частици и остават в елуиращия буфер. Впоследствие магнитните частици отново полепват по външната страна на крайниците. Последният етап се състои в автоматично отделяне на използваните крайници от металните родове. Крайният резултат е получаване на чиста геномна ДНК с висока концентрация.

#### Етапи:

- Разрушаване на кръвните клетки с хипотоничен солеви разтвор;
- Лизиране на ядрата с подходящ за целта буфер и протеиназа К в присъствието на SDS (натриев додецил сулфат - детергент, който дисоциира протеините от ДНК и създава условия за действие на протеиназата);
- Свързване на освободената от ядрата ДНК към магнитните частици;
- Отделяне на комплекса ДНК-магнитни частици от кръвно-клетъчния лизат;
- Няколкократно промиване с етанол съдържащи буфери;
- Освобождаване на пречистената ДНК от магнитните частици;

#### Процедура:

- Получаване на клетъчен лизат - във всяка 50 ml епруветка се смесват определени количества венозна кръв с лизиращия буфер до 15 ml
- Прибавяне на 25 µl Протеаза. Разрушаване на клетъчните стени- активно смесване 20 мин
- Прибавяне на Свързващ буфер (25ml) и магнитни частици (800 µl). Активно смесване 10 мин.
- Промиване на комплекса ДНК-магнитни частици последователно в Буфери от 3 до 6.
- Елуиране на ДНК в елуиращ Буфер EB (в зависимост от 500 до 1000µl)

Позициите на подвижния модул са номерирани във възходящ ред и в различните позиции се поставят епруветки със съответния буфер.

С цел създаване на ДНК биобанка на пациенти с тежка хронична спонтанна уртикария изолираните ДНК проби се съхраняват в криоепруветки и са са прибирани на -80°C, за да послужат за бъдещи генетични изследвания при тази пациентска група.

#### Таргетно секвениране от ново поколение (next-generation sequencing, NGS) на *SERPING1* гена

Генотипизирането на *SERPING1* на субекти, при които има съмнение за наследствен ангиоедем, дължащ се на C1-INH дефицит (C1-INH-NAE), е важно, както за клиничната практика, така и за изследователски цели.

За целите на анализа на *SERPING1* в неговата пълна дължина (всички екзони, интрони, промотор, 5'- и 3'-нетранслирани участъци -UTRs) бе конструиран дизайнерски панел на NGS, създаден с помощта на Ion AmpliSeq Thermo Fisher Scientific Designer. 77 ампликони в две групи праймери осигуряват 100% покритие на всички транслирани региони и UTRs с липсващи райони, разположени единствено в интроничните региони (общо покритие ≈83%). Допълнителни ампликони (общо 300) за различни гени във всички хромозоми, избрани измежду тези, кодиращи протеини, участващи в метаболизма на брадикинина, бяха включени в панела, за да се постигне по-стабилен анализ на CNVs.

Конструира се ДНК библиотека за всяка проба с помощта на Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Scientific). Накратко, 10 ng gDNA за праймерен пул е амплифициран и индексирен с уникален адаптер, използващ комплект адаптори за баркод Ion Xpress (Thermo Scientific). Равномерните

обеми на двата пула се комбинират и баркодните библиотеки се пречистват с помощта на Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter), количествено определено с Qubit 2.0 флуорометър (Thermo Scientific), разрежено до 100 pM и обединено в еквимоларно съотношение. Подготовката на шаблона беше извършена върху система OneTouch2, използвайки комплекта шаблони Ion OT2 HI-Q (Thermo Scientific) и обогатяването на йонните сферични частици (ISPs) върху Ion One Touch ES (Thermo Scientific). Секвенирането се провежда върху PGM, като се използва комплект за секвениране Ion PGM Hi-Q (Thermo Scientific) на 318 чип. Всички процедури са извършени съгласно инструкциите на производителя.

Секвенирането на необработените данни беше анализирано за базова последователност, демултиплексиране, привеждане в съответствие с hg19 референтния геном (GRCh37), анализ на покритието и вариации на софтуера на Torrent Suite 5.2, използвайки параметри по подразбиране. По-конкретно, вариантите бяха изследвани от VariantCaller v.5.2 plug-in и изследване на покритието от coverageAnalysis v.5.2.1.2 plug-in. Обобщение на вариантите и анализ на CNVs беше извършена върху софтуера на Ion Reporter v.5.2 (Thermo Scientific). Откритите варианти бяха анотирани с името на гена и вписани в базата данни dbSNP съгласно препоръките на Human Genome Variation Society (HGVS) (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). In silico прогноза за патогенност на вариантите беше извършена с помощта на биоинформационни инструменти на SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) и PolyPhen version 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). CNVs бяха открити от алгоритъма на Hidden Markov Model на софтуера на Ion Reporter v.5.2, използвайки двойния CNVs анализ и параметрите по подразбиране. Работният алгоритъм на CNV анализа използва определена дълбочина на покритие и е ограничен от броя и обхвата на ампликоните, които покриват засегнатите райони. Подредбата на всички получени *SERPING1* секвенции бяха визуално инспектирани, като се използва Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.2 (Broad Institute).

### **Верифициране на вариантите**

Всички идентифицирани варианти бяха потвърдени чрез секвениране по Sanger, както е описано по-рано от Speletas (Speletas, Szilagyi et al. 2015). Разкритите CNVs бяха потвърдени от комерсиално наличния MLPA кит (MRC-Holland за *SERPING1*) и от PCR с голям диапазон. В MLPA бяха анализирани 60 ng gDNA от всяка проба. Три референтни проби (без CNV), една положителна и една отрицателна контрола бяха включени. Всички процедури се извършиха съгласно инструкциите на производителите. Анализът на фрагментите беше извършен чрез ABI 3730xl (Applied Biosystems) и MLPA анализ на данните в софтуера Coffalyser.Net (MRC-Holland). Провеждането на PCR-а с голям диапазон се проведе, както е описано от Pappalardo (Pappalardo, Cicardi et al. 2000).

### **Статистически методи**

За обработката и анализирането на резултатите бяха използвани дескриптивен, корелационен и др. методи за анализ.

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен с програма Software package for statistical analysis (SPSS®), IBM 2009, версия 19 (2010) и Excel (v. 2014).

Графичните изображения, представящи статистическите данни, са изготвени основно с помощта на Excel и на SPSS v.19.

## **1. Дескриптивен анализ**

Използвахме методите на дескриптивната статистика за описание на демографската и клинична характеристика на пациентите, както и за представяне на данните от изследваните имунологични параметри.

## **2. Тестове за определяне нормалността на разпределението (Колмогоров-Смирнов, Шапиро-Уилкс)**

Тестовете за определяне на вида разпределение бяха използвани за проверка дали данните за определен имунологичен параметър са с нормално разпределение. Вида разпределение определя и преценката дали ще бъдат използвани параметрични или непараметрични тестове за сравнение на извадки.

## **3. Вариационен анализ**

Използвахме вариационен анализ при описание на количествени показатели с нормално или близко до нормалното разпределение.

## **4. Корелационен анализ**

Използвахме корелационен анализ – между категорийни признаци (метод на  $\chi^2$  - квадрат), между категорийни и количествени признаци (Дисперсионен анализ – ANOVA) и между количествени признаци (корелационен и регресионен анализ) за определяне на асоциация между два или повече показателя, какъв е нейният характер, съществува ли причинно-следствена връзка между показателите, съществува ли корелационна зависимост между показателите и клиничната активност.

**5.  $\chi^2$ -квадрат (chi-square) и точният тест на Фишер (Fisher`s exact test)** – за търсене на статистическа зависимост на качествените променливи.

**6. Т-тест при две независими извадки (Independent Samples T-Test)** - проверка за равенство на две средни при нормално разпределение.

**7. Непараметричен тест на Mann-Whitney** – за проверка на хипотези за различие на две независими извадки.

## 5. Резултати

Резултатите са групирани в 6 глави, според поставените за изпълнение на целта задачи.

### ГЛАВА 1

#### Предлагане на съвременна клинична и патофизиологична класификация при пациентите с ангиоедем

Настоящата класификация на ангиоедема без уртикария е разработена от Cicardi и Международната работна група за Наследствен ангиоедем (HAWK) (Cicardi, Aberer et al. 2014), като в нея се разграничават две основни групи ангиоедем: наследствен (HAE) и придобит (AAE).

Налага се осъвременяване в частта отнасяща се към HAE с нормален C1-INH (**nIC1-INH-HAE**), поради бурното откритие на нови патогенни мутации през изминалите години: Фактор 12, плазминоген и ангиопоетин-1 (Bork, Wulff et al. 2009, Bork, Wulff et al. 2017, Bafunno, Firinu et al. 2018). Предлагаме актуализиране на клиничната класификация на Cicardi и Международната работна група за Наследствен ангиоедем (HAWK).

Фигура 1. Клинична класификация на ангиоедема: предложена актуализация според Cicardi et al. (Cicardi, Aberer et al. 2014)

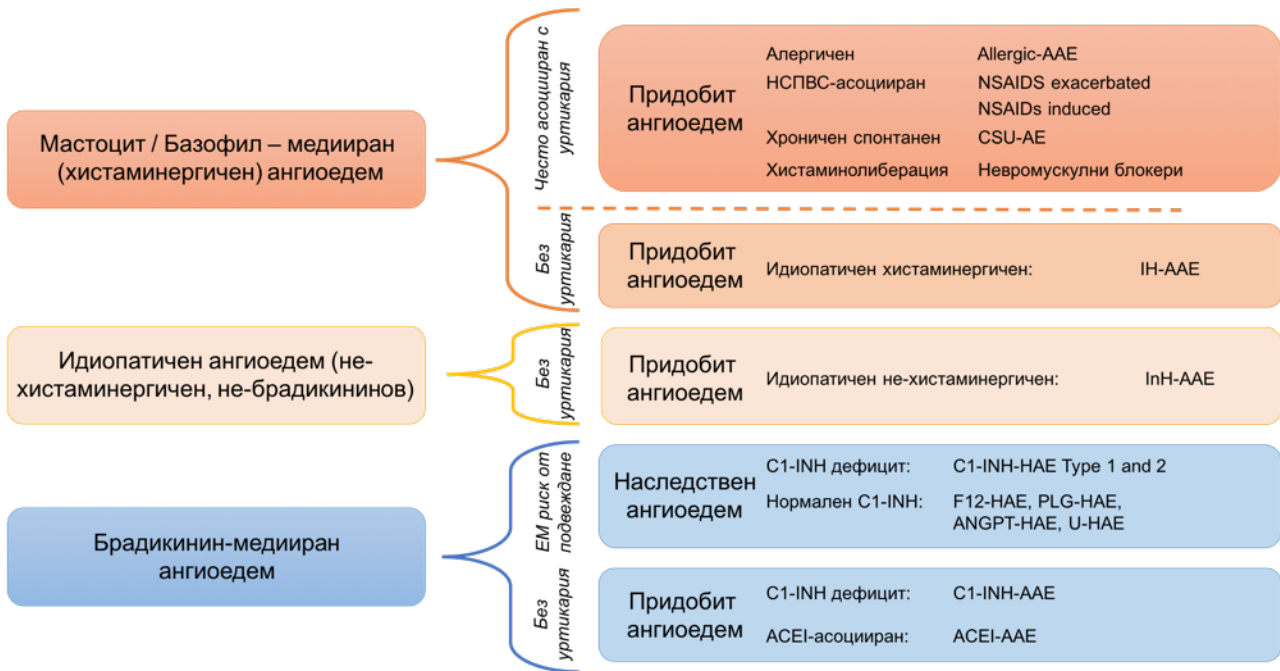


Легенда: наследствен ангиоедем (HAE), дължащ се на C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-HAE); наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитор (nIC1-INH-HAE); придобит ангиоедем, дължащ се на C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-AAE); придобит идиопатичен не-хистаминергичен ангиоедем (InH-AAE); асоцииран с прием на АСЕ инхибитори придобит ангиоедем (ACEI-AAE);

НАЕ с мутация на Фактор 12 (F12-НАЕ); НАЕ с мутация на плазминоген (PLG-НАЕ); НАЕ с мутация на ангиопоетин-1 (ANGPT1-НАЕ); НАЕ с неизвестна мутация (U-НАЕ, unknown).

Предлагаме и **оригинална патофизиологична класификация**, която застъпва нова хипотеза за съществуване на припокриване (overlap) между медиаторите при недобре характеризираните форми на идиопатичен ангиоедем.

Фигура 2. Патофизиологична класификация на ангиоедема



Легенда (допълнение): CSU-AAE – хронична спонтанна уртикария и ангиоедем; NSAIDS – НСПВС, нестероидни противовъзпалителни средства.

## ГЛАВА 2

*Изследване на пациенти с прояви на хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария чрез оценка показатели за минимално-персистиращо системно възпаление*

При 45 болни с хистаминергичен ангиоедем и хроничната уртикария определихме нива на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1, чрез имуноензимни методи (ELISA) и ги сравнихме с данни за нива на посочените цитокини при здрави лица. Изследван бе витамин Д статуса на пациентите с ХУ. Изследванията бяха обезпечени по проект Млад Изследовател от конкурса на МУ-София за финансиране на научни проекти на докторанти (Договор №8-Д/2015 г., Проект вх. № 270/14.01.2015 г.).

### Пациентска група

Разпределението на пациентите с ХУ и здравите лица е показано на таблица 1.

Таблица 3. Характеристики на изследваните пациенти с ХУ

	ХУ пациенти	Здрави лица
Брой	45	10
Възраст (години) ± SD	46.71 ± 18.46	31.90±6.86
Пол		
Мъже	12 (26.7%)	5 (50%)
Жени	33 (73.3%)	5 (50%)

Според клиничните белези и съпътстваща медикаментозна терапия, болните бяха групирани в 2 групи: лека/средно тежка и тежка/много тежка ХУ. Тези групи бяха определени според нуждата от редовна контролираща терапия (1, 2, 3 или 4 таблетки неседативен антихистамин) и/или липсата на контрол при оптимална антихистаминова терапия (според приетите международни гайдлайни за лечение на болестта (Zuberbier, Aberer et al. 2018), употребата на биологична терапия (анти-IgE, omalizumab) и/или редовна употребата на системен кортикостероид.

Таблица 4. Характеристики на изследваните пациенти с ХУ според тежестта на болестта

	Лека/средно тежка	Тежка/много тежка
Брой	24 (53,3%)	21 (46,7%)
Възраст (години) ± SD	29.33 ± 24.86	45.00 ± 28.16
Пол		
Мъже	9 (37.5)	3 (14.3%)
Жени	15 (62.5%)	18 (85.7%)

Не се открива статистическа разлика според възрастта и пола на пациентите от двете групи ( $p > 0.05$ ).

### Клинични и имунологични резултати

При изследваните болни, освен включените в проекта параметри, използвахме и данни от рутинни клинични изследвания при същите болни с оглед сравняването на маркерите, както и клиничните характеристики на болестта.

Таблица 5. Стойности на изследваните лабораторни показатели

	hsCRP	СУЕ	D-димер	Общи IgE	25-OH-vit.D	Моноцити
Средна $\pm$ SE	3,56 $\pm$ 0,55	11,57 $\pm$ 1,51	0,79 $\pm$ 0,17	136,86 $\pm$ 28,97	42,39 $\pm$ 3,03	0,43 $\pm$ 0,02
Лека/средно тежка ХУ	1.97 $\pm$ 0.45	8.09 $\pm$ 1.32	0.51 $\pm$ 0.13	173,80 $\pm$ 48,35	47,50 $\pm$ 4,18	0.42 $\pm$ 0.04
Тежка/много тежка ХУ	5.37 $\pm$ 0.94	15.38 $\pm$ 2.62	1.09 $\pm$ 0.33	96,03 $\pm$ 27,96	36,52 $\pm$ 4,13	0.43 $\pm$ 0.03
p-value	<b>0.03</b>	<b>0.015</b>	ns	ns	<b>0.06</b>	ns

Нивата на изследваните показатели са изследвани според изискванията на клиничната лаборатория, при различните групи болни. Разликите между болните лица са приети за сигнификантни при  $p < 0.05$ .

Статистически значими разлики се откриха за hsCRP и СУЕ в зависимост от тежестта на болестта.

Има набелязана тенденция в зависимост от статуса на 25-OH-витамин Д при пациентите с тежка ХУ, макар статистическа значимост да не може да бъде достигната при изследвания брой пациенти.

Според наличието или отсъствието на съпътстващ ангиоедем, белези на аутоимунен тиреоидит, положителен автоложен тест със собствен серум - данните за изследваните показатели са представени в Таблица 4:

Таблица 6. Болни според наличието на ангиоедем, аутоимунен тиреоидит, положителен автоложен тест със собствен серум.

N=45	Ангиоедем	Аутоимунен тиреоидит	ASST
Да	31 (68,9%)	11 (24,4%)	28 (62,2%)
Не	14 (31,1%)	34 (75,6%)	17 (37,8%)

ASST – Autologous Serum Skin Test

По отношение на изследваните цитокини (IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1) беше направена проверка на нормалността на показателите чрез One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test. За IL-6, CCL2/MCP-1 бе установено нормално разпределение на показателите, подари което бяха използвани параметрични тестове за статистически анализ. За IL-10, IL-33 се установи, че разпределението не е нормално и съответно бяха приложени непараметрични тестове.

Стойностите, получени за IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ и при здрави контроли са представени в Таблица 5. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SE.

Таблица 7. Стойности на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ и при здрави

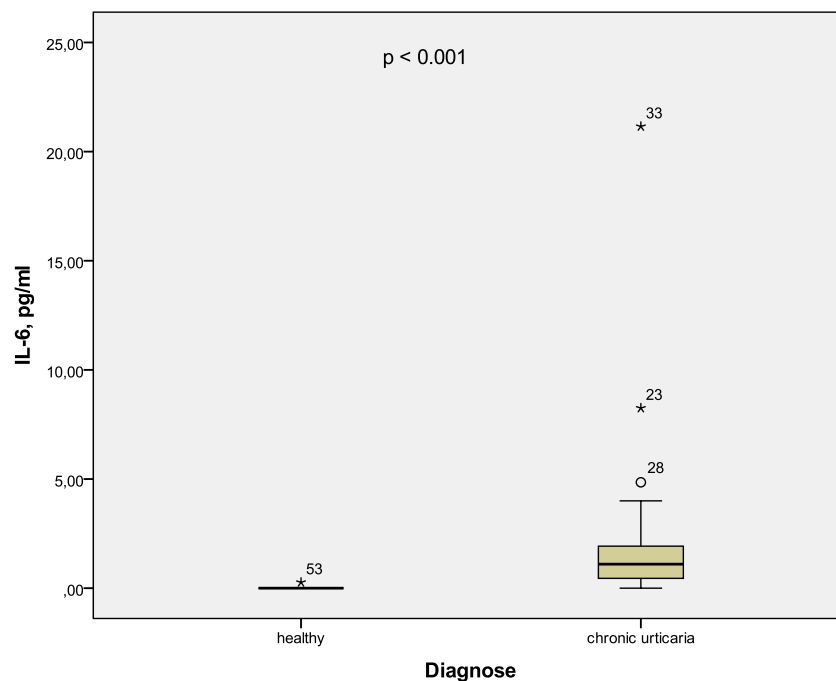
контроли.

Параметър	Пациенти ХУ	Здрави контроли	p-value
IL-6, pg/ml	1.91 ± 0.50	0.03±0.02	<0.001
IL-10, pg/ml	5.91 ± 0.48	0.86 ± 0.51	<0.001
IL-33, pg/ml	0.89 ±0.41	5.04 ± 1.02	0.005
MCP1/CCL2, pg/ml	80.41 ± 5.61	58.02 ± 6.45	0.076

Установените разлики в нивата на IL-6, IL-10, IL-33 пациенти с ХУ и здрави са статистически значими. Данните за IL-6 имат потвърдителен характер, както е установено и от други международни изследователски екипи. **Установените разлики в нивата на IL-10 и IL-33 не са съобщавани в реферираната медицинска периодика до момента и представляват оригинален принос в изследването на тези цитокини при пациенти с ХУ.**

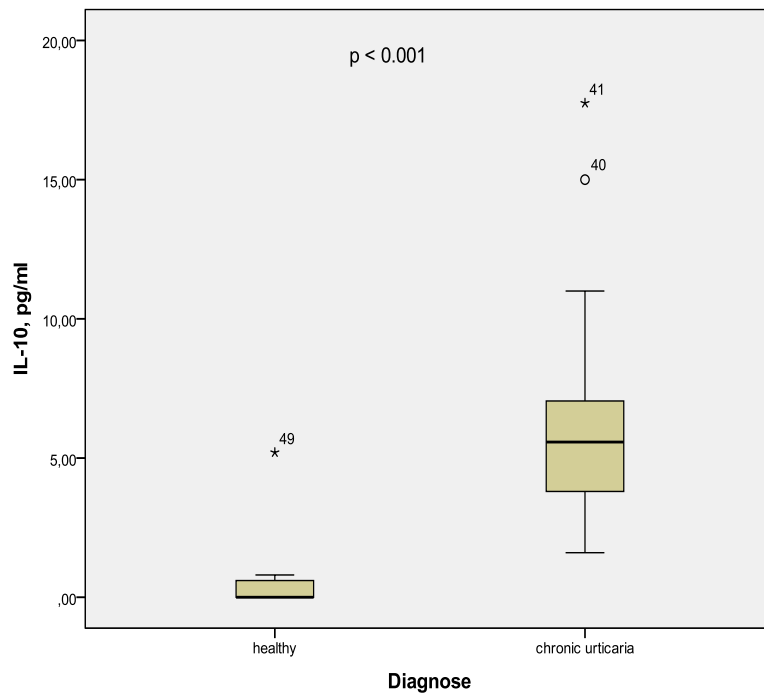
Приложени по-долу са Фигура 3, 4 и 5, съответно за всеки един от изследваните цитокини.

Фигура 3. Съпоставка стойностите на IL-6 при пациенти с ХСУ и здрави.

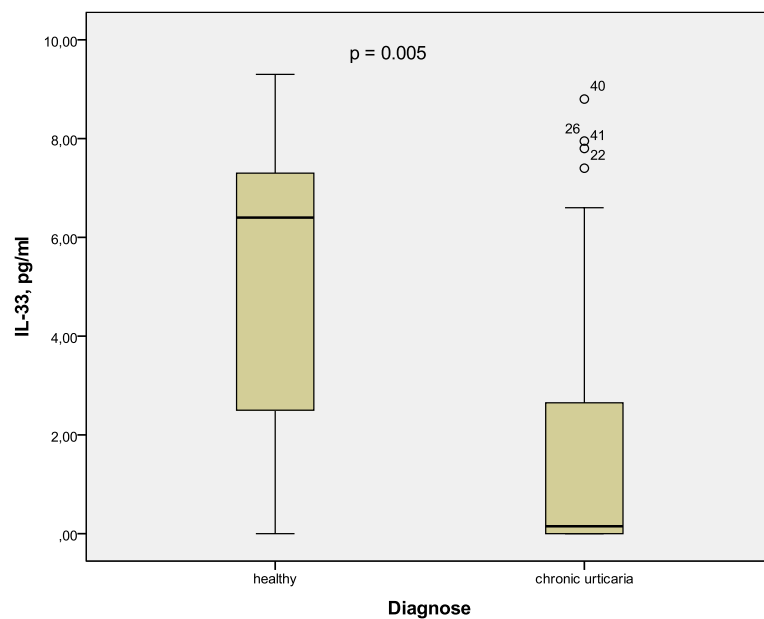




Фигура 4. Съпоставка стойностите на IL-10 при пациенти с ХУ и здрави.



Фигура 5. Съпоставка стойностите на IL-33 при пациенти с ХУ и здрави.



Последната Фигура 5 прави особено впечатление, тъй като показва по-ниски средни нива на IL-33 при болни, отколкото при здрави, с изключение на 4 болни, които имат стойности над средната за здрави.

Изследвана беше и разликата в нивата на цитокините според тежестта на болестта. Не бяха открити сигнификантни разлики в нивата на IL-6, IL-10, IL-33 пациенти с лека и тежка ХУ. Забелязват се по-високи нива на IL-6 и IL-33 при болни с тежка/много тежка ХУ, но без достигане на статистически значима разлика ( $p=0.473$ ).

Таблица 8. Стойности на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ според тежестта на болестта.

