МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО УШНИ,НОСНИ И ГЪРЛЕНИ БОЛЕСТИ

Д-Р ЮЛИЯН СТЕФАНОВ ХАДЖИЕВ

ЕКСПРЕСИОНЕН ПРОФИЛ НА BPIFA1 (SPLUNC1) ГЕНА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧЕН РИНОСИНУИТ И ХРОНИЧЕН ГНОЕН ОТИТ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

За присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

Научна специалност: ото-рино-ларингология

Научен ръководител: проф. д-р Диана Петрова Попова д.м.н.

София, 2017

Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление 7.1. Медицина

Научна специалност:

03.01.35. Ото-рино-ларингология

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. Въведение…….....7

2. Литературен обзор……...9

2.1 Адаптивен имунитет…….9

2.2 Вроден имунитет……..…..9

2.2.1 Протеини на неспецифичния имунитет…….....11

2.2.2 PLUNC протеини…….12

2.2.3 SPLUNC1 (BPIFA1) протеин…….....13

2.2.3.1 Функции на BPIFA1 протеина…..……15

2.2.3.2 Регулация на BPIFA1 протеина……23

2.3 Хроничен риносинуит, хроничен гноен отит и BPIFA1 протеин……...29

2.3.1 Хроничен риносинуит…….....29

2.3.2 Хроничен гноен отит……...……...32

2.3.3 Функция на BPIFA1 протеина при хроничен риносинуит и хроничен гноен отит……...…34

2.4 SPLUNC2 (BPIFA2) протеин…….……...40

2.5 LPLUNC1 (BPIFB1) протеин……...……...…….40

2.6 PLUNC и злокачествени новообразувания…….....……41

2.7 Обобщение……..……...42

3.Цел и задачи……...……..44

3.1 Цел..……..……44

3.2 Задачи……...44

4.Материали и методи……..……..…45

4.1 Материали ……..…..45

4.1.1 Клиничен материал……....45

4.1.2 Критерии за включване на пациентите в проучването…….....…45

4.1.2.1 Критерии при пациенти с хроничен риносинуит……..…45

4.1.2.2 Критерии при пациенти с хроничен гноен отит……....46

4.1.2.3 Критерии при контролните пациенти……..47

4.1.3 Биологичен материал……..……...47

4.2 Методи……..……..48

4.2.1 Клинични методи……..……..48

4.2.2 Генетични методи……...……49

4.2.3 Статистически методи……55

5. Резултати…….……..……...……56

5.1 Клинични характеристики на пациентите……..……56

5.2 Екпресионен анализ на BPIFA1…….64

5.2.1 Експресионен анализ на BPIFA1 при пациенти с хроничен риносинуит и контроли……..64

5.2.2 Експресионен анализ на BPIFA1 при пациенти с хроничен гноен отит и контроли……..77

5.2.3 Експресионен анализ на BPIFA1 при пациенти с хроничен гноен отит и хроничен риносинуит……91

6. Дискусия……..94

7. Изводи…….102

8. Приноси……..103

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ И ОЗНАЧЕНИЯ

ХРС с НП	Хроничен риносинуит с носни полипи
ХРС без НП	Хроничен риносинуит без носни полипи
ХГО	Хроничен гноен отит
ХРС	Хроничен риносинуит
ДП	Дихателни пътища
ГДП	Горни дихателни пътища
ЕТ	Евстахиева тръба
НДБК	Недребноклетъчен белодробен карцином
ЕНаК	Епителен натриев канал
ЕЦМ	Екстрацелуларен матрикс
ЛПЗ	Липополизахаридите
ENaC	Epithelial Na^+ channel
CRS	Chronic rhinosinusitis
CRSwNP	CRS with nasal polyps
CRSsNP	CRS without nasal polyps
UT	Uncinate tissue
PLUNC	Palate LUng Nasal epithelial Clone
BPIFA	BPI protein fold-containing family member A
BPIFB	BPI protein fold–containing family member B)
SPLUNC1	Short PLUNC1
LPLUNC2	Long PLUNC2

BPI	Bactericidal/Permeability-Increasing Protein
NLF	Nasal lavage fluid
TGF	Tumor grow factor
MMP	Matrix metal-loproteinase
t-PA	Tissue plasminogen activator
PRR	Pattern recognition receptors
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
DAMP	Damage associated molecular patterns)
mRAGE	Membrane RAGE).
sRAGE	Soluble RAGE)
esRage	Endogenous secretory RAGE)
FESS	Functional endoscopic sinus surgery
LMS	Lund-Mackay score
ASL	Airway surface liquid
SP-B	Surfactant protein B
SP-C	Surfactant protein C

1. Въведение

В процеса на дишане човешкият организъм ежедневно влиза в контакт с голям брой патогени. Въпреки това не винаги настъпва инфектиране, защото дихателните пътища притежават защитни механизми. Първата бариера представлява мукуцилиарния клирънс-комплекс от цилиите на епителните клетки и повърхностната течност над епителa. Ресничките придвижват секретите към устната кухина, откъдето се преглъщат. В тази неспецифична имунна защита участват и различни протеини от повърхностната течност. Един от тях е BPIFA1 протеина. За първи път е описан през 2000 год. Секретира се от мукозните клетки на слюнчените жлези и субмукозните клетки на дихателните пътища. Представен е много добре в лигавицата на околоносните кухини и средното ухо при нормално физиологично състояние на организма.

BPIFA1 потиска бактериалния растеж. Оказва инхибиращ ефект върху епителния натриев канал и така намалява вискозитета на мукуса. По този начин се подобрява очистването на лигавицата. Ефективният мукуцилиарен клирънс предотвратява образуването на бактериални биофилми върху повърхността на мукозата. Биофилмите са мултибактериални колонии, прикрепени към лигавицата. Отличават се с антибиотична полирезистентност. В наши дни все повече надделява мнението,че хроничните възпалителни заболявания на параназалните синуси и средното ухо са биофилм инфекции.

При хроничния риносинуит и при хроничния гноен отит се наблюдава персистиращ възпалителен процес на лигавицата.Основен защитен механизъм се явява мукоцилиарния клиърънс.

Хроничният риносинуит (ХРС) е здравен проблем със значително социално-икономическо значение. ХРС включва хетерогенна група от възпалителни заболявания на носа и околоносните кухини с две общи характеристики- наличие на персистиращ възпалителен процес и тъканно ремоделиране. Ангажира около 10,9% от популацията в Европа като се обособява в две форми: с носни полипи и без полипи.

Хроничния гноен отит(ХГО) е честа причина за намаление на слуха и затруднено функциониране на индивида в социума. По данни на СЗО в световен мащаб са засегнати от

65 до 350 милиона души. При хроничният гноен отит (ХГО) е налична персистираща инфекция и възпаление на тъпанчевата кухина и клетките на процесус мастоидеус. ХГО е заболяване, което се характеризира с трайно намаление на слуха, интермитентна или постоянна оторея, перфорация на тъпанчевата мембрана. Протича като епитимпанит или мезотимпанит.

При хроничния риносинуит и при хроничния гноен отит могат да се развият тежки усложнения, застрашаващи живота на болния.

Ролята на BPIFA1 протеина при хроничния риносинуит все още е недобре изяснена, въпреки че има редица доклади по въпроса. Участва при възпалителните процеси като оказва влияние върху различни клетки на възпалението, но като цяло механизмите му на действие до момента са неясни. Притежава и противоалергични свойства по отношение на дихателните пътища като регулира еозинофилите при алергия.

Към настоящия момент няма провеждани изследвания върху BPIFA1 при хроничния гноен отит, както и при здраво ухо.

В това проучване си поставихме за цел да определим експресията на BPIFA1 при болни с хроничен риносинуит, хроничен гноен отит, при здрави контроли и да ги обвържем с клиничната картина, да установим клинично значима връзка между протичането, оперативното лечение на заболяването и BPIFA1 профила.

За първи път ще се определи нивото на експресия на BPIFA1 при нормално, здраво ухо и при хроничен гноен отит.

Смятаме, че определянето експресията на BPIFA1 гена ще спомогне за изясняване ролята на макроорганизма при хронични инфекции на горните дихателни пътища и ухото с голямо социално-икономическо значение.Запазването на проби ДНК в биобанката на Центъра по Молекулна Медицина в бъдеще ще спомогне за разработване на специфични биомаркери за тези заболявания и създаване на нови терапевтични стратегии.

2. Литературен обзор

Милиони потенциални патогени като бактерии, вируси, гъби и паразити ежедневно влизат в съприкосновение с лигавицата на средното ухо (чрез Евстахиевата тръба), носната кухина и околоносните кухини. Това се случва при дишане и при контакт. За щастие не винаги се развива инфекция. Благодарение на имунната система човешкия организъм реагира адекватно на огромния брой патологични микроорганизми. Имунната система се обособява в два основни компонента-специфичен (адаптивен) и неспецифичен (вроден) имунитет.

2.1 Адаптивен (специфичен) имунитет.

Развил се е преди по-малко от 500 милиона години и е присъщ само на гръбначните животни. Той се осъществява от Т и В лимфоцитите с образуване на специфични антитела, които взаимодействат само със съответстващите им специфични антигени. Освен специфичност за адаптивната имунна система е характерна и имунната памет-„запаметяване“ информацията за даден антиген и бързото му унищожаване при повторно попадане в организма.

2.2 Вроден (неспецифичен) имунитет.

За разлика от специфичния имунитет при *вродения* липсва специфичност. Например горните дихателни пътища са покрити с лигавичен слой, който включва ресничест цилиндричен епител и ASL (airway surface liquid), секретирана от чашковидните клетки (неспецифични механизми за борба срещу различните патогени).

Броят на бактериите, пренасяни от въздуха може да варира драстично от около 200 бактерии/ m^3 въздух в офис сграда до 700 000/ m^3 въздух в кланица. Въпреки този огромен брой бактерии, въздухът, който достига до алвеолите на белия дроб е почти изцяло

пречистен. Основно значение за това има ASL (airway surface liquid), която покрива дихателните пътища. Тази течност се придвижва в дихателните пътища в краниална посока под действие на ресничките на респираторния епител или при кашлица, след което се отхрачва или се гълта като се обеззаразява в стомаха от солната киселина. Следователно ASL е първата бариера пред инхалаторните патогени. ASL е почти изотонична с кръвната плазма **(111).** Съдържа над 100 протеина, протеази и техните инхибитори, муцини и антимикробни пептиди като лизозим**.** ASL се състои от приблизително 7 μm перицилиарен течен слой и надлежащ мукусен слой. Цилиите на респираторните епителни клетки са потопени в перицилиарния течен слой, който играе ролята на лубрикант и участва в мукоцилиарния клирънс. Мукусът е не-Нютънова течност, чиито физични свойства основно се определят от наличието на гел-формиращи муцини като MUC5AC и MUC5B **(112).** Хидратацията на мукуса има изключително значение за очистването му от подлежащия епител **(113).** Следователно колкото по-добре хидратирана е ASL, толкова по-добро ще бъде очистването на мукуса. Последното е добре видимо при генетичното заболяване псевдохипоалдостеронизъм, при което активността на епителния натриев канал (ЕНаК) е намалена в значителна степен. При тези пациенти дихателните пътища са много добре хидратирани поради намалената абсорбция на натриеви йони от ASL. В резултат на това мукоцилиарният клирънс на тези болни е много по-добър в сравнение със здрави доброволци **(114).**

ASL задържа микроорганизмите, прах и различни екзогенни частици, които впоследствие се отделят чрез кашлица.

Секретът от носната кухина и околоносните синуси се състои от епителни клетки, чашковидни клетки, протеини на епителните клетки, слъзен секрет и трансудат.

2.2.1 Протеини на неспецифичния имунитет

При неспецифичния имунитет се извършва отговор към неспецифични структури-към липополизахариди при Грам отрицателните бактерии, към тейхоева киселина при Грам положителните бактерии, към двойноверижна РНК при някои вируси и др. Например попадналите патогени върху лигавицата на дихателните пътища най-напред се разпознават от Toll-like рецепторите. След това неспецифичната имунна система реагира на патогените чрез антибактериални протеини, лизозим, лактоферин, LL37, муцини, електролити, сърфактант и фагоцитиращи клетки. Всички те са включени в мукуса, покриващ епителa на дихателните пътища (ДП) и Евстахиевата тръба (ЕТ). Заедно с ресничките на респираторния епител участват в мукоцилиарния клирънс. Голяма част от тези протени функционират и като сърфактант (**8, 9**).

Основните протеини на мукуса са група от гликопротени – муцини. Те се състоят от основна пептидна верига със странични разклонения от олигозахариди. Тези гликопротеини оказват значително влияние върху консистенцията на мукуса и върху взаимодействието между макро- и микроорганизма. Муцините се свързват към повърхностните адхезини на патологичните микроорганизми и по този начин инхибират колонизирането на респираторния епител **(65).** Благодарение на мукоцилиарния транспорт мукусът от околоносните кухини се придвижва към носната кухина и фаринкса, след което се преглъща и достига до стомаха. Нормалното извършване на този процес (нормален мукоцилиарен клирънс) е от огромно значение за патологията на горните дихателните пътища. Като пример могат да бъдат посочени болни с муковисцидоза (нарушение в транспорта на хлорни йони) и пациенти със синдром на Картагенер (дискинезия на цилиите). И при двете групи болни се наблюдава често развитие на синуит и друга патология на дихателната система.

Други протеини с важно значение за защита на организма, които са част от неспецифичния имунитет са:

-PLUNC proteins (palate, lung and nasal epithelium clone)

-(LT/LBP) lipid transfer/lipopolysaccharide binding protein

-(BPI) bactericidal/permeability increasing protein

-(CETP) cholesteryl ester transfer protein

-(PLTP) phospholipid transfer protein (**10**).

2.2.2 PLUNC протеини

PLUNC proteins (palate, lung and nasal epithelium clone) представляват група от седем белтъка. PLUNC протеините се кодират от 7 гена, разположени в хромозома 20q11.2. За първи път са описани през 2000 год. от Bingle et al. в лигавицата в дихателните пътища на мишки. Белтъците от PLUNC се разделят в две основни групи в зависимост от размера им:

1. „къси“ белтъци-SPLUNC1 (256 амино киселини), SPLUNC2 (249 амино киселини),SPLUNC3 (253 амино киселини)

2. „дълги“ белтъци-LPLUNC1 (484 амино киселини), LPLUNC2 (458 амино киселини), LPLUNC3 (463 амино киселини),LPLUNC4 (>469 амино киселини) (**11**)

SPLUNC са означавани още като BPIFA (bactericidal/permeability-increasing protein fold–containing family member A), а LPLUNC като BPIFB (BPI fold–containing family member B).

Към BPIFA се отнасят протеини, съдържащи един BPI домейн, а към BPIFB тези, съдържащи два BPI домейна.

PLUNC proteins (palate, lung and nasal epithelium clone) са едни от преобладаващите протеини, съставна част на мукуса, покриващ лигавицата на горните дихателни пътища **(20).** Протектират дихателните пътища чрез бактерицидни и небактерицидни механизми (**12**).

2.2.3 SPLUNC1 (BPIFA1) протеин.

Генът BPIFA1 има 7,3 kb дължина и се експресира в респираторния епител, субмукозните жлези на небцето, носа, околоносните кухини, трахеята и бронхите. Човешкият BPIFA1 ген има сходство в 72% с този на мишката. Продуктът на BPIFA1 гена е белтък, който се състои от 256 аминокиселини. Неговата маса е 26,6 kD и има кълбовидна структура с добре изразени хидрофобни свойства. През 2013 год. Garland и сътрудници представят кристалната структура на SPLUNC1 (BPIFA1)-мономер, образуван от централно разположен β-лист, който е обграден от шест α-спирали.

Структурата му е сходна с тази на BPI **(81).** BPIFA1 показва сходство с N-края на BPI. Един централно разположен участък в BPI е мястото където се осъществява свързването с липополизахаридите на бактериите. При BPIFA1 в този участък се намира α6 спирала, която е уникална за BPIFA1 и не се наблюдава при BPI. Това потвърждава факта, че въпреки голямото сходство с BPI, всъщност BPIFA1 е уникална молекула. В сравнение с BPI притежава уникални структурни елементи. Съществуват определени електростатични участъци от повърхността на BPIFA1, които включват Asp-112, Lys-138, Arg152, и Asp-193. Когато се наруши функционирането на тези части от различни мутации, в значителна степен се повлиява способността на BPIFA1 да се свързва с ЕНаК и да регулира образуването на ASL.

Групи от определени аминокиселинни остатъци в BPIFA1 протеина формират т. нар. електростатичен участък, който е от основно значение за ролята на BPIFA1 в йонния транспорт и регулацията в образуването на мукус.

SPLUNC1 е най-екстензивно изучавания протеин от PLUNC семейството. Той се открива в значителни количества в мукуса като съставлява около 10% от всички протени, експресирани в повърхностната течност на дихателните пътища.(**13**). SPLUNC1 е секреторен протеин, който е установен в назофарингеален секрет (**14**) и в храчка (**15**).Продуцира се основно от мукозните клетки на големите, малките слюнчени жлези и субмукозните жлези на ДХ. Не се синтезира от серозните клетки на паротидна жлеза например, което потвърждава връзката на SPLUNC1 с мукозните клетки **(44).** Освен това не се установява в чашковидните клетки на дихателните пътища и в алвеоларния епител **(13).** Доказано е наличието му в малките жлези на носната кухина, параназалните синуси, корена на езика и небните тонзили **(13).** В горните дихателни пътища BPIFA1 се установява в слюнката, носен секрет и при серозен отит. Също така експресията му се установява и в ресничестите епителни клетки на горните дихателни пътища (**13**). По отношение на долните дихателни пътища е доказан в храчка, трахеален секрет, бронхиален секрет и в течност от бронхоалвеоларен лаваж **(83).** Експресията на BPIFA1 е добре изразена в проксималната част на трахеята, постепенно намалява дистално към главните бронхи и липсва в периферната част на белия дроб. Слабо изразена експресия на BPIFA1 извън дихателната система се наблюдава в бъбреците ,дебелото черво, както и в специфични гранули на неутрофилите **(16)**.

SPLUNC1:

-ограничава формирането на биофилм от Псевдомонас еругиноза ин витро (**16**), но няма бактерициден ефект спрямо нетипабилен Хемуфилус инфлуенце (**12**).

-функционира и като сърфактант, който намалява повърхностното напрежение на въздушно-водната повърхност (**19**).Това е още един механизъм за нормален мукоцилиарен клирънс.

-при инфекция SPLUNC1 участва в хемотаксиса на макрофаги и неутрофили **(21).**

В респираторните секрети се установяват многобройни изоформи на BPIFA1, които са образувани чрез транслационни модификации, като например гликозилиране. Има предположения, че промени в концентрацията на тези гликозилирани изоформи могат да оказват влияние върху възпалителния процес **(82).** BPIFA1 и неговите изоформи се свързват с липополизахаридите на бактериите като модулират имунния отговор. Това свързване BPIFA1 осъществява чрез своя BPI участък.

BPIFA1 е един основните секреторни продукти на трахеобронхиалните епителни клетки. Концентрацията му значително се повишава след окончателното диференциране на епителните клетки на дихателните пътища. Следователно може да служи като маркер за диференцирането на епителните клетки. Други изследвания обаче не откриват BPIFA1 в неутрофили, моноцити, макрофаги, Т- и В-лимфоцити **(84).** Вероятно тези противоположни резултати се дължат на различно активиране на BPIFA1 експресията в норма и при патологични състояния. Повишена експресия е установена при мукоепидермоиден карцином, белодробен аденокарцином, аденосквамозен карцином и назофарингеален карцином.

2.2.3.1 Функции на BPIFA1 протеина

Антимикробни свойства

Основна част от проучванията върху BPIFA1 го определят като многостранен антимикробен протеин с директен ефект върху бактериалния растеж, образуването на биофилм, експресията на други антибактериални протеини и мукоцилиарния клирънс. Доказано е ,че инхибирането на BPIFA1 намалява резистентността на дихателните пътища към бактериални инфекции с *Mycoplasma pneumoniae*(Mp), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Klebsiella pneumoniae* (Kp) и нетипабилен *Haemophilus influenza* **(85,87).** Също така блокирането на BPIFA1 води до увеличаване инфилтрацията от възпалителни клетки и повишаване концентрацията на цитокини. При експериментален модел с повишена експресия на BPIFA1 се подобрява бактериалния клирънс, потиска се

възпалителния процес в дихателните пътища и се подобрява преживяемостта при инфекции с *Pseudomonas aeruginosa* **(87).** При ин витро проучвания е доказан директен бактериостатичен ефект на BPIFA1 спрямо *Mycoplasma pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* , както и инхибиторен ефект върху репликацията на Epstein-Barr вирус **(88)**. BPIFA1 инхибира бактериалната подвижност и повишава пропускливостта на клетъчната стена чрез формиране на пори. По този начин потиска бактериалния растеж **(86).**

BPIFA1 вероятно модулира и секрецията на други антимикробни протеини в дихателните пътища, защото при мишки с липса на BPIFA1 се установява понижена експресия на LL37, лактоферин, лизозим, MUC5AC, MUC5B и CCSP **(89).**

BPIFA1 има ефект върху локалния имунитет чрез засилване на бактериалната деструкция от фагоцитиращите клетки. Според редица автори основната функция на BPIFA1 е свързването му с липополизахаридите на патогена и прекъсване на последващите проинфламаторни процеси **(90).** Локализацията на BPIFA1 предимно в проксималните дихателни пътища и високите му нива при нормално физиологично състояние го определят като един от основните протеини в протекцията на макроорганизма. Следователно BPIFA1 оказва своя най-силен ефект преди да е настъпила патогенна инвазия чрез възпрепятстване инфектирането на макроорганизма. След настъпилата инфекция нивата на BPIFA1 могат да спаднат значително. BPIFA1 спада рязко след експозиция на организма към липополизахариди като нивото му се редуцира в около 70% след 24 часа. При експериментални модели на белодробна инфекция с Грам положителни, Грам отрицателни бактерии и вируси нивата му се понижават значително. Трябва да отбележим също, че за разлика от тези наблюдения в друго проучване са доказани високи нива на BPIFA1 при пневмония, причинена от микоплазма **(86).** Следователно нивата на BPIFA1 могат да варират в отговор на активиране на различни пътища на неспецифичния имунитет. Тази флуктуация в концентрацията на BPIFA1 вероятно участва в инициирането на имунния отговор и активиране на други протективни механизми на дихателните пътища, които са по ефективни за елиминиране на бактериалната инфекция.

Йонен транспорт и участие в мукоцилиарния клирънс.

SPLUNC1 е мултифункционален протеин, който регулира ЕНаК. Епителният натриев канал е хетеродимер, който се състои от α, β и γ субединици **(109).** Всяка субединица съдържа интрацелуларен N и C край, два трансмембранни участъка и голяма екстрацелуларна примка. Екстрацелуларните участъци на α и γ субединиците могат да бъдат протеолитично свързани от голям брой протеази като FT-конвертаза, серинова протеаза, неутрофилна еластаза, кисели протеази, което води до активиране на натриевия канал и абсорбция на натриеви йони. На практика съществува голям спектър от протеази, които могат да активират ЕНаК. Също така по време на възпалителна реакция протеазите, произлизащи от неутрофилите (например неутрофилна еластаза) могат допълнително да активират ЕНаК **(110).** Предполага се, че ексцесивната протеазна активност при муковисцидоза причинява нарушена регулация на ЕНаК при тези пациенти **(110).**

Епителният натриев канал е със съществено значение за регулацията на количеството мукус, покриващо горните дихателни пътища. ЕНаК трябва да бъде активиран от интра- и екстрацелуларни протеази, преди да започне да провежда натриеви йони и да абсорбира ексцесивното количество мукус от дихателните пътища. Натриевият канал се активира основно от интрацелуларната FT-протеаза и от екстрацелуларната протеза простазин. ЕНаК може да бъде активиран също и от екзогенната серинова протеаза трипсин. Силата на тази трипсинова активация се регулира от протеазния инхибитор апротинин**.(55)** Този процес на активиране на ЕНаК може да бъде блокиран от редица протеазни инхибитори. Установено е, че рекомбинантен BPIFA1 инхибира ЕНаК в клетъчни култури от човешки бронхиални клетки. По този начин се блокира активирането на натриевия канал, което води до намалена абсорбция на натриеви йони и вода с увеличаване количеството течност върху ДП. Повишеното количество мукус спомага за по-лесно очистване на ДП от различни патогени. Блокирането на BPIFA1 при бронхиални епителни клетки нарушава функцията на ЕНаК и причинява промени в количеството на повърхностните течности. Деблокирането на ЕНаК възстановява функцията на натриевия канал. Концентрирането или разреждането на BPIFA1 в мукуса инхибира или активира ЕНаК. Така се регулира количеството течност на ДП, част от мукоцилиарния клирънс. Установено е, че човешки бронхиални епителни клетки могат сами да регулират йонния транспорт и височината на ASL, за да съхранят

нормалния транспорт на мукус **(115).** В по-голямата си част тази хомеостаза се поддържа от BPIFA1, който играе ролята на автокринен, негативен регулатор на ЕНаК **(17).** Например при блокиране на BPIFA1, нормални човешки бронхиални клетки не могат да регулират активността на ЕНаК, което води до дехидрадиране на ASL **(17).** Добавянето на рекомбинантен BPIFA1 към ASL на втори етап възстановява инхибирането на ЕНаК и хомеостазата на ASL. Това предполага, че екстрацелуларния BPIFA1 е достатъчен за регулиране на ЕНаК. Интересно е да се отбележи, че тази функция на BPIFA1 не се наблюдава само в дихателните пътища, но също и в средното ухо **(12).**

BPIFA1 не е бърз инхибитор на ЕНаК като са нужни около 45 мин., за да изрази пълния си ефект **(17).** Мукуцилиарният клирънс нормално се осъществява със скорост около 10мм/мин **(116).** Следователно е малко вероятно BPIFA1 да причинява промени в мукуцилиарния клирънс минута по минута чрез влиянието си върху ЕНаК.