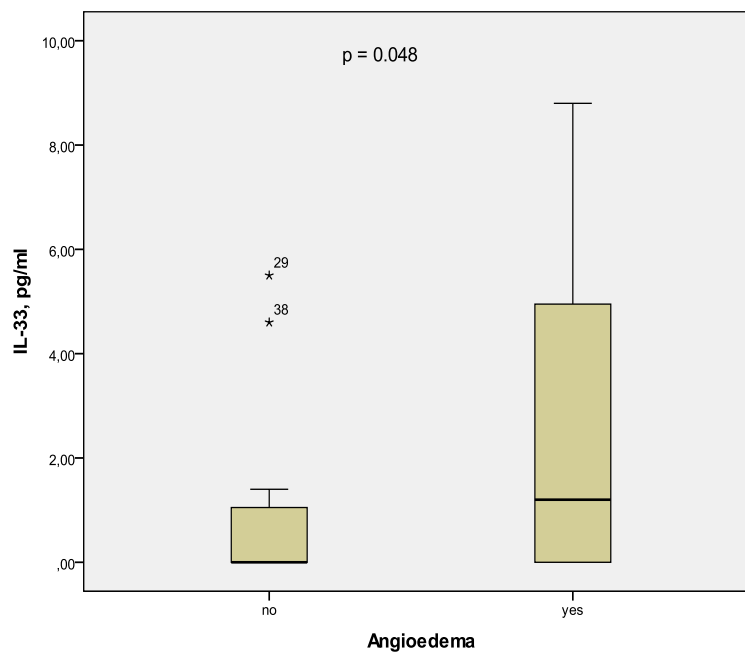
Параметър	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml	IL-33, pg/ml	MCP1/CCL2, pg/ml
Лека/средно тежка ХУ	1.27 ± 1.14	6.19 ± 0.78	1.67 ± 0.56	96.68 ± 7.61
Тежка/много тежка ХУ	2.60 ± 1.01	5.62 ± 0.56	2.14 ± 0.63	84.68 ± 8.41
P-value	0.473	0.925	0.451	0.483

Според разликата в нивата на IL-6, IL-10, IL-33 и наличието на съпътстващ ангиоедем са представени в Таблица 9. Открита беше сигнификантна разлика според нивото на IL-33.

Таблица 9. Стойности на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ според наличието на ангиоедем.

Параметър	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml	IL-33, pg/ml	MCP1/CCL2, pg/ml
Ангиоедем	2,31 ± 0,72	5,92 ± 0.67	2,36 ± 0.55	78.69 ± 7.41
Без ангиоедем	1,05 ± 0,25	5.91 ± 0.52	0,90 ± 0.48	84.23 ± 7.81
P-value	0.226	0.480	<b>0.048</b>	0.653

Фигура 6. Стойности на IL-33 при пациенти с ХУ според наличието на ангиоедем.



Според наличието на съпътстващ автоимунен тиреоидит и разликата в нивата на IL-6, IL-10, IL-33 не бяха установени сигнификантни разлики. Данните за всички цитокини и наличие на автоимунен тиреоидит са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Стойности на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ според наличието на автоимунен тиреоидит.

Параметър	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml	IL-33, pg/ml	MCP1/CCL2, pg/ml
<b>АТ</b>	1,93 ± 0,80	5,90 ± 0.80	1,37 ± 0.64	86.50 ± 13.86
<b>Без АТ</b>	1,90 ± 0,61	5.92 ± 0.59	2,05 ± 0.51	78.44 ± 6.02
<b>P-value</b>	ns	ns	ns	ns

Според ASST и разликата в нивата на IL-6, IL-10, IL-33 не бяха установени сигнификантни разлики. Данните за всички цитокини и ASST са представени в Таблица 11.

Таблица 11. Стойности на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ според наличието ASST.

ASST	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml	IL-33, pg/ml	MCP1/CCL2, pg/ml
<b>(+) ASST</b> Положителен	2,28 ± 0,80	5,56 ± 0.64	1,93 ± 0.51	78.67 ± 7.22
<b>(-) ASST</b> Отрицателен	1,32 ± 0,29	6.48 ± 0.73	1,83 ± 0.73	83.28 ± 9.14
<b>P-value</b>	ns	ns	ns	ns

Беше направен корелационен анализ на променливите, които не са категорични (непрекъснати). Данните от установените корелации които са представени в Таблица 12.

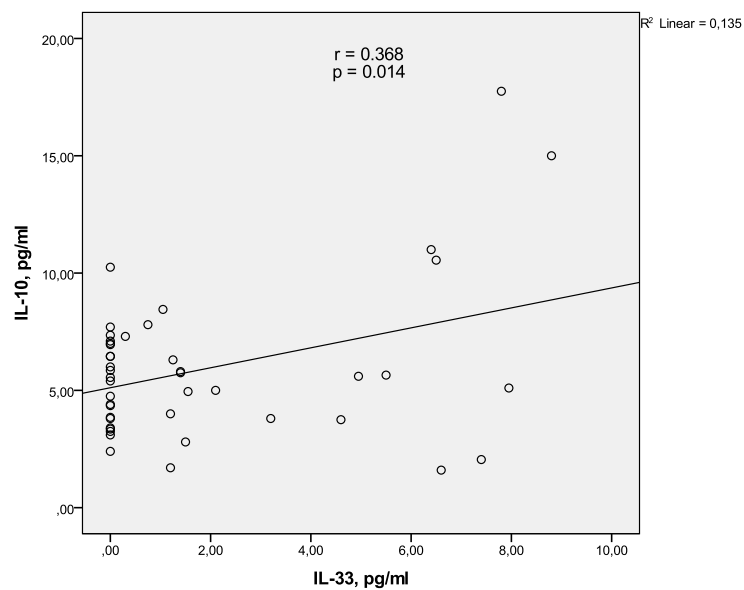
Открити бяха слаби корелации с коефициент под  $r=0.5$ , които са значими ( $p<0.05$ ).

Таблица 12. Корелации между лабораторни и имунологични показатели.

	IL-6	IL-10	IL-33	CCL2/MCP-1	D-dimer	Моноцити	hsCRP	СУЕ
IL-6		n.s.	n.s.	r = 0.426 p = 0.001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IL-10			r = 0.368 p = 0.014	n.s.	n.s.	r = 0.420 p = 0.006	n.s.	n.s.
IL-33				r = -0.281 p = 0.040	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CCL2/MCP-1					n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
D-dimer						n.s.	n.s.	r = 0.476 p = 0.007
Моноцити							n.s.	n.s.
hsCRP								r = 0.417 p = 0.005
СУЕ								

На следващата фигура е представена графика на корелацията между IL -10 - IL-33.

Фигура 7. Корелация между IL -10 - IL-33.



### ГЛАВА 3

*Изследване на пациентите с прояви на редки форми на брадикинин-медиран ангиоедем, чрез оценка на техните демографски, клинични и имунологични показатели*

Няма публикувани актуални данни за редките брадикинин-медиранни форми на ангиоедем в България.

Нашата цел е да идентифицираме клиничните и лабораторните характеристики, както и терапевтичните особености на пациентите с редки форми на брадикинин-медиран ангиоедем в българската популация.

#### Пациентска група

#### Период 1971-2012

Ретроспективно изследваните данни са за периода 1972-2012 от поставянето на първата диагноза НАЕ в България от проф. д-р Божко Божков и обхващат информация, съхранявана в Регистъра за НАЕ, който е създаден към Клиниката по алергология на УМБАЛ “Александровска” за целите на по-добро проследяване и грижа за пациентите с редки форми на ангиоедем.

Информацията в Регистъра за НАЕ е периодично обновявана през годините, като обобщените данни сочат, че за периода 1972-2012: единствената потвърдена диагноза на брадикинин-медиран ангиоедем е този, дължащ се на дефицит на C1-INH (количествен или качествен). Обобщена е информация за всички семейства с поставена диагноза на рядка форма на ангиоедем, тяхната фамилна история, фамилно дърво и проведени изследвания за диагностика на ангиоедема. Данните за пациентите с доказано заболяване са представени в Таблица 13:

Период 1972-2012		Брой	%
Пациенти с АЕ	Общо	202	100%
	Тип 1	171	85%
	Тип 2	26	13%
	Неизяснени	5	2%
Фамилии с АЕ	Общо	41	100%
	Тип 1	28	68%
	Тип 2	12	29%
	Неизяснени	1	2%
Пол	Жени	91	45%
	Мъже	111	55%

*Демографска характеристика*

Общият брой на проследяваните болни е 202, от които 91 са жени и 111 мъже. Разпределението между С1-ИНН-НАЕ тип 1 и 2 е 171 (85%) към 26 (13%), респективно.

Броят на фамилиите с рядка форма на ангиоедем е 41, от които 28 са С1-ИНН-НАЕ тип 1 (68%), 12 С1-ИНН-НАЕ тип 2 (29%).

Сред пациентите, в 86% от случаите (174 болни) има данни за положителна фамилна анамнеза за ангиоедем в предходни поколения, докато при 10% фамилна анамнеза липсва (20 болни):

Таблица 14.

Период 1972-2012		Брой	%
<b>Фамилна анамнеза (ФА)</b>	Положителна ФА	174	86%
	Отрицателна ФА	20	10%
	Неизяснена ФА	8	4%
<b>Възраст на проява АЕ</b>	Средна (обхват)	14.64 години	(1-54)
<b>Забавяне на диагнозата</b>	Средна (обхват)	10.21 години	(0-44)
<b>Проследяване след 2012</b>	Проследяващи се	46	23%
	Загинали	56	27%
	Загубени от проследяване	100	50%

Средната възраст на поява на оплакванията от ангиоедем е 14.64 години (обхват, 1-54 години). Средното забавяне от проява на симптомите до поставяне на правилна диагноза е 10.21 години (обхват, 0-44 години). Активно проследявани след 2012 са 23% от болните (46 от диагностицираните преди 2012 година). Загубени от проследяване са 50% от болните (100 пациенти).

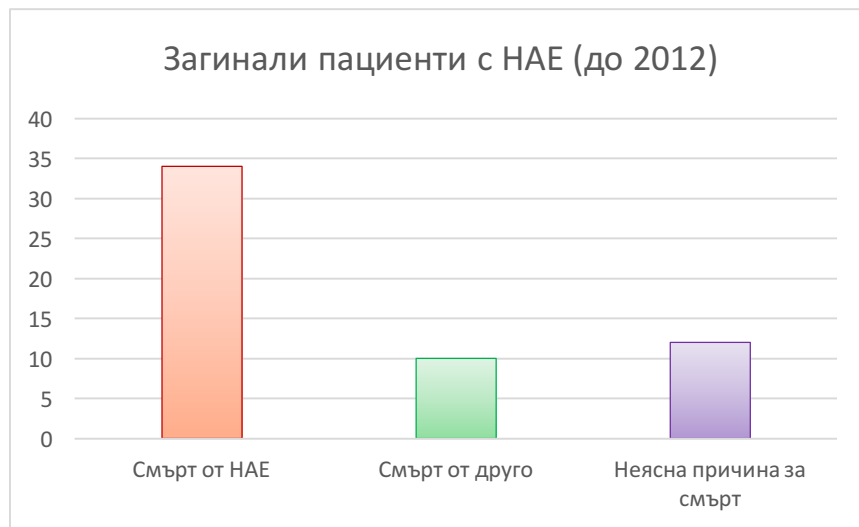
*Смъртни случаи*

Загинали преди 2012 година са 27% от пациентите (56 пациенти: 28 жени и 28 мъже). Средната възраст на смъртта е 36.6 години.

Сред загиналите проследихме каква част от пациентите са загинали в резултат на НАЕ и данните са обобщени в Таблица 15:

Период 1972-2012		Брой	Процент	Възраст при смъртта (средна)
<b>Загинали пациенти с НАЕ</b>		56 (28 жени)	100%	36.6 години
	От НАЕ	34 (18 жени)	60.7%	33.3 години
	От друго	10 (6 жени)	17.9%	66.7 години
	Неясна причина за смърт	12 (4 жени)	21.4	21.3 години

Фигура 8



Загиналите в резултат на оток на ларинкса и смърт от асфиксия са 60.7% (34 пациенти: 18 жени и 16 мъже). Средната възраст на смъртта е 33.3 години. Загиналите в резултат на друга причина (различна от НАЕ) са 17.9% (10 пациенти: 6 жени) със средна възраст на смъртта 66.7 години. Загиналите в резултат на неясна причина (липсва информация дали причината е НАЕ или друго заболяване) са 21.4% (12 пациенти, 4 жени), със средна възраст при смъртта 21.3 години.

Последната смърт в резултат на НАЕ е регистрирана през 1998 година (пациент на 30 години).

Сравнихме какво е разпределението между пациентите с или без поставена диагноза НАЕ към момента на смъртта в резултат на НАЕ (фатален оток на ларинкса).

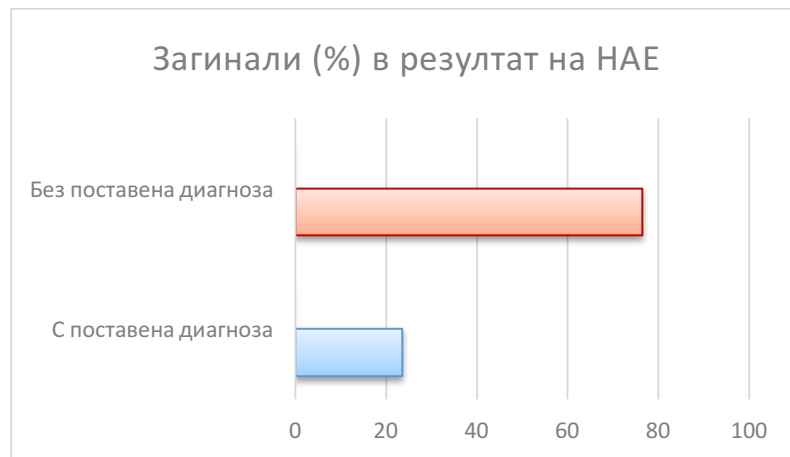
Данните сочат, че едва при 23.5% от случаите (8 пациенти) смърт е настъпила при налична поставена диагноза и известен НАЕ в резултат на C1 инхибиторен дефицит.

Мнозинството от смъртните случаи (76.5%, 26 болни) са получили фатален ларингеален оток преди диагностициране на НАЕ в семейството:

Таблица 16.

Загинали в резултат на НАЕ	Брой	Процент
С поставена диагноза	8	23.5%
Без поставена диагноза	26	76.5%

Фигура 9.

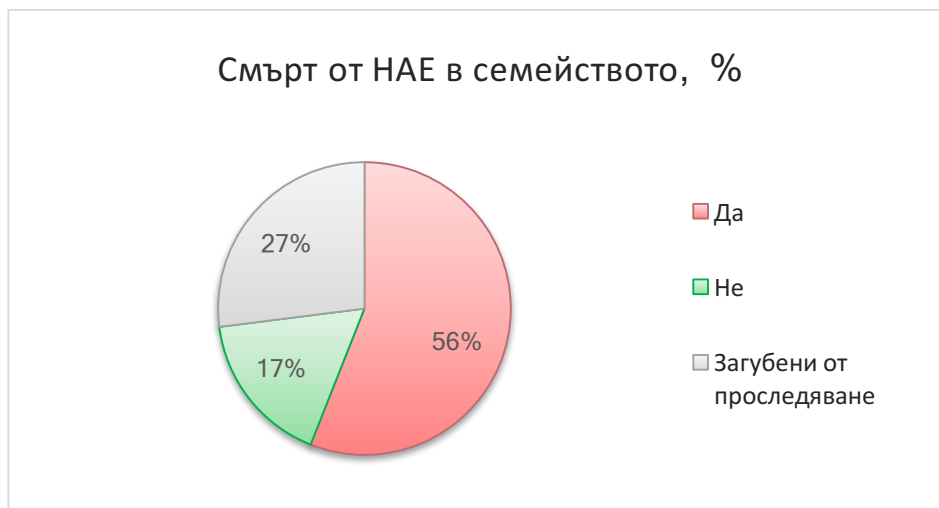


Историята за смъртен случай от НАЕ в семейството е налична при 56% от фамилиите (23 броя). Едва в 17% от фамилиите не е наблюдаван случай на смърт от НАЕ (7 фамилии). При останалите 27% тази информация не е категорична, тъй като представителите от тези фамилии са загубени от проследяване.

Таблица 17.

Период 1972-2012		Брой	%
Смърт от НАЕ във фамилията	Да	23	56%
	Не	7	17%
	Загубени от проследяване	11	27%

Фигура 10.



Загубените от проследяване фамилии са 21 броя: 11 на C1-INH-НАЕ тип 1 (18 пациенти), 6 фамилии с C1-INH-НАЕ тип 2 (8 пациенти) и една фамилия, при която не може да се заключи дали е тип 1 или 2 (4 пациенти).

При 3 фамилии е настъпила смърт на всички засегнати членове на семейството.

Таблица 18.



Период 1972-2012		Брой	Членове на същите фамилии
<b>Загубени фамилии с АЕ</b>	Общо	21	33
	Тип 1	11	18
	Тип 2	6	8
	Неизяснени	1	4
<b>Смърт на цялата фамилия</b>	Тип 1	2	2
	Тип 2	1	1

Разпределението на загубените от проследяване пациенти по вид на НАЕ е показано в Таблица 19:

Период 1972-2012		Брой	Процент %
<b>Загубени от проследяване пациенти с АЕ</b>	Общо	100	100%
	Тип 1	88	88%
	Тип 2	8	8%
	Неизяснени	4	4%

### Период 2013-2018

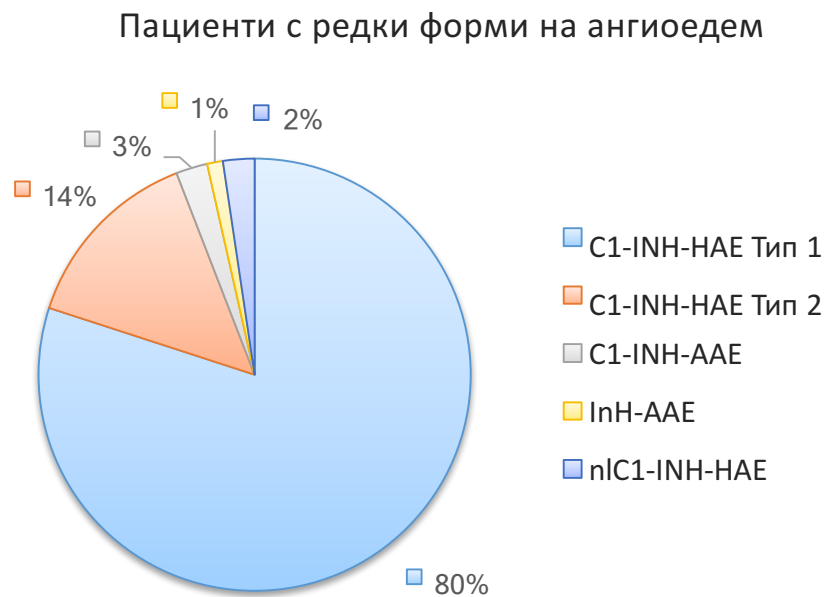
Проспективно проследяване на пациентите с редки форми на ангиоедем бе проведено за периода 2013-2018 година. Пациентите бяха групирани спрямо техните демографски, клинични характеристики, както и терапевтично поведение.

Данните обобщени за пациентите са представени в следващите таблици.

Таблица 20.

Период 2013-2018		Брой	Процент %
<b>Пациенти с АЕ</b>	Общо	85	100%
	C1-INH-НАЕ Тип 1	68	80.0% (85.0 от НАЕ)
	C1-INH-НАЕ Тип 2	12	14.1% (15.0 от НАЕ)
	C1-INH-ААЕ	2	2.4%
	InH-ААЕ	1	1.1%
	nIC1-INH-НАЕ	2	2.4%
<b>Фамилии с C1-INH-НАЕ</b>	Общо	26	100%
	Тип 1	22	84.6%
	Тип 2	4	15.4%

Графично е представено разпределението между отделните редки форми на ангиоедем в следната графика:  
 Фигура 11.



#### Демографска характеристика

Демографските характеристики на пациентите с C1-INH-NAE и придобит ангиоедем ААЕ са представени в следната таблица:  
 Таблица 21.

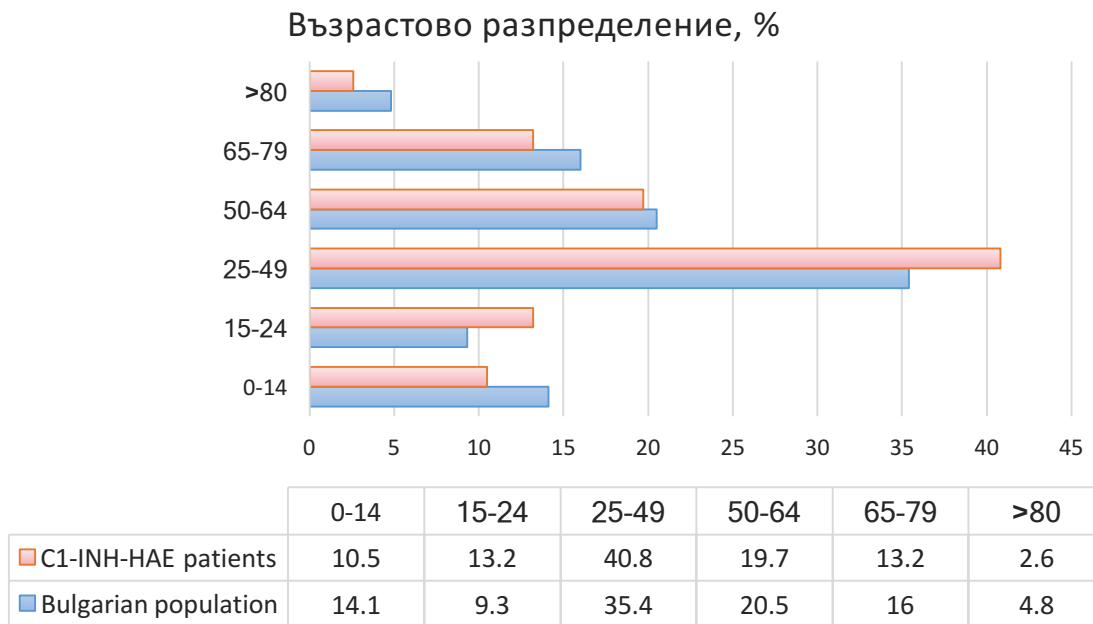
Период 2013-2018			
Възраст (към 2018 г)		Средна	Обхват
	C1-INH-NAE	43	(8-84)
	AAE	55	(48-62)
		Брой	Процент %
<b>Пол C1-INH-NAE</b>	Жени	43	53.7%
	Мъже	37	46.3%
<b>Пол ААЕ</b>	Жени	3	60%
	Мъже	2	40%

Средната възраст на пациентите с НАЕ е 43 години (обхват, 8-84 г), докато при ААЕ тя е 55 години (48-62 г).

Процентното разпределение спрямо пол при C1-INH-NAE е 54:46% (ж:м), което е очаквано предвид автозомно доминантния тип на унаследяване на болестта.

Изчислим процентното възрастово разпределение при C1-INH-NAE и го сравним с това на българската популация.

Фигура 12. Възрастово разпределение на българската популация и С1-INH-НАЕ.



При С1-INH-НАЕ прави впечатление по-ниското застъпване сред възрастовите групи 0-14 г и >65 г. Проследихме данните за наличие или отсъствие на фамилна анамнеза за ангиоедем в семейството. Положителна такава се наблюдава в 80 % от случаите.

Изчислена бе средната възраст на поява на симптомите на НАЕ: 10.4 години (обхват, 1-50).

Изчислена бе и средната възраст на поставяне на диагнозата НАЕ: 27.2 години (обхват, 2-79).

Изчисленото време за поставяне на диагнозата е 16.8 години (0-74 г).

Средната продължителност на проследяване на пациентите в Клиничния център по алергология и Клиниката по алергология на УМБАЛ “Александровска” е 16 години (1-42 г).

Таблица 22. Фамилна анамнеза, възраст на проява на симптомите и поставяне на диагнозата.

Период 2013-2018	С1-INH-НАЕ	Брой	Процент %
<b>Фамилна анамнеза (ФА)</b>	Положителна ФА	64	80%
	Отрицателна ФА	16	20%
<b>Възраст на проява</b>	Средна (обхват)	10.4 години	(1-50)
<b>Възраст при диагнозата</b>	Средна (обхват)	27.2 години	(2-79)
<b>Забавяне на диагнозата</b>	Средна (обхват)	16.8 години	(0-74)
<b>Продължителност на проследяването в Клиниката по алергология</b>	Средна (обхват)	16.0 години	(1-42)

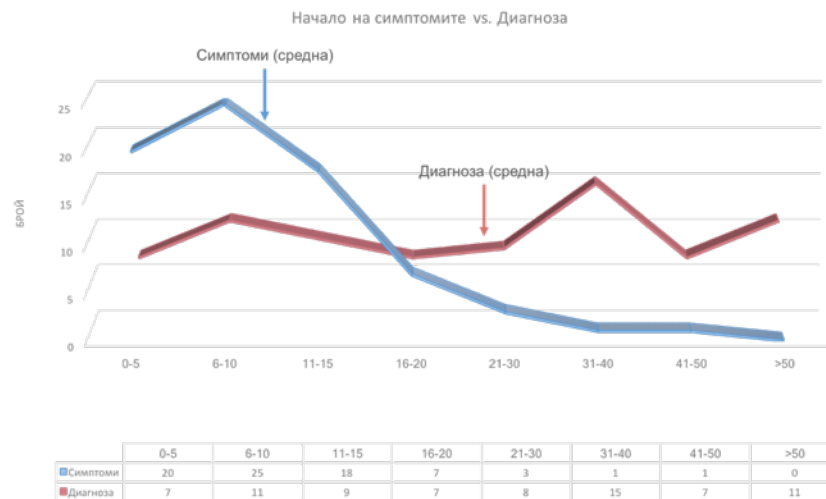
Направено бе съпоставяне на двата показателя: възраст на проява на НАЕ и възраст при диагностициране на НАЕ.

Графичното изобразяване представя разминаването между двата показателя и ниското разпределение на диагнозата в ранните години на живота.

Таблица 23.

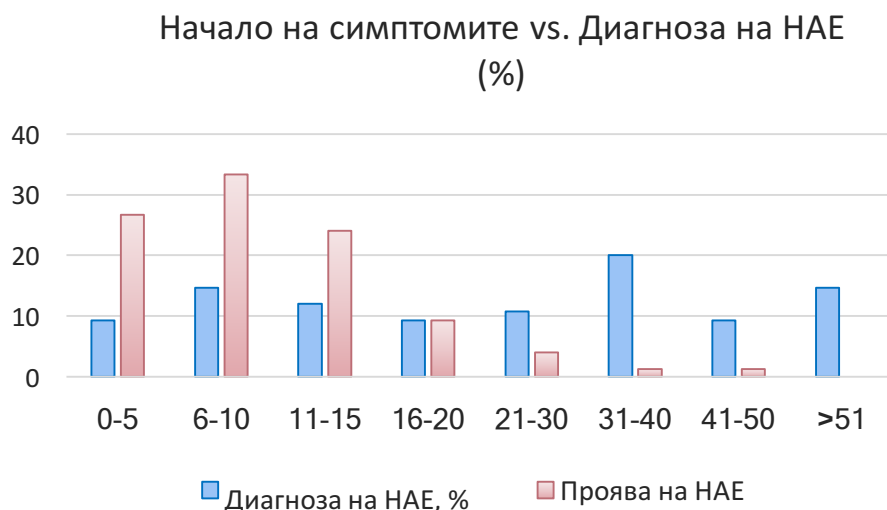
n=75	0-5	6-10	11-15	16-20	21-30	31-40	41-50	>51
<b>Проява на НАЕ</b>	20 (26.7%)	25 (33.3%)	18 (24.0%)	7 (9.3%)	3 (4.0%)	1 (1.3%)	1 (1.3%)	0 (0.0%)
<b>Диагноза на НАЕ</b>	7 (9.3%)	11 (14.7%)	9 (12.0%)	7 (9.3%)	8 (10.7%)	15 (20.0%)	7 (9.3%)	11 (14.7%)

Фигура 13.



Данните сочат, че 93.3% от пациентите получават първите си симптоми до 20 годишна/възраст, докато едва 45.3% получават диагноза преди навършване на тази възраст.

Фигура 14.



### Смъртни случаи

За периода 2013-2018 бяха регистрирани 4 смъртни случая на пациенти с С1-INH-НАЕ:

- 2 в резултат на сърдечно-съдово заболяване (усложнения в резултат на мозъчен инсулт и остър миокарден инфаркт),

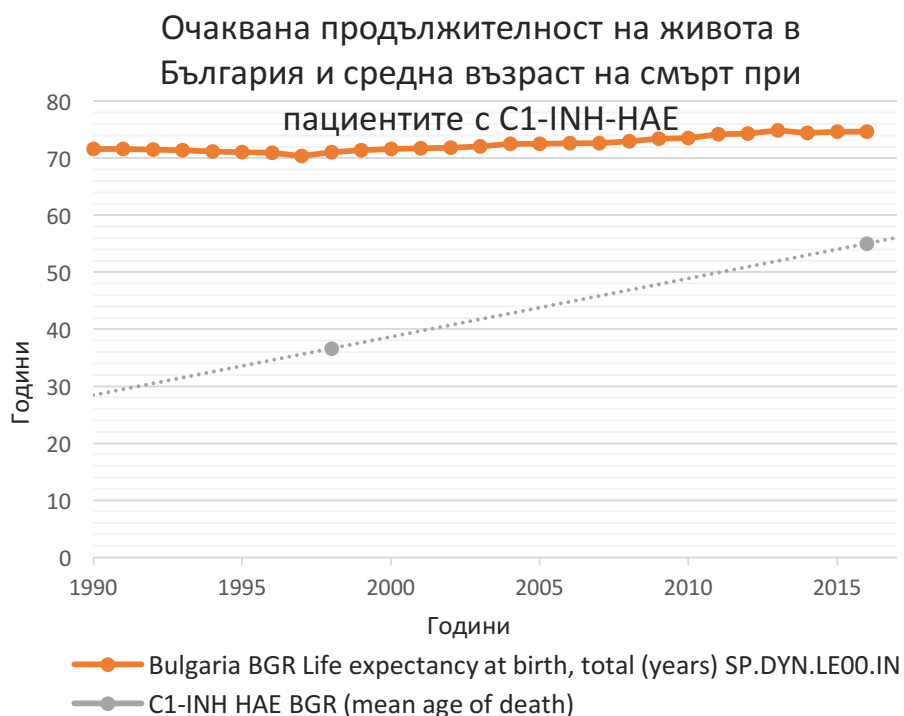
- 1 в резултат на дисеминирано злокачествено заболяване (метастатичен рак на млечната жлеза) и
- 1 в резултат на усложнения на неврологично заболяване (болест на Паркинсон).  
Не бе регистриран нито един случай на смърт в резултат на фатален ларингеален оток.

Таблица 24.

Период 2013-2018	C1-INH-HAE	Брой	Процент	Възраст при смъртта (средна)
<b>Загинали пациенти с HAE</b>		4 (3 мъже)	100%	55.0 години
	От HAE	0	0%	-
	От друго	4	100%	55.0 години
<b>Причини за смъртта</b>	Сърдечно-съдово заболяване	2	50%	49.5 години
	Злокачествено заболяване	1	25%	47.0 години
	Неврологично заболяване	1	25%	74.0 години

Средната възраст на загиналите пациенти е 55.0 години, което се наблюдава приблизително към очакваната продължителност на живота в българската популация.

Фигура 15.



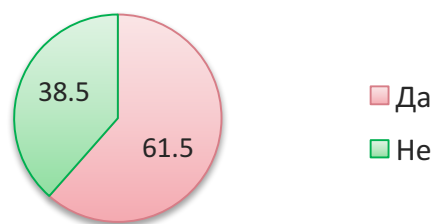
Данните за наличие или отсъствие на смърт от НАЕ във фамилията са съответно 61.5% към 38.5%, което е представено в следващите таблица и фигура.

Таблица 25.

Период 2013-2018	С1-ИНН-НАЕ	Брой	Процент %
Смърт от НАЕ във фамилията	Да	16	61.5%
	Не	10	38.5%

Фигура 16.

Смърт от НАЕ в семейството, %



#### Клинични прояви на НАЕ

Клиничните прояви на НАЕ спрямо локализациите на ангиоедем са обобщени в следната таблица: 98.8% представят периферни подкожни отоци, 98.7% – оро-фациални отоци, 91.9% - болезнени коремни кризи, 65.7% генитални отоци, 44.3% - ларингеални отоци.

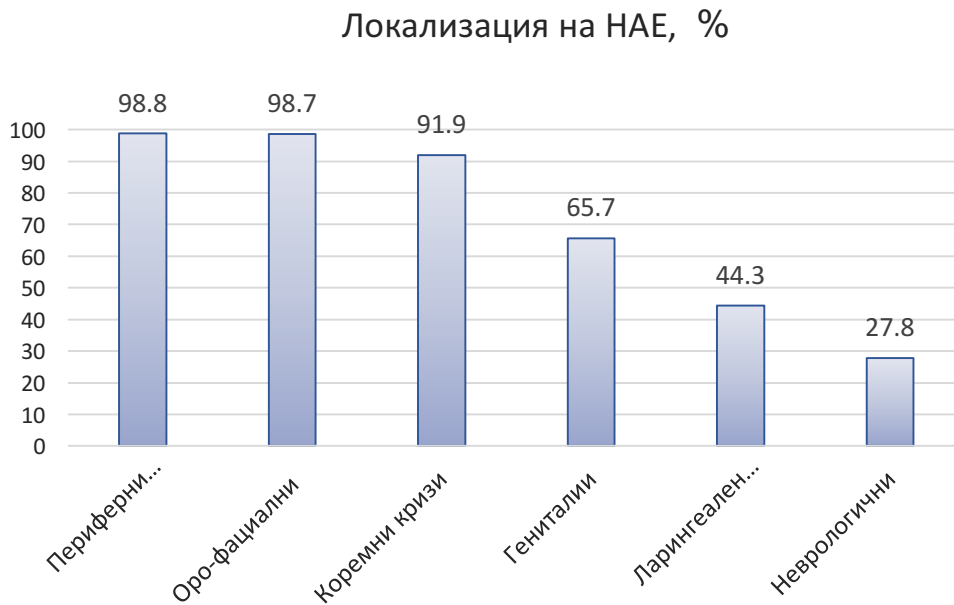
Известен процент от пациентите свързват неврологична симптоматика (главоболие, дезориентация) като прояви на НАЕ – 27.8%.

Данните са представени в табличен и графичен вид: прояви на ангиоедем, спрямо процента пациенти, съобщаващ за подобни локализации.

Таблица 26.

Период 2013-2018	С1-ИНН-НАЕ	Случаи (n/80)	Процент %
Локализация на атаките при С1-ИНН-НАЕ	Периферни отоци	79 / 80	98.8%
	Оро-фациални	78 / 79	98.7%
	Коремни кризи	68 / 74	91.9%
	Гениталии	48 / 73	65.7%
	Ларингеален оток	35 / 79	44.3%
Симптоми, асоциирани като прояви на НАЕ	Неврологична симптоматика (главоболие, дезориентация)	20 / 72	27.8%

Фигура 17.



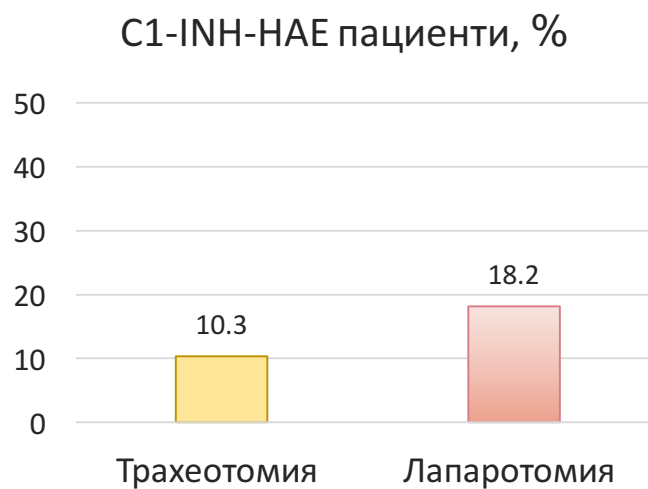
*Инвазивни процедури*

Сред проследените пациенти, известен брой съобщават за свързани с ангиоедема инвазивни медицински манипулации в миналото: 10.3% са били подложени на трахеотомия, 18.2% са били подложени на лапаротомия в хода на коремна криза.

Таблица 27.

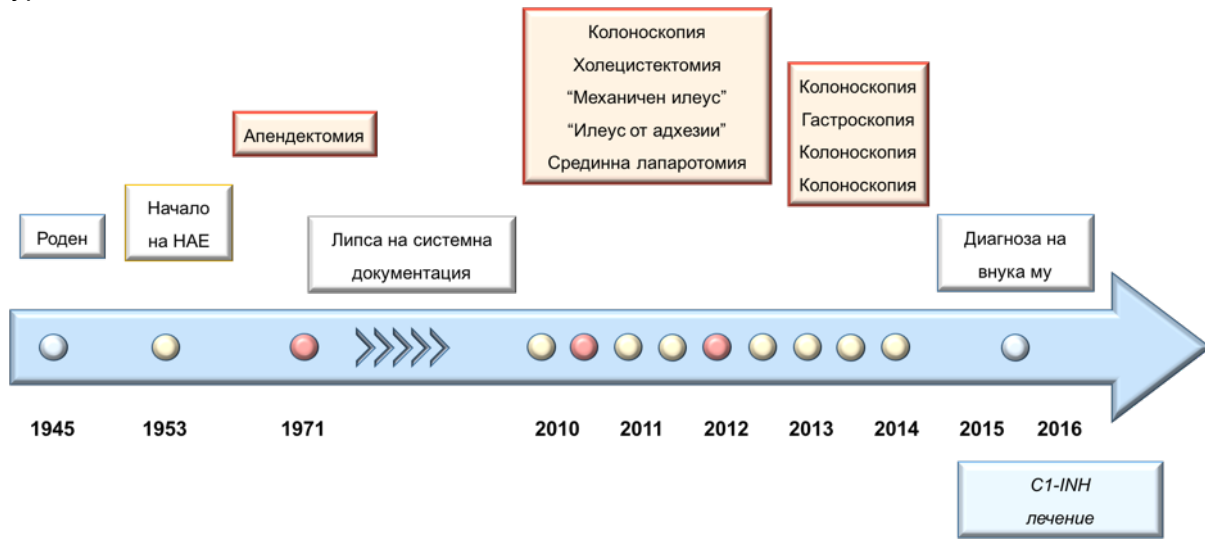
Период 2013-2018		Случаи (n/80)	Процент %
<b>Инвазивни манипулации в миналото</b>	Трахеотомия	8 / 78	10.3%
	Лапаротомия	14 / 77	18.2%

Фигура 18. Пациенти (%), подложени на инвазивни медицински манипулации поради НАЕ.



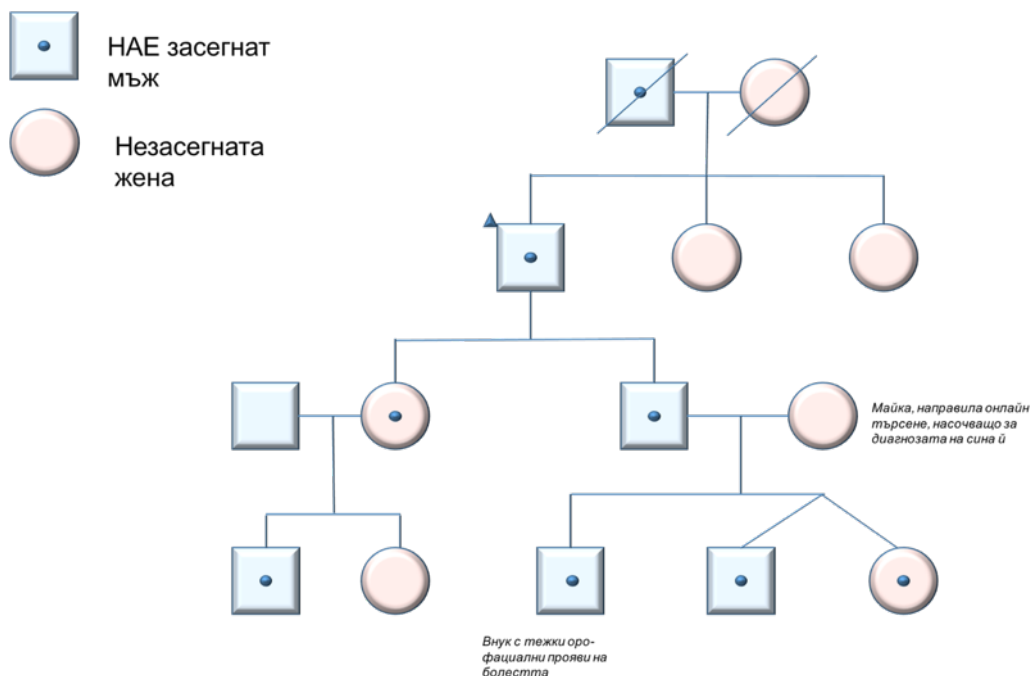
Един от пациентите съобщава за 3 оперативни интервенции в миналото, 5 спешни ендоскопски изследвания, както и многократни хоспитализации по повод на коремни болки.

Фигура 19.



При същия пациент поставянето на диагнозата се случва с 62-годишно забавяне, при наличие на положителна фамилна анамнеза за ангиоедем в най-малко четири поколения на семейството. Диагнозата е предложена от незасегнатата майка на неговия внук, преди потвърждение в нашия център.

Фигура 20.



### Клинична тежест на НАЕ

Клинична тежест на симптомите при отделните пациенти бе оценена спрямо честота на симптомите от НАЕ.

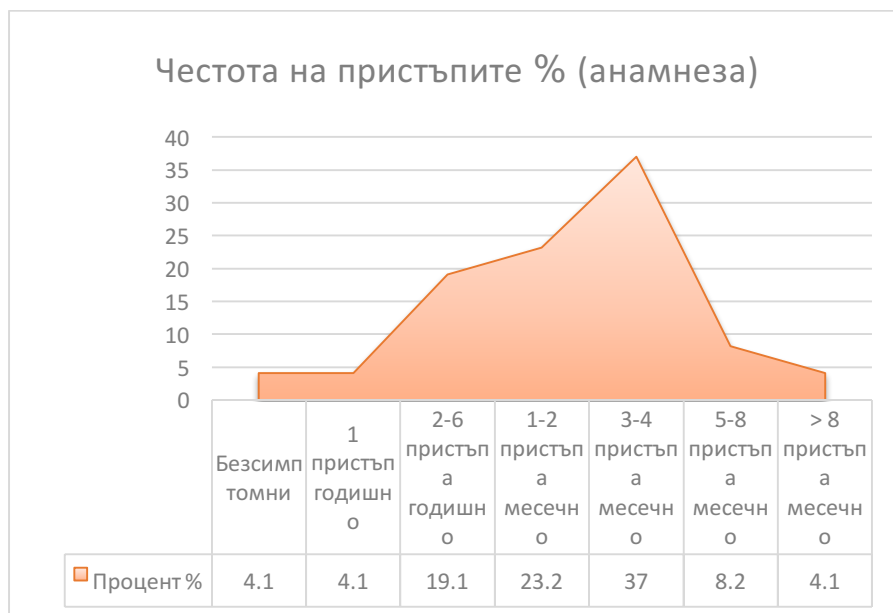


Направихме изчисления за обичайната честота на пристъпите, според анамнезата на пациента, както и според данните за настъпили НАЕ атаки през изминалата 2017 година. Анамнестично съобщената честота на пристъпи от ангиоедем е представена в следните таблица и графика.

Таблица 28.

Период 2013-2018	C1-INH-НАЕ	Случаи (n/73)	Процент %
Честота на пристъпите (анамнеза)	Безсимптомни	3	4.1%
	1 пристъп годишно	3	4.1%
	2-6 пристъпа годишно	14	19.1%
	1-2 пристъпа месечно	17	23.2%
	3-4 пристъпа месечно	27	37.0%
	5-8 пристъпа месечно	6	8.2%
	> 8 пристъпа месечно	3	4.1%

Фигура 21.



Данните за настъпили НАЕ пристъпи през 2017 са представени в следните таблици и графика.

Таблица 29.

Период 2013-2018	Пристъпи на C1-INH-НАЕ	Случаи (n/69)	Процент %
Честота на пристъпите (2017)	0	2	2.9%
	1-2	2	2.9%
	3-6	14	20.3%
	7-18	11	15.9%

	19-30	18	26.1%
	31-48	9	13.9%
	49-60	6	8.7%
	61-72	3	4.3%
	>73	4	5.8%

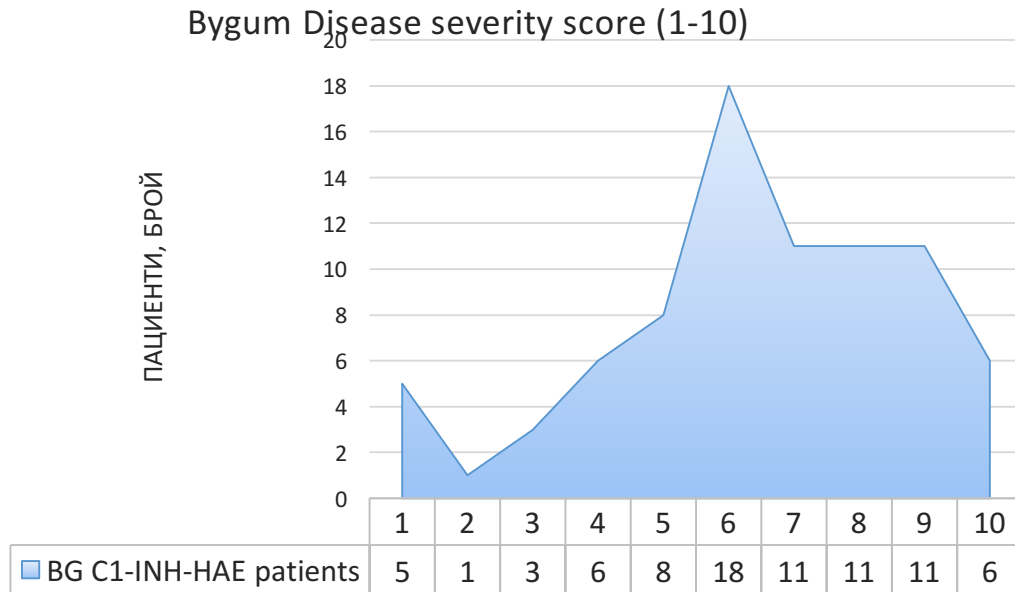
Фигура 22.



### Bygum score

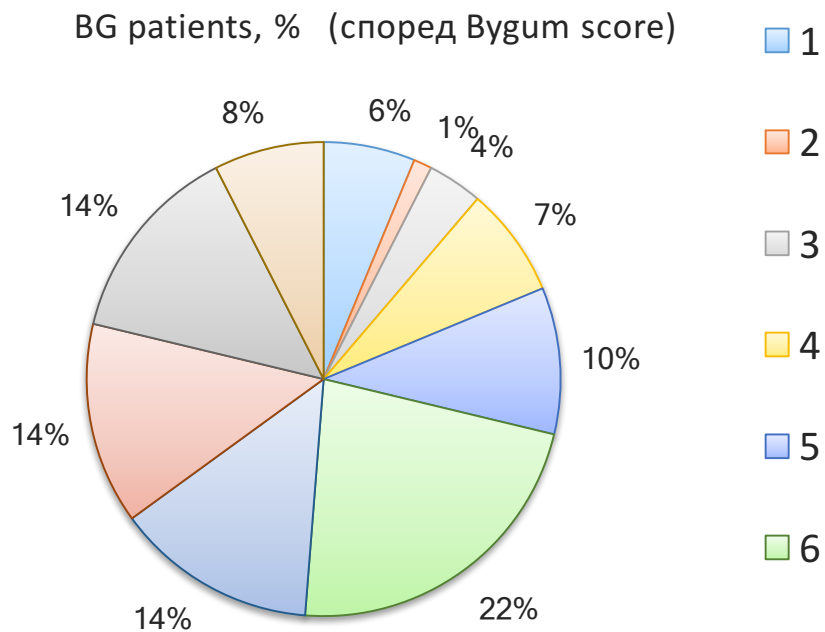
Честотата на симптомите на НАЕ (анамнестично или за даден период) са величини, с потенциално променлив характер, зависещ от множество комплексни фактори. За да преодолеем този проблем, разпределихме пациентите в 10 категории според клиничната тежест на болестта, спрямо изчисления скор за оценка на клиничната тежест на НАЕ (Bygum score: обективен метод за оценка клиничната тежест на С1-INH-НАЕ) (Bygum, Fagerberg et al. 2011).

Фигура 23.



Прави впечатление, че мнозинството от пациентите с НАЕ в българската популация имат стойност на този скор  $\geq 5$ , който съответства на по-тежък клиничен ход на болестта.

Фигура 24.



### Терапевтично поведение при пациентите с НАЕ

Изследвахме терапевтичните подходи при пациентите с НАЕ, като данните от обобщените резултати са описани в следната таблица.

Таблица 30.