Вероятно е BPIFA1 индиректно да регулира също и нивото на хлорните йони в ASL чрез модулиране потенциала на апикалната мембрана: когато концентрацията на хлорните йони в ASL е приблизително четири пъти по-голяма от интрацелуларната концентрация-не се наблюдава секреция на хлорни йони екстрацелуларно, поради липса на химичен градиент **(117).** От друга страна инхибирането на ЕНаК води до хиперполяризация на апикалната мембрана, което осигурява електричен градиент за секреция на хлорни йони **(117).**

BPIFA1 модулира натриевия транспорт през ЕНаК и по pH-зависим начин. При нормално pH при здрави дихателни пътища, BPIFA1 се свързва с ЕНаК и предотвратява протеолитичната му активация. По този начин се запазва нормалната височина на ASL. Благодарение на тази подходяща височина на ASL цилиите на респираторните епителни клетки функционират нормално като чрез движението си отстраняват мукуса и бактериите от повърхността на дихателните пътища. При по-кисело pH (например муковисцидоза, хроничен риносинуит) се нарушава функцията на BPIFA1 да инхибира ЕНаК. Резултатът от това е повишена реабсорбция на натрий и вода от дихателните пътища. **(81).** Тази увеличена реабсорбция води до дехидратация на ASL с намаляване на височината й, което от своя страна е причина за блокиране движението на цилиите, задръжка на мукус в ДП с повишен вискозитет.

Повишението на pH при пациенти с муковисцидоза води до възстановяване нормалната хомеостаза на ASL. Можем да предположим, че това е валидно и за хроничен риносинуит и хроничен гноен отит. Важно е да се отбележи, че при блокиране на BPIFA1 изчезва pH чувствителността на ЕНаК.

Пептидът S18, който е получен експериментално чрез разцепване на BPIFA1, се свързва към ЕНаК и блокира функцията му по pH-зависим начин. При добавяне на S18 към BPIFA1 в епителни клетки от дихателните пътища на болни от муковисцидоза се увеличава мукусът и се предотвратява неговата хиперабсорбция. Муковисцидозата е полиорганно генетично заболяване, при което са нарушава функцията на CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Това предизвиква хиперактивация на ЕНаК с хиперабсорбция на натриеви йони и хипосекреция на хлорни йони. В белия дроб това води до дехидратиран, вискозен мукус с хронична белодробна инфекция и възпаление.

Твърде вероятно е BPIFA1 да регулира ЕНаК чрез S18. Регулацията на ЕНаК от S18 остава постоянна дори при високи нива на неутрофилната еластаза, което е често срещано при муковисцидоза. В бъдеще S18 може да послужи като терапевтична молекула, която да поддържа ефективно мукоцилиарния клирънс както при болни с хронични възпалителни заболявания на белия дроб (например муковисцидоза), така и при пациенти с хронични възпаления на околоносните кухини и средното ухо **(91).**

Към 2016 год. Spyryx Biosciences, USA правят проучвания на нов медикамент разработен на базата на S18, който представлява инхибитор на ЕНаК и се прилага при болни с муковисцидоза **(121).** Този препарат се разработва като инхалаторен медикамент. Той е термостабилен и осъществява много добър контакт със своя таргетен протеин. Притежава добре изразена протеазна резистентност. Непреминава епителната бариера на ДП и недостига до бъбреците. По този начин не може да предизвика хиперкалиемия както се наблюдава при някои малки молекули антагонисти на ЕНаК като амилорид. Малък недостатък на това лекарство е, че повлиява само белодробната патология при пациенти с муковисцидоза без останалата органна патология.

Имуномодулаторна функция

При експериментални модели е установено, че BPIFA1 има проинфламаторен и антиинфламаторен ефект. При мишки с дефицит на BPIFA1 и алергична реакция от страна на дихателните пътища са налице значително изразена еозинофилия, повишена продукция на мукус, хипер реактивност на дихателните пътища, високи нива на IL-4, IL-5, IL-13 в сравнение с контроли. Тези изследвания показват, че BPIFA1 има противоалергичен ефект при алергия на дихателните пътища **(92).** Това се потвърждава и при мишки с дефицит на BPIFA1, където се докладват повишени нива на еозинофилния хемокин CCL24 (Eotaxin-2) в белия дроб **(93).** BPIFA1 потиска експресията на CCL24 в макрофагите. Вероятно по този механизъм BPIFA1 контролира нивото на еозинофилите при алергия **(93).**

Проинфламаторният и антифибротичния ефект на BPIFA1 са изучавани при мишки с остро възпаление на белия дроб, предизвикано от инхалиране на SWCNTs (single-walled carbon nanotubes). CNTs представляват алотропни форми на въглерода с цилиндрична наноструктура. Техният диаметър е около 1 нанометър, но дължината им може да бъде милиони пъти по- голяма. Инхалирането на CNTs оказва токсичен ефект върху дихателните пътища и белия дроб, придружен от силно изразен възпалителен отговор с ранно започване развитието на фиброза.

SWCNTs в дихателните пътища спомагат за възстановяване на левкоцитите и засилване процесът на фагоцитоза при липса на инфекция. При генно модифицирани мишки, които свръхекспресират BPIFA1, инхалираните SWCNTs предизвикват увеличение на неутрофилите в белия дроб, на TNF-α и IL-6. Следователно при този експериментален модел се доказва, че BPIFA1 подпомага неутрофилите във възпалителния процес. Белият дроб на тези мишки показва значително по-слабо изразена фиброза след прекараното възпаление. Това предполага, че BPIFA1 има протективен ефект спрямо фиброзата **(94).** Тези резултати обаче контрастират с проведени проучвания върху идиопатичната пулмонална фиброза, при която по-високите нива на BPIFA1 са свързани с по-лоша прогноза на заболяването **(95).**

Вероятно BPIFA1 участва и във възпалителния процес на дихателните пътища като увеличава апоптозата на епителните клетки. Chen и сътрудници демонстрират свръхекспресия на BPIFA1 при назофарингеален карцином, понижена експресия на

антиапоптозния протеин Bcl-2, повишена експресия на проапоптозните протеини BAX, BAD, на каспазите 3 и 8. Също така свръхекпресията на BPIFA1 при назофарингеален карцином води до значително нарастване на апоптозата чрез активиране на MAPK пътя **(96).**

BPIFA1 има разнообразни ефекти при възпалителните процеси в дихателните пътища и вероятно оказва влияние върху различни клетъчни типове. Той има слабо изразено действие по отношение на хемотаксиса спрямо макрофаги и неутрофили.

Роля на сърфактант на дихателните пътища

Функцията на сърфактантите на ASL на дихателните пътища до момента е слабо изследвана като част от неспецифичната имунна система. Дихателните пътища подобно на алвеолите също притежават някаква форма на повърхностно активна субстанция **(118).** Все още остава неясно кои молекули са в ролята на тези повърхностно активни вещества.

При алвеоларния сърфактант, повърхностното напрежение се намалява от липиди и липид-свързващи протеини като SP-B (surfactant protein B) и SP-C (surfactant protein C). В ASL на дихателните пътища се съдържат множество липиди подобни на тези при алвеоларния сърфактант, но SP-B и SP-C липсват в ASL **(119).** Това предполага, че някакъв уникален протеин или група от протеини спомага за намаляването на повърхностното напрежение на горните дихателни пътища. Остава дискутабилен въпросът, защо въобще е необходим сърфактант на горните дихателни пътища. В белодробния паренхим алвеоларния сърфактант повишава белодробния комплайънс и предотвратява алвеоларния колапс по време на дишане. Обаче в изграждането на горните дихателни пътища участва хрущялна тъкан, която прави малко вероятно колапса на дихателния път. Следователно все още остава неясен въпроса каква е ползата от сърфактант за тази част от дихателната система.

Установено е значително структурно сходство между BPIFA1 и един протеин при конете, наречен латерин. Той е изолиран от конска пот и слюнка. Латеринът упражнява силно изразен сърфактантен ефект на въздушно-водната повърхност **(120).** Той е част от PLUNC фамилията при конете и демонстрира необикновено висока степен на

хидрофобност. Хидрофобните участъци при човешкия PLUNC и при латерина съставляват приблизително еднаква част от общия брой на аминокиселините, изграждащи двата протеина (44.2 % при латерина и 44.7 % при PLUNC). При двата протеина хидрофобните свойства произлизат от насищането с левцинови остатъци, което е уникално свойство типично за тях. Силно изразената хидрофобност на тези два протеина предполага сходни свойства с алвеоларните сърфактантни протеини SP-B и SP-C (които също са с много добре изразена хидрофобност).

Сърфактантната активност на PLUNC може да бъде директно определена чрез сърфактометър, чрез който се измерва повърхностното напрежение в разтвори, съдържащи PLUNC в различна концентрация. Установено е, че при тези разтвори рекомбинантен PLUNC понижава повърхностното напрежение по дозо- зависим начин до минимална стойност от ~18 mN/m. Този ефект на PLUNC да снижава повърхностното напрежение е наблюдаван при много ниски концентрации от около 1–2 μg/ml. Концентрация на PLUNC от само 10 μg/ml е необходима за максимална активност. Сърфактната ефективност на PLUNC се намира някъде между протеина BSA (който има умерено изразена активност при високи концентрации) и Infasurf (търговски препарат, който представлява белодробен сърфактант, използван при новородени с респираторен дистрес синдром като може да доведе до повърхностно напрежение от 0 mN/m).

Антибиофилм ефект

Както стана ясно биологичната роля на сърфактантите при дихателните пътища е недобре изяснена, но вероятно е различна от тази на алвеоларния сърфактант. Нараства схващането, че сърфактанта на горните дихателни пътища разрушава и предотвратява формирането на биофилми (съобщества от бактерии,прикрепени към повърхността на ДП и включени в матрикс, който им осигурява защита спрямо факторите на околната среда и имунната система на макроорганизма). Вероятно част от стратегията при ГДП за борба с бактериалната колонизация е образуването на сърфактант. Установено е при ин витро опити, че в присъствие на BPIFA1значително намалява формирането на биофилм от *Ps. Aeruginosa* **(19).** Следователно при тези условия BPIFA1 има добре изразен потенциал да инхибира образуването на биофилм. Важно е да се отбележи, че при тези изследвания

BPIFA1 не демонстрира бактерициден ефект спрямо *Ps. Aeruginosa.*Това води до извода, че намаленото формиране на биофилм не се дължи на директно унищожаване на бактериите, а на блокирането от BPIFA1 на определен етап от развитието на биофилма. Освен с антимикробните си свойства към определени бактерии, BPIFA1 участва в неспецифичния имунитет на ГДП като намалява повърхностното напрежение на повърхността екстрацелуларен матрикс/бактерии. По този начин BPIFA1 нарушава началните етапи на образуването на биофилм-бактериалната агрегация и формирането на микроколония. Така патогенните бактерии остават в състояние, в което е невъзможно да изградят биофилм върху дихателните пътища и по този начин ще бъдат по-чувствителни спрямо антибиотици и спрямо защитните механизми на макроорганизма.

2.2.3.2 Регулация на BPIFA1 протеина.

Регулация от респираторни патогени

Б) Рецептори на неспецифичния имунитет-Toll-,NOD- и RIG-рецептори.

Епителните респираторни клетки са свързани помежду си чрез адхезионни комплекси. Намалена експресия на определен пептид от тези комплекси (например клаудин, оклудин, десмозомални протеини) може да има съществено значение за възникване на заболявания на горните дихателни пътища. Например при носните полипи се установява намалена експресия на оклудин и Е-кадхерин като по този начин епителната бариера може по-лесно да бъде преодоляна от вируси и бактерии **(66).**

Епителните респираторни клетки не са само физическа бариера, а взимат и активно участие в неспецифичната имунна функция. Те експресират мембранно-свързани и цитоплазмени рецептори (PRRs- pattern recognition receptors), които се свързват с определени патогенни молекули (PAMPs- pathogen-associated molecular patterns).

Активирането на тези рецептори води до отделяне на хемокини, цитокини и други компоненти на неспецифичния имунитет, които впоследствие активират имунни клетки (например неутрофили). Голям брой PAMPs (например бактериални липополизахариди, флагелин, липотейхоева киселина и др.) могат да бъдат разпознати от много PRRs. Например активирането на PRRs в синуназалната лигавица води до отделяне на различни медиатори на възпалителния процес. Към групата на PRRs влизат TLR (toll-like receptors), NOD (nucleotide-binding oligomerisation domain like receptors), RIG-1 (retinoic acid induced gene-1 like receptors) и MDA-5 (melanoma differentiation associated gene-5). Комплексът TLR включва 10 интегрални мембранни гликопротеини, които разпознават екстрацелуларни и интрацелуларни PAMPs **(67).** Свързването на toll-like рецепторите с PAMPs води до активиране на транскрипционен фактор NF-κB (nuclear factor kappa B). Този фактор контролира експресията на голям брой инфламаторни цитокини. Всички toll-like рецептори се експресират при нормална назална мукоза и при хроничен риносинуит, но експресията на TLR2, TLR4, TLR9 и NF-κB при пациенти с ХРС е по-висока в сравнение със здрави пациенти **(68).** Възможно е нарушена експресия на тези рецептори да е причина за развитие на хроничен риносинуит **(69).**

Вътреклетъчни PAMPs (например мурамил дипептид, пептидогликан) се разпознават от NOD-like рецепторите. Тези рецептори се експресират в епителните клетки на лигавицата на носната кухина и параназалните синуси **(70).** След това епителните клетки експресират PAR (protease-activated receptors), които се активират от различни екзогенни и ендогенни протеази (свързани с бактерии, гъби и алергени) **(71).** Например протеазите на *Staphylococcus aureus* активират PAR-2 и водят до освобождаване на интерлевкин 8 (IL-8) **(72).** При случаите на ХРС епителните клетки експресират повече PAR-2 в сравнение с контроли **(72).**

Както PAMPs така и различни цитокини инхибират BPIFA1. При проведени експерименти е установено, че количеството на BPIFA1 е още по-високо при липса на иританти и патогени. Следователно BPIFA1 е потиснат при нормално, физиологично състояние на организма, когато има ниска концентрация на патогени и медиатори на възпалението в дихателните пътища. При наличие на възпалителен процес и инфекция BPIFA1 е още по-драстично инхибиран. Тези наблюдения предполагат, че BPIFA1 може да

служи като сензор за прогнозиране на риска от развитие на инфекциозен процес. Колкото по-голяма е експозицията към патогени и по-голям е риска за организма, толкова по-силно инхибиран е BPIFA1. Всичко това предполага, че флуктуацията в концентрацията на BPIFA1 има важно значение в протекцията на организма.

BPIFA1 е представен във високи концентрации в дихателните пътища като при нормални условия протектира ежедневно макроорганизма от големия брой патогени инхалирани при дишане. Доказано е че, експозицията на патогени регулира количеството на BPIFA1 в дихателните пътища, защото мишки с липса на TLR 4 имат два пъти по-висока концентрация на BPIFA1 в нормално, физиологично състояние **(97).** Тези тонични инхибиторни сигнали идват от PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) и потискат BPIFA1 до едно постоянно, стабилно ниво. Също така BPIFA1 бързо се променя по време на инфекция. BPIFA1 е значително намален при експериментален модел на остра инфекция на дихателните пътища с *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Streptococcus pneumoniae*, *Influenza A virus* и е повишен при инфекция с *Mycoplasma pneumonia* (Mp), *Klebsiella pneumoniae* (Kp) **(99).**

Инфекциозният процес води до разграждане на BPIFA1 от различни протеази. При ин витро експеримент чрез добавяне на неутрофилна еластаза към култивирани човешки трахеобронхиални клетки се установява деградация на BPIFA1 по дозо-зависим начин. При ин виво опити, третирането с α-1 протеазен инхибитор на мишки (инфектирани с *Pseudomonas aeruginosa*) води до повишение на BPIFA1. Това предполага, че повишената активност на протеазите по време на инфекция допринася за понижението на BPIFA1 **(98).** Следователно всички тези данни показват, че регулирането на BPIFA1 по време на инфекция се осъществява чрез промяна в протеазната активност, в регулацията на генната експресия и в специфичните отговори към различни PAMPs.

Индикатори за клетъчна смърт: DAMPs (damage associated molecular patterns)

Чрез DAMPs се разпознават клетъчните увреждания. Те са молекули, които модулират възпалителните реакции при патологични условия. Комбинацията от чужди екзогенни продукти и налични клетъчни увреждания предизвиква реакция от страна на неспецифичния имунитет и активиране на адаптивния имунитет с участието на DAMPs **(73).** DAMPs могат да се освобождават пасивно от увредени клетки в хода на възпалителна реакция или активно от определени клетъчни типове чрез алтернативни секреторни пътища. Повече от 40 вида молекули се отнасят към DAMPs. Те упражняват своя ефект чрез активиране на поне един рецептор от TLR (toll-like receptors), друг член от групата на PRRs (pattern recognition receptors) или специализирани рецептори от групата RAGE (receptor for advanced glycation end products). Някой DAMPs се свързват с екстрацелуларни структури като хепаран сулфат протеогликани **(74).** Експресията на BPIFA1 се засилва при клетъчно увреждане и при повишаване концентрацията на DAMPs .

От всички DAMPs и техните рецептори по отношение на горните дихателни пътища най-добре проучен е RAGE. Той е клетъчен протеин и част от групата на имуноглобулините. Експресира се като трансмембранен рецептор – mRAGE (membrane RAGE). Също така RAGE може да съществува и в свободна, разтворима фракция- sRAGE (soluble RAGE). sRAGE има две форми. Едната произхожда от mRNA и се означава като esRage (endogenous secretory RAGE), а другата възниква при протеолитичното разделяне на mRAGE и се означава като cRAGE.

При нормални физиологични условия RAGE се експресира във висока степен в белия дроб и в горните дихателни пътища в сравнение с други тъкани **(75).** При случаи на ХРС без носни полипи се установяват повишени количества на sRAGE и понижени на mRAGE. При ХРС без носни полипи се наблюдава значително фиброзиране на мукозата, а фиброзната тъкан е с повишени нива на sRAGE. При ХРС с носни полипи количествата на sRAGE и mRAGE са понижени **(76).** При случаите на ХРС с носни полипи има значително изразена колонизация със *Staph. aureus*. , което може да доведе до намаление на sRAGE. Този бактерий предизвиква освобождаване на sRAGE от екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ).

RAGE участва в диференцирането на Т-лимфоцитите до Th1-фенотип. При липса на RAGE синтезирането на Th1 цитокини е понижено, а на Th2 цитокините е повишено **(77).**

Регулация от инфламаторни цитокини

Установено е, че IFN-γ има бърз и добре изразен инхибиращ ефект спрямо експресията на BPIFA1 при епителни клетки в дихателните пътища. Този ефект е по-бърз и по-силен в сравнение с ефекта на липополизахаридите (ЛПЗ). Вероятно това бързо инхибиране от ЛПЗ ин виво се дължи на различни цитокини в допълнение към ефекта на TLRs. Тонични инхибиторни сигнали потискат BPIFA1 и го поддържат на постоянно, основно ниво. Това е доказано в експериментален модел с мишки с липса на IFN-γ рецептор 1, които имат значително по-високо основно ниво на BPIFA1 в сравнение с контроли.

Също така е установено, че концентрацията на BPIFA1 в дихателните пътища се изменя под влияние на различни иританти. Епителни клетки от дихателните пътища на пациенти непушачи експресират BPIFA1 във висока концентрация, докато при пациенти пушачи се установява силно занижена концентрация на BPIFA1 **(106).** В назални епителни клетки са установени аналогични резултати. При пациенти със сезонен алергичен ринит е наблюдавана по-ниска концентрация на BPIFA1 по време на алергичния сезон в сравнение с останалата част от годината. Тези проучвания демонстрират, че при наличие на възпалителен процес в дихателните пътища има редуциране нивата на BPIFA1. В същото време е наблюдавано повишение на BPIFA1 при някои хронични белодробни болести като ХОББ и муковисцидоза. Трябва да се има предвид, че такива пациенти често имат хронични инфекции с нарушен мукоцилиарен клирънс, което може да доведе до дисрегулация на BPIFA1.

TNF-α и IL-1β също инхибират експресията на BPIFA1 **(99).** Експресията на BPIFA1 се засилва при клетъчно увреждане. Тези резултати са наблюдавани в назални епителни клетки след олфакторна булбектомия, както и в белия дроб след експозиция на

цитотоксичната субстанция 1-нитронафтален **(10,102).** Вероятно BPIFA1 има съществена функция по отношение на дихателните пътища при нормално, физиологично състояние чрез антимикробните си свойства и чрез поддържане на необходимото количество мукус, покриващ лигавицата. PAMPs причиняват флуктуация на нивото на BPIFA1 при наличие на възпалителен процес в дихателните пътища. Предполага се, че чрез тези флуктуации, BPIFA1 участва в регулацията на неспецифичния имунитет. Това се осъществява чрез неговите ефекти върху гранулоцитите и различните цитокини. Чрез регулацията на ЕНаК BPIFA1 влияе върху реологичните свойства на секретите на дихателните пътища и по този начин може да оказва промени върху мукоцилиарния клирънс. Строгият контрол на BPIFA1 предполага, че промените в нивото му имат важно значение за бързото активиране на неспецифичния имунитет и иницииране на възпалителния отговор. Следователно BPIFA1 играе ролята на интегратор на неспецифичния и специфичния имунитет.

BPIFA1 се синтезира и от слъзната жлеза, конюнктивалните епителни клетки, епителните клетки на носослъзния канал като участва във формирането на слъзния филм. BPIFA1 активно участва в намаляването на повърхностното напрежение на слъзния филм. Чрез взаимодействието си с ЕНаК, BPIFA1 играе важна роля в поддържането баланса на слъзната течност по конюнктивалната повърхност. Всичко това определя голямото значение на BPIFA1за различни патологични състояние и по очната повърхност (например сухота в очите) **(107).**

2.3 Хроничен риносинуит, хроничен гноен отит и BPIFA1

2.3.1 Хроничен риносинуит

Хроничният риносинуит (ХРС) е здравен проблем със значително социално-икономическо значение. ХРС включва хетерогенна група от възпалителни заболявания на носа и околоносните кухини. Тази група от заболявания има две общи характеристики-наличие на персистиращ възпалителен процес и тъканно ремоделиране. Според GALEN проучването ХРС(съгласно ЕРЗОS критериите) ангажира 10,9% от популацията в Европа, като в различните европейски страни варира между 6,9% и 27,1%. По-висок процент се наблюдава сред млади хора, жени и в по-южните европейски държави. Тютюнопушенето значително увеличава риска. В САЩ е ангажиран малко по-голям брой от популацията като около 20-33% боледуват от хроничен риносинуит с наличие на носни полипи, 60-65% без носни полипи и 8-12% от алергичен микотичен синуит.

При деца, страдащи от алегичен ринит и ХРС съществува повишен риск от развитие на астма след 18 годишна възраст. При изследвани 2500 болни с астма в САЩ се установява наличие на ХРС при 51% от пациентите**(64).** Връзката между хроничния риносинуит и астмата не е добре проучена. При астматици ХРС влошава кашлицата и увеличава броя на екзацербациите. Обикновено е с мултибактериална етиология **(39).**

Хроничният риносинуит се определя като възпалителен процес на носа и околоносните кухини, продължаващ поне 8-12 седмици с поне 2 от следните симптома:

1.носна обструкция.

2.повишено отделяне на секрет от носа.(напред през ноздрите или назад към хоаните).

3.лицева болка/тежест и/или намалено обоняние/загуба на обоняние.

4. данни от предна риноскопия/ендоскопски данни (мукопуролентна или безцветна носна секреция, най-често в средния носов ход с/без носни полипи) или КАТ данни за промени на лигавицата **(40).**

Хроничният риносинуит се разделя на два вида:

1. Хроничен риносинуит с носни полипи(ХРС с НП)-

При пациенти с носни полипи се наблюдава рецидив при около 80% от пациентите през първите 12 години, а около 50% от тези болни претърпяват отново операция в следващите години.

2. Хроничен риносинуит без носни полипи. (ХРС без НП)

Възпалението при ХРС без НП протича по тип 1 възпалителен отговор, а при ХРС с НП по тип 2 със значително изразена еозинофилия в носните полипи. Тези случаи са валидни предимно за Европа и Северна Америка, докато при азиатската популация преобладава смесен тип възпалителен отговор. При двата подвида хроничен риносинуит се наблюдава ремоделиране на синуназалната мукоза. Ремоделирането при ХРС включва промени в структурата на тъканите с натрупване на екстрацелуларен матрикс (ЕЦМ)**(56).** Основните фактори в този процес са ММР (matrix metal-loproteinase) и TGF-β. ММР представлява група от цинк-зависими протеолитични ензими, които разграждат различни компоненти на ЕЦМ и медиират ремоделирането на синусната тъкан при физиологични и патологични условия. И при двата подвида ХРС са установени повишени нива на ММР-7 и ММР-9 **(57).** Следователно ММР-7 и ММР-9 вероятно са фактори на ремоделирането и при двете форми на ХРС. TGF-β медиира противовъзпалителния отговор чрез регулиране функцията на различни видове имунни клетки **(58).** TGF-β оказва влияние върху процесът на фиброзиране на тъканите като повишава отлагането на ЕЦМ (колаген, фибронектин и протеогликани) **(59).** TGF-β има три изоформи TGF-β1, TGF-β2 и TGF-β3. Van Bruaene et al. докладват за повишени стойности на TGF-β1, TGF-β2 и колаген при болни ХРС без НП сред белгийската популация **(60).** Аналогични резултати се съобщават и за други страни по целия свят при болни с ХРН без НП **(61,62).**

При ХРС с НП са доказани понижени нива на колаген и TGF-β в сравнение с контроли**(60).** Takabayashi et al. съобщават за повишаване на фибрина и понижаване на t-PA (tissue plasminogen activator) в носните полипи **(63).** Всъщност t-PA преобразува плазминогена в плазмин, който допринася за разграждането на фибрина. Също така повишените нива на IL-

4 и IL-13 в носните полипи редуцират експресията на t-PA в епителните клетки. Takabayashi et al. докладват за значително увеличени нива на FXIIIA (factor XIII-A) в носните полипи, секретиран от M2 макрофаги**(63).** FXIIIA е фактор на кръвосъсирването. Той може да индуцира отлагането на фибрин чрез активиране на α2-плазмин инхибитор. По този начин се блокира функцията на плазмина и намалява разграждането на фибрин. Всичко това предполага, че свръхекспресията на FXIIIA и намалението на t-PA могат да доведат до ексцесивно натрупване на фибрин чрез инхибиране на фибринолизата.
Изводите са, че при ХРС без НП ремоделирането на лигавицата се контролира от TGF-β, при ХРС с НП се регулира по тип 2 възпалителен отговор.
По различни литературни данни при 50-90% от пациентите с ХРС се установява значителна инфилтрация на синуназална мукоза от еозинофили.

Носните полипи представляват двустранни туморовидни образувания със сивкаво-белезникав цвят, гладка, блестяща повърхност, еластична консистенция, крушовидна или овална форма, най-често изхождащи от етмоидалните клетки. Характерни са честите рецидиви след тяхното отстраняване. Една от хипотезите за възникването им се отдава на теорията на Бернули. Бернули феномена се отнася до течности и газове, които преминават през стеснени пространства(каквито обикновено се срещат в носа и околоносните кухини). Това създава отрицателно налягане в съседство на стриктурата. Така създаденото отрицателно налягане предизвиква преминаване на плазма екстравазално с едематозно просмукване на тъканта**(123).** Формират се ограничени оточни участъци(полипи),които под силата на тежестта се уголемяват надолу. Полипите или хипертрофичната носна лигавица в областта на средния носов ход блокират остиомеаталния комлекс (мястото на естествените отвори на синусите).По този начин се възпрепятства аерацията на синусите, нарушава се мукоцилиарния клирънс със задръжка на секрет в синуса. Нелекуваният риносинуит може да причини орбитални или интракраниални усложнения с потенциална опасност за живота.

2.3.2 Хроничен гноен отит

Хроничния гноен отит(ХГО) е честа причина за намаление на слуха и затруднено функциониране на индивида в социума. По данни на СЗО в световен мащаб са засегнати от 65 до 350 милиона души. При хроничният гноен отит (ХГО) е налична персистираща инфекция и възпаление на тъпанчевата кухина и клетките на процесус мастоидеус. ХГО е заболяване, което се характеризира с трайно намаление на слуха, интермитентна или постоянна оторея, перфорация на тъпанчевата мембрана **(22).** Pseudomonas aeruginosa и Staphylococcus aureus са най-честите патогени, изолирани при болни с хроничен гноен отит **(23, 24, 25, 26).**

Различават се две форми:

1.Хроничен гноен отит-епитимпанит:

1.1.с гранулиращ остеит

1.2.с холестеатом

2.Хроничен гноен отит-мезотимпанит.

Хроничен гноен отит-епитимпанит.

При епитимпанита(гранулиращ остеит или холестеатом) перфорацията на тъпанчевата мембрана е разположена в pars flaccida или е крайстенна перфорация в pars tensa(винаги е нарушена целостта на фиброзния пръстен на тъпанчевата мембрана).Възпалителния процес освен лигавицата ангажира и подлежащата кост, като винаги се наблюдава деструкция на костта в определена зона на средното ухо(латерална стена на атика-най-често;слухови костици, хоризонтален полуокръжен канал, костен канал на лицевия нерв, тегмен тимпани, тегмен антри, костна стена на синус сигмоидеус) **(122)**

1.1.При епитимпанита с гранулиращ остеит разрастват гранулации в кавум тимпани и в мастоида, които съдържат остеокласти, водещи до деструкция на костта.

1.2.При епитимпанита с холестеатом се формира холестеатом в средното ухо. Холестеатомът е образувание формирано от десквамирани епителни клетки без ядра(подредени като люспи на лук), холестеролови кристали, мастни киселини **(41).** Тази маса е обградена от матрикс, който има същия хистологичен строеж като кожата, но без косми и жлези. Холестеатомите се формират от ретракционен джоб в парс флакцида или при миграция на епидермиса от външния слухов проход през крайстенна перфорация в парс тенза. Нелекуваният по хирургичен път епитимпанит винаги предизвиква тежки усложнения(парализа на лицевия нерв, фистула на хоризонталния полуокръжен канал, тромбоза на синус сигмоидеус, тромбоза на синус кавернозус, екстрадурален абсцес, субдурален абсцес, менингит, мозъчен абсцес, малкомозъчен абсцес)**(42).**

Хроничен гноен отит-мезотимпанит.

При мезотимпанита перфорацията на тъпанчевата мембрана винаги е в парс тенза и винаги е запазена целостта на фиброзния пръстен на мембраната. Възпалителният процес ангажира само лигавицата на средното ухо като често се образуват сраствания между слуховите костици **(122).**

2.3.3 Функция на BPIFA1 протеина при хроничен риносинуит и хроничен гноен отит

BPIFA1 допринася за ефективен мукоцилиарен клирънс (**17**)-ключов протективен механизъм на лигавицата на средното ухо и околоносните кухини (**18**). Изследвания през последните години демонстрират, че дисфункция на неспецифичната имунна система играе важна роля в патогенезата на хроничния риносинуит (ХРС) (**1**).Създава се среда, която благоприятства бактериалната колонизация на синуназалната лигавица (**2**).

Както вече стана въпрос хроничният риносинуит може да бъде разделен на ХРС с НП и ХРС без НП. При ХРС без НП преобладава неутрофилния тип възпаление, докато при ХРС с НП се наблюдава в значителна степен изразена еозинофилия. Тези различни възпалителни отговори отразяват сложното взаимодействие между защитните механизми на макроорганизма и патогени като вируси, бактерии и фунги. Следователно анормални дефанзивни механизми на организма като дефектна епителна бариера или дисрегулация на неспецифичната имунна система имат съществена роля за инициирането и поддържането на възпалителния процес при пациенти с хроничен риносинуит.

ХРС с НП е хронично възпалително заболяване, при което се наблюдава нарушена регулация във взаимодействието между локалния мукозен имунитет и факторите на околната среда **(2).** Смята се, че дисфункцията на неспецифичната имунна система създава благоприятна среда за нарастване на микробната колонизация на синуназалната мукоза. Също така в носните полипи се установява в значителна степен понижена експресия на SPLUNC1 (BPIFA1), LPLUNC2, BPI, TLR2, TLR3 и TLR4 mRNA в сравнение с ХРС без НП. В носните полипи броят на субмукозните жлези е редуциран в значителна степен за разлика от контролни пациенти със здрава мукоза. Този намален брой жлези е причина за редуцираната експресия на TLR2, TLR3 и TLR4 в полипите. Следователно вероятната причина за намалената експресия на BPIFA1в полипите е нарушеното активиране на TLR. До момента има недостатъчна информация за ролята на TLR сигнализацията и проинфламаторните цитокини по отношение регулацията на BPIFA1 в назалните епителни клетки. Установено е, че BPIFA1 mRNA и нивата на SPLUNC1 протеина са значително повишени при стимулация на TLR, което предполага, че антимикробната сигнализация е

съществена за индуцирането на BPIFA1 експресията. От друга страна при ин витро опити с наличие на T_H2 цитокини (IL-4 и IL-13) е доказано инхибиране на експресията на BPIFA1. Съгласно казаното дотук TLR и проинфламаторните цитокини (особено T_H2 цитокините) модулират по различен начин BPIFA1експресията в синуназалните епителни клетки.

Тъй като BPIFA1има добре изразен антимикробен и антибиофилм ефект, намалената му експресия е свързана с хронична синусна инфекция и незадоволителни терапевтични резултати.

ХРС с НП може да бъде разделен патохистологично на еозинофилен и не-еозинофилен тип **(108).**

При полипите се наблюдава дефект в локалното синтезиране на BPIFA1 протеини(**3**). Занижените нива на BPIFA1 в полипната тъкан може да са основание за повишен трансепителен транспорт на вода, което допринася за образуването на полипи (**3**).Култивирани епителни клетки от носни полипи показват по-висока степен на трансепителен йонен транспорт (**6**) .Това предполага, че преминаването на вода в епителните клетки и интерстициума е причина за едемните промени в полипите.

Пониженатa експресия на BPIFA1 по повърхността на полипите повишава чувствителността на лигавицата към бактериална колонизация и формиране на биофилми(**3**). Биофилмите представляват мултибактериални съобщества, които са прикрепени към лигавицата. Включени са в матрикс от екстрацелуларни полизахариди и се отличават с изразена антибиотична резистентност. Биофилмите са водеща причина за антибиотична резистентност при хроничния риносинуит (**4,5**). Ниските нива на BPIFA1се съчетават с мултибактериална колонизация особено по отношение на Стафилококос ауреус и Псевдомонос еурогиноза.

Пониженатa експресия на BPIFA1 в полипната тъкан се дължи и на намален брой жлези. Носните полипи имат по-ниска плътност на гландуларни структури спрямо околната тъкан **(100).** Хиперплазия на жлезите при ХРС се наблюдава в мукозата извън полипите. Следователно намалената експресия на BPIFA1 при ХРС с НП се дължи на формирането на полипи без хиперплазия на субмукозните жлези в тях. BPIFA1 и LPLUNC2 са силно експресирани в субмукозните жлези и умерено експресирани в повърхностния епител.

Според някои проучвания намалената експресия на BPIFA1при болни с ХРС с НП е свързана с мултибактериална колонизация на мукозата. Като това е особено добре изразено при инфекция със S.aureus и P. aeruginosa. Пациентите, при които се извършва повторно синус хирургия(поради рецидивиращ риносинуит) имат много по-ниски нива на BPIFA1 експресия в сравнение с пациенти с еднократна хирургична намеса. Тези резултати предполагат, че пациенти с ХРС с НП и намалена експресия на BPIFA1 е вероятно да имат някакъв дефект в неспецифичния имунитет, който допринася за рецидивиращата инфекция със S.aureus и P. aeruginosa. Важно е да се отбележи, че намалените нива на BPIFA1 експресия при ХРС не са свързани с Lund-Mackay метода, който е широко използван за КАТ оценка на болните с ХРС **(101).** КАТ е много полезно образно изследване за оценка състоянието на синусите при пациенти с ХРС особено преди хирургичната интервенция. Lund и Mackay са предложили ринологична стадираща система. Тя се базира на формиране на определен брой точки от радиологичното изследване, което позволява ефективна оценка на тежестта на ХРС. Lund-Mackay score (LMS) е доказан ефективен метод, лесно приложим в клиничната практика.

Какво представлява Lund-Mackay CT Scoring? (LMS)

Лявата или дясната група синуси се разделя на 6 части, които включват максиларен синус, предни етмоидални клетки, задни етмоидални клетки, сфеноидален синус, фронтален синус и остиомеатален комплекс. Тежестта на възпалението на синусната мукоза или наличието на течна колекция се оценяват съответно с 0 (напълно просветлен синус), 1 (частично засенчен), 2 (напълно засенчен). Леко изразено задебеляване на лигавицата без течна колекция се оценява с 0; леко изразено задебеляване на лигавицата с течна колекция, която предизвиква частично засенчване се оценява с 1; умерено или тежко изразено задебеляване на лигавицата без течна колекция, което предизвиква частично засенчване се оценява 1. Остиомеаталният комплекс се оценява или с 0 (без обструкция) или с 2 (с наличие на обструкция), защото е трудно да се опише състоянието на комплекса чрез някакво определено степенуване. Точките от всеки синус и точките от билатералните остиомеатални комплекси се събират, формирайки тоталния LMS. Lund-Mackay CT Scoring може да варира от 0 (всички синуси са напълно просветлени) до 24 (всички синуси са

напълно засенчени). Също така имаме и унилатерален LMS, който може да варира от 0 до 12.

Все още е въпрос на обсъждане дали само КАТ на синуси може да се използва като прогностичен маркер за резултатите от оперативната намеса или нуждата от реоперация. Всъщност причините за повторна хирургия на синусите са многообразни. Оперативната интервенция сама по себе си може да доведе до нуждата от ревизия. Например запазването или разширяването на естествения остиум на максиларния синус по време на FESS (functional endoscopic sinus surgery) ще повлияе крайния резултат от операцията **(102).** Различният обем на операцията също ще доведе до различни промени в синусната мукоза и различна вероятност от повторна хирургична намеса. Напоследък като най-важен индикатор за дългосрочния резултат от операцията се приема хипотезата за „възпалителното натоварване“. Следователно намаляването на това „възпалително натоварване“ (например по определен начин чрез използване на рекомбинантен BPIFA1) при пациенти с по-радикална хирургична интервенция ще доведе до по-малка нужда от реоперация и до по-добър краен резултат **(103).**

Има предположения, че микробната колонизация на синуназалната лигавица със S.areus действа като супер антиген, който има значение за развитие на носна полипоза **(104).** Освен това е доказано, че биофилм формация, съдържаща S.areus и P. aeruginosa е свързана с неблагоприятен резултат след синус хирургия **(105).** По този начин определянето на нивата на експресия на BPIFA1 в мукозата може да послужи за измерване на възпалителното натоварване на синусната лигавица, свързано със S.areus и P. aeruginosa. Следователно при пациенти с понижена BPIFA1 експресия е по-вероятно да се наблюдава по-лош ефект от синусната хирургия и по-голяма честота на рецидивите, което да налага повторни операции. Към момента обаче няма проведени проучвания дали повтарящите се операции не причиняват намаление на BPIFA1.

Вероятно голям брой механизми са в основата на връзката между BPIFA1 и възпалителния процес при различните инфекции.

Разбиране на връзката между експресията на BPIFA1 и рецидивиращия риносинуит може да доведе до нова стратегия в лечението на това хронично заболяване.(**38**). В бъдеще BPIFA1 може да послужи като нов прогностичен биомаркер при пациенти с ХРС с НП и

наличие на бактериална колонизация. При пациенти с понижена експресия на BPIFA1 трябва да се прилага по-продължително време постоперативна антибиотична терапия и по-интензивна локална терапия. Бъдещи проучвания ще изяснят клиничната полза на BPIFA1 при лечение на ХРС.

При при пациенти с хроничен риносинуит се установяват по-често ниски нива на експресия на BPIFA1 **(37).**

Към момента не е изследвана генната експресия на BPIFA1 при хроничния гноен отит. Тъй като синуназалната лигавица и лигавицата на средното ухо представляват едно цяло, може да се предположи връзка между BPIFA1 експресията и хроничния гноен отит, аналогично на хроничния риносинуит.

BPIFA1 е доказан и в секрет от средно ухо (при серозен отит), но все още не е установено от кои клетки се произвежда **(12).** При блокиране експресията на BPIFA1 при чинчила настъпва дисфункция на Евстахиевата тръба-нарушено изравняване на налягането и промени в мукоцилиарния клирънс в сравнение с контроли. При опитните животни с блокирана BPIFA1 експресия се наблюдава отрицателно налягане в кавум тимпани с ретракция на тъпанчевата мембрана в сравнение със здрави контроли **(12)**.При контролните животни (заразени с Хемуфилус инфлуенце в кавум тимпани и с нормална експресия на BPIFA1) се развива възпалителен клетъчен инфилтрат в лумена на Евстахиевата тръба и се установяват отделни чашковидни клетки сред респираторния ресничест епител. При другата група опитни животни(заразени с Хемуфилус инфлуенце в кавум тумпани и с потисната експресия на BPIFA1) се демонстрира по-ясно изразен инфлукс на имунни клетки, клетъчен дебрис и натрупване на слуз в лумена на ЕТ. Хиперплазията на чашковидните клетки сред епителa на ЕТ е по-добре представена.Увеличеният брой на тези клетки допринася за повишеното акумулиране на мукус в Евстахиевата тръба. Следователно стигаме до следната връзка- потиснатата експресия на BPIFA1>повишена продукция на муцини в лумена на ЕТ>намалена сърфактантна активност на ЕТ>повишаване на повърхностното напрежение на ЕТ>дисфункция на ЕТ>отрицателно налягане в кавум тимпани>серозен отит>предполагаме (следвайки тази логическа връзка), че възможно е развитие на ретракционен джоб>хроничен гноен отит. Хипотетично можем

да допуснем, че понижена експресия на BPIFA1 при хора може да е причина за развитие на хроничен гноен отит.

Според McGillivary и Bakaletz , BPIFA1 като сърфактант играе съществена роля в хомеостазата и протекцията на средното ухо (**12**).Чрез тензиометрия е сравнено повърхностното напрежение на капка вода-72 mN/m(отрицателна контрола) и на капка BPIFA1 (64 mN/m) в концентрация 20 µg SPLUNC/ml вода (най-ниската възможна концентрация). Установяват статистически значима разлика (p<0.0001) в намалението на повърхностното напрежение при BPIFA1 в сравнение с чистата вода. Също така доказват, че повърхностното напрежение на капка BPIFA1 (29 mN/m) в концентрация 500 µg BPIFA1/ml вода е приблизително равно на повърхностното напрежение на капка от детергента SDS (положителна контрола).Тези резултати демонстрират важната функция на BPIFA1 като сърфактант на дихателните пътища, Евстахиевата тръба и вероятното му участие в патогенезата на възпалителните заболявания на дихателните пътища и средното ухо.

При чинчили с потисната експресия на BPIFA1 се установява около 50% намаление на възможността за транспорт на багрило през ЕТ в сравнение с контроли (**12**).Следователно снижената експресия на BPIFA1 предизвиква отслабване на мукоцилиарния клирънс на Евстахиевата тръба.

BPIFA1 протеините (при чинчила модел) са съществени за поддържане на налягането в средното ухо и за ефикасно извършване на мукоцилиарния клирънс в Евстахиевата тръба.Това са механизми със съществено значение за развитие на остър и хроничен отит. Блокирането експресията на BPIFA1 не оказва влияние върху Хемуфилус инфлуенце (**12).**

2.4 SPLUNC2 (BPIFA2) протеин

SPLUNC2 е не толкова добре проучен като SPLUNC1. Основно се продуцира от серозните клетки на големите слюнчени жлези. Значителна е ескпресията му в паротидната жлеза, поради предимно серозният й тип на секреция. Също така е доказан и в някои малки мукозни клетки на устната кухина **(45).** SPLUNC2 е протеин, който се среща основно в слюнката. Установени са занижени нива на експресията му при периодонтит **(46)** и при ХИВ пациенти, заразени с цитомегаловирус или микобактериум туберкулозе **(47).** Завишени нива на SPLUNC2 са демонстрирани при вирусни инфекции на големите слюнчени жлези. Като цяло значението на тези данни до момента остава неясно.

2.5 LPLUNC1 (BPIFB1) протеин

LPLUNC1 е също слабо проучен. Експресионният му профил е сходен с този на SPLUNC1. Продуцира се в чашковидните клетки на горните дихателни пътища и устната кухина **(43).** Установява се в носен секрет, слюнка, епителът и субмукозните жлези на ГДП, малките мукозни жлези на носната кухина и околоносните синуси, малките слюнчени жлези **(48).** LPLUNC1 е доказан в субмандибуларната жлеза, но експресията му липсва при околоушната слюнчена жлеза **(49).** По отношение на различни заболявания при човека и експресията на LPLUNC1 има много оскъдна публикувана информация. Larocque et al. са установили значима асоциация между специфичен генетичен полиморфизъм при LPLUNC1 гена и възприемчивостта към инфекция с Vibrio cholerae **(50).** При друго изследване са доказани 7 пъти по-високи нива на експресия на LPLUNC1 в дуоденалната лигавица на болни в остра фаза на холера в сравнение с болни в реконвалесцентна фаза. Необходими са бъдещи изследвания за разясняване функцията на LPLUNC1 при инфекциозни и неинфекциозни заболявания.

За останалите представители на PLUNC семейството съществува изключително оскъдна информация към настоящия момент.

2.6 PLUNC и злокачествени новообразувания

До този момент PLUNC протеините са изучавани при назофарингеален карцином, недребноклетъчен белодробен карцином (НДБК) и карцином на слюнчените жлези.

Iwao et al. установяват повишени нива на експресия на SPLUNC1 при 84% от пациентите с НДБК **(51).** Те предполагат и използването на SPLUNC1 mRNA като нов диагностичен маркер за откриване на микрометастази в лимфните възли.

Benlloch et al. изследват SPLUNC1 в екстраторакални метастатични лимфни възли от НДБК. В проведеното от тях проучване описват по-лоша преживяемост при пациенти, чиито лимфни възли са позитивни за SPLUNC1 **(52).**

Mitas et al. и Cheng et al. изследват генната експресия на туморни клетки от НДБК, циркулиращи в периферната кръв. Установяват, че SPLUNC1 е най-чувствителния маркер за разпознаване на тези клетки **(53, 54).**

2.7 ОБОБЩЕНИЕ

BPIFA1 е неразпознаван до момента сърфактант на дихателните пътища. Възможно е понижаването на повърхностното напрежение от BPIFA1 на лигавичната повърхност да представлява нова форма на неспецифичния имунитет, която ограничава бактериалната колонизация на ДП. Голям брой въпроси до момента остават нерешени. Един от тях е установяването на точния механизъм, по който BPIFA1 инхибира образуването на биофилм. Това е възможно да бъде постигнато чрез разработване на експериментални модели, при които се проследяват отделните етапи във формирането на биофилмите и влиянието на BPIFA1 върху тях, както и върху различните защитни молекули на макроорганизма. Вероятно BPIFA1 влияе върху функцията на нормалната коменсална микрофлора на горните дихателни пътища, за което свидетелства значителното му присъствие в секретите на дихателните пътища. Също така остава отворен въпроса дали BPIFA1 притежава аналогични свойства на останалите представители от LT/LBP групата (например дали BPIFA1 взаимодейства с бактериалните липиди). Бъдещи проучвания върху мултифункционалния протеин BPIFA1 могат да разкрият нови аспекти на неспефичния имунитет на дихателните пътища.