Период 2013-2018		C1-INH-НАЕ	Случаи (n/76)	Процент %
Специфична терапия за C1-INH-НАЕ	При нужда	C1-INH концентрат	70	92.1%
		➤ pdC1-INH	11	14.5%
		➤ rhC1-INH	59	77.6%
		Icatibant	2	2.6%
	Профилактика	Андрогени	7	9.2%
		Транексамова киселина	1	1.3%
		C1-INH концентрат	6	7.9%

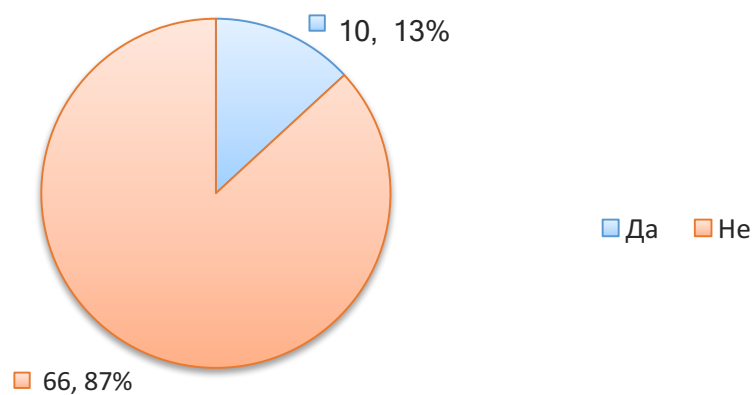
Мнозинството от пациентите (92.1%) се лекуват с C1 инхибиторен концентрат при нужда (рекомбинантен или добит от човешка плазма). От тях едва 13.2% са способни да извършват самоприложение на медикамента, докато 86.8% търсят помощ от здравен работник или в медицинско заведение за венозна апликация при нужда.

Таблица 31.

Период 2013-2018	C1-INH-НАЕ	Брой (n/76)	Процент %
Самоприложение на C1-INH	Да	10	13.2%
	Не	66	86.8%

Фигура 25.

### Самоприложение на C1-INH



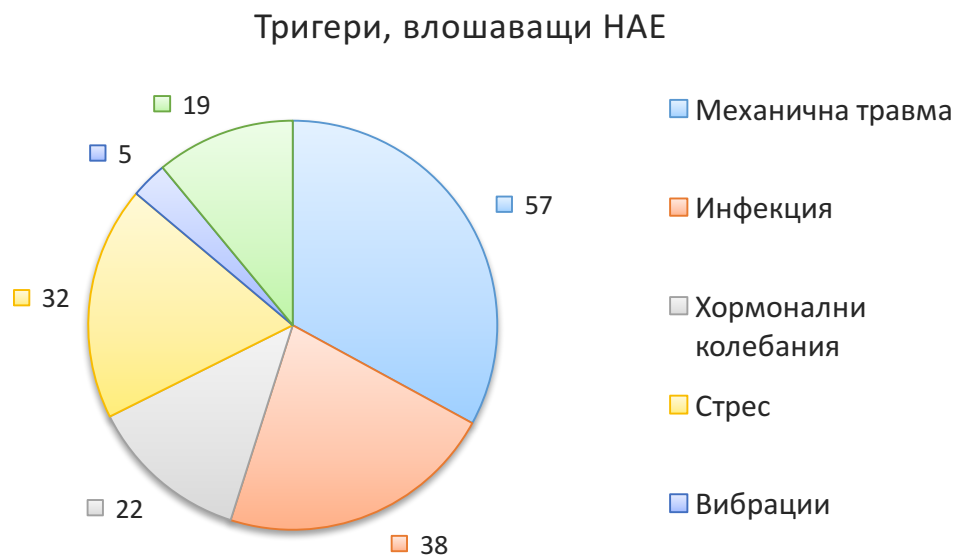
Тригери на НАЕ

Разпознатите причини за провокиране на пристъпите от ангиоедем са обобщени в следните таблица и графика. Механична травма (75%), подлежаща инфекция (50%), хормонални колебания (29%), психо-емоционален стрес (42%), вибрации (7%) или определени храни (25%) са сред разпознатите тригери, отключващи прояви на болестта.

Таблица 32.

Период 2013-2018	С1-INH-НАЕ	Брой (n/76)	Процент %
Тригери, влошаващи АЕ	Механична травма	57	75.0%
	Инфекция	38	50.0%
	Хормонални колебания	22	28.9%
	Стрес	32	42.1%
	Вибрации	5	6.6%
	Храни	19	25.0%

Фигура 26.



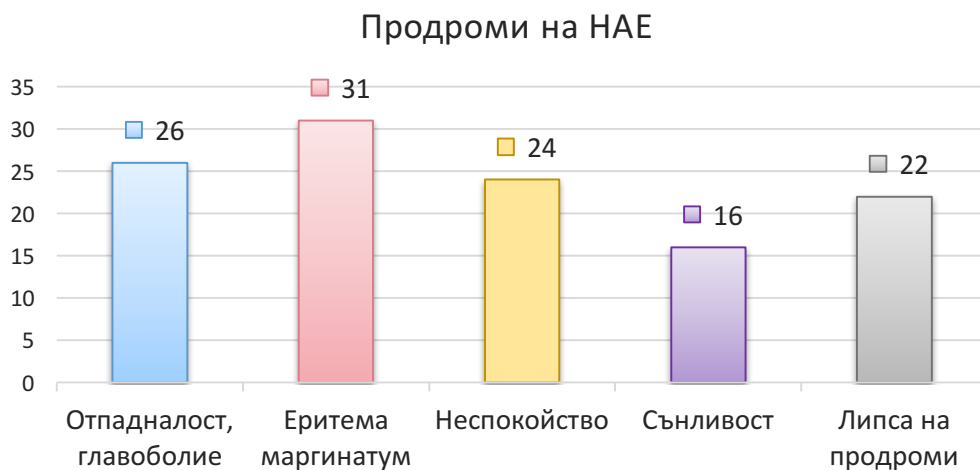
### Продроми на НАЕ

Голям процент от пациентите с НАЕ съобщават за продромни симптоми (предшествващи симптоми), свързвани с начало на прояви на ангиоедема: отпадналост, главоболие (34%), специфичен кожен обрив – еритема маргинатум (41%), неспокойство (32%) или сънливост (21%). Около една трета от пациентите съобщават, че не могат да предвидят проявите на ангиоедем според предшествващи симптоми.

Таблица 33.

Период 2013-2018	С1-INH-НАЕ	Брой (n/76)	Процент %
Продроми на АЕ	Отпадналост, главоболие	26	34.2%
	Еритема маргинатум	31	40.8%
	Неспокойство	24	31.6%
	Сънливост	16	21.1%
	Липса на продроми	22	28.9%

Фигура 27.



#### Съпътстващи заболявания

Сред разпознатите съпътстващи заболяване при пациентите с С1-INH-НАЕ са хипертония (43%), захарен диабет (7%), злокачествени заболявания (3.4%), автоимунно заболяване (3.4%), неврологично заболяване (5%), друго генетично заболяване (7%). Липса на разпознати съпътстващи заболявания се наблюдава при 36% от пациентите.

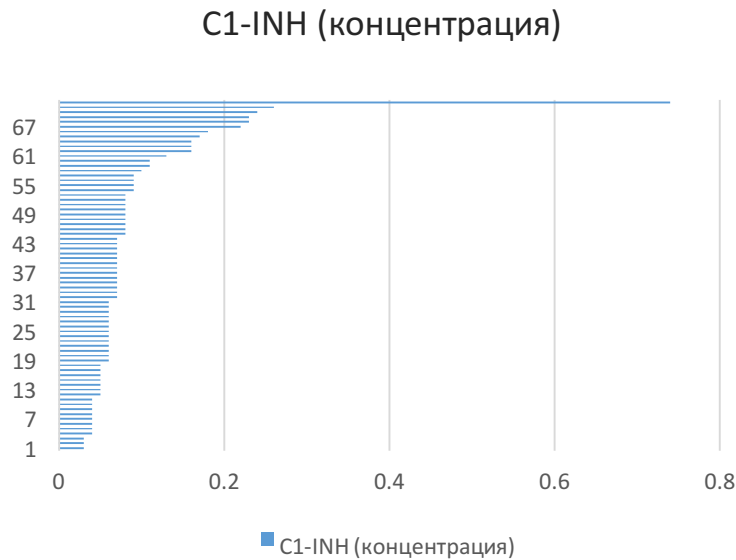
Таблица 34.

Период 2013-2018	С1-INH-НАЕ	Брой (n/61)	Процент %
Съпътстващи заболявания	Хипертония	25	40.1%
	Захарен диабет	4	6.6%
	Злокачествено заболяване	2	3.3%
	Автоимунно заболяване	2	3.3%
	Неврологично заболяване	3	4.9%
	Друго генетично заболяване	4	6,6%
	Липса на съпътстващи заболявания	25	31.3%

*Лабораторни изследвания*

Данните от лабораторните изследвания, потвърждаващи болестта са представени в следващите фигури. Концентрацията на С1-INH се открива много под допустимите референтни граници при мнозинството пациенти. Малък брой пациенти имат плазмена концентрация на протеина, попадаща в нормата или над нея, което кореспондира с С1-INH-НАЕ тип 2, където се синтезира количествено нормален (или по-голямо количество), но дисфункционален плазмен протеин.

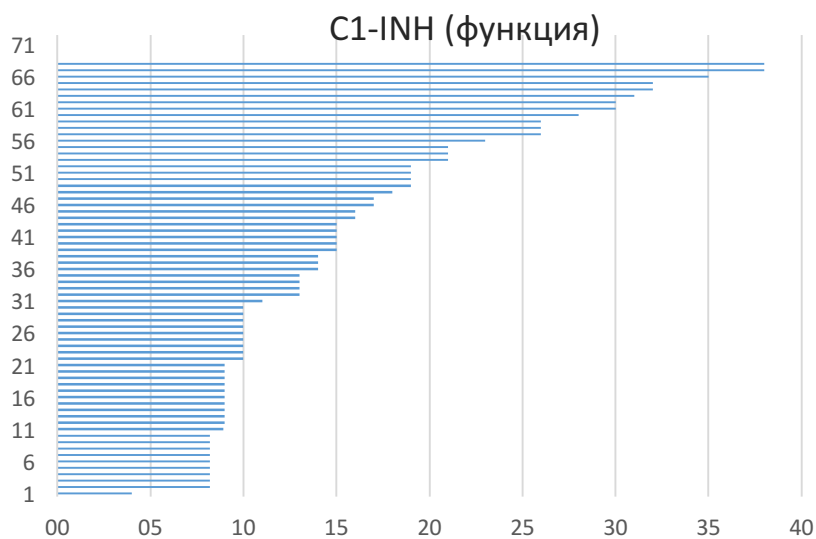
Фигура 28.



С1-INH (концентрация): референтни граници 0,17-0,44 g/l

От функционалното изследване на протеина се вижда, че всички пациенти имат ниски функционални нива на С1 инхибитора, далеч под нормалните 70% активност, бележеща долната граница на нормата.

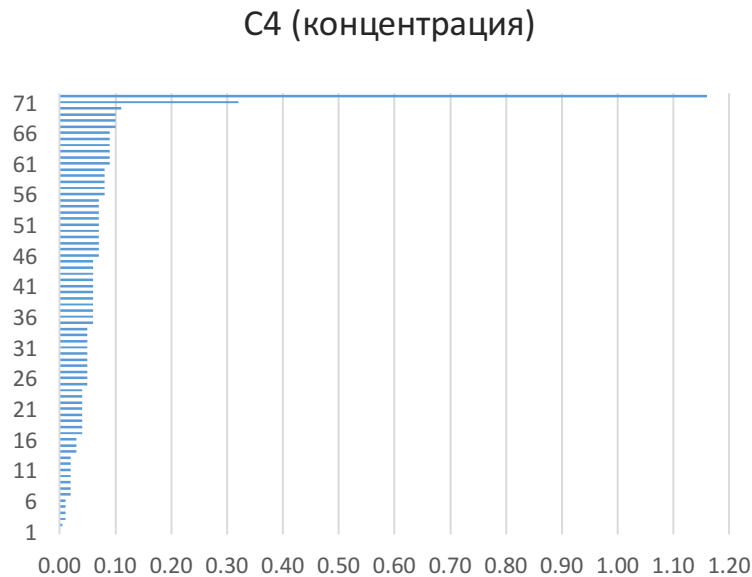
Фигура 29.



С1-INH (функция): референтни граници 70 – 130 %

От изследванията на С4 се вижда добрата диагностична стойност на изследването, което е показателно за функционалния дефицит на С1 инхибитора при пациентите с С1-INH-НАЕ. Макар и малък процент (около 5-6%), някои пациенти демонстрират плазмена концентрация на С4 около нормата, което потвърждава необходимостта от количествено и функционално изследване на С1 инхибитора при съмнение за С1-INH-НАЕ.

Фигура 30.



С4 (концентрация): референтни граници 0,1-0,4 g/l

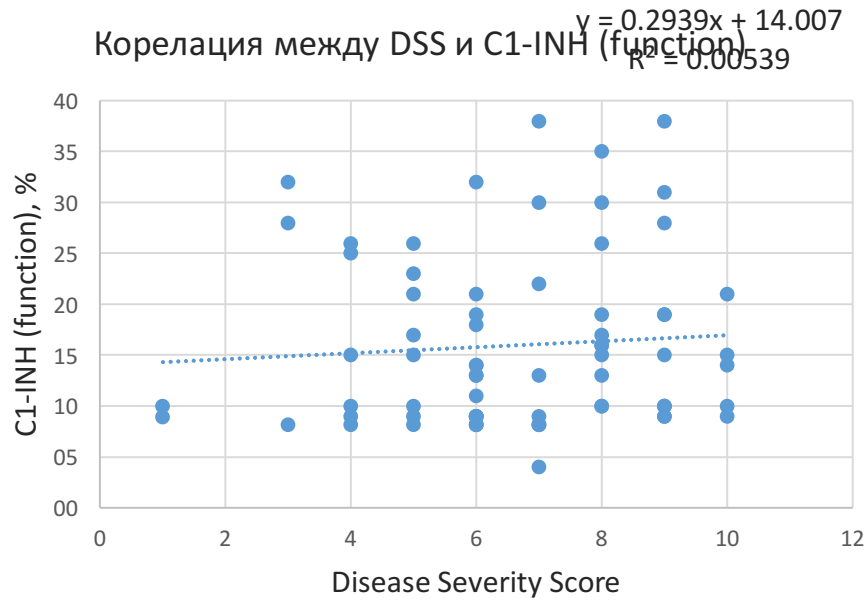
Изследвахме корелацията на функционалната активност на С1 инхибитора и скора за оценка на тежестта на болестта (Bugum score), като резултатът отхвърля наличието на зависимост между двете. Подобна корелация се наблюдава при унгарски пациенти, но не и при други популации. Нашите данни отхвърлят зависимостта на лабораторния показател за С1-INH (функция) с клиничния ход на болестта и потвърждават единствено диагностичното му значение. Численото и графично представяне на тези изследвания са представени в следващите графики.

Фигура 31.





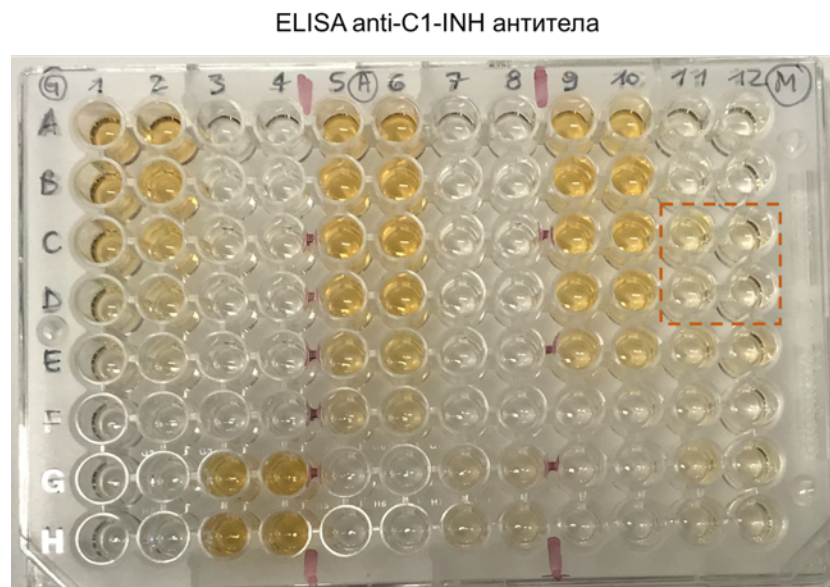
Фигура 32.



В групата на придобит C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-AAE) проведохме изследвания за специфични неутрализиращи антитела срещу C1 инхибитора (ELISA).

Антитела от клас IgM се откриха слабо положителни при един от двата случая на тази диагноза в нашата група. Наличието на тези антитела потвърждава патофизиологичния механизъм, по който възниква дефицитът на C1 инхибитора в разглеждания случай. И двата случая на C1-INH-AAE в нашата група е при пациенти със съпътстващо лимфопролиферативно заболяване (лимфом).

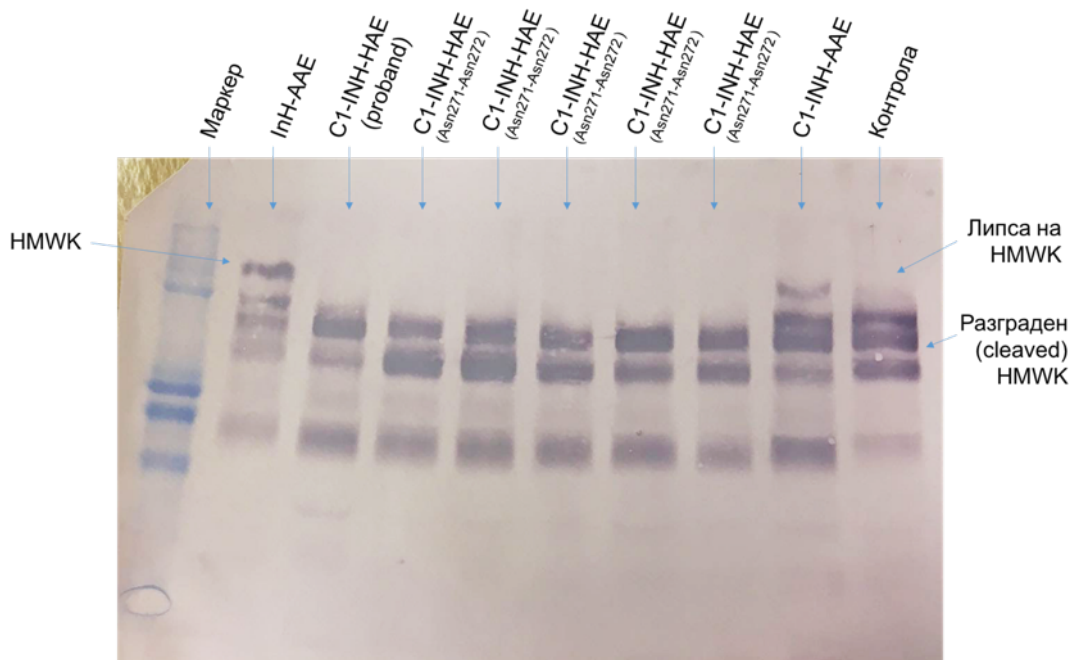
Фигура 33.



Изследването на C1q при двата случая на придобит ангиоедем показва наличие на протеина в референтни граници.

Проведе се изследване за разпадането на високо-молекулния кининоген (НМВК) при пациента с ІnН-ААЕ (идиопатичен не-хистаминергичен придобит ангиоедем), при една от пациентките с придобит С1 инхибиторен дефицит, при един пациент с de novo С1-ІNН-НАЕ, както и при 5 от пациентите с една от новооткритите мутации (тази за НАЕ тип 2, описана подробно в Глава 5).

Фигура 34.



Резултатът показва, че липсват данни за разпадане на кининогена при пациентът с ІnН-ААЕ, което не потвърждава брадикининовия механизъм на състоянието. При пациентката с С1-ІNН-ААЕ, НМВК също се открива, макар с данни за умерено разпадане (ремисия на ангиоедема и лимфома в момента на получаване на пробата). При пациентите от семейството с С1-ІNН-НАЕ тип 2 (нова мутация **Asn271-Asn272**) се вижда напълно разпадане на кининогена, което е белег за нестабилността на молекулата при отсъствието на функциониращ основния контролиращ ензим - С1 инхибитор.

## ГЛАВА 4

Създаване на карта на пациентите с редки форми на ангиоедем (C1-INH-HAE) на територията на Р. България и изчисляване честотата на диагнозата в различните административни области на страната

### Честота на HAE

Използвайки данните, представени в Глава 3, изчислихме честотата на C1-INH-HAE в България:

- 76 доказани живи пациенти с C1-INH-HAE (тип 1 и 2) към месец октомври 2018г.
- Население на страната: 7 075 991 души (данни към декември 2017г, data.worldbank.org)

Съответно, честотата на C1-INH-HAE в българската популация е **1 : 93 105**.

От получената средна честота за страната предположихме, че диагностиката на болестта в България не отговаря на очакваната.

Разпознавайки проблема, изготвихме карта на пациентите с C1-INH-HAE, които се проследяват на територията на страната и изчислихме честотата на диагнозата в различните административни райони на Р. България.

Фигура 35. Административни райони в България.



## Честотата на диагнозата, според административните райони на Р. България и карта на C1-INH-НАЕ

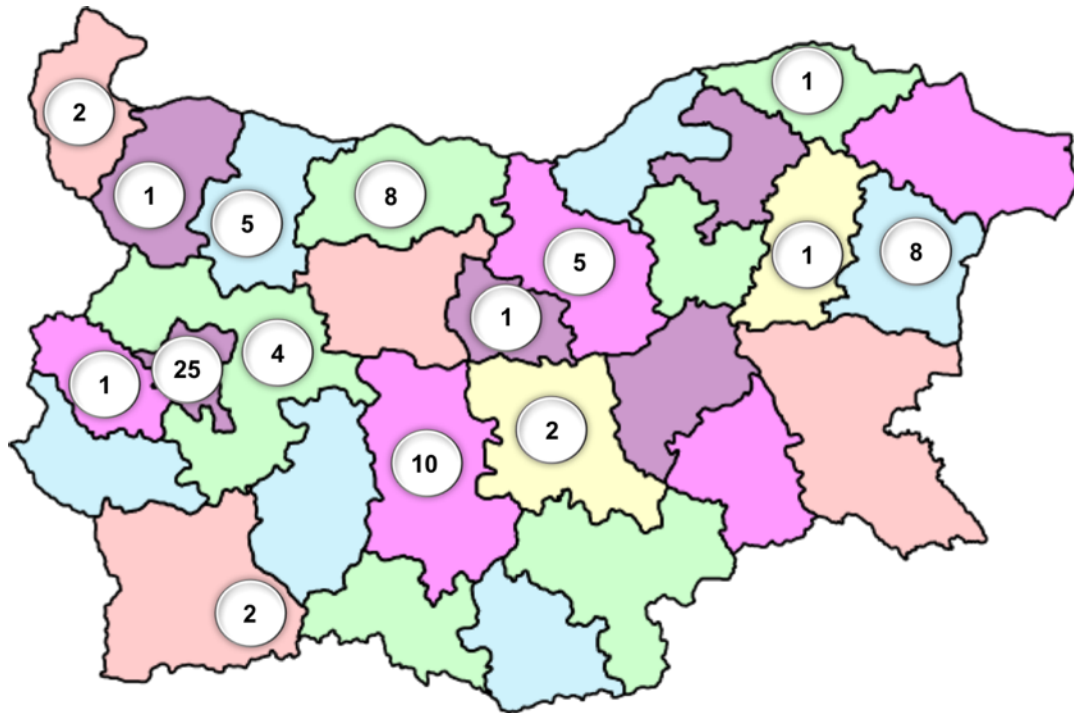
Фигура 36. Честота на диагнозата, според административните райони на Р. България

България  Население: 7 075 991					НАЕ пациенти: 76					Честота на диагнозата: 1 : 93 105				
N:	Област	Население	НАЕ пациенти	Честота на диагнозата	N:	Област	Население	НАЕ пациенти	Честота на диагнозата					
1	Благоевград	310 321	2	155 161	15	Плевен	248 138	8	31 017					
2	Бургас	412 684			16	Пловдив	671 573	10	67 157					
3	Варна	472 654	8	59 082	17	Разград	115 402							
4	Велико Търново	242 259	5	48 452	18	Русе	223 489							
5	Видин	88 867	2	44 334	19	Силистра	111 957	1	111 957					
6	Враца	168 727	1	168 727	20	Сливен	189 788							
7	Габрово	112 334	1	112 334	21	Смолян	109 425							
8	Добрич	178 438			22	София-град	1 323 637	25	52 945					
9	Кърджали	150 837			23	София-област	234 185	4	58 546					
10	Кюстендил	123 431			24	Стара Загора	321 377	2	160 689					
11	Ловеч	129 222			25	Търговище	113 694							
12	Монтана	134 669	5	26 934	26	Хасково	233 415							
13	Пазарджик	260 814			27	Шумен	174 476	1	174 476					
14	Перник	123 770	1	123 770	28	Ямбол	122 276							

Прави впечатление, наличието на 13 области на страната, в които няма нито един диагностициран случай на НАЕ. Най-големите от тях са Бургас, Пазарджик, Хасково и Русе с общо население около 1 000 000 души. В други области, макар да има диагностицирани няколко случая на НАЕ, изчислената честота на болестта е много под очакваната (например Стара Загора, Шумен, Благоевград, Враца).