Много вероятно е BPIFA1 скоро да започне да се прилага като инхалаторен биопрепарат при редица хронични заболявания на горните и долните дихателни пътища. Предимствата на този инхалаторен медикамент ще бъдат минимизирането на системните нежелани реакции, по-дълъг период на терапевтично действие и добре изразено локално, тъканно действие.

Към момента фармацевтичните проучвания са основно в направление за създаване на лекарство на базата на BPIFA1 против муковисцидоза. Наличието на такъв медикамент ще подобри значително качеството на живот на болните с евентуално увеличаване на преживяемостта им. Ефектът на такова лекарство по отношение на мукуцилиарния клирънс може да бъде използван при хроничния риносинуит и хроничния гноен отит. Например по този начин носната полипоза да бъде лекувана по медикаментозен път или пациентите постоперативно да бъдат поддържани свободни от рецидив, без употреба на

кортикостероиди. Дисфункция на Евстахиевата тръба, изискаваща оперативно лечение(при хроничен гноен отит), при наличие на такъв медикамент е възможно да бъде третирана консервативно.

BPIFA1 има определена роля при хроничните възпалителни заболявания на околоносните кухини и средното ухо, която до момента е все още неясна. Определянето на експресията му при хроничен риносинуит и хроничен гноен отит ще представи нова гледна точка върху тези заболявания, ще разшири познанието ни за функциите на BPIFA1 и ще даде нови възможности за лечение.

В бъдеще изследванията върху BPIFA1 могат да доведат до нови разбирания във взаимоотношението между микроорганизмите и макроорганизма при хронични възпалитени заболявания дихателните пътища и ухото.

3 Цел и задачи

3.1 Цел

-Да се анализира експресията на BPIFA1 гена при болни (подлежащи на операция) с хроничен риносинуит, хроничен гноен отит и контроли

3.2 Задачи

1. Да се събере хистологичен материал от пациенти, отговарящи на критериите за хроничен риносинуит, хроничен гноен отит и от контроли.

2. Да се изолира тотална РНК от събраните тъкани на пациентите и да се синтезира кДНК от нея.

3. Да се съхрани част от тъканта на -80^{o}C с цел създаване на тъканна биобанка на заболяванията хроничен риносинуит и хроничен гноен отит.

4. Да се определят нивата на експресията на BPIFA1 гена при пациентите хроничен риносинуит и хроничен гноен отит.

5. Да се определят нивата на BPIFA1 експресията при здрави контроли.

6. Да се направи сравнение на експресията между пациенти и контроли.

7. Да се потърсят връзки между експресията на гена и клиничните характеристики на заболяванията в хода на настоящите резултати в литературата.

4 Материали и методи

4.1 Материали

4.1.1 Клиничен материал

В проведеното изследване са включени 90 пациента с хроничен риносинуит, хроничен гноен отит и контроли. Всички те са оперирани в УНГ клиника на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ за периода от май 2015 до септември 2016.

При постъпването в клиниката е взето информирано съгласие за участието на пациента в проучването след предварително подробно разясняване естеството на изследването. Информираното съгласие се предоставяше на пациента и на Центъра по молекулна медицина при Медицински университет София. При болните под 18 години информираното съгласие се подписваше от единия от родителите. Всеки болен, участващ в проекта получаваше в един екземпляр «Информация за пациента» предварително разработена съвместно с Центъра по молекулна медицина.

4.1.2 Критерии за включване на пациентите в проучването

4.1.2.1 Критерии при пациенти с хроничен риносинуит

В тази група бяха включени болни с възпалителен процес на носа и околоносните кухини, продължаващ поне 8-12 седмици с поне 2 от следните симптома (по EPOS критериите):

1.носна обструкция.

2.повишено отделяне на секрет от носа (напред през ноздрите или назад към хоаните).

3.лицева болка/тежест и/или намалено обоняние/загуба на обоняние.

4.данни от предна риноскопия/ендоскопски данни (слузеста,слузесто-гнойна или безцветна носна секреция,най-често в средния носов ход с/без носни полипи,състояние на назалната на мукоза, долна носна конха, средна носна конха) или КАТ данни за промени на лигавицата.

В зависимост от наличието на носни полипи, болните бяха разделени в две подгрупи на пациенти с хроничен риносинуит с носни полипи и хроничен риносинуит без носни полипи.

Друг много важен критерии за включване в групите беше и интраоперативния статус, при който по-детайлно определяхме състоянието на синуназалната мукоза съответно при наличие или отсъствие на носна полипоза.

4.1.2.2 Критерии при пациенти с хроничен гноен отит

В тази група включихме възрастни пациенти, които са с дълготрайна (над 1 година) постоянна или интермитентна оторея, трайно намаление на слуха и перфорация на тъпанчевата мембрана. Пациентите бяха разделени в две подгрупи (в зависимост от перфорацията на тъпанчевата мембрана) на: болни с епитимпанит и болни с мезотимпнанит.

Към подгрупата на епитимпанита се включиха пациенти с перфорация на тъпанчевата мембрана, разположена в pars flaccida или крайстенна перфорация в pars tensa (при която винаги е нарушена целостта на фиброзния пръстен на тъпанчевата мембрана).

В подгрупата на мезотимпанита включихме болни, при които перфорацията на тъпанчевата мембрана винаги е в парс тенза и винаги е запазена целостта на фиброзния пръстен на мембраната.

По-подробна оценка за включване в изследването получавахме и от интраоперативния статус.

4.1.2.3 Критерии при контролните пациенти

За контроли при хроничния риносинуит използвахме болни с фрактура на носните кости, които са без анамнестични, клинични, интраоперативни данни за хроничен риносинуит и не отговарят на EPOS критериите.

При хроничния гноен отит като контроли използвахме пациенти с двустранна невросензорна глухота, които са постъпили в клиниката за хирургично лечение-кохлеарна имплантация и които са без отоскопски данни за хроничен гноен отит.

4.1.3 Биологичен материал

По време на хирургичната интервенция (при хроничен риносинуит и хроничен гноен отит) се взимаше част от хирургично отстранената патологична лигавица.

При контролните пациенти се взимаше с биопсична ушна щипка (по Хартман) минимално количество лигавица от долна носна конха (при фрактура на носни кости) и от мукозата на процесус мастоидеус (при двустранна глухота). Материалът се поставяше в контейнер със специален буфер, подробно се етикираше и се транспортираше до Центъра по молекулна медицина. Там се съхраняваше при специални условия (-80 градуса по Целзии), за да бъдат последващите изследвания максимално точни.

4.2 Методи

4.2.1 Клинични методи

При постъпването в клиниката се взимаше информирано съгласие за участието на пациента в изследването. Снемаше се подробна анамнеза и клиничен статус, параклинични изследвания - пълна кръвна картина, СУЕ, протромбиново време, INR, кръвна захар, урея и креатинин, рентгенография на бял дроб и сърце. По преценка на лекуващия лекар в зависимост от състоянието на пациента и придружаващите заболявания се провеждаха допълнителни диагностични изследвания с оглед безопасността на оперативната интервенция.

От анамнезата получавахме информация за началото на заболяването, начина на протичане, придружаващи заболявания, минали заболявания, рискови фактори. Съвместно с Центъра за молекулна медицина за нуждите на проучването беше разработена предварително анкетна карта за всички пациенти.

На пациентите с хроничен риносинуит и фрактура на носните кости предоперативно се извършваше предна риноскопия и назална ендоскопия под местна анестезия за прецизна оценка на локалния статус. При пациентите с хроничен риносинуит се описваха наличието или липсата на носни полипи. Провеждаше се и КАТ на околоносни кухини. Пациентите се определяха по EPOS критериите.

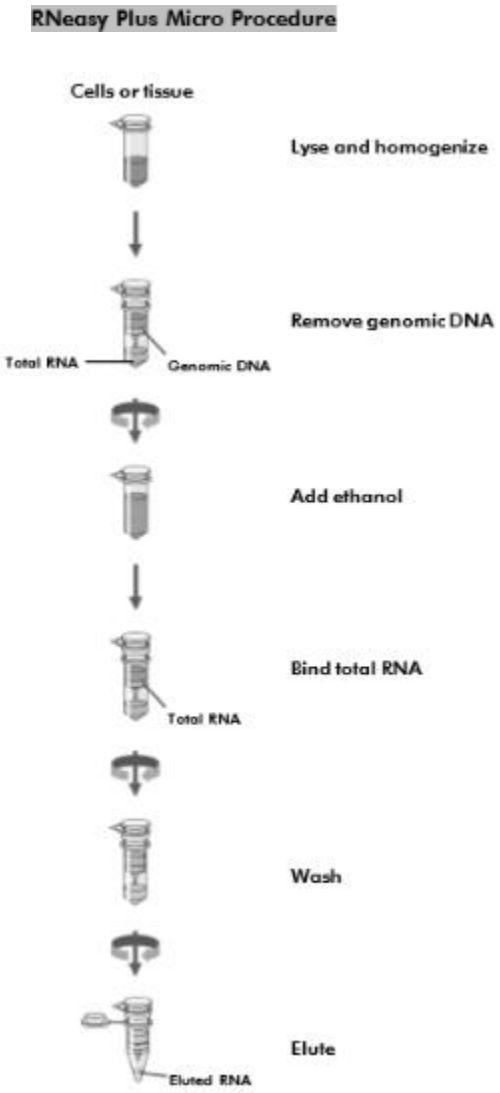
На болните с хроничен гноен отит и двустранна невросензорна глухота се извършваше микроотоскопия за определяне на статус локалис. При болните с хроничен гноен отит се описваше вида на тимпаналната перфорация-епитимпанит или мезотимпанит. На всички болни с хроничен гноен отит беше извършена аудиометрия.

4.2.2. Генетични методи

От събраните тъкани от лигавици на пациентите и контролите с помощта на специфични китове, работещи с колонки се изолира тотална РНК. Спектрофотометрично с помощта на NanoDrop се определи концентрацията и качеството на изолираната РНК. След това от РНК се синтезира кДНК чрез обратно транскриптазна реакция. Това се осъществи с помощта на High Capacity RT kit, работещ с до 2 μg РНК и случайни праймери. На следващ етап се извърши Real time PCR анализ чрез използване на Taq Man технологията. На края се сравниха нивата на експресия на BPIFA1 между пациентите и здравите контроли и между двете групи пациенти (пациентите с риносинуити и отити) с помощта на ΔΔCT метода.

Изолиране на тотална РНК

Тотална РНК беше изолирана от събраните тъканни проби от подбраните пациенти с помощта на RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) като се следваха инструкциите на фирмата производител.



Фигура 1. Процедура на изолиране на тотална РНК с RNeasy Plus Micro Kit.

Измерване на концентрацията на изолираната РНК

Концентрацията на изолираната РНК беше определена спектрофотометрично с помощта на NanoDrop. Концентрацията на изолираните РНК проби варира между 5-300 ng /µl. В следващите стъпки от преданалатичната обработка бяха включени само РНК проби, които показаха добри A260/280 и A260/230 съотношения.

Синтез на кДНК от РНК чрез обратнотранскриптазна реакция:

Обратната транскрипция бе извършено с помощта на High-Capacity cDNA Reverse Transcription kits. В Таблица 1 са представени компонентите на обратно транскриптазната реакция

Таблица 1. Състав на 2x мастер микс за обратна транскрипция.

Етап	**Компонент**	**Количество (µl) за една реакция**
Подготовка на РНК	РНК (до 2 µg)	x
	Свободна от РН-ази вода	10-x
Обратна транскрипция – синтез на кДНК	10X RT Buffer	2.0
	25X dNTP Mix (100mM)	0.8
	MiltiScribe Ензим-Обратна Транскриптаза	2.0
	RNase Inhibitor	1.0
	Nuclease-free H_2O	1.0
	Краен обем	**20.0**

Използвана Апаратура:

PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)

Микроцентрофуга Micro CL 21 (Thermo Scientific)

Принцип:

В RT-PCR, матричната мРНК първо се превръща в комплементарна ДНК (кДНК) с помощта на ензим обратна транскриптаза. След това кДНК се използва като матрица за експоненциално амплифициране с PCR метода. До сега RT-PCR е най-чувствителния метод за откриване наличието на РНК. Използването на RT-PCR за откриване на РНК транскрипти води до революция в изследванията на генната експресия поради следните причини: 1) прави теоретично възможно установяването практически на всеки генен транскрипт; 2) елиминира необходимостта от голямо количество изходен материал, недостатък на Northern Blot анализа; 3) създаде възможност за толерантност към частичното разграждане на РНК, докато РНК секвенцията в областта на праймерите е непокътната;

Етапи:

Подготовка на РНК пробата

Провеждане на реакция на обратна транскрипция

Процедура:

Извършва се синтез на кДНК на базата на тотална мРНК, изолирана от свежа тъкан, с помощта на ензим обратна транскриптаза по протокол на производителя.

- Подготовка на РНК разредка с подходяща концентрация, еднаква за всички реакции

 Подготовка на 2х мастер микс за обратна транскрипция (2X RT master mix) с реактиви от кита, на лед.Смесване и кратко центрофугиране.

 Провеждане на обратна транскрипция на PCR апарат по следната програма:

Таблица 2

Температура	Време (мин)
25°C	10
37°C	120
85°C	5
4°C	изчакване/∞

Съхраняване на готовите проби в хладилник на -20°C до пристъпване към следващата стъпка.

Експресионен анализ на BPIFA1 в лигавица на пациенти с хроничен риносинуит и отит, и контроли чрез T PCR в реално време (Real Time PCR)

Използвана Апаратура:

 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)

 Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf);

 Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific)

 Устройство за разбъркване Press–to–mix (Snijders);

 Сух стерилизатор MMM (Ecocell)

Етапи:

 Изолиране на РНК и определяне на качеството и концентрацията

 Обратна транскрипция за синтез на кДНК

- Изготвяне на разредки на кДНК
- Провеждане на PCR в реално време
- Анализ на генната експресия

Количественото определяне на кДНК по време на амплификационната реакция се осъществява чрез проследяване на флуоресцентния сигнал от репортера – при нарастване на броя на амплифициращите се ампликони флуоресцентният сигнал също се увеличава. Измерваната Cq (Ct) стойност е логаритмична стойност, която е необходимо да бъде конвертирана в линейна количествена стойност чрез функцията: $RQunkn = 2^{\wedge-(\Delta\Delta Ct)}$.

ΔCt = Ct (ген)-Ct (енд.к.), където енд.к. – ендогенна контрола

ΔΔCt = ΔCt (изследвана проба) - ΔCt (калибратор) като ΔCt на калибратора представлява средната стойност получена от всички калибраторни проби (в случая ДПХ контролите)

RQ = 2- $^{\Delta\Delta Ct}$**,** където RQ е relative quantification (относително ниво на генната експресия)

Всяка една проба бе повторена три пъти и за изчисляване на ΔCt се взимат средните Ct стойности получени за изследвания ген и ендогенната контрола. При RQ>2,00 се отчита повишена експресия на гена, а при RQ<0,49 генната експресия се отчита като понижена.

4.2.3.Статистически методи.

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 23.0. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието $p<0.05$.

Бяха приложени следните методи:

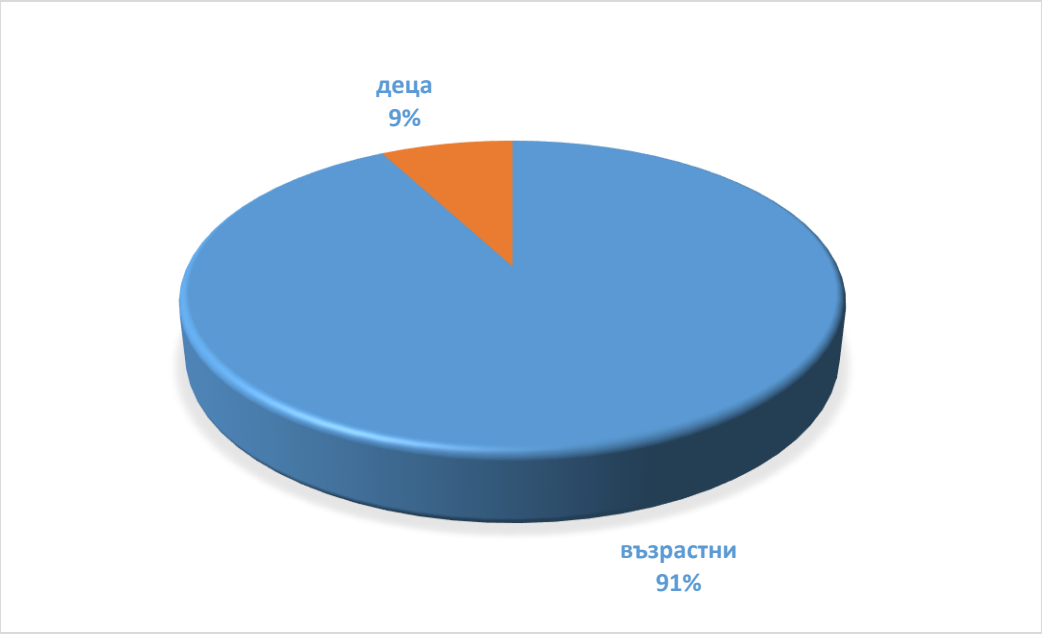
1. ***Дескриптивен анализ*** – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
2. ***Вариационен анализ*** – за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическо разсейване.
3. ***Графичен анализ*** – за визуализация на получените резултати.
4. ***Алтернативен анализ*** – за сравняване на относителни дялове.
5. ***Точен тест на Фишер и тест χ^2*** - за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.
6. ***Непараметричен тест на Шапиро-Уилк*** – за проверка на разпределението за нормалност.
7. ***Непараметричен тест на Ман-Уитни*** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.
8. ***Корелационен анализ*** - за количествена оценка на зависимостта между метрирани признаци.
9. ***Регресионен анализ*** - за определяне уравнението на зависимостта между количествени признаци.

5. Резултати.

5.1 Клинични характеристики на пациентите.

Събрани са данни на 90 пациента с хроничен риносинуит, хроничен гноен отит и контроли.

От всички изследвани болни, (91%) са възрастни и (9%) са деца.



Фиг. 2 Разпределение на пациентите по възраст

В Табл. 3 групирахме възрастните пациенти по отношение на тютюнопушенето. Те бяха разпределени в четири групи: 1-никога не е пушил; 2-бивш пушач; 3-пуши рядко; 4-пуши ежедневно

ТЮТЮНОПУШЕНЕ			
		Брой пациенти	**Проценти**
Групи пациенти	*1*	48	57.83%
	2	6	7.23%
	3	2	2.41%
	4	27	32.53%
общо		83	100.00%

Табл. 3 Разпределение на пациентите според тютюнопушенето

Най-голям дял от пациентите съставлява групата на пациентите, които никога не са били пушачи (57,83%), а болните ежедневни пушачи са 32,53%.

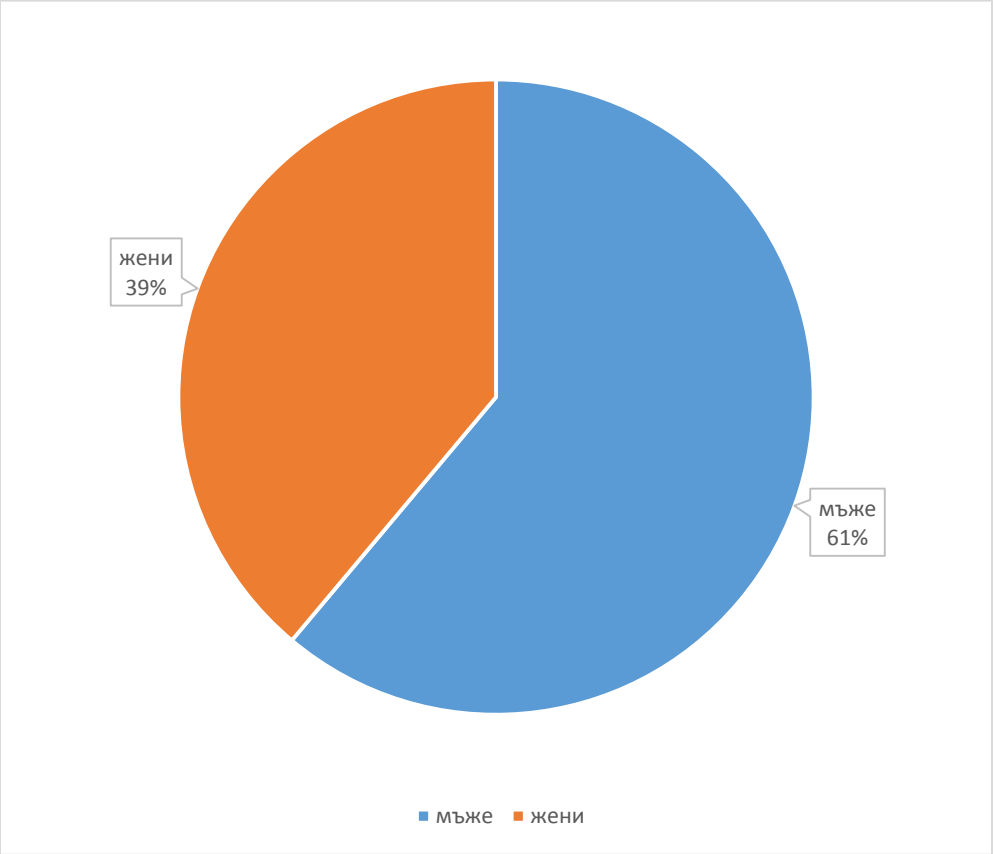
В таблицата по-долу е дадено разпределението на пациентите по възрастови групи.

Табл. 4 Разпределение на пациентите по възрастови групи

Години	**Брой Пациенти**	**Проценти**
0-6	6	6.67%
7 -18	2	2.22%
19- 24	4	4.44%
25-35	21	23.33%
36-45	11	12.22%
46-55	18	20.00%
56-65	17	18.89%
66-75	9	10.00%
76-85	2	2.22%
Общо	90	100.00%

Основната част от изследваните пациенти (74.44%) са в интервала от 25 до 65год.

По отношение на половото разпределение 55 от болните са мъже и 35 жени.



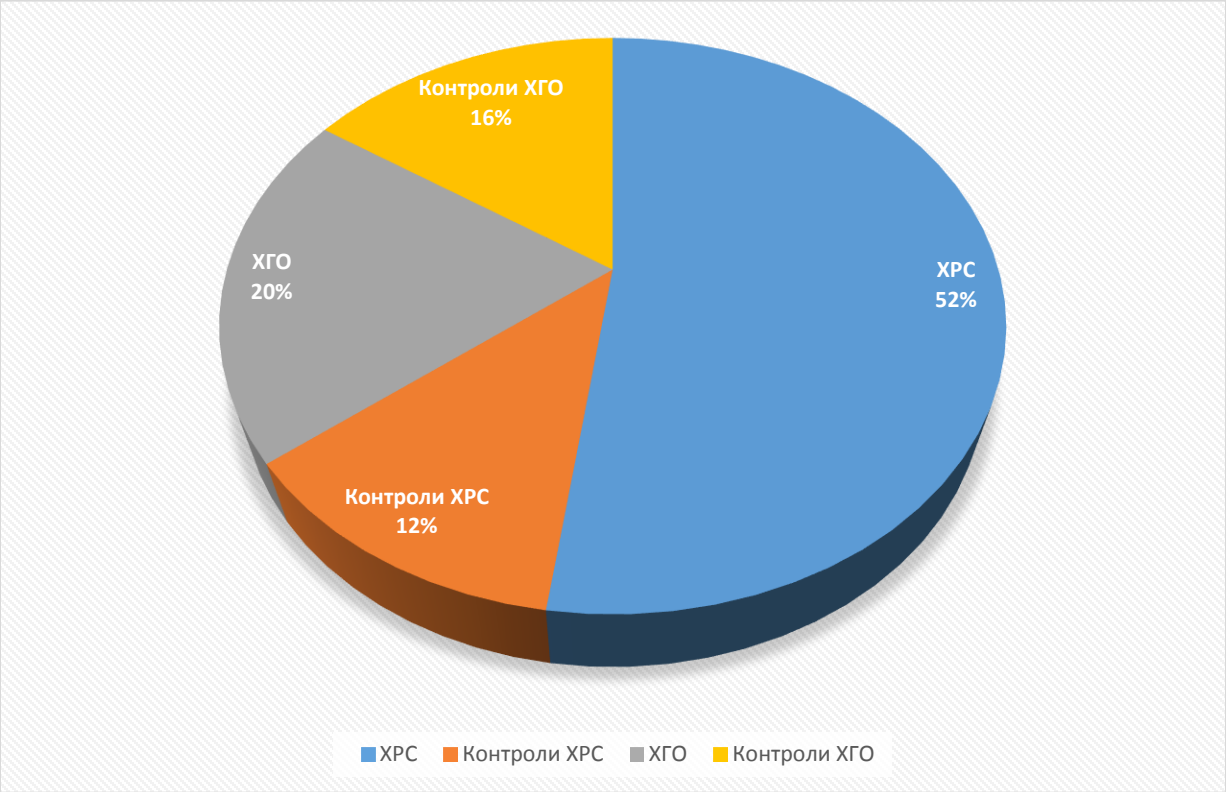
Фиг. 3 Разпределение на пациентите по пол

Табл. 5 Разпределение на пациентите по области в България

Област	**Брой Пациенти**	**Проценти**
Благоевград	6	6.67%
Бургас	1	1.11%
Варна	0	0.00%
В. Търново	3	3.33%
Видин	0	0.00%
Враца	5	5.56%
Габрово	0	0.00%
Добрич	0	0.00%
Кърджали	0	0.00%
Кюстендил	0	0.00%
Ловеч	0	0.00%
Монтана	1	1.11%
Пазарджик	1	1.11%
Перник	2	2.22%
Плевен	2	2.22%
Пловдив	3	3.33%
Разград	1	1.11%
Русе	2	2.22%
Силистра	1	1.11%
Сливен	1	1.11%
Смолян	0	0.00%
София	57	63.33%
Ст. Загора	2	2.22%
Търговище	0	0.00%
Хасково	1	1.11%
Шумен	1	1.11%
Ямбол	0	0.00%

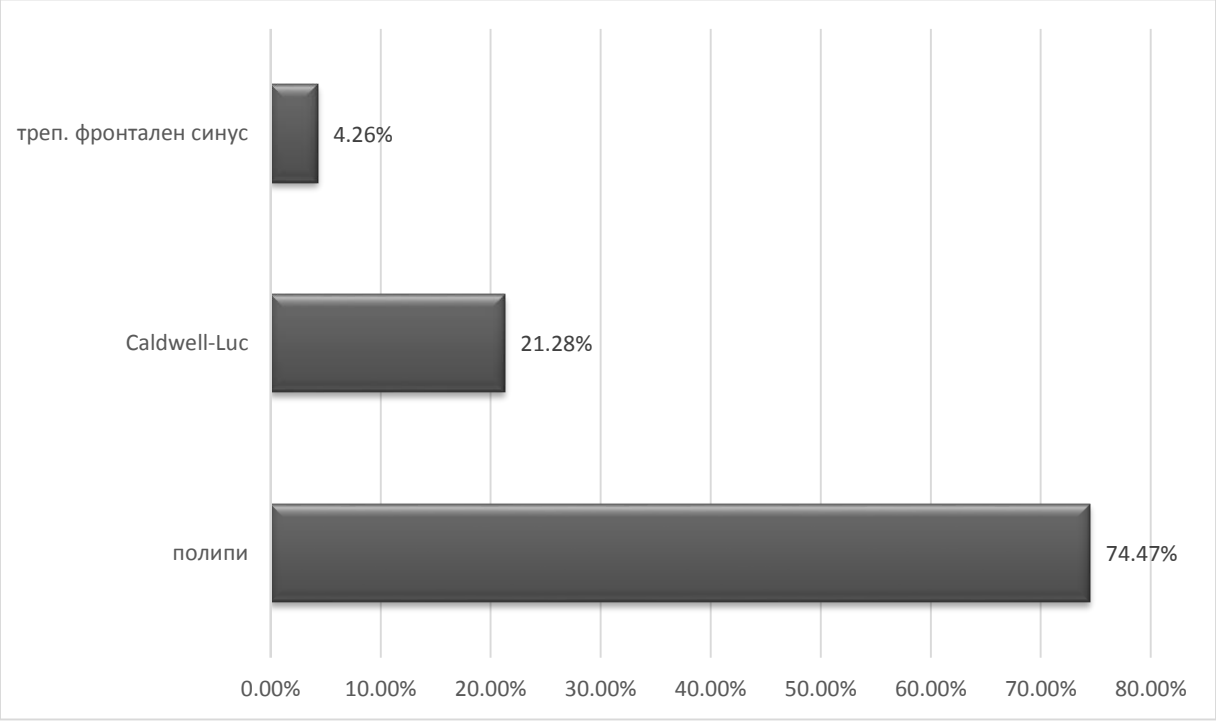
Съгласно табл. 5, изследваните пациенти са главно от област София-57(63.3%), а следващи са съответно област Благоевград (6.67%) и област Враца (5.56%). От 10 области нямаме нито един пациент, а от останалите по един или двама пациенти.

От събраните пациенти най-голям е дялът на болните с хроничен риносинуит-47 (52%).



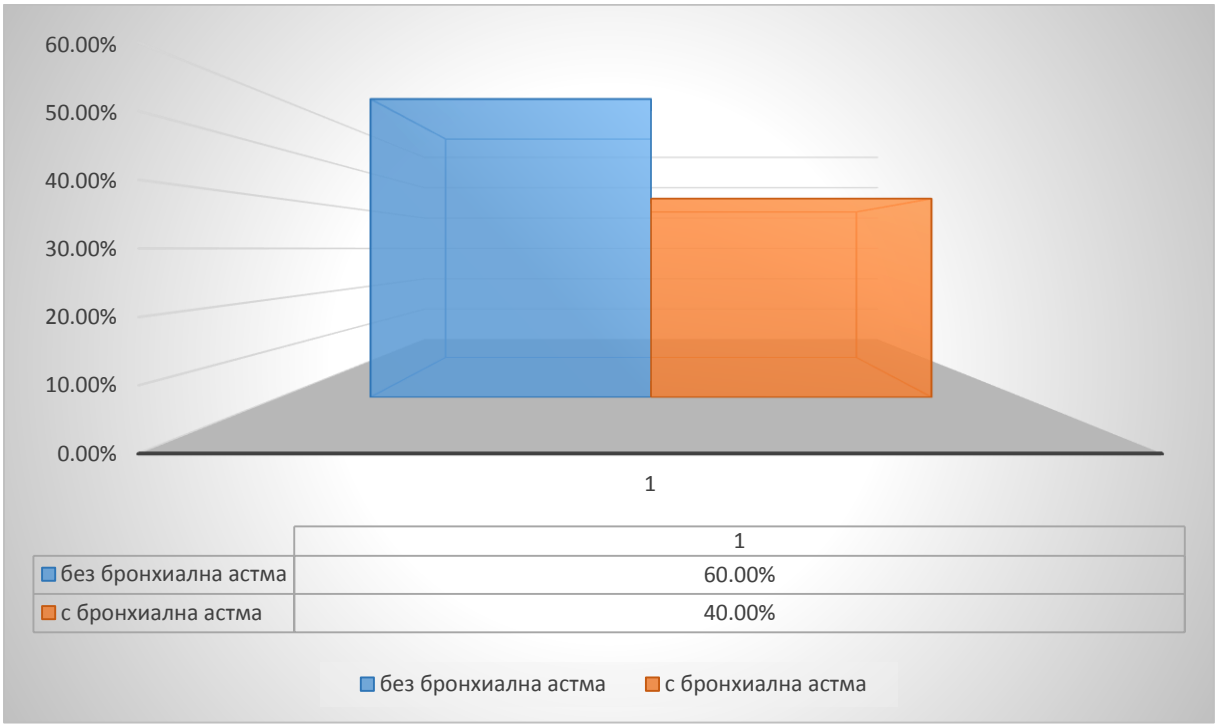
Фиг. 4 Разпределение на пациентите по клинична диагноза

При болните с ХРС най-многобройни са пациентите с носна полипоза-35 (74.47%),болните с трепанация на максиларния синус по Cadwell-Luc (без носна полипоза) са 10 (21.28%) и имаме 2 болни с трепанация на фронталния синус по повод на мукоцеле.



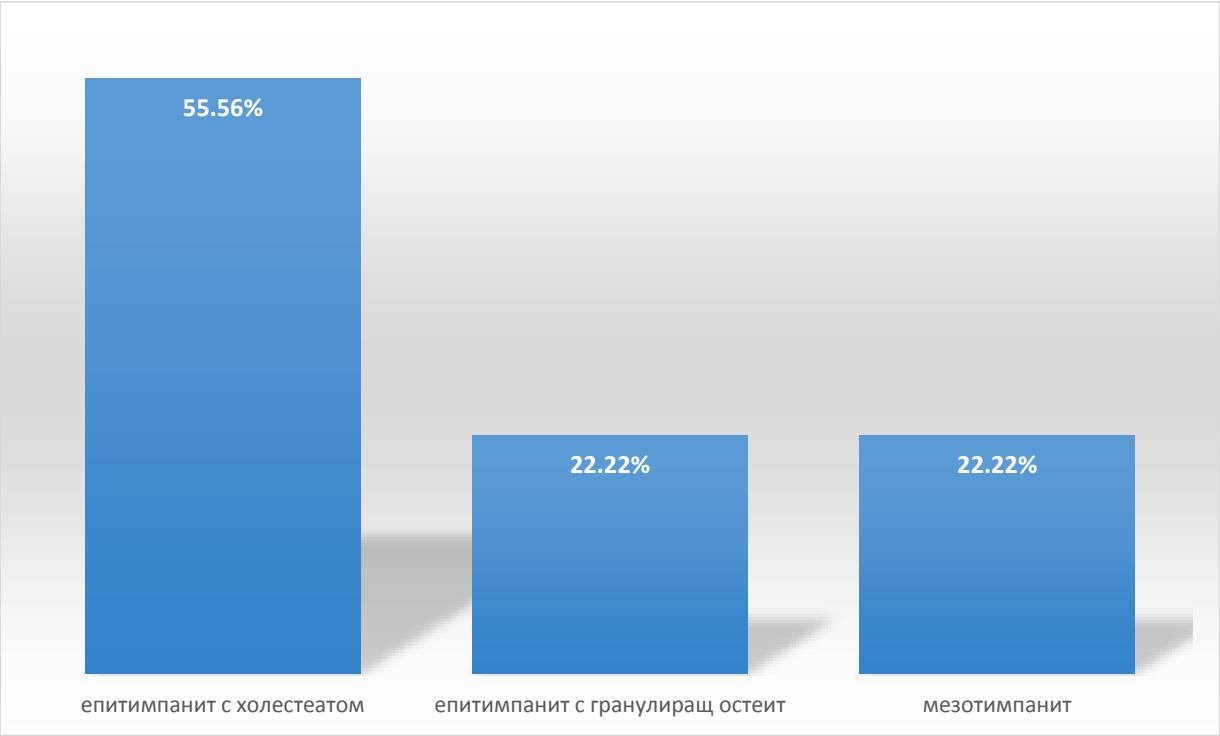
Фиг. 5 Разпределение на болните с хроничен риносинуит

Наличие на съпътстваща бронхиална астма установихме при 40% от болните с носна полипоза. Останалите 60% от пациентите бях без данни за бронхиална астма.



Фиг. 6 Разпределение на болните с носна полипоза и наличие на бронхиална астма

Приблизително около половина от болните с хроничен гноен отит са с епитимпанит с холестеатом-55.56%, а болните с гранулиращ остеит и мезотимпанит са по-равно-22.22%.



Фиг. 7 Разпределение на пациентите с хроничен гноен отит

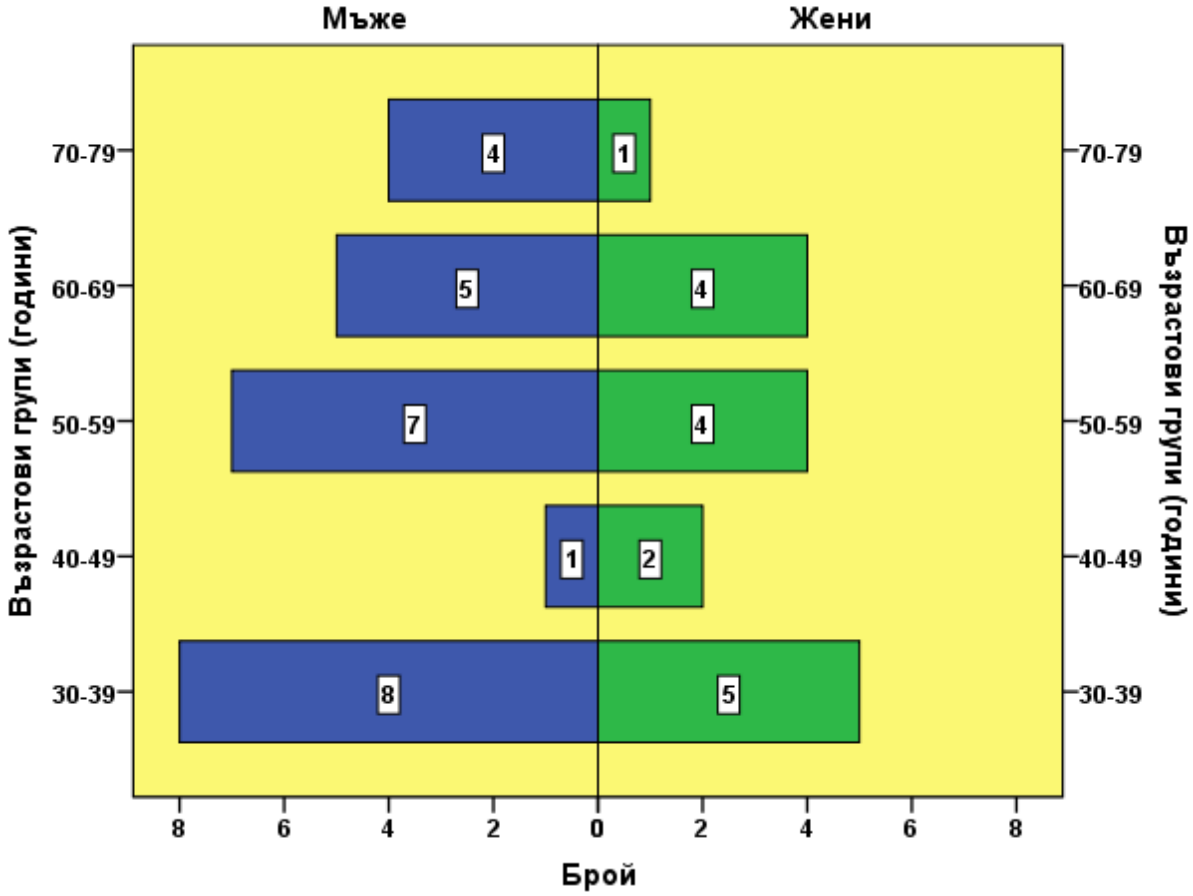
5.2 Експресионен анализ на BPIFA1.

От всички тъканни проби бе изолирана РНК. За провеждането на обратната транскрипция за синтез на cDNA бяха използвани само РНК проби с концентрация над 6 ng/µl от тъканни проби от 63 пациента- 33-ма пациенти с CRS и 8 контроли с изкривена носна преграда, 12 пациенти с хроничен гноен отит (COM) и 10 контроли с несиндромна слухова загуба.

5.2.1 Експресионен анализ на BPIFA1 (SPLUNC1) при пациенти с хроничен риносинуит (CRS) и контроли

Изследван контингент

Включените в извадката 41 пациенти са със средна възраст 50,51±13,64 години в диапазона 31-76 години. От тях 25 (61,0%) са мъже и 16 (39,0%) жени. Възрастовата група с най-голяма численост (8) при мъжете е 30-39 години, следвана от 50-59 години със 7, а с най-малка (1) – 40-49 години. При жените с най-голяма численост (5) е възрастова група 30-39 години, следвана от 50-59 и 60-69 години с по 4, а с най-малка (1) - 70-79 години (фиг. 8).



Фигура 8: Разпределение на участниците в извадката по пол и възрастови групи

За целите на настоящето проучване изследваната извадка е разделена на две групи – случаи с хроничен риносинуит и контроли с фрактура на носните кости. Двете групи са изравнени по известните замъгляващи фактори пол и възраст (табл. 6):

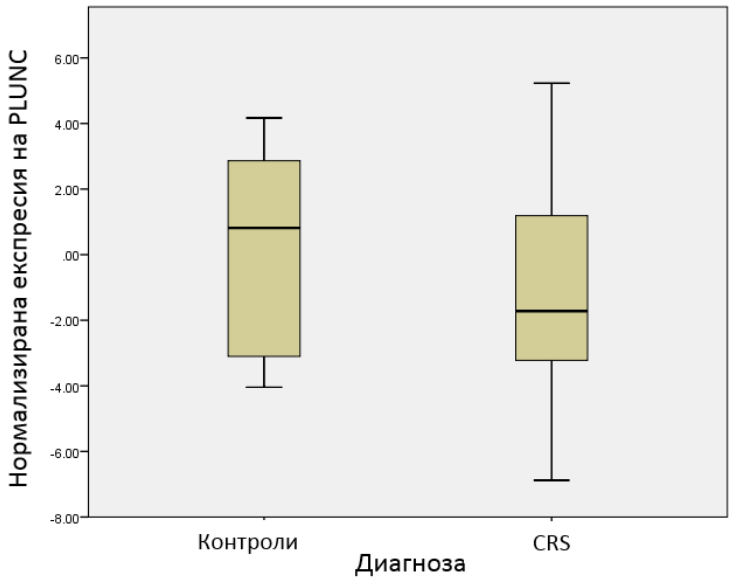
Таблица 6: Сравнителен анализ на показателите пол и възраст при случаи и контроли

Показател	Контроли		Случаи		P
	n	%	n	%	
Пол					0,689
Мъже	4	50,0	21	63,6	
Жени	4	50,0	12	36,4	
Възраст	$\overline{X}$	**SD**	$\overline{X}$	**SD**	
(години)	43,38	13,73	52,24	13,24	0,099

Експресионните нива на BPIFA1 бяха изследвани в 33-ма пациента и 8 контроли. Резултатите от проведения анализ са представени в Таблица 7, Фигура 9.

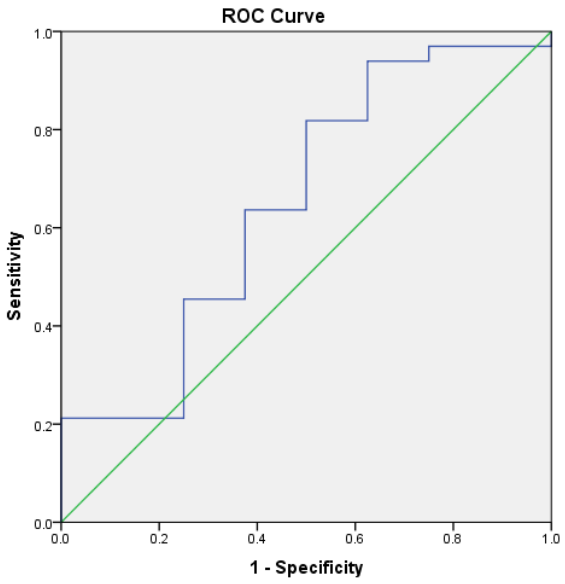
Таблица 7. Резултати от BPIFA1 експресионния анализ в тъкан на пациенти с CRS и контроли, служещи за калибратори

Резултати: пациенти с CRS спрямо контроли	**Брой пациенти (%)**
Без значима разлика в експресията	6 (18.18%)
Понижена експресия	7 (21.21%)
Повишена експресия	20 (60.61%)



Фигура 9. Box plot графика, показващи експресионните нива (представени чрез deltaC$_T$) на *PLUNC(BPIFA1)* при пациенти с CRS и контролите. Експресионните нива на PLUNC са нормализирани към GAPDH. Контролите са здрави и тъкан е взета при провеждане на репозиция на носните кости

За да определим дали експресионните нива на BPIFA1 могат да бъдат използвани за разграничаване на пациентите с CRS от контролите проведохме анализ на ROC кривите. Резултат е представен на Фигура 10.



Фигура 10. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностичната стойност на BPIFA1 за разграничаване на пациентите с CRS от контролите.

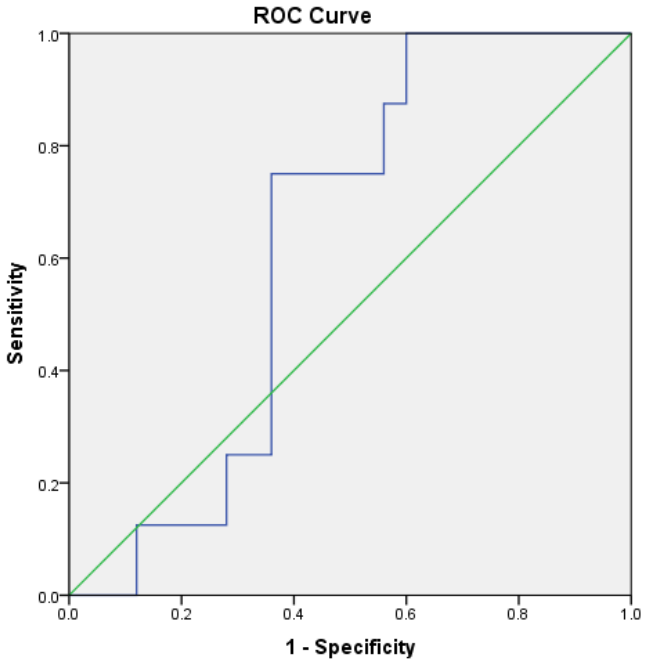
Площта под кривата (AUC) е 0.652 с чувствителност и специфичност съответно 81.8% и 50%, но резултатът недостига статистическа значимост (p=0.19). Тези резултати показват, че експресионните нива на BPIFA1 не могат да разграничат надеждно пациентите от контролите. Това трябва да се потвърди в по-голяма група пациенти и контроли.

От анализираните 33-ма пациенти с CRS, 25 са с наличие на полипи и 8 са без полипи. Направихме сравнение на експресията на BPIFA1 между пациентите с полипи и тези без полипи. Резултатите от това сравнение са представени в Таблица 8. В 52% от пациентите с полипи се наблюдава понижена експресия спрямо пациентите без полипи.

Таблица 8. Резултати от *BPIFA1* експресионния анализ в тъкан на пациенти с CRS с полипи и пациенти без полипи, служещи за калибратори

Резултати: пациенти с полипи спрямо пациенти без полипи	**Брой пациенти (%)**
Без значима разлика в експресията	5 (20%)
Понижена експресия	13 (52%)
Повишена експресия	7 (28%)

При анализът на ROC кривите се достигнаха гранично статистически значими резултати и вероятно нивата на BPIFA1 могат да бъдат използвани за разграничаване на пациентите с полипи от тези без полипи (Фигура 11).



Фигура 11. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностичната стойност на BPIFA1 за разграничаване на пациентите без полипи от пациентите с полипи.
AUC=0.625, p<0.1, чувствителност 75% и специфичност 64%.

На табл. 9 се вижда, че средната стойност на експресията при случаите е по-висока от тази на контролите, но разликата няма сигнификантен характер.

Статистически значима разлика на експресията не се установява и между контролите и пациентите с ХРС с полипи и без полипи, макар че и в двата случая средната стойност на експресията е по-висока в алгебричен план при случаите (табл. 10 и 11).

Отново по-висока в алгебричен план средна стойност на експресията спрямо контролите се наблюдава при пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) и хоанален полип, но липсата на статистическа представителност на последната група не позволява направата на статистически достоверен извод (табл. 12).

При пациентите с ХРС и с полипи средната стойност на експресията е по-ниска спрямо тази на пациентите с ХРС без полипи, като разликата има гранично сигнификантен характер ($p<0,1$) (табл. 13).

Средната стойност на експресия при жените спрямо тази на мъжете в групата на пациентите с ХРС е по-висока, но само в алгебричен план (табл. 14). В групата на контролите резултатът е подобен, но липсата на статистическа представителност на изследваните групи не позволява направата на статистически достоверен извод (табл. 15).

Сравнителният анализ на RQ value (експресия) на пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) според етническата принадлежност показа, че (табл. 16):

- Средните стойности на експресията при българи и турци са приблизително равни, докато тази на циганите е значително по-ниска;
- Поради липса на статистическа представителност на изследваните групи турци и цигани не може да се направи статистически достоверен извод.