Изготвихме и карта на диагностицираните случаи с C1-INH-НАЕ.

Фигура 37.



Трудно е да се предвиди точната честота на НАЕ в българската популация, предвид историята за имиграция на известен брой от българските пациенти през годините, когато в страната не са съществували никакви терапевтични възможности за лечение на проявите на НАЕ. Известни са случаи на такива пациенти, които в момента живеят и се лекуват в други европейски страни (Италия, Австрия, Германия, Испания, Португалия). В тези случаи семействата са потърсили по-добри условия за живот и лечение на болестта, имайки предвид историческата липса на модерни терапевтични възможности в България.

През последните години се наблюдава и обратното явление: някои пациенти се завръщат в страната, разбирайки, че вече и тук са налични съвременни медикаменти за лечение на НАЕ. Такъв е случаят на двама членове на едно от големите семейства с C1-INH-НАЕ, които са прекарвали около 10 години в Испания и през последните 2 години живеят отново в България.

## ГЛАВА 5

### *Изследване приносите на генетичното изследване и биобанкирането при пациенти с ангиоедем*

Предвид актуалността на проблема със сложността в клиничното фенотипизиране на ангиоедема, предприехме две основни стратегии за генетично изследване при нашите групи пациенти: 1) брадикинин-медиирани и 2) хистаминергични форми. При първата група предприехме генетични изследвания, насочени към разпознаване на мутации в гените SERPING1, както и F12. Това доведе до **най-мащабното генетично изследване в българската популация на пациенти с брадикинин-медиирани форми на ангиоедем.**

Изследванията бяха проведени като част от мащабен международен изследователски проект (главен изследовател проф. Анастасиос Герменис, Лариса, Гърция) за изследване на генетичните аспекти при пациенти с прояви на пароксизмален хиперпермеабилитет, с участие на учени от Гърция, Италия, Испания, Германия, Австрия, Унгария, Полша, Румъния, Франция и Иран.

В хода на проекта бяха извършени генетични изследвания на представители на 19 от 26-те фамилии с C1-INH-HAE в българската популация (над 50 пациенти и техни роднини). Това представлява **генотипизиране на 73% от всички диагностицирани фамилии с HAE в България.** При 13 от фамилиите бе открита патогенна мутация в SERPING1 гена, **като 3 от тези мутации се откриха за първи път като причинни за C1-INH-HAE.** Разпознатите мутации бяха описани и съобщени в публичната Human Genome Database. При 3 от семействата мутация не бе открита. При останалите 3 фамилии резултатът все още се очаква, като първоначалните изследвания, предлагат извършване на цялостен NGS, тъй като таргетното изследване на очакваните причинни гени не показва наличие на мутация.

Проведени бяха и изследвания на пациенти с C1-INH-AAE, nIC1-INH-HAE и InH-AAE, като генетичното изследване доказва липса на патогенна мутация в гените SERPING1 и F12.

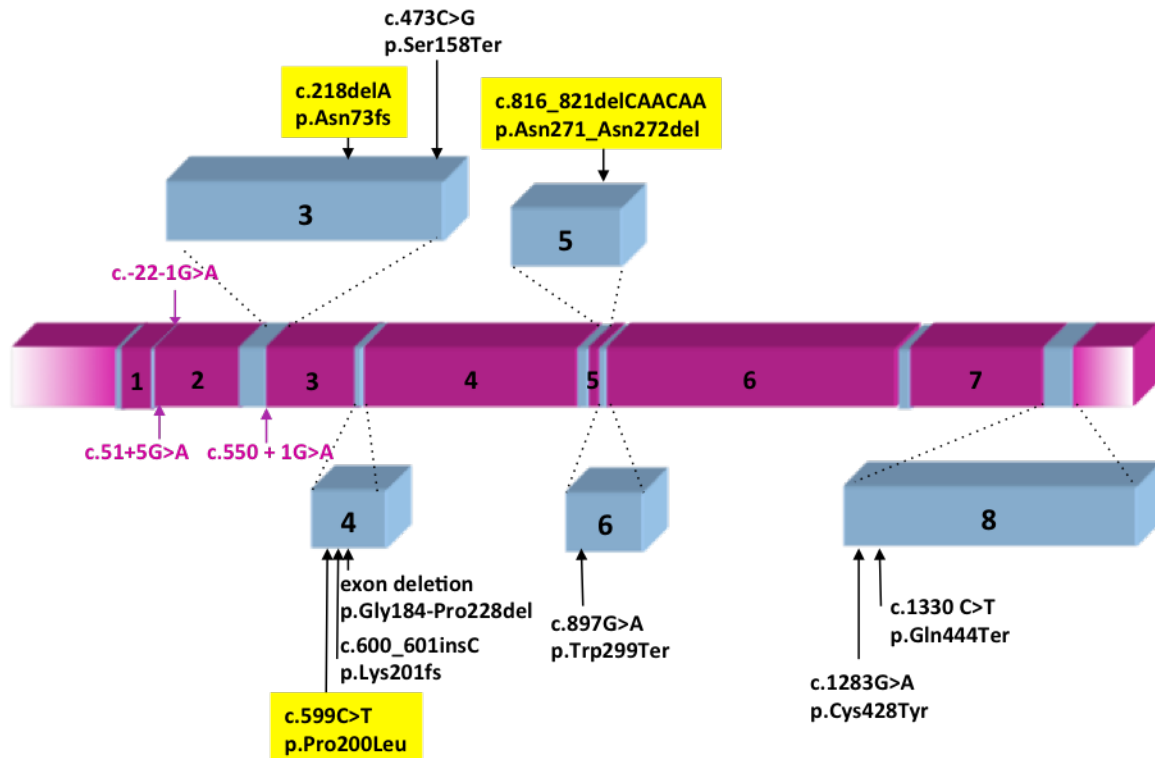
Данните от проведените генетични изследвания на българските пациенти са представени в следващата таблица.

Таблица 35. Генетични характеристики на пациентите с редки форми на ангиоедем.

Disease_Family	HAE_Type	Gene	Genotype	Location	Nucl.change	AAChange	Type of mutation
C1-INH-HAE							
B1	C1-INH-HAE 1	no defect	WT				
B2	C1-INH-HAE 1	no defect	WT				
B3	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	intron 3	c.550+1G>A	-	splice site
B5	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	exon4	deletion		Large defect
B6	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	utr-5	c.-22-1G>A	-	splice site
B7	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	exon 8	c.1330C>T	p.Gln444Ter	nonsense
B8	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	exon 6	c.897G>A	p.Trp299Ter	nonsense
B10	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	exon 3	c.473C>G	p.Ser158Ter	nonsense
B11	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	exon 4	c.600_601insC	p.Lys201fs	frameshift
B12	C1-INH-HAE 1	no defect	WT				
B13	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	exon 8	c.1283G>A	p.Cys428Tyr	missense
B14	C1-INH-HAE 1	SERPING1	het	exon 3	c.218delA	p.Asn73fs	frameshift
B15	C1-INH-HAE 2	SERPING1	het	exon 5	c.816_821delCAACAA	p.Asn271_Asn272del	INDEL non frameshift
B18	C1-INH-HAE 1	<i>pending NGS</i>					
B19	C1-INH-HAE 2	SERPING1	het	exon 8	c.1372G>C	p.Ala458Pro	Only Sanger
B21	C1-INH-HAE 2	<i>pending NGS</i>					
B23	C1-INH-HAE 2	SERPING1	het	exon 8	c.1396C>T	p.Arg466Cys	Only Sanger
B24	C1-INH-HAE 1	SERPING1, F12	het	exon 4	c.599C>T	p.Pro200Leu	
B26	C1-INH-HAE 1	SERPING1, F12	het	intron 2	c.51+5G>A		splice site
C1-INH-AAE							
B4	C1-INH-AAE	no defect, <i>pending NGS</i>	WT				
B29	C1-INH-AAE	no defect, <i>pending NGS</i>	WT				
InH-AAE							
B9	InH-AAE	no defect, <i>pending NGS</i>	WT				
nC1-INH-AAE							
B30	nC1-INH-HAE	no defect, <i>pending NGS</i>	WT				
B11*	nC1-INH-HAE	no defect, <i>pending NGS</i>	WT				

На следващата фигура са представени графично различните локализации на мутациите в SERPING1 гена, открити при пациентите с C1-INH-НАЕ. Маркирани с жълто са мутациите, които се откриват за първи път в света и не са описвани до момента като причинни за НАЕ.

Фигура 38.



Легенда:

екзони = светлосиньо

интрони = пурпурно

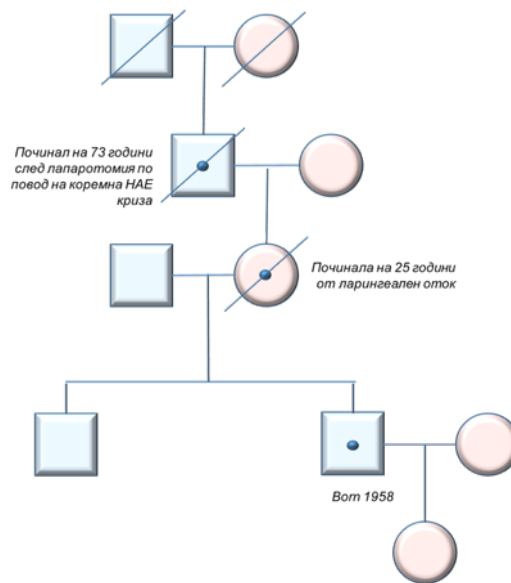
новите мутации са маркирани в жълто

Генетичният скрининг чрез новата потребителска таргетна NGS платформа разкри: 3 nonsense мутации (в екзон 3, екзон 6 и екзон 8), 4 дефекта на мястото на снаждане (splicing дефекти: в интрон 2, интрон 3, utr-5), 2 изменения на четене на рамката (frameshift мутации: екзон 3 и екзон 4), 1 INDEL мутация без промяна на рамката (екзон 5), 2 missense мутации (екзон 8) и 1 голяма делеция на екзон 4.

Едната новооткрита мутация, засяга рамката на четене на гена (frameshift: **p.Asn73fs**), което води до преждевременен стоп-кодон.

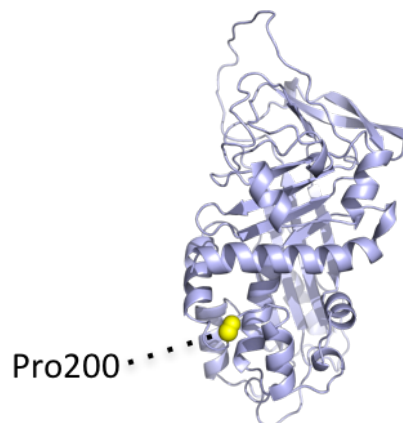


Фигура 39. Фамилно дърво (frameshift: **p.Asn73fs**)

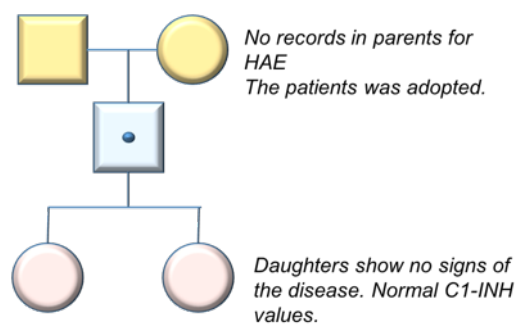


Втората новооткрита мутация е заместване на една аминокиселина **Pro200Leu** в екзон 4.

Фигура 40. Задна част на протеина (при **Pro200Leu**)



Фигура 41. Фамилно дърво (**Pro200Leu**)

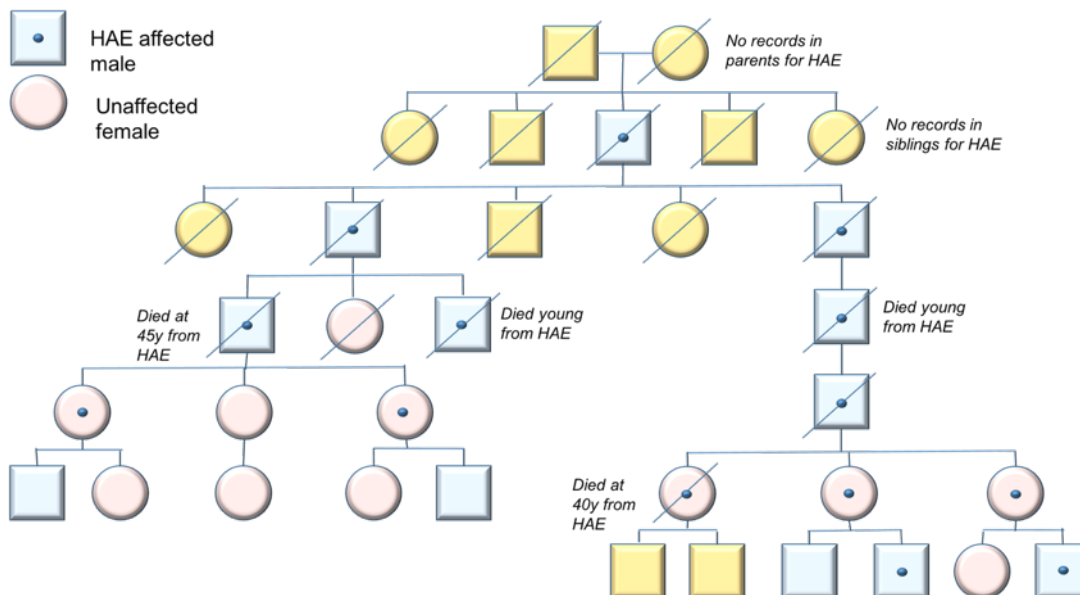


Третата новооткрита мутация е делецията на нуклеотидите, кодиращи **Asn271-Asn272** в екзон 5.

Фигура 42. Предна част на протеина (при **Asn271-Asn272**)



Фигура 43. Фамилно дърво (**Asn271-Asn272**)



Генетични изследвания бяха проведени и при пациенти с други форми на ангиоедем, при които поставянето на диагнозата не беше възможно единствено на базата на фамилната анамнеза и имунологичните изследвания. За момента мутации не са открити в изследваните гени (SERPING1, F12, PLG и ANGPT1). Предстоят допълнителни изследвания и вероятна цялостна NGS.

В групата на хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария (пациентска група по Глава 2), съгласно проекта Млад Изследовател от конкурса на МУ-София за финансиране на научни проекти на докторанти, беше съхранен ДНК материал от 20 пациенти с много тежък клиничен ход на болестта (резистентни на терапия случаи). Това представлява първата биобанка с ДНК материал от пациенти с хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария, при които в бъдеще да се проведат генетични изследвания за разпознаване на вероятни гени, патогенни за състоянието.

## ГЛАВА 6

### Предлагане на клиничен алгоритъм за диагностициране и поведение при пациентите с прояви на ангиоедем

Диагностичното и терапевтичното поведение при пациенти с ангиоедем често е затруднено в клиничната практика поради редица фактори. Състоянието е разпространено в ежедневната медицинска практика и води до чести посещения при лекар. Въпреки това, патофизиологичните разновидности на различните фенотипове ангиоедем не са добре известни, което е и предпоставка за трудности в разграничаването на отделните форми ангиоедем.

Диагностичната оценка и подходящата диференциална диагноза са от решаващо значение при заболяване с такъв хетерогенен клиничен профил. Правилната клинична оценка изисква подробна и внимателна медицинска анамнеза. Клиничните признаци, насочващи към диагнозата са изброени в следващата таблица. Сред тях са скоростта на поява на симптомите, времето до тяхното спонтанно отминаване, възрастта на поява, преобладаващата локализация, факторите влошаващи оплакванията, наличието на фамилна анамнеза и присъствието на лекарствата, влошаващи симптомите.

Таблица 36.

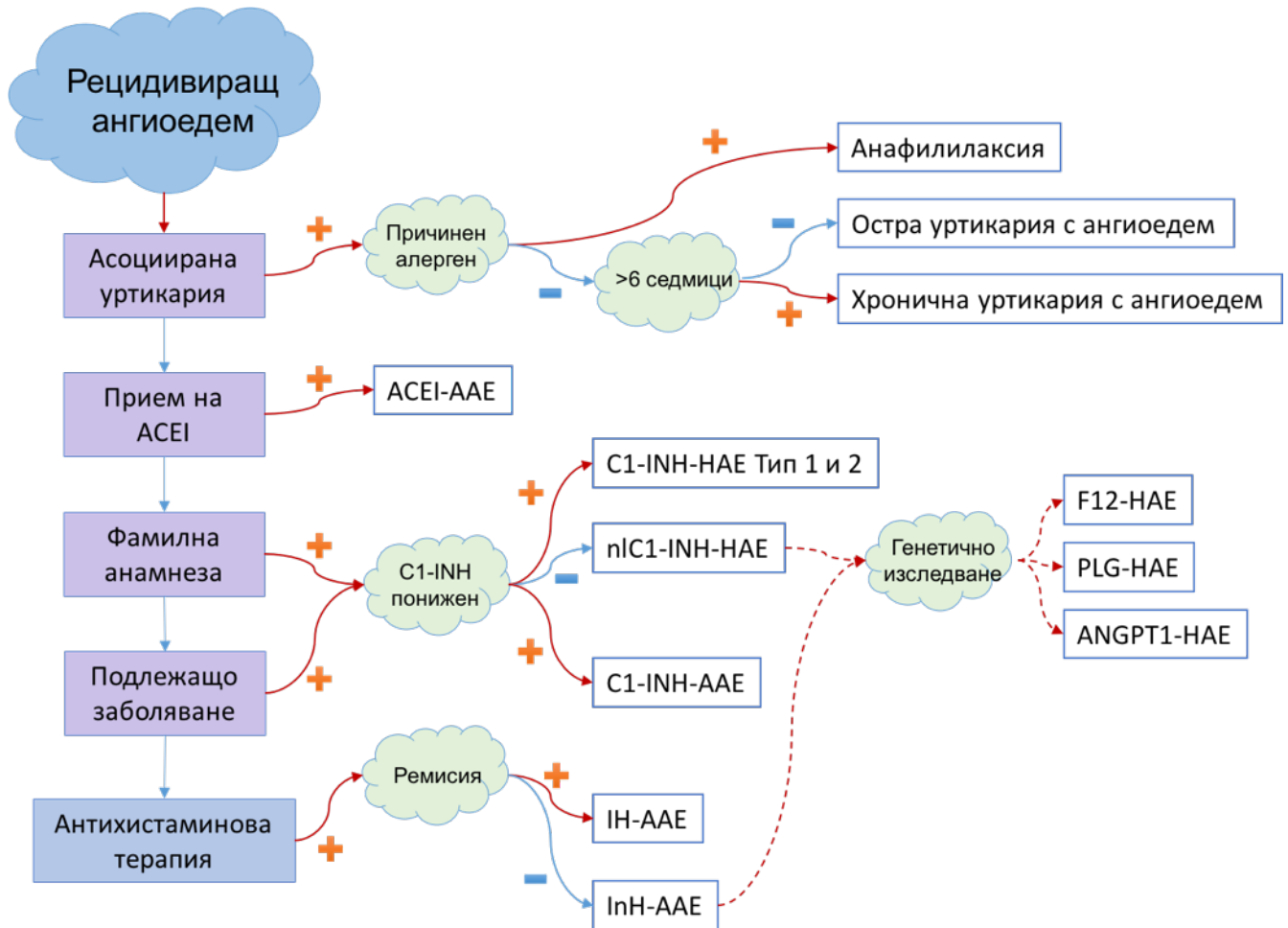
Характеристики АЕ	Хистаминергичен	Брадикинин-медиран	
		Придобит	Наследствен
Скорост на началото	Минути	Часове	Часове
Асоциация с уртикария	Често	Не	Не #
Време до спонтанно преминаване	Минути до часове	Дни	Дни
Възраст на появата	Всяка	След 4-та декада; След 6-та декада за ACEI-AAE	1-2 декада от живота
Преобладаваща локализация	Лице (клепачи, устни); Понякога длани и ходила (при ДПУ)	Устни, език, увула, дихателни пътища	Лице, периферни отоци, коремни кризи, дихателни пътища
Тригери, влошаващи фактори	Известни алергени или без ясен провокиращ фактор	Лекарства	Травма, инфекции, стрес, хормонални колебания
Фамилна анамнеза	Не	Не	Не
Индукциращи / екзацериращи лекарства	НСПВС	ACEI, ARB, глиптини, сакубитрил	ACEI, естрогени
Лекарства на избор	Антихистамини, кортикостероиди, адреналин	C1-INH*, Icatibant*, tranexamic acid*;	C1-INH, Icatibant

# NB! Еритема маргинатум може да се опише като уртикария от неспециалисти.

\*нелицензирана терапия

Предлагаме оригинален диагностичен алгоритъм за пациенти с ангиоедем, който е представен в следващата фигура:

Фигура 44. Алгоритъм за диагностика и поведение при пациенти с ангиоедем.



## 7. Обсъждане

Обсъждането е групирено в 6 глави, според съответните глави на Резултатите.

### **ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 1**

#### *Предлагане на съвременна клинична и патофизиологична класификация при пациентите с ангиоедем*

Настоящата класификация на ангиоедема без уртикария е разработена от Cicardi и Международната работна група за Наследствен ангиоедем (HAWK) (Cicardi, Aberer et al. 2014), като в нея се разграничават две основни групи ангиоедем: наследствен (HAE) и придобит (AAE). Осъвременяването в частта отнасяща се към HAE с нормален C1-INH (**nIC1-INH-HAE**), се налага поради бурното откритие на нови патогенни мутации през изминалата 2017-2018 година (Bork, Wulff et al. 2009, Bork, Wulff et al. 2017, Bafunno, Firinu et al. 2018).

Настоящата клинична класификация на ангиоедема има няколко ограничения, свързани най-вече със случаи от клиничната практика, които не могат да бъдат ясно класифицирани към някой от подвидовете ангиоедем. Основните затруднения се отнасят до групата на InH-AAE, тъй като патогенетичните аспекти на това състояние остават до голяма степен неизяснени и съществуват сериозни доказателства, че тази форма на ангиоедем е хетерогенна група и вероятно включва варианти с различни патогенетични механизми. Липсата на отговор към профилактичната терапия с висока доза антихистамини подкрепя ролята на нехистаминергичен ангиоедем и/или съучастие на други пътища за стимулиране на хиперпермеабилитет, в това число и брадикинин. Въпреки това, положителният отговор на лечението с анти-IgE (омализумаб) при някои пациенти, предполага основна роля на мастоцитите при тази подгрупа от пациентите с InH-AAE (Sands, Blume et al. 2007, von Websky, Reich et al. 2013, Ozturk and Kocaturk 2014, Faisant, Du Thanh et al. 2017).

Друга класификация, фокусирана върху патофизиологичните механизми на АЕ, е предложена от Giavina-Bianchi et al. (Giavina-Bianchi, Aun et al. 2015). Тази класификация се основава на идентификацията от 2 основни групи, при които ангиоедемът се медира от мастоцитна и/или базофилна дегранулация, или съответно от продуцирането на брадикинин.

Въпреки това, класификация, основана на твърд патогенетичен дуализъм, продължава да затруднява категоризирането на определени форми идиопатичен ангиоедем, при който може да се предполага припокриване на различни медиатори и/или активиране на плазмените биоамплификационни системи.

Поради това, при предложената от нас патофизиологична класификация, се застъпва нова хипотеза за съществуване на припокриване (overlap) между медиаторите при недобре характеризирани форми на идиопатичен ангиоедем. Такъв подход при аналитичното разглеждане на различните фенотипове на ангиоедема, би помогнал на клиничната практика, тъй като обръща внимание на честите и отгатваеми механизми при хистаминергичния ангиоедем, отделя ясно групите на брадикини-медиирания ангиоедем, но оставя и място за нередките състояния в клиничната практика, при които строго разграничаване на патофизиологичния механизъм не е възможно или има припокриващи се белези на двете по-добре-дефинирани групи. Именно при тази форма на "припокриване" (overlap), биха били оправдани методи на интервенция от изследователски характер: анти-IgE терапия (omalizumab) (Sands, Blume et al. 2007, von Websky, Reich et al. 2013, Ozturk and Kocaturk 2014, Staubach, Metz et al. 2016, Faisant, Du Thanh et al. 2017), анти-каликреинова терапия

(lanadelumab, BCX7353) (Banerji, Busse et al. 2017, Aygoren-Pursun, Bygum et al. 2018), анти-фактор 12 (anti-F12 моноклонално антитяло) и други (Voelker 2017).

## ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 2

### *Изследване на пациенти с прояви на хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария чрез оценка показатели за минимално-персистиращо системно възпаление*

Изследваните пациенти бяха определени по демографски характеристики и сравнени според получените стойности на изследваните цитокини, като при пациентите се измериха значимо повишени стойностите спрямо здрави лица за IL-6 ( $1.91 \pm 0.50$ , pg/ml, vs.  $0.03 \pm 0.02$ ) ( $p < 0.001$ ), за IL-10 ( $5.91 \pm 0.48$ , pg/ml vs.  $0.86 \pm 0.51$ ) ( $p < 0.001$ ) и за IL-33 ( $0.89 \pm 0.41$ , pg/ml vs.  $5.04 \pm 1.02$ ) ( $p = 0.005$ ). Стойностите на hsCRP бяха различни при болни с лека/средно тежка ( $1.97 \pm 0.45$ ) спрямо тези с тежка проява на болестта ( $5.37 \pm 0.94$ ) ( $p = 0.03$ ), както бе потвърдено и от СУЕ ( $8.09 \pm 1.32$  vs.  $15.38 \pm 2.62$ ) ( $p = 0.015$ ). За CCL2/MCP-1 резултатите не достигнаха значима разлика, макар да има набелязана тенденция за повишени стойности при пациенти спрямо здрави контроли ( $p = 0.076$ ). Открита бе сигнификантна разлика според нивото на IL-33 при пациенти с хронична уртикария и съпътстващ хистаминергичен ангиоедем ( **$p = 0.048$** ). От направения корелационен анализ получихме данни за слаби, но сигнификантни корелации между hsCRP – СУЕ ( $r = 0.417$ ,  $p = 0.005$ ), D-dimer – СУЕ ( $r = 0.476$ ,  $p = 0.007$ ), IL-10 – IL-33 ( $r = 0.368$ ,  $p = 0.014$ ) и брой на моноцитите – IL-10 ( $r = 0.420$ ,  $p = 0.006$ ), CCL2/MCP-1 и IL-6 ( $r = 0.426$ ,  $p = 0.001$ ), както и за CCL2/MCP-1 и IL-33 ( $r = -0.281$ ,  $p = 0.040$ ). От нашите изследвания показателите IL-6, IL-10, IL-33, hsCRP и СУЕ са обещаващи маркери за активността на болестта при пациенти с ХСУ.

Наблюдавахме набелязана тенденция в зависимост от статуса на 25-ОН-витамин Д при пациентите с тежка ХУ, което може да бъде обяснено с предполагаемата имуномодулаторна функция на витамин Д. Подобни изследвания, проведени от други изследователски екипи предлагат клинична полза от 4-6 седмичен курс с витамин Д, което би могло да помогне за подобрене на терапевтичния отговор при пациенти с трудна за лечение ХСУ (Grzanka, Machura et al. 2014, Tuchinda, Kulthanan et al. 2018). Необходимо е изследване на витамин Д статуса при по-голяма пациентска група, с оглед оценка на значимостта му в диагностично-терапевтичното поведение при пациенти с ХСУ.

Според наличието или отсъствието на съпътстващ ангиоедем, в нашата пациентска група наблюдавахме, че мнозинството пациенти имат белези, както на рецидивираща уртикария, така и на хистаминергичен ангиоедем (70% от пациентите). Автоимунен тиреоидит се наблюдава при около 25% от пациентите с ХУ, което е по-висока честота, спрямо тази на общата популация. Положителен автоложен тест със серум се наблюдава в 62% от пациентите, което може да бъде обсъдено като доказателство за автоимунния характер на болестта.

Измерването на стойностите на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ и при здрави контроли, показва разлики между двете групи. Оказва се, че цитокините IL-6 и IL-10 са значимо повишени при пациентите с ХУ, белег за минимално персистиращо възпаление при пациентите с ХУ. Подобни данни са описвани и от други изследователи, потвърждавайки наличието на системно възпаление, съпътстващо болестта. Данните за IL-6 имат потвърдителен характер,

както е установено и от други изследователски екипи (Machura, Szczepanska et al. 2013, Kasperska-Zajac, Grzanka et al. 2015). За разлика от тях, IL-33 се откри сигнификантно намален при пациентите с ХУ в сравнение със здрави индивиди. Обсъждането на този феномен не може да бъде еднозначно поради различните хипотези за неговото значение при състояния с персистиращо системно възпаление. Установените значимо различни нива на IL-10 и IL-33 не са съобщавани в реферирания медицинска периодика до момента и имат оригинален характер в изследването на тези цитокини при пациенти с ХУ.

От сравнението на нивата на цитокините според тежестта на болестта не бяха открити сигнификантни разлики за IL-6, IL-10, IL-33 между пациенти с лека и тежка ХУ. Този факт предполага, че наличието на имунен дисбаланс е част от феномените, характеризирани болестта, но не непременно дозо-зависим фактор, способен да предскаже клиничната тежест на ХУ.

**Открита беше сигнификантна разлика според нивото на IL-33 и наличието на съпътстващ ангиоедем. Това са данни, наблюдавани за първи път при пациенти ХУ и ангиоедем.** Интересно би било тези наблюдения да бъдат проверени и при пациенти с други форма на ангиоедем (наследствен, придобит, ACEI-индуциран и др).

От корелационния анализ на различните променливи бяха открити слаби корелации между коефициент под  $r=0.5$ , които са значими ( $p<0.05$ ). Някои от тях са напълно логични и предвидими, например hsCRP – СУЕ ( $r = 0.417$ ,  $p = 0.005$ ). Такъв е и случаят с корелация между D-dimer – СУЕ ( $r = 0.476$ ,  $p = 0.007$ ), както е наблюдавано и от други изследователски екипи (Kasperska-Zajac and Brzoza 2009, Kasperska-Zajac and Jasinska 2011). Нашите изследвания са в подкрепа на хипотезата за системния характер на хроничната уртикария (Darlenski, Kazandjieva et al. 2014).

Интересен е резултатът за корелация между IL-10 – IL-33 ( $r = 0.368$ ,  $p = 0.014$ ) и брой на моноцитите – IL-10 ( $r = 0.420$ ,  $p = 0.006$ ). Тези наблюдения, биха могли да се коментират като косвено доказателство за значимостта на IL-10 като имунорегулаторен цитокин, чието различие спрямо нормални стойности води до имунен дисбаланс и про-инфламаторни свойства на серума на тези пациенти.

Установената пропорционална корелация за CCL2/MCP-1 и IL-6 ( $r = 0.426$ ,  $p = 0.001$ ), както и обратната корелация за CCL2/MCP-1 и IL-33 ( $r = -0.281$ ,  $p = 0.040$ ) предлагат още един поглед върху наличната имунна дисрегулация и предпоставки за минимално-персистиращо системно възпаление при пациентите с хронична уртикария.

### ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 3

*Изследване на пациентите с прояви на редки форми на брадикинин-медиран ангиоедем, чрез оценка на техните демографски, клинични и имунологични показатели*

Брадикинин-медирианият ангиоедем е рядко и потенциално животозастрашаващо заболяване. Природата на брадикининовата дисрегулация, която води до прояви на ангиоедем, варира между различните типове ангиоедем. Потенциалните причини за нарушение на брадикининовата регулация при ангиоедема, дължащ се на дефицит на C1-INH (C1-INH-NAE и C1-INH-AAE), ангиоедема с нормален C1-INH (nl-C1-INH-NAE), идиопатичния нехистаминергичен ангиоедем (INH-AAE), както и този, асоцииран с прием на ACE инхибитори (ACEI-AAE), са твърде разнообразни. Това, което ги обединява е клиничната картина.

Фигура 45. Адаптирана по Cicardi и Zuraw 2018, JACI In Practice (Cicardi and Zuraw 2018).



Чрез проведените изследвания, представихме пионерни и актуални данни за редките брадикинин-медирирани форми на ангиоедем в България.

Изследванията обхващат два периода: ретроспективен (1972-2012) и проспективен (2013-2018).

#### Период 1971-2012

Ретроспективното изследване за периода 1972-2012 обхваща годините от поставянето на първата диагноза HAE в България от проф. д-р Божко Божков и анализират информация, съхранявана в Регистъра за HAE, който е създаден към Клиниката по алергология на УМБАЛ "Александровска" за целите на по-добро проследяване и грижа за пациентите с редки форми на ангиоедем. Годината на поставяне на първата диагноза HAE е сред първите в Европа и



говори за високо ниво на познанието на Учителите в областта на Алергологията в България. Известно е, че проф. Божков се е свързал лично с Prof. Sir Peter Lachmann за провеждане на първите изследвания на комплемента при българските пациенти (Bozhkov, Nikolov et al. 1988). Prof. Sir Peter Lachmann е един от признатите светила в изучаването на болести, свързани с участието на комплемента (Lachmann 1984, Lachmann and Rosen 1984).

Информацията в Регистъра за НАЕ е периодично обновявана през годините благодарение на доц. д-р Мария Стаевска. Нейно дело са и първоначалните изследвания в областта на НАЕ, както и първите генетични изследвания на български пациенти с C1-INH-НАЕ, проведени в Института Луи Пастър в Париж, Франция. Данните от тези изследвания са съобщавани пред българската алергологична общност, също и като част от обучителната програма на специалистите алерголози, което ги превръща в основните медицински специалисти в България, които се занимават с диагнозата, лечението и проследяването на пациентите с НАЕ и другите редки форми на брадикинин-медиран ангиоедем.

Обобщените данни от Регистъра на НАЕ сочат, че за периода 1972-2012: единствената потвърдена диагноза на брадикинин-медиран ангиоедем в България е този, дължащ се на дефицит на C1-INH (количествен и/или качествен). Обобщена бе информация за всички диагностицирани семейства с поставена диагноза на рядка форма на ангиоедем, тяхната фамилна история, фамилно дърво и проведени изследвания за диагностика на ангиоедема.

#### *Демографска характеристика*

Общият брой на проследените болни е 202, от които 91 жени и 111 мъже, като разпределението между C1-INH-НАЕ тип 1 и 2 е 171 (85%) към 26 (13%), респективно. Тези данни са в унисон с очакваните за автозомно-доминентно генетично заболяване (Cicardi, Bergamaschini et al. 1982, Zingale, Bork et al. 2007, Zanichelli, Arcoleo et al. 2015).

Броят на фамилията с диагноза C1-INH-НАЕ са 41, от които 28 са C1-INH-НАЕ тип 1 (68%), 12 C1-INH-НАЕ тип 2 (29%). Не е коректно изчисление на честотата на НАЕ на популационно ниво спрямо нашите данни, тъй като в тях са включени живи и починали пациенти от различни поколения. Исторически, срезовите данни на проф. Божков, извършени в края на 90-те години на изминалия век, съобщават честота на НАЕ в България около **1 : 68,000** (120 проследяващи се пациенти с НАЕ, население 8,190,000 млн. души към 2000 г.) (Bozhkov, Nikolov et al. 1988)(Божков Б, М. Стаевска. Проучване на наследствения ангиоедем (НАЕ) в България от Катедрата по алергология при Медицински факултет – София. Годишник на БАКИ 2008:1:51-55).

Сред пациентите в нашата група, 86% от случаите (174 болни) имат данни за положителна фамилна анамнеза за ангиоедем в предходни поколения, докато при 10% фамилна анамнеза липсва (20 болни). Тези данни кореспондират с обичайно съобщените такива относно честотата на de-novo мутации в SERPING1 гена (Tosi 1998, Tosi, Carugati et al. 1998, Pappalardo, Cicardi et al. 2000, Lopez-Lera, Garrido et al. 2011). Тази честота е обичайно около 25% на нови мутации, като разминаването в получените при нас данни е вероятно поради многочислеността на една от големите фамилии с НАЕ (Фамилия 11: исторически данни за над 112 засегнати членове, в най-малко 6 поколения; към момента продължават да се проследяват 26 от тези пациенти).

Средната възраст на поява на оплакванията от ангиоедем е 14.64 години (обхват, 1-54 години), което кореспондира и на международните данни за болестта (Agostoni and Cicardi 1992, Weis 2009).

Средното забавяне от проява на симптомите до поставяне на правилна диагноза е 10.21 години (обхват, 0-44 години), което е приблизително, както цитираните в развитите страни (Италия, Испания, Германия)(Zanichelli, Magerl et al. 2013, Longhurst and Bygum 2016).

Активно проследяване след 2012 продължава при 23% от болните (46 са диагностицирани преди 2012 година), като са загубени от проследяване 50% от болните (100 пациенти). Трудно е да се коментира малкият брой на проследяваните към днешна дата пациенти от историческия първоначален Регистър на НАЕ: вероятно е известен процент от пациентите да не са преживели, за да потърсят лекарска помощ през изминалите години. За други е известно, че са имигрирали в страни от Западна Европа в търсене на по-добра здравна система и модерни методи за лечение на заболяването. Такъв е случаят на най-малко 7 пациенти, за които имаме информация, че живеят и се лекуват в Италия, Испания, Португалия, Австрия и Германия.

Други 27% от пациентите (56 пациенти: 28 жени и 28 мъже) са загинали пациенти с НАЕ на средната възраст от 36.6 години. От тях, загиналите в резултат на смърт от асфиксия са 60.7% (34 пациенти: 18 жени и 16 мъже) на средната възраст при фаталния ларингеален оток от 33.3 години. Загиналите в резултат на друга причина (различна от НАЕ: сърдечно-съдов инцидент, злокачествено заболяване, травма, инфекция и др.) са едва 17.9% (10 пациенти: 6 жени) със средна възраст при смъртта 66.7 години. Загиналите в резултат на неясна причина (липсва информация дали причината за смърт е НАЕ или друго заболяване) са 21.4% (12 пациенти, 4 жени), със средна възраст при смъртта 21.3 години. Вероятно е в тази група също известен процент от случаите да са загинали в резултат на фатален оток на ларинкса, както и други неизвестни причини (детска смъртност, битови инциденти, инфекции и др.).

Последната смърт в резултат на НАЕ е регистрирана през 1998 година при пациент на 30 годишна възраст, който умира в дома си от оток на ларинкса. При описания случай той не търси медицинска помощ, знаейки, че в близкото здравно заведение нямат подходящо лечение за неговия вид ангиоедем.

Сравнихме какво е разпределението между пациентите с или без поставена диагноза НАЕ към момента на смъртта в резултат на фатален оток на ларинкса, като данните сочат, че едва при 23.5% от случаите (8 пациенти) смърт е настъпила при вече поставена диагноза НАЕ в резултат на С1 инхибиторен дефицит. Мнозинството от смъртните случаи (76.5%, 26 болни) са получили фатален ларингеален оток преди диагностициране на НАЕ в семейството. Представените данни за смъртността от НАЕ при отсъствие на диагноза и отсъствие на специфична терапия за НАЕ, кореспондират със съобщенията от Bork et al., който коментира тези проблеми в някои от основополагащите публикации за НАЕ (Bork, Siedlecki et al. 2000, Bork and Barnstedt 2003, Bork, Hardt et al. 2003, Bork, Hardt et al. 2012). Съобщената от него смъртност от НАЕ е при около 33% от загиналите случаи, което показва значително по-високата честота на фатални ларингеални атаки в българската група пациенти с НАЕ. Като вероятна причина може да се обсъдят по-ниският процент на диагностицираните случаи в нашата страна, както и особеностите на здравната мрежа и система в България и Германия. Друга гледна точка представят многобройните случаи, при които в миналото пациентите дори не търсят лекарска помощ при остра атака на НАЕ, именно поради вътрешното си убеждение, че специфична терапия за техния случай няма, а стандартно прилаганите кортикостероиди, антихистамини и/или адреналин: няма да помогнат. Такъв е и случаят на последният известен загинал пациент с НАЕ през 1998 година: пациент на възраст от 30 години.

Историята за смъртен случай от НАЕ в семейството е налична при 56% от фамилията (23 семейства). Едва при 17% от фамилията исторически не е наблюдаван случай на смърт от ларингеален оток (7 фамилии). При останалите 27% тази информация не е категорична, тъй като представителите от тези фамилии са загубени от проследяване. Актуални са и данните,

съобщени от Agostoni и Cicardi, които съобщават, че при липса на специфична терапия може да се очаква смърт на до 50% от членовете на фамилия с НАЕ (Agostoni and Cicardi 1992). Загубените от проследяване фамилии в нашата група са 21 броя: 11 семейства с C1-INH-НАЕ тип 1 (18 пациенти), 6 фамилии с C1-INH-НАЕ тип 2 (8 пациенти) и една фамилия, при която не може да се заключи дали е тип 1 или 2 (4 пациенти). При 3 фамилии е настъпила смърт на всички засегнати членове на семейството. От разпределението на загубените от проследяване пациенти по вид на НАЕ може да се дискутира, че изчезналите фамилии са със сигурна диагноза и вероятно с тежки прояви на болестта: 88% с C1-INH-НАЕ тип 1.

## Период 2013-2018

Проспективно проследяване на пациентите с редки форми на ангиоедем бе проведено за периода 2013-2018 година, като пациентите бяха групирани според техните демографски, клинични характеристики, както и терапевтично поведение. Диагностицираните пациенти с редки форми на ангиоедем са 85, като мнозинството от тях са C1-INH-НАЕ тип 1 и 2 (80 и 14%, респективно, които са 85 и 15% от НАЕ). Диагностицирани са два случая на ангиоедем, дължащ се на придобит C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-AAE). Диагнозата при един от пациентите е придобит нехистаминергичен ангиоедем (InH-AAE). При едно семейство (майка и дъщеря) бе поставена диагноза на наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитор (nC1-INH-НАЕ). Броят на диагностицираните фамилии с C1-INH-НАЕ е 26, от които 22 са тип 1 и 4 тип 2. Получените данни съответстват на данните от световната литература за разпределение между C1-INH-НАЕ тип 1 и 2 в съотношение 85:15 (Nzeako, Frigas et al. 2001, Zeerleder and Levi 2016).

### Демографска характеристика

Средната възраст на пациентите с C1-INH-НАЕ е 43 години (обхват, 8-84 г), докато при ААЕ тя е 55 години (48-62 г). Този резултат е очакван, предвид обичайно по-късното начало на болестта при придобития C1-INH дефицит (Bekos, Perkmann et al. 2016, Zeerleder and Levi 2016, Longhurst, Zanichelli et al. 2017, Otani and Banerji 2017, Zanichelli, Azin et al. 2017, Aygoren-Pursun, Magerl et al. 2018, Cicardi and Zuraw 2018).

Разпределение спрямо пол при C1-INH-НАЕ е 54:46% (жени : мъже), което е очаквано предвид автозомно доминантния тип на унаследяване на болестта.

Изчисленото процентно възрастово разпределение при C1-INH-НАЕ и при българската популация (данни на Национален статистически институт, [www.nsi.bg](http://www.nsi.bg)) демонстрира по-ниското застъпване сред възрастовите групи 0-14 г и >65 г при пациентите с C1-INH-НАЕ. Полученият резултат е предпоставка за дискусия относно по-ниската преживяемост при пациентите с C1-INH-НАЕ, както и незадоволителната диагностика на НАЕ в детската възраст и/или нежелание за продължение на рода при пациентите с C1-INH-НАЕ, водещо до по-ниска раждаемост в семействата на пациенти с НАЕ. Данни относно по-ниско възрастово застъпване в ранна и напреднала възраст сред пациенти с C1-INH-НАЕ са съобщени и от Zanichelli et al. (Zanichelli, Arcoleo et al. 2015). Той обяснява явлението с това, че в миналото в Италия пациентите с C1-INH-НАЕ са имали по-малки шансове, в сравнение с общото население, да достигнат до по-напреднали десетилетия от живота. Вероятно е причината в България да е същата, като при нас пациентите намаляват своята възрастова застъпеност спрямо българската популация, още в годините след 65, докато в Италия това се случва след 70 годишна възраст. Очакваме, че диагностичните методи и терапевтичните възможности, които са на разположение днес, ще

премахнат асфиксията като обща причина за смъртност при пациентите с С1-INH-НАЕ и това в бъдеще да доведе до равно представяне на пациентите спрямо общото население в напредналите десетилетия на живота, освен ако други фактори не оказват влияние върху очакваната продължителност на живота при НАЕ.

Проследихме данните за наличие или отсъствие на фамилна анамнеза за ангиоедем в семейството. Положителна такава се наблюдава в 80% от случаите. Тези данни се доближават до очакваните 25% спонтанни de-novo мутации на SERPING1 гена, които са описани в международната медицинска литература (Tosi 1998, Pappalardo, Cicardi et al. 2000, Lopez-Lera, Garrido et al. 2011, Germeis and Speletas 2016).

Средната възраст на поява на симптомите на НАЕ бе открита на 10.4 години (обхват, 1-50), докато средната възраст на поставяне на диагнозата НАЕ: 27.2 години (обхват, 2-79). Съответно, забавянето до поставяне на диагнозата е 16.8 години (обхват, 0-74 г). Тези данни са близки до съобщените за други европейски страни и потвърждават общата липса на добро разпознаване на състоянието, което бива диагностицирано след множество безрезултатни медицински прегледи и неефективно лечение (Zanichelli, Magerl et al. 2013, Gakhil and Marcotte 2014, Psarros, Koutsostathis et al. 2014, Longhurst and Bygum 2016, Caballero, Aberer et al. 2017). Съпоставянето на двата показателя: възраст на проява на НАЕ и възраст при диагностициране на НАЕ, представя разминаването между двата показателя и ниското разпределение на диагнозата в ранните години на живота. Данните сочат, че 93.3% от пациентите получават първите си симптоми до 20 годишна/възраст, докато едва 45.3% получават диагноза преди навършване на тази възраст. Ранното начало на оплакванията от НАЕ са и един от критериите, разпознати като показателни за по-тежкия ход на болестта, както е описано и от други автори (Andrejevic, Korosec et al. 2015, Ohsawa, Honda et al. 2015, Christiansen, Davis et al. 2016, Aabom, Andersen et al. 2017, Bygum, Busse et al. 2017, Gianni, Loules et al. 2017, Grivceva-Panovska, Kosnik et al. 2018).

Средната продължителност на проследяване на пациентите в Клиничния център по алергология и Клиниката по алергология на УМБАЛ "Александровска" е 16 години (обхват, 1-42 г), което може да бъде повод за гордост, с която не могат да се похвалят много европейски страни, при които болестта се разпознава за първи път сравнително скоро.

### *Смъртни случаи*

За периода 2013-2018 бяха регистрирани 4 смъртни случая на пациенти с С1-INH-НАЕ: 2 в резултат на сърдечно-съдово заболяване (усложнения в резултат на мозъчен инсулт и остър миокарден инфаркт), 1 в резултат на дисеминирано злокачествено заболяване (метастатичен рак на млечната жлеза) и 1 в резултат на усложнения на неврологично заболяване (болест на Паркинсон). Причините за смърт в проследения период съответстват на водещите причини за смъртност в българската популация (Национален статистически институт, [www.nsi.bg](http://www.nsi.bg)). Не бе регистриран нито един случай на смърт в резултат на фатален ларингеален оток, което потвърждава напредъка в мениджмънта и ефективността на съвременното специфично лечение на НАЕ, което е на разположение на българските пациенти след 2013 година. Подобна положителна промяна спрямо естествения ход на болестта е съобщен и от други изследователи в резултат на достъпа на пациентите до модерна терапия (Caballero, Aygoren-Pursun et al. 2014, Bork, Bernstein et al. 2016, Longhurst and Bygum 2016).

Средната възраст при регистрираните 4 смъртни случая е 55.0 години, което се наблюдава приближено към очакваната продължителност на живота в българската популация.