От табл. 17 става ясно, че:

- Средната стойност на експресията на пациентите с ХРС и астма е значително по-ниска от тази на пациентите с ХРС без астма;
- Липсата на статистическа представителност на групата с астма не позволява да се направи статистически достоверен извод.

Таблица 9: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) и контролната група

Контроли			Случаи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	5,26	7,63	30	6,76	9,03	0,332

Таблица 10: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите със хроничен риносинуит (ХРС) и полипи, и контролната група

Контроли			Пациенти с ХРС с полипи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	5,26	7,63	22	5,90	8,88	0,565

Таблица 11: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите със хроничен риносинуит (ХРС) без полипи и контролната група

Контроли			Пациенти с ХРС без полипи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	5,26	7,63	8	9,12	9,63	0,130

Таблица 12: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) с хоанален полип и контролната група

Контроли			Пациенти с ХРС и хоанален полип			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	5,26	7,63	3	9,69	5,49	-

Таблица 13: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) с полипи и без полипи

Пациенти с ХРС без полипи			Пациенти с ХРС с полипи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	9,12	9,63	22	5,90	8,88	0,087

Таблица 14: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между двата пола при пациентите с хроничен риносинуит (ХРС)

Пациенти с ХРС мъже			Пациенти с ХРС жени			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
18	5,40	8,57	12	8,80	9,69	0,185

Таблица 15: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между двата пола при контролите

Контроли мъже			Контроли жени			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
4	4,36	7,77	4	6,17	8,56	-

Таблица 16: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) според етническата принадлежност

Етническа принадлежност	n	$\overline{X}$	SD
Българи	26	7,10	9,35
Турци	2	8,07	10,30
Цигани	2	1,11	1,18

Таблица 17: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) според наличието на астма

Пациенти с ХРС без астма			Пациенти с ХРС и астма			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
23	8,29	9,79	6	1,62	2,29	-

Резултатите от табл. 18 показват, че:

- Най-висока средна стойност на експресията между пациентите с хроничен риносинуит се наблюдава при имащите хоанален полип, следвана от тези с полипоидно дегенерирала лигавица, а с най-ниска средна стойност са имащите полипи;
- Разликата между първа и трета подгрупи няма статистическа значимост, а втора подгрупа не участва в анализа поради липса на статистическа представителност.

Средните стойности на експресията при пушачите и в двете изследвани групи (случаи и контроли) са по-ниски в алгебричен план, но при случаите разликата няма статистически достоверен характер, а при контролите липсва необходимата статистическа представителност за направата на достоверен статистически извод (табл. 19 и 20).

На табл. 21 се вижда, че:

- Пушачите от групата с ХРС имат малко по-висока средна стойност на експресията от пушачите в групата на контролите;
- Липсата на представителност на групата на пушачите от контролната група не позволява направата на достоверен статистически извод.

Аналогични са резултатите от сравнителния анализ на непушачите в двете изследвани групи (табл. 22).

Таблица 18: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между при пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) според хирургическата находка

Хирургическа находка	n	$\overline{X}$	SD
Полипи	18	5,58[a]	9,45
Хоанален полип	3	9,69	5,49
Полипоидно дегенерирала лигавица	9	8,14[a]	9,48

Таблица 19: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пушачи и непушачи при контролите

Контроли непушачи			Контроли пушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
3	6,25	10,53	5	4,67	6,72	-

Таблица 20: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) според показателя тютюнопушене

Пациенти с ХРС непушачи			Пациенти с ХРС пушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
18	7,82	9,82	12	5,17	7,84	0,692

Таблица 21: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пушачите от групата с хроничен риносинуит (ХРС) и контролите

Контроли пушачи			Пациенти с ХРС пушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
5	4,67	6,72	12	5,17	7,84	-

Таблица 22: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между непушачите от групата с хроничен риносинуит (ХРС) и контролите

Контроли непушачи			Пациенти с ХРС непушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
3	6,25	10,53	18	7,82	9,82	-

Проведеният корелационен и регресионен анализи не установиха наличие на зависимост между възрастта и RQ value.

От табл. 23 става ясно, че няма сигнификантна разлика между честотното разпределение на категориите на експресията в двете изследвани групи.

Таблица 23: Сравнителен анализ на двете изследвани групи по нива на експресия

Показател	Контроли		Случаи		P
	n	%	n	%	
Експресия					
Потисната RQ<0,5	0	0	1	3,3	n.s.
Нормална 0,5≤RQ≤2	1	12,5	4	13,3	n.s.
Повишена RQ>2	7	87,5	25	83,3	n.s.

5.2.2 Експресионен анализ на BPIFA1 при пациенти с хроничен гноен отит (ХГО) и контроли

От всички тъканни проби на (n=32) бе изолирана РНК. За първи път се изследва експресия на BPIFA1 гена в лигавицата на средно ухо при човек и при хроничен гноен отит. За първи път се направи сравнение на експресията на BPIFA1 при хроничен гноен отит и при контроли. Установихме експресия при всички изследвани болни (n=32) независимо от състоянието на лигавицата- както при патологично променена мукоза при ХГО така и в нормална мукоза на средно ухо при контроли (двустранна невросензорна глухота) (Таб.24).

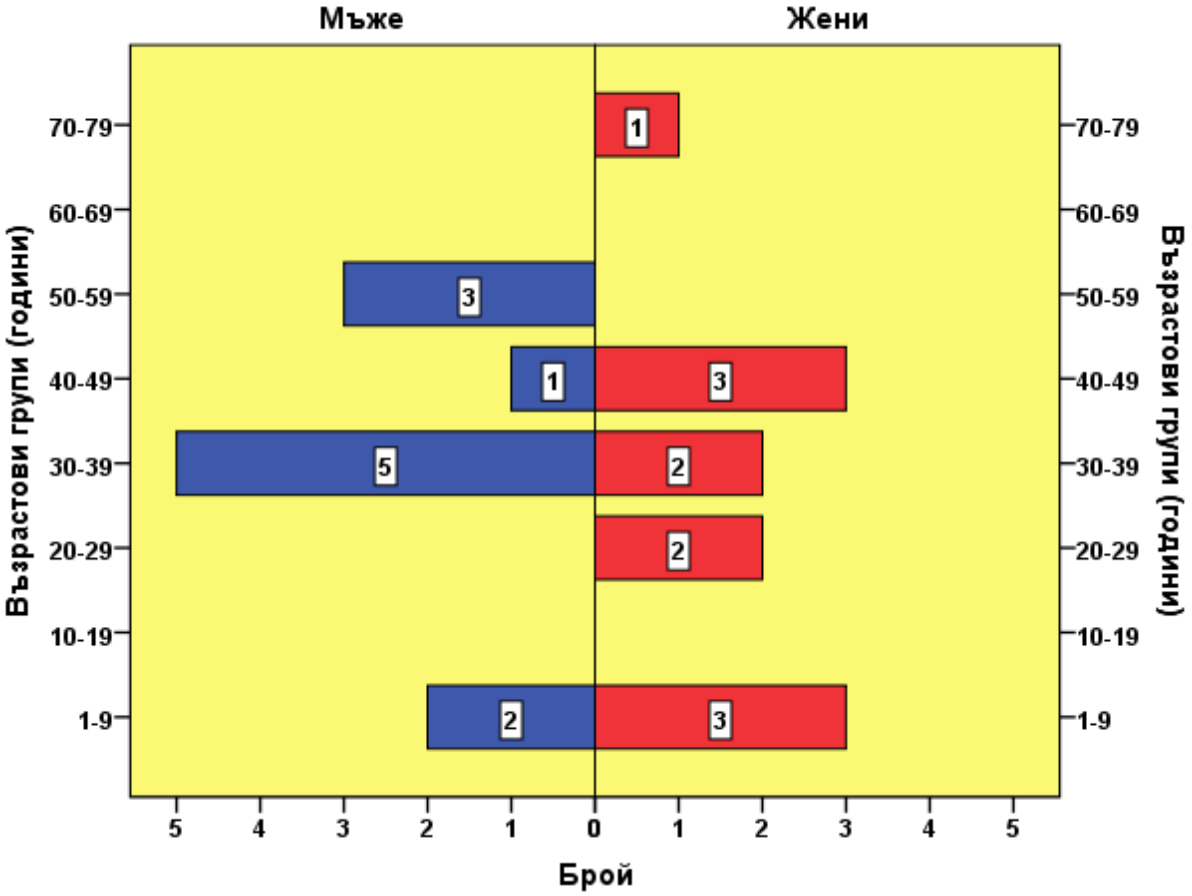
Таб. 24 Сравнение между пациенти с ХГО и контроли

	ХГО	**Контроли**
Брой пациенти (n)	17	15
Брой пациенти с BPIFA1 експресия (n %)	17 (53%)	15 (47%)
Мъже (n %)	7 (41%)	8 (53%)
Жени (n %)	10 (59%)	7 (47%)
Възраст (години)	44 (между 27-73)	18 (между 1-50)
Брой пациенти във възрастова група 0-18 years(n %)	0 (0 %)	9 (60%)
Българи (n %)	15 (88%)	8 (53%)
Цигани (n %)	1 (6%)	6 (40%)
Турци (n %)	1 (6%)	1 (7%)
Пушачи (n %)	10 (59%)	3 (20%)
Непушачи (n %)	7 (41%)	12 (80%)
Брой пациенти с радикална трепанация	17	0
Брой пациенти с кохлеарна имплантация	0	15
Брой пациенти с BPIFA1 експресия < 6 ng/µl (n %)	5 (29%)	5 (33%)
Брой пациенти с BPIFA1 експресия > 6 ng/µl (n %)	**12** (71%)	**10** (67%)

Български етнос се установява при 88% (n=15) от изследваните с ХГО, а при контролите при 53% (n=8). Също така при контролите, 40% (n=6) от болните са от циганси етнос докато при ХГО те са 6% (n=1). Броят на пушачите при случаите достига 59% (n=10).Тъй като при контролите 60% от изследваните са до 18 години респективно и броят на пушачите е по-малък-20% (n=3). При всички 17 изследвани болни с хроничен гноен отит е проведена радикална мастоидектомия с премахване на холестеатома, а при всички 15 пациента с двустранна невросензорна глухота е извършена кохлеарна имплантация.

С оглед използвания метод на изследване за сравнителен експресионен анализ на BPIFA1 между болните с ХГО и контролите можеха да бъдат използвани само РНК проби с концентрация над 6 ng/µl. Това бяха 22 пациенти 71% (n=12) от болните с ХГО и 67% (n=10) от болните двустранна невросензорна глухота. Изследваната лигавица от пациентите с ХГО е патологично променена лигавица от средно ухо, вследствие хроничния възпалителен процес. Болните с двустранна невросензорна глухота бяха използвани като контролна група, защото на практика взетата от тях мукоза представлява нормална, здрава лигавица от средно ухо.

Включените в извадката 22 пациенти са със средна възраст 32,68±20,05 години в диапазона 1-72 години. От тях 11 (50,0%) са мъже и 11 (50,0%) жени. Възрастовата група с най-голяма численост (5) при мъжете е 30-39 години, следвана от 50-59 години с 3, а с най-малка (1) – 40-49 години. Във възрастови групи 10-19, 20-29 и 60-69 мъже няма. При жените с най-голяма численост (3) са възрастови групи 1-9 и 40-49, години, следвани от 20-29 и 30-39 години с по 2, а с най-малка (1) - 70-79 години. Във възрастови групи 10-19 и 60-69 жени липсват (фиг. 12).



Фигура 12: Разпределение на участниците в извадката по пол и възрастови групи

За целите на настоящето проучване изследваната извадка е разделена на две групи – случаи с гноен отит и контроли с глухота или фрактура на темпоралната кост. Двете групи са изравнени по известните замъгляващи фактори пол и възраст (табл. 25):

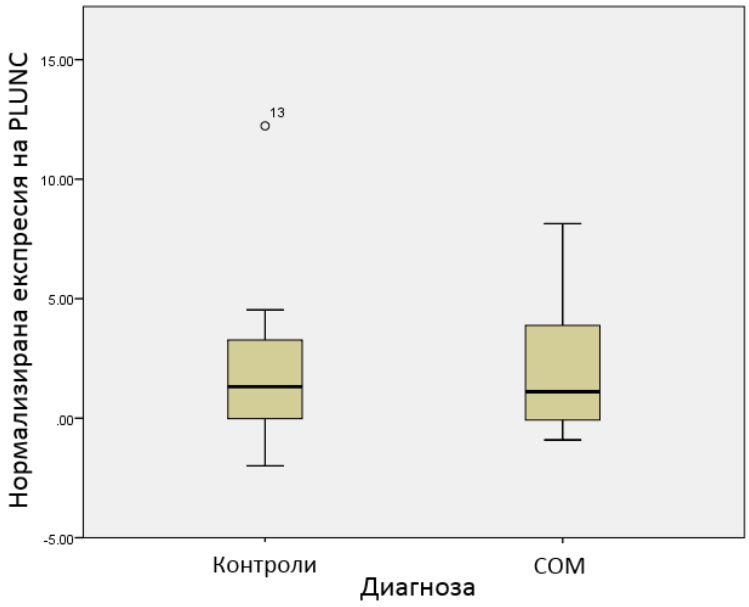
Таблица 25: Сравнителен анализ на показателите пол и възраст при случаи и контроли

Показател	Контроли		Случаи		P
	n	%	n	%	
Пол					1,000
Мъже	5	50,0	6	50,0	
Жени	5	50,0	6	50,0	
Възраст	$\overline{X}$	**SD**	$\overline{X}$	**SD**	
(години)	21,90	21,62	41,67	13,84	0,107

Таблица 26 демонстрира, че при 16,67% (n=2) от болните с ХГО няма съществена разлика в BPIFA1 експресията спрямо контролите Половината от болните с ХГО показват повишена експресия, а 33,33% (n=4) понижена.

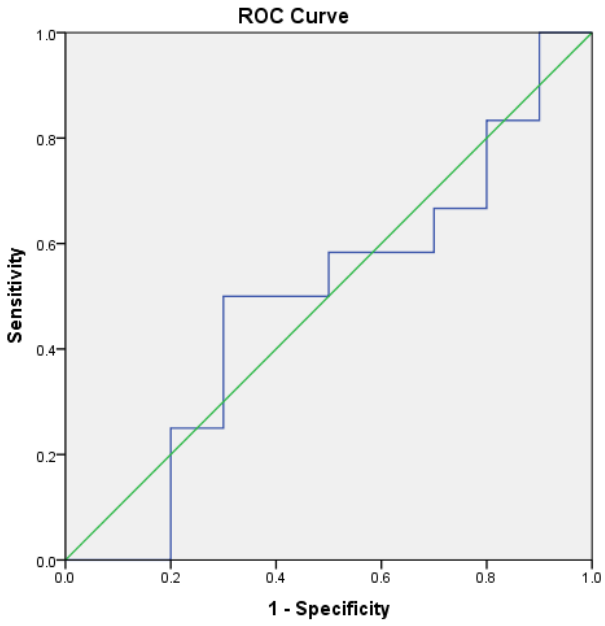
Таблица 26. Резултати от *BPIFA1* експресионния анализ в тъкан на пациенти с ХГО и контроли, служещи за калибратори

Резултати: пациенти с ХГО спрямо контроли	**Брой пациенти (%)**
Без значима разлика в експресията	2 (16.67%)
Понижена експресия	4 (33.33%)
Повишена експресия	6 (50%)



Фигура 13. Box plot графика, показващи експресионните нива (представени чрез deltaCт) на PLUNC (BPIFA1) **при пациенти с хроничен гноен отит(CMO) и контролите**. Експресионните нива на PLUNC са нормализирани към GAPDH. Контролите са здрави и тъкан е взета при провеждане на кохлеарна имплантация.

Проведеният анализ на ROC кривите показа, че нивата на BPIFA1 не могат надеждно да разграничат пациентите с хроничен гноен отит от контролите (Фигура 14). Това може да се дължи и на малката изследвана група от пациенти и контроли. За потвърждаване на получените резултати е необходимо увеличаване на изследваната кохорта.



Фигура 14. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностичната стойност на PLUNC за разграничаване на пациентите с хроничен гноен отит (COM) от контролите. AUC=0.492, p=0.947, чувствителност 58.3% и специфичност 50%.

На табл. 27 се вижда, че средната стойност на експресията при случаите е по-висока от тази на контролите, но разликата няма сигнификантен характер. Статистически значима разлика на експресията не се установява и между контролите и пациентите с ХГО с холестеатом и гранулиращ остеит, макар че и в двата случая средната стойност на експресията е по-висока в алгебричен план при случаите (табл. 28 и 29).

Тъй като подгрупата на имащите гранулиращ остеит няма статистическа представителност не може да се направи на статистически достоверен извод относно различието на експресията й от тази на имащите холестеатом (табл. 30).

При пациентите с ХГО по-висока средна стойност на експресията в алгебричен план имат мъжете спрямо тази на жените, а при контролите е точно обратното, но и тук липсата на статистическа представителност на изследваните подгрупи не позволява направата на достоверен статистически извод (табл.31 и 32).

Средната стойност на експресия при българите от групата на случаите е значително по-висока от тази на единствения турчин, но отново няма възможност за статистически значим извод (табл. 33). В групата на контролите резултатът е подобен, но този път спрямо подгрупата на циганите (табл. 34).

Сравнителният анализ на RQ value (експресия) на пациентите с гноен отит (ХГО) според извършената операция показа, че (табл. 35):

- Средната стойност на експресията при пациентите с МААТ е значително по-висока от тази на пациентите с радикална трепанация;
- Поради липса на статистическа представителност на изследваните подгрупи не може да се направи статистически достоверен извод.

Таблица 27: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите с гноен отит (ХГО) и контролната група

Контроли			Случаи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	1,56	1,45	12	2,75	2,82	0,233

Таблица 28: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите с гноен отит (ХГО) и холестеатом, и контролната група

Контроли			Пациенти с ХГО с холестеатом			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	1,56	1,45	8	2,74	3,05	0,349

Таблица 29: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите с гноен отит (ХГО) и гранулиращ остеит и контролната група

Контроли			Пациенти с ХГО и гранулиращ остеит			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	1,56	1,45	4	2,79	2,73	-

Таблица 30: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пациентите с гноен отит (ХГО) с холестеатом и гранулиращ остеит

Пациенти с ХГО и холестеатом			Пациенти с ХГО и гранулиращ остеит			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	2,74	3,05	4	2,79	2,73	-

Таблица 31: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между двата пола при пациентите с гноен отит (ХГО)

Пациенти с ХГО мъже			Пациенти с ХГО жени			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
6	2,83	2,94	6	2,67	2,98	-

Таблица 32: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между двата пола при контролите

Контроли мъже			Контроли жени			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
4	1,25	2,09	4	1,87	0,53	-

Таблица 33: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) според етническата принадлежност

Етническа принадлежност	n	$\overline{X}$	SD
Българи	11	2,96	2,87
Турци	1	0,52	.
Цигани	0	-	-

Таблица 34: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при контролите според етническата принадлежност

Етническа принадлежност	n	$\overline{X}$	SD
Българи	6	1,60	1,71
Турци	0	-	-
Цигани	2	1,46	0,04

Таблица 35: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) според извършената операция

Пациенти с ХГО и МААТ			Пациенти с ХГО и радикална трепанация			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
5	4,95	2,77	7	1,18	1,61	-

От табл. 36 става ясно, че:

- Средната стойност на експресията на пациентите с ХГО и МААТ е значително по-висока от тази на контролите;
- Липсата на статистическа представителност на групата с МААТ не позволява да се направи статистически достоверен извод.

На табл. 37 се вижда, че:

- Средната стойност на експресия при пациентите с ХГО и радикална трепанация е по-ниска от тази на контролите;
- Липсата на статистическа представителност на групата с радикална трепанация не позволява да се направи статистически достоверен извод.

Средната стойност на експресията при пушачите в групата на контролите и случаите е по-ниска от тази на непушачите, но липсва необходимата статистическа представителност на повечето от подгрупите за направата на достоверен статистически извод (табл. 38 и 39).

На табл. 40 се вижда, че:

- Пушачите от групата с ХГО имат по-висока средна стойност от пушачите в групата на контролите;
- Липсата на представителност на двете подгрупи не позволява направата на достоверен статистически извод.

Аналогични са резултатите от сравнителния анализ на непушачите в двете изследвани групи (табл. 41).

Таблица 36: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) и MAAT, и контролната група

Контроли			Пациенти с ХГО и MAAT			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	1,56	1,45	5	4,95	2,77	-

Таблица 37: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) и радикална трепанация, и контролната група

Контроли			Пациенти с ХГО и радикална трепанация			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	1,56	1,45	7	1,18	1,61	-

Таблица 38: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пушачи и непушачи при контролите

Контроли непушачи			Контроли пушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
6	2,05	1,34	2	0,09	0,13	-

Таблица 39: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) според показателя тютюнопушене

Пациенти с ХГО непушачи			Пациенти с ХГО пушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
8	2,92	2,92	4	2,43	3,03	-

Таблица 40: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пушачите от групата с гноен отит (ХГО) и контролите

Контроли пушачи			Пациенти с ХГО пушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
2	0,09	0,13	4	2,43	3,03	-

Таблица 41: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между непушачите от групата с гноен отит (ХГО) и контролите

Контроли непушачи			Пациенти с ХГО непушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
6	2,05	1,34	8	2,92	2,92	-

Проведеният корелационен и регресионен анализи не установиха наличие на зависимост между възрастта и RQ value.

От табл. 42 става ясно, че няма сигнификантна разлика между честотното разпределение на категориите на експресията в двете изследвани групи.

Таблица 42: Сравнителен анализ на двете изследвани групи по нива на експресия

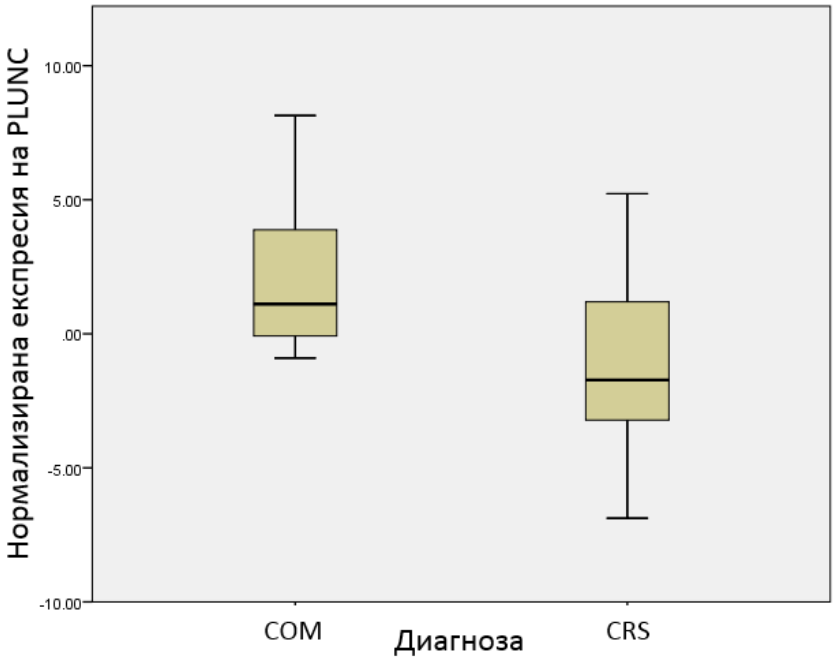
Показател	Контроли		Случаи		P
	n	%	n	%	
Експресия					
Потисната RQ<0,5	3	37,5	4	33,3	n.s.
Нормална 0,5≤RQ≤2	2	25,0	2	16,7	n.s.
Повишена RQ>2	3	37,5	6	50,0	n.s.

5.2.3 Експресионен анализ на BPIFA1 при пациенти с хроничен гноен отит и хроничен риносинуит

За да определим дали има разлика в експресията на BPIFA1 при двете изследвани от нас заболявания направихме сравнение между пациентите с ХРС (CRS) и ХГО(COM). Статистически значима повишена експресия бе наблюдавана в 72.73% от пациентите с CRS в сравнение с пациентите с COM (Таблица 43, Фигура 15).