Изчислените данните за наличие или отсъствие на смърт от НАЕ във фамилията са съответно 61.5% към 38.5%, което бележи подобрение спрямо установените 17% без смъртен случай от

НАЕ, които установихме в ретроспективната група. Въпреки това, процентът семейства с НАЕ, при които има фамилна история за смърт от НАЕ в предходни поколения, продължава да оказва сериозна психо-социална тежест върху семействата на пациентите (Toscani and Riedl 2011, Fouche, Saunders et al. 2014). Този проблем е сред основните, асоциирани с тежестта на болестта върху качеството на живот, заедно с други показатели като страх да предадат болестта на поколението си, страх от внезапно задушаване, страх от болезнените коремни кризи, притеснение във връзка с външния вид и др. (Aygoren-Pursun, Bygum et al. 2014, Caballero, Aygoren-Pursun et al. 2014, Banerji, Busse et al. 2015, Bygum, Aygoren-Pursun et al. 2015, Bygum, Busse et al. 2017)

### *Клинични прояви на НАЕ*

Анализирахме клиничните прояви на НАЕ спрямо локализациите на ангиоедема: 98.8% представят периферни подкожни отоци, 98.7% – оро-фациални отоци, 91.9% - болезнени коремни кризи, 65.7% генитални отоци, 44.3% - ларингеални отоци. Представяне на проявите на ангиоедема се съобщава от различни изследователски групи с различна честота и застъпеност. Например, почти всички автори съобщават за висок процент на прояви на периферни подкожни отоци (Agostoni and Cicardi 1992, Goring, Bork et al. 1998, Ohsawa, Honda et al. 2015). Обичайната разпространеност на коремните кризи при НАЕ е обект на разнородни съобщения: от около 40 до над 90% от засегнатите пациенти (Bork, Meng et al. 2006, Zanichelli, Vacchini et al. 2011, Nzeako and Longhurst 2012, Xu, Jiang et al. 2013). В нашата пациентска група този процент е от високите, което се асоциира и с по-висока оценка тежестта на болестта, както е съобщено от Bygum et al. (Bygum, Fagerberg et al. 2011). Известен процент от пациентите в нашата група свързват неспецифична неврологична симптоматика (главоболие, дезориентация) като прояви на НАЕ – 27.8%. Подобни съобщения се цитират и от други автори, като е възможно симптомите да са резултат от действието на брадикинин (Luong and Nguyen 1999, Chung and Kim 2012).

### *Инвазивни процедури*

Сред проследените за периода пациенти, известен брой съобщават за свързани с ангиоедема инвазивни медицински манипулации в миналото: 10.3% са били подложени на трахеотомия, а 18.2% са били подложени на лапаротомия в хода на остра коремна криза. Спешната трахеотомия в случая е терапевтична животоспасяваща манипулация, като това е била една от малкото ефективни спешни интервенции в миналото в случай на ларингеален оток (Roche, Blanch et al. 2005, Cicardi, Bellis et al. 2014, Xu, Zhi et al. 2014, Henaо, Kraschnewski et al. 2016, LoVerde, Files et al. 2017). Известен процент от пациентите са били подложени и на интубация в случай на оток, ангажиращ дихателните пътища, когато е преценено, че е възможно ефективното поставяне на въздуховод (Spargo and Smith 1987, Bentsianov, Parhiscar et al. 2000).

Противно на това, инвазивната оперативна или ендоскопска намеса в случай на коремна криза, безспорно се разглежда като ятрогенна намеса (Bork, Bindewald et al. 1997, Gugila, Ruxanda et al. 2003, Janardhanan, Nair et al. 2007, Obtulowicz, Urbanik et al. 2013, Gabos, Dobru et al. 2017) . В нашата пациентска група тази честота е изключително висока: 18.2% от пациентите съобщават за инвазивна оперативна намеса. В един от случаите това води до 3 оперативни интервенции в миналото, 5 спешни ендоскопски изследвания (неколкократно провеждане на спешна колоноскопия и гастроскопия), както и многократни хоспитализации по повод на коремни болки. Поставената “диагноза” е “рецидивиращ илеус” без разпознаване на

характерните прояви за болестта като предшестваща еритема маргинатум (описана като уртикариален обрив) и наличието на подобни оплаквания в 4 поколения на засегнатото семейство. При същия пациент поставянето на диагнозата се случва с 62-годишно забавяне, което е едно от най-големите описвани в световната литература (Peterson and Bugum 2016, Valeriewa A. 2018). Диагнозата е предложена от незасегнатата майка на неговия внук, преди потвърждение в специализирания център за ангиоедем. Изложените факти предлагат обсъждането на ангиоедема да бъде включено във всички медицински учебници и пособия за обучение на студенти по медицина, както и обучение на специализиращите лекари в сферата на хирургията, гастроентерологията, анестезиологията, урологията и нефрологията. Още повече, че преходен, “рецидивиращ асцит” е често наблюдаван симптом в хода на коремна НАЕ криза, което допълнително обърква поставянето на диагнозата от лекар, незапознат с естеството на заболяването (Gabos, Dobru et al. 2017). Ангиоедемът трябва да бъде включен във всички диференциално-диагностични алгоритми за уточняване на рецидивираща коремна болка.

### *Клинична тежест на НАЕ*

Клинична тежест на симптомите при отделните пациенти бе оценена спрямо честота на симптомите от НАЕ, като направихме изчисления за обичайната честота, според анамнезата на пациента, както и според данните за настъпили НАЕ атаки през изминалата 2017 година. Прави впечатление, процентното застъпване на пациентите с висока честота на острите атаки от НАЕ като това е видимо, както от анамнестичните данни за обичайна честота на пристъпите от НАЕ, така и от броя на атаките през изминалата 2017 година. Не е изключено сред двете величини да има известно разминавания, тъй като обичайната честота на пристъпите е вариабилен показател, зависещ от множество фактори. Ако сравним данните с друго проспективно проучване в италианска популция от С1-INH-НАЕ, се установява, че сред италианските пациенти честота на пристъпите от НАЕ >6 пристъпа за годината се наблюдава при около 46% от случаите, докато сред българските пациенти този процент е около 72% (Zanichelli, Vacchini et al. 2011). Причината за това вероятно е големият брой на пациенти, провеждащи дългосрочна профилактика с атенюирани андрогени сред италианските пациенти: около 50% от изследваните 103 пациенти. В българската група едва 9% от пациентите провеждат дългосрочна профилактика с андрогени, като и сред тях профилактиката не е постоянна поради фактори, свързани с притеснение от дългосрочните ефекти от андрогеновата терапия, както и с трудности да се снабдяват с лекарството, което не е достъпно в България.

### *Bugum score*

Тъй като честотата на симптомите от НАЕ (анамнестично или за даден период) са величини с потенциално променлив характер, зависещ от множество комплексни фактори, разпределихме пациентите в 10 категории според клиничната тежест на болестта, спрямо разработения скор за оценка на клиничната тежест на НАЕ предложен от Bugum и сътрудници (Bugum score: обективен числен метод за оценка клиничната тежест на С1-INH-НАЕ) (Bugum, Fagerberg et al. 2011). От получените резултати прави впечатление, че мнозинството от пациентите с НАЕ в българската популция имат стойност на този показател  $\geq 5$ , което съответства на по-тежък клиничен ход на болестта. Тези данни потвърждават наблюденията ни, че диагностицираните пациенти с НАЕ в българската популция спадат към група с по-тежко протичане на НАЕ: ранно начало на оплакванията, множество локализации на ангиоедема, история за дългосрочна профилактика на НАЕ. Интересно е да се коментира и защо българските пациенти имат

сравнително по-тежък ход на НАЕ: вероятно е това да е релативно разпределение на тежестта на болестта, предвид хиподиагностиката на болестта в България. Възможно е случаите с по-редки прояви на болестта да са именно тези, които не са диагностицирани до момента, което би било очаквано предвид слабото познаване на заболяването и незадоволителната информираност сред различните медицински специалисти.

### *Терапевтично поведение при пациентите с НАЕ*

Изследвахме терапевтичните подходи при пациентите с НАЕ, като данните показват, че към сегашна дата мнозинството от пациентите (92.1%) се лекуват с С1 инхибиторен концентрат при нужда (рекомбинантен или добит от човешка плазма). От тях едва 13.2% са способни да извършват самоприложение на медикамента, докато 86.8% търсят помощ от здравен работник или медицинско заведение за венозна апликация при нужда. Този процент на обучените за поставяне на венозна инжекция е сравнително нисък в сравнение с пациенти от други страни (Levi, Choi et al. 2006, Bygum, Andersen et al. 2009, Tourangeau, Castaldo et al. 2012, Rizk, Karsh et al. 2013, Tuong, Olivieri et al. 2014, Aabom, Andersen et al. 2015, Wang, Fouche et al. 2015). Например, Zanichelli съобщава за значително подобряване на качеството на живот на пациентите след провеждане на обучение за самоприложение на интравенозен С1 инхибитор (Zanichelli, Azin et al. 2018). Подобно обучение би било от полза и за българските пациенти с цел подобрене на самостоятелността и възможността за бързо и ефективно справяне с острите прояви на ангиоедем, независимо от конкретната отдалеченост от здравно заведение. Мнозинството от българските пациенти търсят медицинско лице (личен лекар, фелдшер, медицинска сестра) за приложение на медикамента при нужда, което понякога става причина за забавяне поставянето на лекарството, което може да се асоциира и с намаляване на ефективността на терапията (Longhurst, Farkas et al. 2010, Papadopoulou-Alataki 2010, Riedl, Gower et al. 2011, Maurer, Aberer et al. 2013, Bork 2014, Cancian 2015, Wang, Fouche et al. 2015, Zanichelli, Mansi et al. 2015, Nasr, Manson et al. 2016, Maurer, Magerl et al. 2018).

Малък процент от пациентите съобщават за други разновидности на прилаганата специфична терапия за НАЕ: едва двама пациенти съобщават за употреба на брадикинин-2 рецепторен антагонист icatibant при нужда, който не е достъпен в нашата страна до момента; 7 провеждат интермитентна перорална профилактика с андрогени; 1 пациент (педиатричен случай) прилага дългосрочна профилактика с транексамова киселина. И трите лекарства се набавят лично от пациентите от други страни, тъй като не са на разположение във фармацевтичната мрежа на страната.

### *Тригери на НАЕ*

Направихме обобщение на разпознатите причини за провокиране на пристъпите от ангиоедем, които са докладвани като най-чести от пациентите: механична травма (75%), съпътстваща инфекция (50%), хормонални колебания (29%), психо-емоционален стрес (42%), вибрации (7%) или някои храни /канела, ядки, алкохол и др./ (25%). Описаните данни са добре познати от международната литература (Prematta, Bewtra et al. 2012, Bernstein 2013, Caballero, Maurer et al. 2016, Reshef, Kidon et al. 2016, Zuraw and Christiansen 2016), като българските пациенти съобщават и за “нов” стимул, който не е описван от други автори по конкретния начин: “вибрации при продължително пътуване с кола”. Този тригер може да бъде дискутиран към стимулите, асоциирани с механична травма, но поради специфичността на описанието, дадена от пациентите, решихме да го отграничим като отделен провокиращ фактор. Интересно е, че

пациентите, с подобни оплаквания асоциират този провокиращ фактор за специфична причина за оток на гениталиите.

Останалите провокиращи фактори са добре известни от световната литература и потвърждават валидността на общите препоръки при лечение на пациенти с НАЕ: да се избягват по възможност дейности, причиняващи физическа травма, а в случаите, когато такава е наложителна (например, инвазивни медицински манипулации като хирургични и стоматологични интервенции), да се провежда краткосрочна профилактика за НАЕ (Mohr, Pollok-Kopp et al. 1996, Farkas, Gyeney et al. 1999, Bernstein, Coleman et al. 2010, Bork, Hardt et al. 2011, Farkas, Zotter et al. 2012, Frank 2012, Aygoren-Pursun, Martinez Saguer et al. 2013, Jurado-Palomo, Munoz-Caro et al. 2013, Angeletti, Angeletti et al. 2014, Betschel, Badiou et al. 2014, Bhardwaj and Craig 2014, Gavigan, Yang et al. 2014, Nanda, Singh et al. 2014, Nanda, Singh et al. 2014, Farkas, Kohalmi et al. 2015, Williams and Craig 2015, Rosa, Miranda et al. 2016, Henry Li, Riedl et al. 2018). Състояния, при които пациентите са изложени на повишен риск от пристъпи от НАЕ са и съпътстващите инфекции, като подобен период може да бъде разгледан за показан за временна дългосрочна профилактика (Farkas, Gyeney et al. 1999, Rais, Unzeitig et al. 1999, Farkas, Fust et al. 2001, Visy, Fust et al. 2007). Хормоналните колебания са друга част от асоциираните състояния, водещи до повишена честота на пристъпите от НАЕ (Frank 1979, Bockers and Bork 1987, Kashyap and Kashyap 2002, Agostoni, Aygoren-Pursun et al. 2004, Bouillet, Longhurst et al. 2008, Mowat and Kimble 2014, Iahn-Aun, Aun et al. 2017). Такъв феномен на влошаване на хода на болестта се наблюдава и при въвеждане на естроген-съдържащи перорални контрацептивни средства, което е и причина за манифестиране на болестта в някои от случаите (Ebo, Verweij et al. 2010, Caballero, Farkas et al. 2012, Bergmann, Caubet et al. 2013, Bouillet and Gompel 2013, Caballero, Canabal et al. 2014, Mowat and Kimble 2014). Психоемоционалният стрес и определени храни също са докладвани като влошаващи оплакванията от НАЕ, като оценката е затруднена от редица субективни фактори, валидни според конкретния случай (Zotter, Csuka et al. 2014, Caballero, Maurer et al. 2016, Wu, Casella et al. 2017).

### *Продроми на НАЕ*

Подобно на други данни от медицинската литература, голям процент от пациентите с НАЕ съобщават за продромни симптоми (предшестващи симптоми), асоциирани с начало на прояви на ангиоедем. В нашата група са описани редица от обичайно разпознатите предшестващи ангиоедема симптоми като отпадналост, главоболие (34%), специфичен кожен обрив – еритема маргинатум (41%), неспокойство (32%) или сънливост (21%). Около една трета от пациентите съобщават, че не могат да предвидят проявите на ангиоедем според предшестващи симптоми. Тези данни са подобни на докладваните в групи пациенти от различни страни (Warin 1983, Prematta, Bewtra et al. 2012, Magerl, Doumoulakis et al. 2014, Zotter, Csuka et al. 2014, Tachdjian, Banerji et al. 2015, Caballero, Maurer et al. 2016, Martin, Renne et al. 2016, Rasmussen, de Freitas et al. 2016, Reshef, Kidon et al. 2016), като “сънливостта” до колкото ни е известно не е сред съобщаваните до момента.

Начилието на еритема маргинатум е една от най-характерните черти на започваща НАЕ атака (Farkas, Harmat et al. 2001, Starr, Brasher et al. 2004, Bygum 2009, Rasmussen, de Freitas et al. 2016). Някои автори дори смятат появата ѝ за начало на пристъпа на НАЕ и съветват прилагане на лечението още в този много ранен етап преди настъпване на страдание, причинено от оток или коремни болки (Bygum and Broesby-Olsen 2011). Подобен съвет се приема за вероятно полезен в клиничната практика, но спекулативен, тъй като липсват данни, показващи какъв процент от случаите, при които се наблюдава еритема маргинатум, са



последвани от остра атака на ангиоедем (Magerl, Doumoulakis et al. 2014, Martinez-Saguer and Farkas 2016, Rasmussen, de Freitas et al. 2016, Kohalmi, Veszeli et al. 2017).

### *Съпътстващи заболявания*

В разглежданата група C1-INH-НАЕ пациенти, анализирахме разпознатите съпътстващи заболявания, като такива се откриха в 34 от наличните за анализ 58 пациенти. Най-честите са: хипертония - 25 случая (40%), захарен диабет - 4 случая (6.6%), злокачествени заболявания - 2 случая (3.3%), 2 случая на автоимунно заболяване (3.3%), 3 случая на неврологично заболяване (5%) и 4 случая на друго съпътстващо генетично заболяване (6.6%). Липса на разпознати съпътстващи заболявания се наблюдава при 25 (31.3%) от пациентите. Трудно е да се коментира наличието на придружаващи ангиоедема заболявания, като за момента те могат да се разглеждат като независещи от ангиоедема. Честотата на тези болести в българската популация също е голяма, което прави задачата да се предвидят зависимостите между присъствието на генетичен C1 инхибиторен дефицит като предразполагащо за даден вид заболяване – не лесна задача. Липсват и подобни данни в световната литература, вероятно поради трудността да се окрупнят данни от достатъчен брой пациенти, предвид рядката честота на болестта. Единственото, което открихме като дискусия е за връзката с продължителната профилактика с андрогени върху дългосрочния здравен риск на спазващите такава терапия пациенти (Cicardi, Castelli et al. 1997, Frank and Jiang 2008, Hsieh and Chen 2008, Dagen and Craig 2010, Zanichelli, Wu et al. 2015, Bork 2016, Greve, Strassen et al. 2016, Zuraw, Davis et al. 2016, Kohalmi, Veszeli et al. 2017, Longhurst and Zinser 2017, Tse, Zuraw et al. 2017). Известно е, че съществен брой от българските пациенти са приемали в миналото продължителни курсове с атенюирани андрогени поради липсата на алтернативни медикаменти. Връзката на тази терапия в миналото с наблюдаваните сега сърдечно-съдови, гастроентерологични, ендокринологични и неврологични болести не може да бъде обективно оценена. Според нас актуален е и въпросът към какви състояния води генетичната предразположеност към хиперпермеабилитет. Wu et al. например, коментират наличието на подлежаща автономна дисрегулация при пациенти с C1-INH-НАЕ (Wu, Casella et al. 2017). Съществуват и наблюдения за инверсия в причините за смъртност сред италиански пациенти с C1-INH-НАЕ с превес на злокачествените заболявания, спрямо общата популация [лична комуникация, непубликувани данни на Chiara Pomaranzi, Francesca Perego, Antonio Gidaro et Marco Cicardi]. Атрактивна е спекулацията, че състоянието на хиперпермеабилитет, предразполага и към нео- процеси, предвид фактът, че съдовият пермеабилитет е от основно значение за нарастването на новообразуванията, като неразривна част от ангиогенезата (Raju and Ibrahim 2011, Breuss and Uhrin 2012, Dejana and Giampietro 2012, Anisimov, Tvorogov et al. 2013, Tacconi, Correale et al. 2015, Gordon, Fukuhara et al. 2016). Steffania Loffredo et al. съобщават за увеличени про-ангиогенни фактори при пациенти с C1-INH-НАЕ, като това е обект на интересни настоящи изследвания (Loffredo, Vova et al. 2016). Насочени към подобна тема са и изследванията на Bossi et al., която анализира наличието на взаимно-свързаност между кининовите системи и съдовия пермеабилитет (Bossi, Peerschke et al. 2011).

### *Лабораторни изследвания*

Данните от лабораторните изследвания, проведени при българските пациент с C1-INH-НАЕ сочат, че концентрацията на C1-INH се открива много под допустимите референтни граници при мнозинството пациенти. Въпреки това, малък брой пациенти имат плазмена концентрация на протеина, попадаща в нормата или над нея, което кореспондира с C1-INH-НАЕ тип 2, където

се синтезира количествено нормален (или по-голямо количество), но дисфункционален плазмен протеин. Тези наблюдения потвърждават твърденията на други международни автори, коментиращи важността на изследването концентрацията на С1 инхибитора в плазма, без абсолютизиране на резултата, тъй като съществуват около 15% от случаите на С1-INH-NAE тип 2, при които количеството на плазмения протеин е нормално или дори повишено (Krishna, Goswami et al. 2005, Zuraw and Christiansen 2009, Cicardi, Aberer et al. 2014, Farkas, Veszeli et al. 2016, Maurer, Magerl et al. 2018).

От функционалното изследване на протеина се вижда, че всички пациенти имат ниски функционални нива на С1 инхибитора, далеч под нормалните 70% активност, бележеща долната граница на нормата. Стойността на функционалната активност на протеина обикновено е около 10-20% при нашите пациенти, в няколко случая – до 38% от нормата. Тези изследвания потвърждават напълно диагнозата С1-INH-NAE сред разглежданите пациенти. Редно да е се има предвид, че препоръчително е изследванията на С1 инхибитора да се анализират в комплект (концентрация и функция) и да не се абсолютизира значението единствено на изследването концентрацията или функцията на протеина. Този коментар е необходим поради съображението, че функционалното изследване на С1 инхибитора е трудоемка и много чувствителна методика, предразполагаща към известен брой фалшиво понижени резултати, именно поради капризността на метода. Резултатите са чувствителни, както на спецификите на самата методика, така и на условията на съхранение на материала от плазма преди изследването (Molina, Brun et al. 1977, Schapira, Silver et al. 1982, Morris, Slavin et al. 1987, Nilsson 1987, Chng and Boey 1990, Sim and Grant 1990, Cicardi, Bergamaschini et al. 1998, Gompels and Lock 2005, Wagenaar-Bos, Drouet et al. 2008, Bowen, Cicardi et al. 2010, Cicardi, Suffritti et al. 2016, Farkas, Veszeli et al. 2016).

От изследванията на С4 се вижда добрата диагностична стойност на изследването, което е показателно за функционалния дефицит на С1 инхибитора при пациентите с С1-INH-NAE. Изследването на С4, също така, е най-достъпно и приложимо от гледна точка на своите икономически параметри: ниска цена, достъпност на метода, който може да се изработи практически във всяка лаборатория, устойчивост на протеина и ниска зависимост на резултата при обичайни условия за съхранение на плазмения материал. Макар и малък процент (около 5-6%), някои пациенти демонстрират плазмена концентрация на С4 около нормата, което би довело до “фалшиво” отрицателен резултат и потвърждава необходимостта от количествено и функционално изследване на С1 инхибитора при съмнение за С1-INH-NAE.

Като допълнение, изследвахме корелацията на функционалната активност на С1 инхибитора (най-чувствителен показател за нарушение на ефективността на протеина) и показателя за оценка на тежестта на болестта (Vugum score), като резултатът отхвърля наличието на зависимост между двете. Подобна корелация се наблюдава при унгарски пациенти (Csuka, Fust et al. 2011), но не и при други популации (Vugum, Fagerberg et al. 2011). Нашите данни отхвърлят зависимостта на лабораторния показател за С1-INH (функция) с клиничния ход на болестта и потвърждават единствено диагностичното му значение.

В групата на придобит С1 инхибиторен дефицит (С1-INH-AAE) проведохме изследвания за специфични неутрализиращи антитела срещу С1 инхибитора (ELISA), като антитела от клас IgM се откриха слабо положителни при един от двата случая на тази диагноза в нашата група. Наличието на тези антитела потвърждава патофизиологичния механизъм, по който възниква дефицитът на С1 инхибитора в разглеждания случай (Zanichelli, Suffritti et al. 2013, Ates, Sunar et al. 2015, Castelli, Wu et al. 2016, Farkas, Veszeli et al. 2016, Aabom, Vugum et al. 2017). И двата случая на С1-INH-AAE в нашата група се явяват при пациенти със съпътстващо лимфопролиферативно заболяване. Изследванията за целите на нашия проект бяха извършени лично с участието на докторанта при практиката ѝ по програма за обучение на

докторанти в Лабораторията за изследване на Комплекента, ръководена от Prof. Marco Cicardi, Университет на Милано, Болница Луиджи Сакко, Милано, Италия. Методиката е дизайнерски адаптирана по Alsenz et al., с използването на собствени реактиви за положителна контрола (IgA, IgG и IgM) (Alsenz, Bork et al. 1987, Alsenz and Loos 1988, Alsenz, Lambris et al. 1989, Alsenz and Loos 1989, Cicardi, Zingale et al. 2003, Cicardi and Zingale 2007, Zanichelli, Suffritti et al. 2013). Уместно е да се коментира нуждата от въвеждане на това изследване в практиката в България, което към момента не е достъпно като рутинно изследване на пациенти при съмнение за придобит C1 инхибиторен дефицит.

Изследванията на C1q при двата случая на придобит ангиоедем показва наличие на протеина в референтни граници. Този резултат не отхвърля диагнозата, тъй като C1q може да бъде в референтни граници при около 30% от изследваните пациенти с C1-INH-AAE (Cicardi and Zanichelli 2010, Farkas, Veszeli et al. 2016, Otani and Banerji 2017). Още повече, кръвният материал при единия пациент бе получен в етап на ремисия на ангиоедема и съпътстващото лимфопролиферативно заболяване. Като допълнение при същия пациент, разпадането на високомолекулния кининоген показва стабилност на молекулата, което предполага ниска степен на брадикининовото влияние към конкретния момент.

Разпадането на високо-молекулния кининоген (HMWK) при пациента с InH-AAE (идиопатичен не-хистаминергичен придобит ангиоедем) показва, че липсват данни за разпадане на кининогена при този пациентът, което не потвърждава брадикининовия механизъм на състоянието. HMWK разпадането потвърди механизма на ангиоедема при пациент с de novo C1-INH-AAE (един от трите случая, при които не се открива мутация с SERPING1 чрез проведената таргетна NGS, най-вероятно с недетектируема мутация в интроните на гена).

При пациентите от семейството с C1-INH-AAE тип 2 (5 пациенти с нова мутация **Asn271-Asn272**) се демонстрира напълно разграждане на високомолекулния кининоген, което е белег за нестабилността на молекулата при отсъствието на функциониращ основния контролиращ ензим - C1 инхибитор. Това е и косвено доказателство за патофизиологичния механизъм в конкретния случай, потвърждаващ нашите in silico симулации и предвиждания относно загубата на функционална активност на мутиралия C1 инхибиторен протеин.

## ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 4

*Създаване на карта на пациентите с редки форми на ангиоедем (C1-INH-НАЕ) на територията на Р. България и изчисляване честотата на диагнозата в различните административни области на страната*

Според международните данни за C1-INH-НАЕ, честотата на заболяването варира средно между 1 случай на 10 000, до 1 случай на 64 000 души (Zanichelli, Arcoleo et al. 2015, Aygoren-Pursun, Magerl et al. 2018).

Обобщавайки данните, представени в Глава 3, изчислихме честотата на C1-INH-НАЕ в България: **1 : 93,105**. Тези данни сочат по-ниска честота на C1-INH-НАЕ в сравнение с исторически съобщената за българската популация от проф. Божков и доц. Стаевска: 1:68,000 [Божков Б., М.Балева, Кр. Николов, М. Стаевска, М. Угърчински, И. Стоилов, В. Ганев, И. Кременски, А.Алексиев, Т. Лисичков. Наследствен ангиоедем – резултати от досегашните проучвания и перспективи. Сборник пленарни доклади, III Национален конгрес по алергология, 152 – 157; Божков Б, М. Стаевска. Проучване на наследствения ангиоедем (НАЕ) в България от Катедрата по алергология при Медицински факултет – София. Годишник на БАКИ 2008:1:51-55]. Намалението на честотата на НАЕ се наблюдава поради загубата от проследяване на съществен брой от проследяваните към 1990-2000 година пациенти. Съдбата на тези пациенти продължава да бъде неясна, като положителната гледна точка е, че спонтанно през известен период от време представители на тези фамилии търсят медицински съвет относно заболяването си в Клиниката по алергология и постепенно липсващите страни на историята на НАЕ в България започват да се запълват. Не е изключено част от тези пациенти да не са преживели, за да потърсят консултация със специалист и за съжаление такава е и очакваната прогноза при отсъствие на специфично лечение в случай на остър пристъп на ларингеален оток (Cicardi, Bergamaschini et al. 1982, Cicardi and Zingale 2003, Cicardi and Zanichelli 2010, Bork, Hardt et al. 2012, Bork 2016).

От данните е видно, че получената средна честота за страната е прекалено ниска и вероятно диагностиката на болестта в България не е задоволителна, По наши прогнози откритите случаи на C1-INH-НАЕ са около половината от очакваните за населението на страната.

Разпознавайки проблема, решихме да изготвим карта на пациентите с C1-INH-НАЕ, които се следят на територията на страната и да изчислим честотата на диагнозата в различните административни райони на Р. България.

Анализът показва наличието на 13 области на страната, в които няма нито един диагностициран случай на НАЕ. Най-големите от тях са Бургас, Пазарджик, Хасково и Русе с общо население около 1 000 000 души. Останалите 9 области (Добрич, Кърджали, Кюстендил, Ловеч, Разград, Сливен, Смолян, Търговище и Ямбол) имат население около 1.5 млн. души. Това прави липса на диагнозата в част от България с общо население около 2.5 млн. души, където се очаква да живеят между 40 и 250 пациенти с C1-INH-НАЕ, изчислено според международните данни за разпространение на болестта. В други области, макар да има няколко диагностицирани случая на НАЕ, изчислената честота на болестта е много под очакваната (например Стара Загора, Шумен, Благоевград, Враца, Перник).

Причините за подозираната хиподиагностика на болестта са много, част, от които свързани с особености на здравната мрежа в описаните области, трудности в достъпа до консултация с обучен за състоянието лекар (най-често алерголог), социална стигма за търсене на помощ по повод на неясно генетично заболяване и много други.

Трудно е да се предвиди точната честота на НАЕ в българската популация, предвид историята за имиграция на известен брой от българските пациенти през годините, когато в страната не са съществували никакви терапевтични възможности за лечение на проявите на НАЕ. Известни са случаи на такива пациенти, които в момента се лекуват в други европейски страни (Италия, Австрия, Германия, Испания, Португалия), където семействата има са потърсили по-приемливи условия за живот и лечение на болестта. Подобен вид *имиграция по медицински причини* е описвана от няколко автори, разглеждащи проблеми, асоциирани с редки болести и неравнопоставен достъп на пациенти от различни страни до модерни методи за диагностика и лечение (Winyard 2007, Pohjola, Hedley et al. 2016).

През последните години се наблюдава и обратното явление: някои пациенти да се завръщат в страната, разбирайки, че вече и тук са налични съвременни медикаменти за лечение на НАЕ. Такъв е случаят на двама членове на едно от големите семейства с C1-INH-НАЕ, които са прекарвали около 10 години в Испания и през последните 2 години живеят отново в България. Видно е, че причините да вземане на решение дали да живеят в България или в друга страна на Европейския съюз са комплексни, но фактът, че достъпът до лечение на заболяването им не участва в този избор, е желана стъпка на напредък при пациентите с НАЕ.

## **ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 5**

### *Изследване приносите на генетичното изследване и биобанкирането при пациенти с ангиоедем*

Съвременните генетични изследвания разкриват, че ангиоедемът представлява разнородна фамилия от състояния, свързани с кининовия метаболизъм, като реалността е свързана с много по-голяма генетична сложност и разнообразие от първоначално предвижданите. През изминалите години бяха публикувани убедителни данни, показващи, че клиничната хетерогенност на наследствения ангиоедем, дължащ се на дефицит на C1 инхибитора (класифициран като C1-INH-НАЕ), се асоциира с мутации на *SERPING1* гена, или на мутации в кодиращи гени за ензими, участващи в метаболизма или функцията на брадикинина (Gosswein, Kocot et al. 2008, Johnston 2011, Craig, Bernstein et al. 2014, Speletas, Szilagyi et al. 2015, Germeis and Speletas 2016, Zuraw and Christiansen 2016, Loules, Zamanakou et al. 2018). Мутации, установени във Фактор 12 (F12), се считат за отговорни за около 25% от случаите на наследствен ангиоедем с нормален C1-INH (nC1-INH-НАЕ) (Dewald and Bork 2006, Duan, Binkley et al. 2009, Picone, Donnadieu et al. 2010, Vitrat-Hincky, Gompel et al. 2010, Bork, Wulff et al. 2011, Kiss, Barabas et al. 2013, Bjorkqvist, de Maat et al. 2015, Firinu, Bafunno et al. 2015, Moreno, Valle et al. 2015). Наскоро описаните мутации в гените за плазминоген (PLG) и ангиопоетин-1 (ANGPT1) са сред последните, разпознати да водят до състояния, предразполагащи към прояви на пароксизмален хиперпермеабилитет (Bafunno, Firinu et al. 2018, Bork, Wulff et al. 2018).

Повече от 125 години след разпознаването на наследствената природа на НАЕ от Osler (Osler 1888), хетерогенността на клиничните прояви, генетиката на това заболяване и връзките между генотип и фенотип, все още представляват предизвикателство, което ще бъде разкрито в бъдещето (Andrejevic, Korosec et al. 2015, Grivceva-Panovska, Kosnik et al. 2018). Очаква се широкомащабни, задълбочени генетични изследвания да отговорят на причинните въпроси, свързани с възникването на болестта, но и да изяснят по-подробно много от неясните патогенетични пътища на ангиоедема. Откриването на генетични биомаркери, влияещи върху

тежестта на заболяването и / или ефективността на различните средства за лечение, може да доведе до предотвратяване на остри атаки и оптимизиране на лечението на пациентите, страдащи от ангиоедем. В България първите пилотни генетични изследвания при пациенти с НАЕ са проведени от екип на Клиниката по алергология и Катедрата по медицинска генетика на МУ-София през 1997 г (Стаевска М., А. Савов, В. Ганев, И. Кременски, М. Балева и Б. Божков. Полиморфизъм на C1-инхибиторния ген у здрави и болни с наследствен ангиоедем у нас – предварителни резултати от генетичните проучвания. Съвр. мед. 1997, №6, 17-21). Тогава са изследвани проби от 14 пациенти, принадлежащи към 10 фамилии с диагностициран НАЕ. Открити са 2 големи делеции на екзон 4 и една точкова мутация (Val458Met), която е открита при пациенти и при здрави.

Предвид актуалността на проблема, предприехме две основни стратегии за изследване на групите пациенти с ангиоедем: 1) брадикинин-медиирани и 2) хистаминергични форми. При първата група бяха извършени генетични изследвания, насочени към разпознаване на мутации в гените *SERPING1*, както и *F12*. Това доведе до **най-мощното генетично изследване в българската популация на пациенти с брадикинин-медиирани форми на ангиоедем.**

Изследванията бяха проведени като част от мащабен международен изследователски проект (главен изследовател проф. Анастасиос Герменис, Лариса, Гърция) за изследване на генетичните аспекти при пациенти с прояви на пароксизмален хиперпермеабилитет, с участие на учени от Гърция, Италия, Испания, Германия, Австрия, Унгария, Полша, Румъния, Франция и Иран.

В хода на проекта бяха извършени генетични изследвания на представители на 19 от 26-те фамилии с C1-INH-НАЕ в българската популация, като това представлява **генотипизиране на 73% от всички диагностицирани фамилии с НАЕ в България.** При 13 от фамилиите бе открита патогенна мутация в *SERPING1* гена, **като 3 от тези мутации се откриха за първи път като причинни за C1-INH-НАЕ.** Разпознатите мутации бяха описани и съобщени в публичната Human Genome Database. При 3 от семействата мутация не бе открита. При останалите 3 фамилии резултатът все още се очаква, като първоначалните изследвания, предлагат извършване на цялостен NGS, тъй като таргетното изследване на очакваните причинни гени не показва наличие на мутация. Липсата на открита мутация в *SERPING1* според международните данни за липса на откритие на мутация при C1-INH-НАЕ е около 5 до 10% от случаите (Canonica and Rossi 2012, Craig, Bernstein et al. 2014, Ohsawa, Honda et al. 2015, Хуе, Ankala et al. 2015, Steiner, Keller et al. 2017). При нас този процент е около 15 (3 от изследваните 19 семейства с C1-INH-НАЕ), което може да е инцидентно установена висока честота, вероятно поради хиподиагностицираните случаи в България.

Проведени бяха и изследвания на пациенти с C1-INH-AAE, nC1-INH-НАЕ и InH-AAE, като генетичното изследване доказва липса на патогенни мутации в гените *SERPING1* и *F12*. Генетичен скрининг на неясните случаи е предложен от водещите автори, с цел опит за диагностично уточняване на пациентите с неясен брадикинин-медиран ангиоедем (Germenis and Speletas 2016, Loules, Zamanakou et al. 2018).

### Открити мутации

Генетичният скрининг чрез новата потребителска таргетна NGS платформа разкри: 3 nonsense мутации (в екзон 3, екзон 6 и екзон 8), 4 дефекта на мястото на снаждане (splicing дефекти: в интрон 2, интрон 3, utr-5), 2 изменения на четене на рамката (frameshift мутации: екзон 3 и екзон 4), 1 INDEL мутация без промяна на рамката (екзон 5), 2 missense мутации (екзон 8) и 1 голяма делеция на екзон 4.

Новооткрытая мутация, затрагивающая рамку на считывание гена (frameshift: **p.Asn73fs**) является показательной для тяжелого клинического течения НАЕ, вызывая 2 смертельных случая в 3 поколениях C1-INH-НАЕ пациентов. В этом семействе наблюдается плазматический уровень C1 ингибитора, который составляет приблизительно 50% от нормальной референтной границы, так как протеин синтезируется только из единственного здорового гена у пациентов.

Вторая вновь открытая мутация является заменой одной аминокислоты **Pro200Leu** в экзоне 4. Polyrphen анализ предполагает, что подобная замена является доброкачественной и слабо влияет на конформационную стабильность белка через FoldX. Мутации в этой области предполагаются быть полиморфными для других серпинов (Miranda, Ferrarotti et al. 2017).

Третья вновь открытая мутация является делецией нуклеотидов, кодирующих **Asn271-Asn272** в экзоне 5. Эта мутация является соседней с делецией в *C1-INH Ta* (p.Lys273del), связанной с НАЕ Тип 2 (Zahedi, Aulak et al. 1996). Интересно, что до момента *C1-INH Ta* был единственным вариантом C1-INH-НАЕ Тип 2, где мутация находится вне области, отвечающей за реактивный центр серпина (экзон 8). Предполагается, что мутация в этой части молекулы создает предпосылку для дополнительного места для гликозилирования белка, что со своей стороны мешает нормальной конформации и ферментативной активности. Вероятно, это и предположительно приводит к образованию олиго- и/или полимеров из C1 ингибитора, что не позволяет ему выполнять нормальную функцию. Из исследований у наших пациентов видно, что их количественные уровни C1-INH близки к нормальной границе, однако функциональная активность белка низкая (15-30% от нормы). Предполагаемые механизмы, среди которых мутация **Asn271-Asn272** затрагивает действие фермента к моменту его синтеза, являются предметом спекуляций с нашей стороны. Предстоит молекулярно-механистический анализ после очистки мутантного белка из плазмы, в том числе в сотрудничестве с Лабораторией по изучению комплемента, Университетом Милано, Италия.

У группы пациентов с хистаминергическим ангиоэдемом с хронической уртикарией (пациентская группа по Главе 2), был сохранен ДНК материал от 20 пациентов с тяжелым клиническим течением заболевания (резистентные к терапии случаи). Эта *первая для Болгарии биобанка с ДНК материалом от пациентов с хистаминергическим ангиоэдемом и хронической уртикарией*, может послужить для проведения будущих генетических исследований для распознавания вероятных генов, патогенных для состояния.

## ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 6

### *Предлагане на клиничен алгоритъм за диагностициране и поведение при пациентите с прояви на ангиоедем*

Ангиоедемът е честа причина за посещение при лекар. Диагностичното и терапевтичното поведение при пациентите с ангиоедем, обаче, често е затруднено в клиничната медицинска практика поради редица фактори. Не добре известни са патофизиологичните разновидности на различните фенотипове ангиоедем, което е предпоставка за трудности в клиничното разграничаване на отделните форми. Диагностичната оценка и подходящата диференциална диагноза са от решаващо значение при заболяване с такъв хетерогенен клиничен профил (Craig, Bernstein et al. 2014, Bernstein, Cremonesi et al. 2017, Dreyfus 2017, James and Bernstein 2017). Правилната клинична оценка изисква подробна и внимателна медицинска анамнеза (прием на определени медикаменти, фамилна история за ангиоедем и др.), както и някои минимални лабораторни изследвания, които разгледахме подробно в предните глави (Farkas, Veszeli et al. 2016, Zeerleder and Levi 2016, Dreyfus 2017, Loules, Zamanakou et al. 2018).

Направихме подбор на най-важните клинични признаци, насочващи към диагнозата, като сред тях са скоростта на поява на симптомите, времето до тяхното спонтанно отминаване, възрастта на първата поява, преобладаващата локализация на ангиоедема, факторите влошаващи оплакванията, наличието на фамилна анамнеза и присъствието на лекарствата, влошаващи оплакванията.

Симптомите варират в зависимост от местоположението на ангиоедема:

- Кожният оток може да причини обезобразяване и да влияе на ежедневните дейности,
- Ларингеалният оток може да бъде живото-заstrашаващ,
- Коремните атаки могат да бъдат съпроводени с непоносима болка и да доведат до повръщане, диария и ятрогенни намеси (Bork, Staubach et al. 2006, Bork, Hardt et al. 2012, Caballero, Aygoren-Pursun et al. 2014, Valerieva A. 2018).

Продромите при атаките от ангиоедем могат да включват умора, общо неразположение, специфичен кожен обрив и/или локално дразнене. Поради това е важно комплексно разглеждане на всички фактори и клинични признаци при оценка на състоянието, което пък от своя страна е от решаващо значение за избора на коректна терапия. В предложената от нас таблица се застъпват основните белези, които насочват към фенотипово категоризиране на ангиоедема, както и насоки към подходящите за състоянието медикаменти.

В предложения от нас оригинален диагностичен алгоритъм са посочени основни стъпки, които ръководят към правилна комплексна диагноза и поведение, като неговото следване предлага логична последователност и се основава на ясни и лесни за оценка обективни критерии.



## 8. Изводи и препоръки

### **Изводи**

1. Рецидивираният ангиоедем е хетерогенно заболяване с различни клинични фенотипове.
2. Имунният дисбаланс е в основата на минимално-персистиращото системно възпаление при пациентите с хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария.
3. Неразпознаването и ненавременната диагноза при редките форми на ангиоедем остават сред водещите фактори, асоциирани с усложнения и/или ятрогенни намеси.
4. Смъртните случаи в резултат на НАЕ са по-чести сред групата пациенти без установена диагноза към момента на фатален ларингеален оток.
5. Диагностицираните пациенти с НАЕ в българската популация спадат към група с по-тежко протичане на НАЕ: ранно начало на оплакванията, множество локализации на ангиоедема, история за дългосрочна профилактика на НАЕ.
6. От генетичните изследвания при пациенти с редки форми на ангиоедем в българската популация бяха разпознати 3 нови патогенни варианта в SERPING1, които се съобщиха за първи път в Human Genome Database при пациенти от България.
7. Предложена бе актуализация на клинично-патофизиологичната класификация на различните фенотипове ангиоедем.
8. Предложен бе оригинален алгоритъм за диагностика и поведение при пациенти с рецидивиращ ангиоедем.

### **Препоръки**

1. Необходимо е предприемане на активни действия за подобряване познаването и диагностиката на редките брадикинин-медирирани форми на ангиоедем.
2. Идентифицирани бяха административните области на Р. България, където се предполага, че има значимо намалена честота на диагнозата на редките форми на ангиоедем, като се предлага в описаните райони да бъдат предприети активни мерки за повишаване информираността на населението и здравните работници за възможностите за лечение и профилактика на редките форми на ангиоедем.
3. Предлага се ангиоедемът да бъде включен във всички диференциално-диагностични алгоритми за уточняване на рецидивираща коремна болка.
4. Предлага се въвеждане на представения алгоритъм за диагностика и поведение при рецидивиращ ангиоедем при широка група от медицински специалисти: алерголози, дерматолози, анестезиолози, хирурзи, УНГ-специалисти, гастроентеролози.

## 9. Справка за приносите на дисертационния труд

### **Оригинални приноси**

1. За първи път в България се осъществи характеризиране на пациентите с редки форми на ангиоедем (научно-теоретичен).
2. Извърши се най-мащабното генетично изследване на пациентите с НАЕ в българската популация, като бяха разпознати 3 нови мутации в SERPING1, които се съобщиха за първи път в Human Genome Database при пациенти от България (научно-теоретичен).
3. Оцениха се показатели за имунна дисрегулация и системно възпаление при пациенти с хронична спонтанна уртикария (ХСУ), като степента на минимално-персистиращото възпаление се откри значимо за клиничния ход на болестта (научно-теоретичен и научно-приложен).
4. Създаде се биобанка с ДНК материал от тежка-много тежка ХСУ, която да послужи за бъдещи генетични изследвания в тази пациентска група (научно-теоретичен).
5. Предложи се актуализация на класификацията на различните типове ангиоедем, съгласно новостите в познанието за патофизиологията на някои новоразпознати форми на НАЕ (научно-теоретичен и научно-приложен).
6. Честотата на диагнозата С1-INН-НАЕ се откри неравномерно разпределена в различните административни райони на страната, като бе открито, че в 13 области няма диагностициран нито един случай на НАЕ (научно-приложен).

### **Потвърдителни приноси**

1. Забавянето на диагнозата при редките форми на ангиоедем остава сред водещите фактори, асоциирани с усложнения и/или ятрогенни намеси.
2. Смъртните случаи в резултат на НАЕ са по-чести сред групата пациенти без установена диагноза към момента на фатален ларингеален оток.
3. Възрастовото разпределение при пациентите с редки форми на ангиоедем бе наблюдавано различно спрямо общата популация.
4. Нашите данни отхвърлят зависимостта на имунологичния показател за функционална активност на С1-INН с клиничния ход на НАЕ (според обективния Vugum score) и потвърждават единствено диагностичното значение на лабораторното изследване.

## 10. Публикации и научни съобщения

### Публикации

- I. Публикации в международни списания с ISI импакт фактор:
  1. **Anna Valerieva**, Marco Cicardi, James Baraniuk, Maria Staevska. The physician and hereditary angioedema friend or foe: 62-year diagnostic delay and iatrogenic procedures. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* (2018) 14:75 DOI: 10.1186/s13223-018-0275-4  
**IF: 2.26 (November 2018)**
- II. Публикации в международни списания без ISI импакт фактор
- III. Публикации в национални списания
  2. **Валериева А**, Чикарди М, Димитров В, Стаевска М. Ангиоедем: наследствени и придобити форми. История и класификация. *Алергии, Хиперсензитивност, Астма* 2018;14 (1): 23-30
  3. **Валериева А**, Чикарди М, Димитров В, Стаевска М. Патофизиология и клинични фенотипове на ангиоедема. *Алергии, Хиперсензитивност, Астма* 2018;14 (1): 31-44
  4. Петкова Е, М. Стаевска, **А. Валериева**, В. Димитров. Връзка на стреса като невроендокринен фактор с клиничния ход на болестта при пациенти с хронична уртикария. *Алергии, Хиперсензитивност, Астма* 2016;13;(2) 34-41
  5. Петкова Е., М. Стаевска, **А. Валериева**, В. Димитров Терапевтично поведение при хронична уртикария: Препоръки на EAACI, AAAAI и BSACI. *Алергии, Хиперсензитивност, Астма* 2016;13;(2) 53-64
- IV. Участия в монографии, учебници, сборници, ръководства

### Научни съобщения

### Международни форуми

- V. Участия в международни научни форуми
  1. **Valerieva A**, Vasileva M, Velikova Ts, Petkova E, Dimitrov V, Staevska M, Hereditary Angioedema in Bulgaria: Clinical and Therapeutic Characteristics, 10<sup>th</sup> C1inh Workshop, May 2017, Budapest, Hungary.
  2. **Valerieva A**. Hereditary angioedema and breast cancer: tamoxifen exacerbating angioedema attacks (case discussion). HAE Exchange program for experts (HAE ExPERT) Meeting, 2018, Berlin, Germany
  3. **Valerieva A**, Staevska M, Zamanakou M, Loules G, Caccia S, Cicardi M, Germeis A. Hereditary Angioedema: Novel Targeted Next Generation Sequencing revealed Novel Mutations of the SERPING1 gene in the Bulgarian Population. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
  4. **Valerieva A**, Krusheva B, Staevska M. Long-Term Prophylaxis with Recombinant Human C1 Inhibitor in Patients with Hereditary Angioedema: Extended Experience with Intramuscular Administration. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
  5. **Valerieva A**, Staevska M. Intramuscular Administration of Recombinant Human C1-Inhibitor could be an Alternative for the Treatment of Acute Attacks in Patients with Hereditary Angioedema: A 3

- Year Experience. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
6. **Valerieva A**, Staevska M. Short-Term Prophylaxis with Recombinant Human C1 Inhibitor in 9 Patients with Hereditary Angioedema: a case series. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
  7. **Valerieva A**, Staevska M, Cicardi M. The physician and hereditary angioedema friend or foe: 62-year diagnostic delay and eight iatrogenic procedures. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
  8. Haki R, **Valerieva A**, Farkas H, Jesenak M, Hrubiskova K, Zanichelli A, Staevska M, Bellizzi L, Relan A, Cicardi M. Efficacy and Safety of Recombinant Human C1 Esterase Inhibitor Treatment for Hereditary Angioedema Attacks: Interim Analysis of a European Registry. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany (oral presentation: Valerieva A)
  9. **Valerieva A**. Short-term prophylaxis in hereditary angioedema. 2018, Zagreb, Croatia (plenary)
  10. **Valerieva A**. Designing clinical trials in Primary angioedema with normal C1 inhibitor. 2018, Gazzada, Italy (plenary)

### Национални форуми

#### VI. Участия в национални научни форуми

1. **Валериева А.**, М Стаевска. Карцином на млечната жлеза и терапия с тамоксифен като влошаващи фактори при пациент с наследствен ангиоедем. 7-ма Национална конференция за редки болести и лекарства сираци. 7-10 септември 2016, Пловдив. Сертификат за награден постер
2. **Валериева А.** Фенотипове на ангиоедема. Заседание на Българското дружество по алергология. Април 2016. Банско, България (пленарен доклад)
3. **Валериева А**, Петкова Е, Василева М, Суфрити К, Крушева Б, Недева Д, Узунов С, Лазарова Ц, Заманакоу М, Лулес Г, Качча С, Димитров В, Герменис А, Чикарди М, Стаевска М. Наследствен ангиоедем: демографски характеристики и генетичен скрининг на пациентите с C1-инхибиторен дефицит в българската популация. VII-ми национален конгрес по алергология с международно участие. 16-18 ноември 2018. София. Сертификат за награден постер.