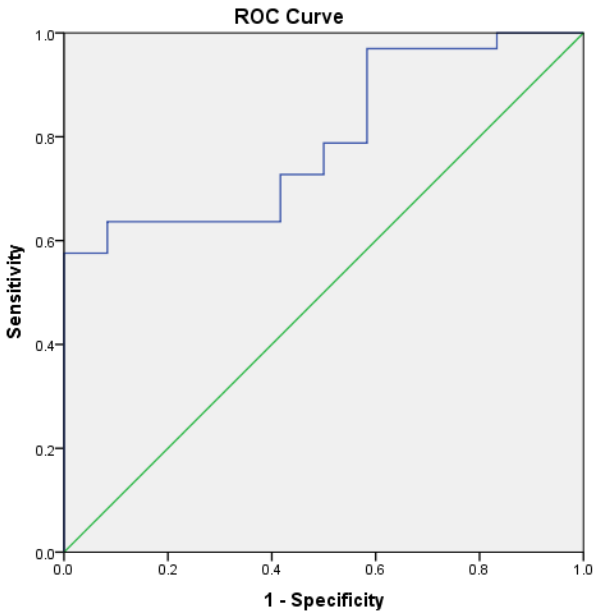
Таблица 43. Резултати от BPIFA1 експресионния анализ в тъкан на пациенти с CRS и COM, служещи за калибратори

Резултати: пациенти с CRS спрямо пациенти с COM	**Брой пациенти (%)**
Без значима разлика в експресията	8 (24.24%)
Понижена експресия	1 (3.03%)
Повишена експресия	24 (72.73%)



Фигура 15. Box plot графика, показващи експресионните нива (представени чрез deltaCт) на *PLUNC* (BPIFA1) при пациенти с COM и CRS. Експресионните нива на BPIFA1 са нормализирани към GAPDH.

Проведеният анализ на ROC кривите показа, че експресионните нива на BPIFA1 могат да бъдат използвани за надеждно разграничаване на пациентите с CRS от COM с чувствителност 72.7% и специфичност 58.3 при гранична стойност на RQ 2.78 (Фигура 16).



Фигура 16. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностичната стойност на PLUNC за разграничаване на пациентите с CRS от тези с COM. AUC=0.795, p=0.003, чувствителност 72.7% и специфичност 58.3%.

6. Дискусия

Към момента не е изследвана генната експресия на BPIFA1 в лигавица на средно ухо при човек и при хроничен гноен отит. Доказана е експресията на BPIFA1 в лигавицата на горните дихателни пътища при нормално състояние на организма и при хроничен риносинуит **(37).** Поради морфологичното и функционално сходство между мукозата на средното ухо и горните дихателни пътища, изследвахме BPIFA1 експресия и в лигавицата на средното ухо. Във всички изследвани от нас пациенти (n=32) доказахме налична BPIFA1 експресия. Това показва присъствието на BPIFA1 в лигавицата на средното ухо, аналогично на присъствието му в дихателните пътища. Доказано е, че BPIFA1 се свързва с липополизахаридите на различни патогенни бактерии и прекъсва последващите проинфламаторни процеси в дихателните пътища **(90).** По този механизъм в средното ухо BPIFA1 има протективен ефект спрямо възпалителни заболявания на лигавицата. Възможно е участието му в патогенезата на острия и хроничния гноен отит, за което са необходими бъдещи проучвания по въпроса.

Инхибирането на BPIFA1 намалява резистентността на дихателните пътища към бактериални инфекции с *Mycoplasma pneumoniae* (Mp), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Klebsiella pneumoniae* (Kp) и нетипабилен *Haemophilus influenzae* ***(85,87).*** Вероятно е инхибирането на BPIFA1 в средното ухо да доведе до повишена заболеваемост от отит. *Pseudomonas aeruginosa* е един от основните бактерии, изолирани при ХГО (**23, 24, 25, 26).** *При ин витро* проучвания е доказан директен бактериостатичен ефект на BPIFA1 спрямо *Mycoplasma pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* **(88)**. Следователно BPIFA1 упражнява бактериостатичен ефект спрямо някой от най-често срещаните патогенни бактерии при хроничен гноен отит.

BPIFA1 е мултифункционален протеин, който регулира ЕНаК. Епителният натриев канал е със съществено значение за регулацията на количеството течност, покриващо горните дихателни пътища и за осъществяването на адекватен мукоцилиарен клирънс. BPIFA1 инхибира ЕНаК в клетъчни култури от човешки бронхиални клетки. По този начин се блокира активирането на натриевия канал, което води до намалена абсорбция на натриеви йони и вода с увеличаване количеството течност върху дихателните пътища. Повишеното количество течност спомага за по-лесно очистване на дихателните пътища от различни патогени. Така намалява вискозитета на ASL и се подобрява мукоцилиарния клирънс. BPIFA1 играе ролята на негативен регулатор на ЕНаК **(17).** Повишената експресия на BPIFA1 води до по-добро очистване на лигавицата от патогени. Също така е възможно да допуснем, че повишаването на експресията на BPIFA1 е отговор на организма към бактериална инфекция с цел подобрение на мукоциларния клирънс чрез втечняване на ASL. В 50% (n=6) от нашите болни с ХГО се доказа повишена експресия на BPIFA1 спрямо контролната група. Вероятно е това повишение да е отговор на хроничното възпаление на мукозата на средното ухо. Установено е, че при генно модифицирани мишки, които свръхекспресират BPIFA1, белият дроб на тези мишки показва значително по-слабо изразена фиброза след прекараното възпаление. Това предполага, че BPIFA1 има протективен ефект спрямо фиброзата **(94).** Така че повишената експресия на BPIFA1 при половината от болните с ХГО е във връзка с ограничаване на фиброзните промени в мукозата на средното ухо. По-слабо изразените фиброзни промени ще бъдат белег за по-доброто състояние на мукозата. Пациенти с ХГО и повишена експресия на BPIFA1 вероятно ще имат по-добре функционираща мукоза и следователно по-добри постоперативни резултати (като разбира се върху хирургичните резултати оказват влияние множество фактори).При болни с ХГО и понижена BPIFA1 експресия ще бъде валидно противоположното.

При 33.33% (n=4) от болните с ХГО беше налична понижена експресия. Предполагаме, че пониженатa експресия е резултат от настъпилите промени в лигавицата на средното ухо с намаление на секреторните елементи и разрастване на фиброзна тъкан. Също така установихме значително повишена средна стойност на BPIFA1 експресия при пациентите с МААТ в сравнение с болните, при които е извършена радикална трепанация на мастоида.Съществува разлика в BPIFA1 експресията между двете групи. По принцип

BPIFA1 експресията се променя при инфекция като в едни случаи е повишена, а в други понижена **(99).** Тази флуктуация в концентрацията на BPIFA1 има важно клинично значение за протекцията на организма. При пациенти подлежащи на МААТ тежестта на патологичния процес е по-малка в сравнение с болните за радикална трепанация.Следователно BPIFA1 има определено отношение към „възпалителното натоварване“ на мукозата на средното ухо аналогично на ХРС. По-ниската концентрация на BPIFA1 при болните с радикална трепанация е белег за по-сериозното патологично увреждане на лигавицата. В бъдеще могат да бъдат направени опити за използване на BPIFA1 като прогностичен маркер при хроничния гноен отит.

Установено е значително структурно сходство между BPIFA1 и един протеин при конете, наречен латерин. Той е изолиран от конска пот и слюнка. Латеринът упражнява силно изразен сърфактантен ефект на въздушно-водната повърхност **(120).**.Вероятно сърфактанта на горните дихателни пътища разрушава и предотвратява формирането на биофилми. Вероятно част от стратегията на горните дихателни пътища за борба с бактериалната колонизация е образуването на сърфактант. Установено е при ин витро опити, че в присъствие на BPIFA1 значително намалява формирането на биофилм от *Ps. Aeruginosa* ***(19).*** BPIFA1 участва в неспецифичния имунитет на ГДП като намалява повърхностното напрежение на повърхността екстрацелуларен матрикс/бактерии. По този начин BPIFA1 нарушава началните етапи на образуването на биофилм-бактериалната агрегация и формирането на микроколония. В мукозата на средното ухо BPIFA1 ще ограничава формирането на биофилми, ще предотвратява развитието и хронифицирането на възпалителните заболявания на средното ухо.

Според нас BPIFA1 ще възпрепятства образуването на бактериални биофилми (върху лигавицата на средното ухо), които са изключително резистентни на медикаментозна терапия. По този начин ще се улесни и ще се съкрати времето за лечението на хроничните възпалителни заболявания на средното ухо. Също така ще се забавят процесите на тъканно ремоделиране на лигавицата. Ние смятаме, че колкото по-добре изразена е BPIFA1 експресията, толкова по-благоприятна ще е прогнозата на ХГО. Това вероятно ще е валидно за ранните стадии на заболяването, защото с прогресирането на възпалителния процес BPIFA1 експресията ще намалява.

Според McGillivary и Bakaletz , BPIFA1 като сърфактант играе съществена роля в хомеостазата и протекцията на средното ухо при чинчила (**12**).Чрез тензиометрия е сравнено повърхностното напрежение на капка вода-72 mN/m(отрицателна контрола) и на капка BPIFA1 (64 mN/m) в концентрация 20 µg BPIFA1/ml вода (най-ниската възможна концентрация). Установяват статистически значима разлика (p<0.0001) в намалението на повърхностното напрежение при BPIFA1 в сравнение с чистата вода. Също така доказват, че повърхностното напрежение на капка BPIFA1 (29 mN/m) в концентрация 500 µg BPIFA1/ml вода е приблизително равно на повърхностното напрежение на капка от детергента SDS (положителна контрола).Тези резултати демонстрират важната функция на BPIFA1 като сърфактант на дихателните пътища, Евстахиевата тръба и вероятното му участие в патогенезата на възпалителните заболявания на дихателните пътища и средното ухо. При блокиране експресията на BPIFA1 при чинчила настъпва дисфункция на Евстахиевата тръба-нарушено изравняване на налягането и промени в мукоцилиарния клирънс в сравнение с контроли. При опитните животни с блокирана BPIFA1 експресия се наблюдава отрицателно налягане в кавум тимпани с ретракция на тъпанчевата мембрана в сравнение със здрави контроли.

Тези резултати получени експериментално при чинчила и доказаната експресия на BPIFA1 в мукоза на средно ухо при човек, предполагат аналогична роля на BPIFA1 протеина при нормална мукоза на средно ухо и при хроничен гноен отит при хора. BPIFA1 протеина определено е част от неспецифичната имунна система на средното ухо и е твърде вероятно участието му в патогенезата на възпалителните заболявания на средното ухо. BPIFA1 ще влияе върху функцията на нормалната коменсална микрофлора на средното ухо.

Нивата на BPIFA1 могат да варират в отговор на активиране на различни пътища на неспецифичния имунитет. Тази флуктуация в концентрацията на BPIFA1 вероятно участва в инициирането на имунния отговор и активиране на други протективни механизми, които са по ефективни за елиминиране на бактериалната инфекция. BPIFA1 бързо се променя по време на инфекция. В нашите болни с ХГО установихме понижена експресия на BPIFA1 при 33,33% (n=4), а повишена при 50% (n=6) и без значима разлика са 16, 67% (n=2). Общо при 80,33% от болните с ХГО установихме, че съществува разлика в BPIFA1 експресията

спрямо контролната група. Разликата между двете групи не достигна статистическа значимост (p=0.947), което вероятно се дължи на малкия брой изследвани лица. Смятаме, че евентуални бъдещи изследвания в тази насока ще покажат съществуваща значима разлика между болни с хроничен гноен отит и контроли, както и участие на BPIFA1 в патогенезата на възпалителните заболявания на средното ухо.

BPIFA1 протеина несъмнено присъства в лигавицата на средното ухо при човек. Той протектира лигавицата чрез различни механизми- потиска бактериалния растеж, намалява вискозитета на ASL, подобрява очистването на лигавицата, предотвратява бактериалната колонизация и образуването на бактериални биофилми върху повърхността на мукозата. Определено съществува разлика в BPIFA1 експресията между здрава мукоза и мукоза при ХГО. В експерименталните модели BPIFA1 влияе върху функцията на Евстахиевата тръба. Следователно той има роля при възпалението на средното ухо, която до момента е все още неясна. Нови проучвания върху функцията на BPIFA1 протеина ще докажат значението му за мукозата на средното ухо в норма и патология.

Установихме експресията на BPIFA1 във всички изследвани от нас 33 болни с хроничен риносинуит и в 8 контролни пациенти, което потвърждава провежданите до момента различни проучвания за значително изразената експресия на BPIFA1 в мукозата на дихателните пътища в норма и патология **(37).** При 21.21% от пациентите с хроничен риносинуит доказахме изключително понижена експресия спрямо контролната група. Manea et al. през 2015 год. са изследвали 34 болни с хроничен риносинуит и 10 контроли. Те установяват значително понижена експресия на BPIFA1 във 23,52% от пациентите спрямо контролната група **(124).** Вероятно съществува връзка между промяната в експресията на BPIFA1 и промяната от нормална към патологична лигавица при хроничен риносинуит. Тази възможна връзка към момента остава неясна. Друг съществен момент е, че всички тези 21.21% от нашите пациенти със значително понижена експресия на BPIFA1 са болни, които са подложени на поредна оперативна интервенция поради рецидив на хроничния възпалителен процес на синусната лигавица. Следователно всяка следваща оперативната намеса води до влошаване на локалния неспецифичен имунитет и цялостното състояние на синусната мукоза. Напоследък като най-важен индикатор за дългосрочния

резултат от операцията се приема хипотезата за „възпалителното натоварване“. Следователно намаляването на това „възпалително натоварване“ (например по определен начин чрез използване на рекомбинантен BPIFA1) при пациенти с по-радикална хирургична интервенция ще доведе до по-малка нужда от реоперация и до по-добър краен резултат **(103).**

При болните с ХРС и полипи средната стойност на BPIFA1 експресията е по-малка от пациентите с ХРС без носни полипи. Като разликата е с гранично статистически сигнификантен характер. От литературната справка е видно, че концентрацията на BPIFA1 може да варира.От една страна PAMPs- pathogen-associated molecular patterns инхибират BPIFA1, а от друга страна експресията на BPIFA1 се засилва при клетъчно увреждане и при повишаване концентрацията на DAMPs (damage associated molecular patterns). Освен това наличието на тъканно ремоделиране с разрастване на фиброза ще намали като цяло мукозните скереторни елементи и синтезирането на BPIFA1. Вероятно взаимодействието между PAMPs ,DAMPs, процесите на тъканно фиброзиране и фактори на възпалението определят промяната в концентрацията на BPIFA1. Следователно по-ниската експресия на BPIFA1 при болни с ХРС и полипи се дължи на по-силно изразена цикатризация на лигавицата, на по-силно изразеното инхибиране на BPIFA1 от PAMPs, на по-слабото стимулиране от DAMPs , или на комбинация от трите фактора.При болните с ХРС без полипи вероятно са по-слабо изразени процесите на тъканна фиброза,по-слабо инхибиращото действие на PAMPs,по-силно изразено стимулиране от DAMPs или трите.

При мишки с дефицит на BPIFA1 и алергична реакция от страна на дихателните пътища са налице значително изразена еозинофилия, повишена продукция на мукус, хипер реактивност на дихателните пътища, високи нива на IL-4, IL-5, IL-13 в сравнение с контроли. Тези изследвания показват, че BPIFA1 има противоалергичен ефект при алергия на дихателните пътища **(92).**В нашето изследване пациентите с ХРС и астма показаха значително по-ниска експресия от болните с ХРС без астма. BPIFA1 потиска експресията на CCL24 в макрофагите. Вероятно по този механизъм BPIFA1 контролира нивото на еозинофилите при алергия **(93).** Наличието на придружаваща астма е индикатор за по-тежко изразена алергична мукозна реакция. Следователно понижената BPIFA1 експресия при ХРС може да служи като индикатор за по-силно изразена алергия от страна на дихателните

пътища и може да се използва като маркер за оценяване състоянието на синуназалната мукоза при предстояща операция.

Несъмнено с нашето проучване доказахме, че съществува значима разлика в BPIFA1 експресията при нормална лигавица (фрактура на носни кости,двустранна глухота) и лигавица при наличие на хроничен възпалителеn процес (хроничен риносинуит, хроничен гноен отит). При нормалната лигавица се установи повишена средна стойност на BPIFA1 експресията в сравнение с патологично променената мукоза. По принцип BPIFA1 е представен във високи концентрации в дихателните пътища като при нормални условия протектира ежедневно макроорганизма от големия брой патогени инхалирани при дишане. С настоящото проучване доказахме присъствието му и в лигавицата на средното ухо. Доказано е че, експозицията на патогени регулира количеството на BPIFA1 в дихателните пътища**(97).** Тонични инхибиторни сигнали, които идват от PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) потискат BPIFA1 до едно постоянно, стабилно ниво при нормално физиологично състояние на организма. BPIFA1 се променя по време на инфекция, тъй като от една страна се увеличават PAMPs, а от друга страна се увеличават DAMPs-които повишават BPIFA1 експресията. DAMPs са молекули, които модулират възпалителните реакции при патологични условия. Комбинацията от чужди екзогенни продукти и налични клетъчни увреждания предизвиква реакция от страна на неспецифичния имунитет и активиране на адаптивния имунитет с участието на DAMPs **(73).** DAMPs могат да се освобождават пасивно от увредени клетки в хода на възпалителна реакция или активно от определени клетъчни типове чрез алтернативни секреторни пътища.

При всички изследвани групи пациенти установихме, че BPIFA1 експресията при пушачите винаги е по-ниска в сравнение с непушачите. Steiling et al. са получили аналогичен резултат по отношение на дихателните пътища **(106).** С нашето проучване ние доказахме, че и в лигавицата на средното ухо BPIFA1 експресията също е значително по-ниска при пушачите. Тъй като BPIFA1 е част от неспецифичната имунна система, понижената му експресия в лигавицата на дихателните пътища и средното ухо ще води до определена непълноценност в неспецифичния имунитет.Следователно недостатъчната експресия на BPIFA1 при пушачи е възможна причина за възникване на възпалителни заболявания на дихателните пътища, средното ухо и за тяхното хронифициране.

Към настоящия момент с нашето проучване за първи път бе извършено и сравнение между експресията на BPIFA1 при болни хроничен риносинуит и хроничен гноен отит. Доказахме статистически значима повишена експресия в 72.73% от пациентите с ХРС в сравнение с пациентите с ХГО (p=0.003, чувствителност 72.7% и специфичност 58.3%.). Тъй като BPIFA1 е продукт на лигавицата можем да допуснем, че при болните с хроничен риносинуит е налице увреждане на лигавицата в по-малка степен, отколкото при пациентите с хроничен гноен отит по отношение на тъканното ремоделиране и цикатризация.

7. Изводи.

1. BPIFA1 протеина е част от неспецифичната имунна защита (секреторните протеини) на лигавицата на средното ухо.

2. BPIFA1 експресията се променя при хроничен гноен отит.

3. Болните с MAAT показват повишена експресия на гена BPIFA1.

4. BPIFA1 експресията се променя при хроничен риносинуит.

5. Пациентите с носни полипи имат статистически значими по-ниски нива на BPIFA1 в сравнение с тези без полипи.

6. Пациентите с астма имат потисната (понижени нива) BPIFA1 експресия.

7. Пушачите имат потисната (понижени нива) BPIFA1 експресия.

8. Приноси.

1. С настоящото проучване за първи път се доказа съществуването на BPIFA1 протеина в лигавицата на средното ухо.

2. За първи път се определи нивото на ескпресия на BPIFA1 гена в лигавицата на средно ухо при хора.

3. За първи път се определи нивото на ескпресия на BPIFA1 гена при хроничен гноен отит.

4. За първи път се сравни нивото на експресия на BPIFA1 гена при хроничен риносинуит, хроничен гноен отит и контроли.

5. Потвърди, че съществува промяна в BPIFA1 експресията при хроничен риносинуит.

6. Създаде се ДНК биобанка в Центъра по Молекулна Медицина, където съхранени проби в бъдеще ще спомогнат за нови проучвания по проблема.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, Grammer LC, Schleimer RP. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. Am J Rhinol. 2008 Nov-Dec; 22(6):549-59.

2. Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP. Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2009 Jul; 124(1):37-42.

3. Seshadri S, Lin DC, Rosati M, Carter RG, Norton JE, Suh L, Kato A, Chandra RK, Harris KE, Chu HW, Peters AT, Tan BK, Conley DB, Grammer LC, Kern RC, Schleimer RP. Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis. Allergy. 2012 Jul; 67(7):920-8.

4. Suh JD, Cohen NA, Palmer JN. Biofilms in chronic rhinosinusitis. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 Feb; 18(1):27-31.

5. Al-Mutairi D, Kilty SJ. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2011 Feb; 11(1):18-23.

6. Bernstein JM, Yankaskas JR. Increased ion transport in cultured nasal polyp epithelial cells. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1994 Sep; 120(9):993-6.

7. Bartlett JA, Gakhar L, Penterman J, Singh PK, Mallampalli RK, Porter E, et al. PLUNC: a multifunctional surfactant of the airways. Biochem Soc Trans. 2011; 39:1012–1016.

8. Bartlett JA, Fischer AJ, McCray PB Jr. Innate immune functions of the airway epithelium. Contrib Microbiol. 2008; 15():147-63.

9. Ganz T. Antimicrobial polypeptides. J Leukoc Biol. 2004 Jan; 75(1):34-8.

10. Sung, Y.K., Moon, C., Yoo, J.Y., Moon, C., Pearse, D., Pevsner, J. and Ronnett, G.V. PLUNC, a member of the secretory gland protein family, is up-regulated in nasal respiratory epithelium after olfactory bulbectomy. J. Biol. Chem., 2002 Jan. 30.

11. Bingle CD, Craven CJ. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. Hum Mol Genet., 2002 Apr 15;11(8):937-43.

12. McGillivary G, Bakaletz LO. The multifunctional host defense peptide SPLUNC1 is critical for homeostasis of the mammalian upper airway. PLoS ONE. 2010; 5:e13224

13. Bingle L, Cross SS, High AS, Wallace WA, Devine DA, et al. SPLUNC1 (PLUNC) is expressed in glandular tissues of the respiratory tract and in lung tumours with a glandular phenotype. J Pathol. 2005; 205: 491–497.

14. Ghafouri B, Kihlstrom E, Stahlbom B, Tagesson C, Lindahl M. PLUNC (palate, lung and nasal epithelial clone) proteins in human nasal lavage fluid. Biochem Soc Trans. 2003; 31: 810–814.

15. Di YP, Harper R, Zhao Y, Pahlavan N, Finkbeiner W, et al. Molecular cloning and characterization of spurt, a human novel gene that is retinoic acid-inducible and encodes a secretory protein specific in upper respiratory tracts. J Biol Chem. 2003; 278: 1165–1173.

16. Bartlett JA, Hicks BJ, Schlomann JM, Ramachandran S, Nauseef WM, et al. PLUNC is a secreted product of neutrophil granules. J Leukoc Biol. 2008; 83: 1201–1206.

17. Garcia-Caballero A, Rasmussen JE, Gaillard E, Watson MJ, Olsen JC, et al. SPLUNC1 regulates airway surface liquid volume by protecting ENaC from proteolytic cleavage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106: 11412–11417.

18. Bakaletz LO, Brogden KA, Guthmiller JM. Otitis Media. Washington DC: ASM Press. 2002; pp. 259–298.

19. Gakhar L, Bartlett JA, Penterman J, Mizrachi D, Singh PK, et al. PLUNC is a novel airway surfactant protein with anti-biofilm activity. PLoS One 5. 2010 Feb; 9:90-98.

20. Mittal R, Kodiyan J, Gerring R, Mathee K, Li JD, Grati M, Liu XZ. Role of innate immunity in the pathogenesis of otitis media. Int J Infect Dis. 2014 Dec; 29:259-67.

21. S. Sayeed, L. Nistico, C. St Croix, Y.P. Di.Multifunctional role of human SPLUNC1 in Pseudomonas aeruginosa infection.Infect Immun. 2013; 81:285–291.

22.P. Morris.Chronic suppurative otitis media.Am Fam Physician. 2013; 88:694–696.

23. O.A. Afolabi, A.G. Salaudeen, F.E. Ologe, C. Nwabuisi, C.C. Nwawolo
Pattern of bacterial isolates in the middle ear discharge of patients with chronic suppurative otitis media in a tertiary hospital in north central Nigeria
Afr Health Sci, 12 (2012), pp. 362–367.

24. J. Madana, D. Yolmo, R. Kalaiarasi, S. Gopalakrishnan, S. Sujatha
Microbiological profile with antibiotic sensitivity pattern of cholesteatomatous chronic suppurative otitis media among children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 75 (2011), pp. 1104–1108.

25. R. Dayasena, M. Dayasiri, C. Jayasuriya, D. Perera. Aetiological agents in chronic suppurative otitis media in Sri Lanka. Australas Med J, 4 (2011), pp. 101–104.

26. A. Sattar, A. Alamgir, Z. Hussain, S. Sarfraz, J. Nasir Badar-e-Alam. Bacterial spectrum and their sensitivity pattern in patients of chronic suppurative otitis media. J Coll Physicians Surg Pak, 22 (2012), pp. 128–129.

27. D. Yang, Z.H. Liu, P. Tewary, Q. Chen, G. de la Rosa, J.J. Oppenheim.
Defensin participation in innate and adaptive immunity. Curr Pharm Des, 13 (2007), pp. 3131–3139.

28. E.A. Jones, G. McGillivary, L.O. Bakaletz. Extracellular DNA within a nontypeable Haemophilus influenzae-induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. J Innate Immun, 5 (2013), pp. 24–38.

29. P.A. Schachern, V. Tsuprun, S. Cureoglu, P.A. Ferrieri, D.E. Briles, M.M. Paparella, et al. Effect of apolactoferrin on experimental pneumococcal otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 136 (2010), pp. 1127–1131.

30. K.W. Heo, D.Y. Hur, S.K. Park, Y.I. Yang, H.H. Kwak, T.Y. Kim. Expression of chitinases in hypertrophied adenoids of children. Otolaryngol Head Neck Surg, 145 (2011), pp. 660–665.

31. D. Preciado, K. Burgett, S. Ghimbovschi, M. Rose. NTHi induction of Cxcl2 and middle ear mucosal metaplasia in mice. Laryngoscope, 123 (2013), pp. E66–E71.

32. H. Kawano, M.M. Paparella, S.B. Ho, P.A. Schachern, N. Morizono, C.T. Le, et al. Identification of MUC5B mucin gene in human middle ear with chronic otitis media. Laryngoscope, 110 (2000), pp. 668–673.

33. M. Ubell, J.E. Kerschner, A. Wackym, A. Burrows. MUC2 expression in human middle ear epithelium of patients with otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 134 (2008), pp. 1–6.

34. J.E. Kerschner, S. Tripathi, P. Khampang, B.C. Papsin. MUC5AC expression in human middle ear epithelium of patients with otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 136 (2010), pp. 819–824.

35. M.N. Elsheikh, M.E. Mahfouz. Up-regulation of MUC5AC and MUC5B mucin genes in nasopharyngeal respiratory mucosa and selective up-regulation of MUC5B in middle ear in pediatric otitis media with effusion. Laryngoscope, 116 (2006), pp. 365–369.

36. D. Parker, A. Prince. Innate immunity in the respiratory epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol, 45 (2011), pp. 189–201.

37. Tsou YA, Peng MT, Wu YF, Lai CH, Lin CD, Tai CJ, Tsai MH, Chen CM, Chen HC. Decreased PLUNC expression in nasal polyps is associated with multibacterial colonization in chronic rhinosinusitis patients. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2014 Feb; 271(2):299-304.

38. Passali D, Sarafoleanu C, Manea C, Loglisci M, Passali FM, Cambi J, Iosif C, Panaitescu E, Bellussi LM.PLUNC proteins positivity in patients with chronic rhinosinusitis: a case-control study. Scientific World Journal. 2014;2014:853583.

39. Bachert C, Pawankar R, Zhang L, Bunnag C, Fokkens WJ, Hamilos DL, Jirapongsananuruk O, Kern R, Meltzer EO,Mullol J, Naclerio R, Pilan R, Rhee CS, Suzaki H, Voegels R, Blaiss M.·ICON: chronic rhinosinusitis.World Allergy Organ J. 2014 Oct 27;7(1):25.

40. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, Bousquet PJ, Brozek G, Bruno A, Dahlén SE, Forsberg B, Gunnbjörnsdóttir M, Kasper L, Krämer U, Kowalski ML, Lange B, Lundbäck B, Salagean E, Todo-Bom A, Tomassen P, Toskala E, van

Drunen CM, Bousquet J, Zuberbier T, Jarvis D, Burney P. Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA²LEN study. Allergy. 2011 Sep; 66(9):1216-23.

41. Verhoeff M, van der Veen EL, Rovers MM, Sanders EA, Schilder AG. Chronic suppurative otitis media: a review. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2006 Jan; 70(1):1-12.

42. Morris P. Chronic suppurative otitis media. Clin Evid (Online). 2012 Aug 6;2012.

43. Lynne Bingle, Colin D. Bingle. Distribution of human PLUNC/BPI fold-containing (BPIF) proteins. Biochemical Society Transactions Aug 01, 2011, 39 (4) 1023-1027.

44. Vargas P.A., Speight P.M., Bingle C.D., Barrett A.W., Bingle L. Expression of PLUNC family members in benign and malignant salivary gland tumours. Oral Dis. 2008; 14:613–619.

45. Bingle L., Barnes F.A., Lunn H., Musa M., Webster S., Douglas C.W., Cross S.S., High A.S., Bingle C.D. Characterisation and expression of SPLUNC2, the human orthologue of rodent parotid secretory protein. Histochem. Cell Biol. 2009; 132:339–349.

46. Wu Y., Shu R., Luo L.J., Ge L.H., Xie Y.F. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. J. Periodontal Res. 2009; 44:636–644.

47. da Silva A., Bingle L., Speight P., Bingle C., Mauad T., da Silva L., Vargas P. PLUNC protein expression in major salivary glands of HIV-infected patients. Oral Dis., 2011; 17:258–264.

48. Bingle C.D., Wilson K., Lunn H., Barnes F.A., High A.S., Wallace W.A., Rassl D., Campos M.A., Ribeiro M., Bingle L. Human LPLUNC1 is a secreted product of goblet cells and minor glands of the respiratory and upper aerodigestive tracts. Histochem. Cell Biol., 2010; 133:505–515.

49. Weston W.M., LeClair E.E., Trzyna W., McHugh K.M., Nugent P., Lafferty C.M., Ma L., Tuan R.S., Greene R.M. Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung. J. Biol. Chem., 1999;274:13698–13703.

50. Larocque R.C., Sabeti P., Duggal P., Chowdhury F., Khan A.I., Lebrun L.M., Harris J.B., Ryan E.T., Qadri F., Calderwood S.B. A variant in long palate, lung and nasal epithelium clone 1 is associated with cholera in a Bangladeshi population. Genes Immun., 2009; 10:267–272.

51. Iwao K., Watanabe T., Fujiwara Y., Takami K., Kodama K., Higashiyama M., Yokouchi H., Ozaki K., Monden M., Tanigami A. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. Int. J. Cancer., 2001;91:433–437.

52. Benlloch S., Galbis-Caravajal J.M., Alenda C., Peiró F.M., Sanchez-Ronco M., Rodríguez-Paniagua J.M., Baschwitz B., Rojas E., Massutí B. Expression of molecular markers in mediastinal nodes from resected stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC): prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases. Ann. Oncol. 2009;20:91–97.

53. Mitas M., Hoover L., Silvestri G., Reed C., Green M., Turrisi A.T., Sherman C., Mikhitarian K., Cole D.J., Block M.I., Gillanders W.E. Lunx is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood. J. Mol. Diagn. 2003;5:237–242.

54. Cheng M., Chen Y., Yu X., Tian Z., Wei H. Diagnostic utility of LunX mRNA in peripheral blood and pleural fluid in patients with primary non-small cell lung cancer. BMC Cancer. 2008;8:156.

55. Vallet V, Chraibi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. Nature. 1997 Oct 9; 389(6651):607-10.

56. Van Bruaene N, Bachert C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2011 Feb; 11(1):8-11.

57. Li X, Meng J, Qiao X, Liu Y, Liu F, Zhang N, Zhang J, Holtappels G, Luo B, Zhou P, Zheng Y, Lin P, Liu S, Bachert C. Expression of TGF, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors in Chinese chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2010 May; 125(5):1061-8.

58. Regateiro FS, Howie D, Cobbold SP, Waldmann H. TGF-β in transplantation tolerance.Curr Opin Immunol. 2011 Oct; 23(5):660-9.

59. Al-Alawi M, Hassan T, Chotirmall SH.Transforming growth factor β and severe asthma: a perfect storm. Respir Med. 2014 Oct; 108(10):1409-23.

60. Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, De Ruyck N, Cuvelier C, Van Cauwenberge P, Bachert C. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis.
J Allergy Clin Immunol. 2009 Aug; 124(2):253-9, 259.e1-2.

61. Shi LL, Xiong P, Zhang L, Cao PP, Liao B, Lu X, Cui YH, Liu Z. Features of airway remodeling in different types of Chinese chronic rhinosinusitis are associated with inflammation patterns. Allergy. 2013 Jan; 68(1):101-9.

62. Sejima T, Holtappels G, Kikuchi H, Imayoshi S, Ichimura K, Bachert C. Cytokine profiles in Japanese patients with chronic rhinosinusitis. Allergol Int. 2012 Mar; 61(1):115-22.

63. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Cho SH, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression.
Am J Respir Crit Care Med. 2013 Jan 1; 187(1):49-57.

64. Dixon AE, Kaminsky DA, Holbrook JT, Wise RA, Shade DM, Irvin CG. Allergic rhinitis and sinusitis in asthma: differential effects on symptoms and pulmonary function. Chest. 2006 Aug; 130(2):429-35.

65. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15; 108 Suppl 1():4659-65.

66. Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, Holzmann D, Treis A, Wanke K, Kast JI, Akdis CA. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN-γ and IL-4. J Allergy Clin Immunol. 2012 Nov; 130(5):1087-1096.e10.

67. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. 2011 May 27; 34(5):637-50.

68. Lane AP, Truong-Tran QA, Myers A, Bickel C, Schleimer RP. Serum amyloid A, properdin, complement 3, and toll-like receptors are expressed locally in human sinonasal tissue. Am J Rhinol. 2006 Jan-Feb; 20(1):117-23.

69. Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol. 2007 Dec; 19(6):711-20.

70. Bogefors J, Rydberg C, Uddman R, Fransson M, Månsson A, Benson M, Adner M, Cardell LO. Nod1, Nod2 and Nalp3 receptors, new potential targets in treatment of allergic rhinitis? Allergy. 2010 Oct; 65(10):1222-6.

71. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. Physiol Rev. 2004 Apr; 84(2):579-621.

72. Rudack C, Steinhoff M, Mooren F, Buddenkotte J, Becker K, von Eiff C, Sachse F. PAR-2 activation regulates IL-8 and GRO-alpha synthesis by NF-kappaB, but not RANTES, IL-6, eotaxin or TARC expression in nasal epithelium. Clin Exp Allergy. 2007 Jul; 37(7):1009-22.

73. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses.Curr Opin Immunol. 2005 Aug; 17(4):359-65.

74. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tör M, Billiar T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. Immunol Rev. 2007 Dec; 220():60-81.

75. Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, Tobolewski JM, Tan RJ, Fattman CL, Ramsgaard L, Richards TJ, Loutaev I, Nawroth PP, Kasper M, Bierhaus A, Oury TD. A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Pathol. 2008 Mar; 172(3):583-91.

76. Van Crombruggen K, Holtappels G, De Ruyck N, Derycke L, Tomassen P, Bachert C.RAGE processing in chronic airway conditions: involvement of Staphylococcus aureus and ECP. J Allergy Clin Immunol. 2012 Jun; 129(6):1515-21.e8.

77. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, Shen JM, Webster JC, Andrews RC, Mjalli AM, Rothlein R, Schmidt AM, Clynes R, Herold KC. RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. J Immunol. 2008 Sep 15; 181(6):4272-8.

78. Meyer JE, Harder J, Sipos B, Maune S, Klöppel G, Bartels J, Schröder JM, Gläser R. Psoriasin (S100A7) is a principal antimicrobial peptide of the human tongue. Mucosal Immunol. 2008 May; 1(3):239-43.

79. Richer SL, Truong-Tran AQ, Conley DB, Carter R, Vermylen D, Grammer LC, Peters AT, Chandra RK, Harris KE, Kern RC, Schleimer RP. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. Am J Rhinol. 2008 May-Jun; 22(3):228-34.

80. Tieu DD, Peters AT, Carter RG, Suh L, Conley DB, Chandra R, Norton J, Grammer LC, Harris KE, Kato A, Kern RC, Schleimer RP. Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2010 Mar; 125(3):667-75.

81. Garland AL, Walton WG, Coakley RD, Tan CD, Gilmore RC, Hobbs CA, Tripathy A, Clunes LA, Bencharit S, Stutts MJ, Betts L, Redinbo MR, Tarran R. Molecular basis for pH-dependent mucosal dehydration in cystic fibrosis airways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 1; 110(40):15973-8.

82. Ghafouri B, Irander K, Lindbom J, Tagesson C, Lindahl M. Comparative proteomics of nasal fluid in seasonal allergic rhinitis. J Proteome Res. 2006 Feb; 5(2):330-8.

83. Barnes FA, Bingle L, Bingle CD. Pulmonary Genomics, Proteomics, and PLUNCs. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Apr; 38(4):377-9.

84. Bingle L, Barnes FA, Cross SS, Rassl D, Wallace WA, Campos MA, Bingle CD. Differential epithelial expression of the putative innate immune molecule SPLUNC1 in cystic fibrosis. Respir Res. 2007 Nov 7; 8():79.

85. Sayeed S, Nistico L, St Croix C, Di YP. Multifunctional role of human SPLUNC1 in Pseudomonas aeruginosa infection. Infect Immun. 2013 Jan; 81(1):285-91.

86. Chu HW, Thaikoottathil J, Rino JG, Zhang G, Wu Q, Moss T, Refaeli Y, Bowler R, Wenzel SE, Chen Z, Zdunek J, Breed R, Young R, Allaire E, Martin RJ. Function and regulation of SPLUNC1 protein in Mycoplasma infection and allergic inflammation. J Immunol. 2007 Sep 15; 179(6):3995-4002.

87. Lukinskiene L, Liu Y, Reynolds SD, Steele C, Stripp BR, Leikauf GD, Kolls JK, Di YP. Antimicrobial activity of PLUNC protects against Pseudomonas aeruginosa infection. J Immunol. 2011 Jul 1; 187(1):382-90.

88. Zhou HD, Li XL, Li GY, Zhou M, Liu HY, Yang YX, Deng T, Ma J, Sheng SR. Effect of SPLUNC1 protein on the Pseudomonas aeruginosa and Epstein-Barr virus. Mol Cell Biochem. 2008 Feb; 309(1-2):191-7.

89. Liu Y, Di ME, Chu HW, Liu X, Wang L, Wenzel S, Di YP. Increased susceptibility to pulmonary Pseudomonas infection in Splunc1 knockout mice. J Immunol. 2013 Oct 15; 191(8):4259-68.

90. Zhou HD, Li GY, Yang YX, Li XL, Sheng SR, Zhang WL, Zhao J. Intracellular co-localization of SPLUNC1 protein with nanobacteria in nasopharyngeal carcinoma epithelia HNE1 cells depended on the bactericidal permeability increasing protein domain. Mol Immunol. 2006 Apr; 43(11):1864-71.

91. Hobbs CA, Blanchard MG, Alijevic O, Tan CD, Kellenberger S, Bencharit S, Cao R, Kesimer M, Walton WG, Henderson AG, Redinbo MR, Stutts MJ, Tarran R. Identification of the SPLUNC1 ENaC-inhibitory domain yields novel strategies to treat sodium hyperabsorption in cystic fibrosis airway epithelial cultures. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013 Dec; 305(12):L990-L1001.

92. Wright PL, Yu J, Di YP, Homer RJ, Chupp G, Elias JA, Cohn L, Sessa WC. Epithelial reticulon 4B (Nogo-B) is an endogenous regulator of Th2-driven lung inflammation. J Exp Med. 2010 Nov 22; 207(12):2595-607.

93. Thaikoottathil JV, Martin RJ, Di PY, Minor M, Case S, Zhang B, Zhang G, Huang H, Chu HW. SPLUNC1 deficiency enhances airway eosinophilic inflammation in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012 Aug; 47(2):253-60.

94. Di YP, Tkach AV, Yanamala N, Stanley S, Gao S, Shurin MR, Kisin ER, Kagan VE, Shvedova A. Dual acute proinflammatory and antifibrotic pulmonary effects of short palate, lung, and nasal epithelium clone-1 after exposure to carbon nanotubes. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013 Nov; 49(5):759-67.

95. Boon K, Bailey NW, Yang J, Steel MP, Groshong S, Kervitsky D, Brown KK, Schwarz MI, Schwartz DA. Molecular phenotypes distinguish patients with relatively stable from progressive idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). PLoS One. 2009; 4(4):e5134.

96. Chen P, Guo X, Zhou H, Zhang W, Zeng Z, Liao Q, Li X, Xiang B, Yang J, Ma J, Zhou M, Peng S, Xiang J, Li X, L E CW, Xiong W, McCarthy JB, Li G. SPLUNC1 regulates cell progression and apoptosis through the miR-141-PTEN/p27 pathway, but is hindered by LMP1. PLoS One. 2013; 8(3):e56929.

97. Britto CJ, Liu Q, Curran DR, Patham B, Dela Cruz CS, Cohn L. Short palate, lung, and nasal epithelial clone-1 is a tightly regulated airway sensor in innate and adaptive immunity. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013 Jun; 48(6):717-24.

98. Jiang D, Persinger R, Wu Q, Gross A, Chu HW. α1-Antitrypsin promotes SPLUNC1-mediated lung defense against Pseudomonas aeruginosa infection in mice. Respir Res. 2013 Nov 9; 14():122.

99. Bingle CD, Bingle L. Characterisation of the human plunc gene, a gene product with an upper airways and nasopharyngeal restricted expression pattern. Biochim Biophys Acta. 2000 Oct 2; 1493(3):363-7.

100. Berger G, Kattan A, Bernheim J, Ophir D. Polypoid mucosa with eosinophilia and glandular hyperplasia in chronic sinusitis: a histopathological and immunohistochemical study. Laryngoscope. 2002 Apr; 112(4):738-45.

101. Hopkins C, Browne JP, Slack R, Lund V, Brown P. The Lund-Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict? Otolaryngol Head Neck Surg. 2007; 137(4):555–561.

102. Myller J, Dastidar P, Torkkeli T, Rautiainen M, Toppila-Salmi S. Computed tomography findings after endoscopic sinus surgery with preserving or enlarging maxillary sinus ostium surgery. Rhinology. (2011;49(4):438–444.

103. Bassiouni A, Naidoo Y, Wormald PJ. When FESS fails: the inflammatory load hypothesis in refractory chronic rhinosinusitis. Laryngoscope. 2012; 122(2):460–466.

104. Bernstein JM, Allen C, Rich G, Dryja D, Bina P, Reiser R, Ballow M, Wilding GE. Further observations on the role of Staphylococcus aureus exotoxins and IgE in the pathogenesis of nasal polyposis. Laryngoscope. 2011; 121(3):647–655.

105. Toth L, Vajas A, Csomor P, Berta A, Sziklai I, Karosi T. Optical coherence tomography for biofilm detection in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013; 48(5):757-67.

106. Steiling K, Kadar AY, Bergerat A, Flanigon J, Sridhar S, Shah V, Ahmad QR, Brody JS, Lenburg ME, Steffen M, et al. Comparison of proteomic and transcriptomic profiles in the bronchial airway epithelium of current and never smokers. PLoS ONE 2009; 4:e5043.

107. Martin, Schicht; Felix, Rausch; Martin, Beron; Christina, Jacobi; Fabian, Garreis; Nadine, Hartjen;Stephanie, Beileke; Friedrich, Kruse; Lars, Bräuer; Friedrich, Paulsen. Palate Lung Nasal Clone (PLUNC), a Novel Protein of the Tear Film: Three-Dimensional Structure, Immune Activation, and Involvement in Dry Eye Disease (DED). Author Affiliations & Notes Investigative Ophthalmology & Visual Science November 2015, Vol.56, 7312-7323.

108. Akdis CA, Bachert C, Cingi C, Dykewicz MS, Hellings PW, Naclerio RM, Schleimer RP, Ledford D. Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: a PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. J Allergy Clin Immunol. 2013 Jun; 131(6):1479-90.

109. Rossier BC, Stutts MJ. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. Annu Rev Physiol. 2009; 71():361-79.

110. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na+ channels and increases airway epithelial Na+ transport. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005 May; 288(5):L813-9.

111. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wager GC, Gatzy JT, Boucher RC. Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. J Clin Invest. 1997 Nov 15; 100(10):2588-95.

112. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. N Engl J Med. 2010 Dec 2; 363(23):2233-47.

113. Button B, Cai LH, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, Boucher RC, Rubinstein M. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. Science. 2012 Aug 24; 337(6097):937-41.

114. Kerem E, Bistritzer T, Hanukoglu A, Hofmann T, Zhou Z, Bennett W, MacLaughlin E, Barker P, Nash M, Quittell L, Boucher R, Knowles MR. Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism. N Engl J Med. 1999 Jul 15; 341(3):156-62.

115. Tarran R, Grubb BR, Gatzy JT, Davis CW, Boucher RC.The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. J Gen Physiol. 2001 Aug; 118(2):223-36.

116. Feng W, Nakamura S, Sudo E, Lee MM, Shao A, King M. Effects of dextran on tracheal mucociliary velocity in dogs in vivo. Pulm Pharmacol Ther. 1999; 12(1):35-41.

117. Boucher RC. Human airway ion transport. Part one. Am J Respir Crit Care Med. 1994 Jul; 150(1):271-81.

118. Bernhard W, Haagsman HP, Tschernig T, Poets CF, Postle AD, van Eijk ME, von der Hardt H. Conductive airway surfactant: surface-tension function, biochemical composition, and possible alveolar origin. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997 Jul; 17(1):41-50.

119. Khoor A, Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA. Temporal-spatial distribution of SP-B and SP-C proteins and mRNAs in developing respiratory epithelium of human lung. J Histochem Cytochem. 1994 Sep; 42(9):1187-99.

120. McDonald RE, Fleming RI, Beeley JG, Bovell DL, Lu JR, Zhao X, Cooper A, Kennedy MW. Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva. PLoS One. 2009 May 29; 4(5):e5726.

121.Fellner RC, Terryah S, Oddo J, Taylor J, Arendshorst W, Tarran R, and Christensen D. SPLUNC1 peptide-derivatives with increased efficacy and decreased renal side effects in vitro and in vivo. In: North American Cystic Fibrosis Conference. 2015; Phoenix, Arizona.

122. Димов Д, Георгиев Г „Ушни носни и гърлени болести“ Издателство Знание, 1998.

123. Ценев Ив. „Клиника на заболяванията на носа и околоносните кухини“. Клинико-морфологична риноларингология, 2003; 111-114.

124. Manea Cl, Sarafoleanu C, Iosif Cr, Patrascu E. The role of PLUNC proteins in the etiopathogeny of chronic rhinosinusitis. Romanian Journal of Rhinology, Vol. 5, No. 19, July - September 2015

Списък с публикациите свързани с дисертационния труд:

- **Hadzhiev Y**, Yordanov S, Popova D, Kachakova D (2017) BPIFA1 gene expression in human middle ear mucosa. *J Int Adv Otol* [in press], [Impact factor 0.392].
- **Хаджиев Ю**, Тодоров Сп, Конов Д, Стоянов О, Йорданов Ст. PLUNC протеините: нов поглед върху патогенезата на хроничния риносинуит. *Международен бюлетин по оториноларингология*. 2015-11(1):5-9.
- **Хаджиев Ю**, Йорданов Ст, Тодоров Сп, Вълчева С. BPIFA1 протеина като бъдеща част от диагностично-терапевтична стратегия на хроничния риносинуит. *Международен бюлетин по оториноларингология*. 2017-13(1):5-9.

Участия в конгреси свързани с дисертационния труд:

- **Хаджиев Ю**, Тодоров Сп. PLUNC протеините: нов поглед върху патогенезата на хроничния риносинуит. Пролетна научна конференция: „Съвременни концепции в лечението на ушите, носа и гърлото“. Пловдив, България. 27-29 Март 2015год. 14 стр.

Спечелен научно-изследователски проект №203/14.01.2015г. от конкурса „ГРАНТ-2015“ на Медицински университет София на тема *„Експресионен профил на BPIFA1 гена при пациенти с хроничен риносинуит и хроничен гноен отит“*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам специални благодарности към своя научен ръководител проф. Диана Попова, към всички колеги от Клиниката по УНГ болести на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ,с помощта на които стана възможно набирането на нужните пациенти и създаването на настоящия труд.

Благодарности към доц. Радка Кънева и Дарина Качакова от Центъра по молекулна медицина за провеждането и анализирането на генетичните изследвания по проблема.