БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
BULGARIAN ASSOCIATION FOR CLINICAL IMMUNOLOGY

Годишник на БАКИ

2018, том 12

Year book of Bulgarian Association for Clinical Immunology

2018, vol. 12

Медицински университет – София Централна медицинска библиотека
2019

ГОДИШНИК НА БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
2018 – том 12

Редакционна колегия
Проф. д-р Марта Балева, дмн
Доц. д-р Дора Попова, дм
Доц. д-р Велизар Шиваров, дм

ISSN 1313-4752

Предпечат: ЦМБ, МУ – София
Печат: Таурус Адвертайзинг

СЪДЪРЖАНИЕ

СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“ 5

НАУЧНИ СТАТИИ

ПРОГНОСТИЧНА РОЛЯ НА СЕРУМНИЯ ВАСКУЛАРЕН ЕНДОТЕЛЕН ФАКТОР VEGF-A И МЕЖДУКЛЕТЪЧНАТА АДХЕЗИОННА МОЛЕКУЛА ICAM-1 ЗА РАННИ СЛЕДХИРУРГИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ТОРАКОТОМИИ И БЕЛОДРОБЕН КАРЦИНОМ
Л. Паунов, М. Ивановска, Т. Попова, Б. Хак, А. Учиков, М. Мурджева..... 9

IgG-МЕДИИРАНА ИМУННА РЕАКТИВНОСТ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС СИНДРОМ НА РАЗДРАЗНЕНОТО ЧЕРВО – ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ
Ц. Великова, И. Алтънкова, А. Михова, В. Терзиева, В. Георгиева, М. Перухова, А. Куков, Н. Юрукова, Ц. Механджийска-Маринова, Г. Мизгова, Г. Железова, Л. Иванова 17

АНТИКАРДИОЛИПИНОВИ АНТИТЕЛА ПРИ УЛЦЕРОЗЕН КОЛИТ И ТРОМБОЗА
П. Николов, З. Спасова, М. Балева, К. Николов, З. Кръстев 32

МЯСТОТО НА КЛЕТЪЧНИЯ ИМУНОЛОГИЧЕН МОНИТОРИНГ В ПЕРСОНАЛИЗИРАНЕ НА ИМУНОСУПРЕСИВНАТА ТЕРАПИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ТРАНСПЛАНТИРАН БЪБРЕК – НАШИЯТ ОПИТ
А. Михайлова, П. Янкова, Ц. Луканов, В. Атанасова, Н. Гешева, С. Лесичкова, Д. Маринова, Е. Наумова..... 41

НАГРАДИ И СТИПЕНДИИ ОТ БАКИ ЗА УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

АКЦЕНТИ ОТ ПЕТИЯ ЕВРОПЕЙСКИ КОНГРЕС ПО ИМУНОЛОГИЯ
Е. Куртева..... 55

ВПЕЧАТЛЕНИЯ ОТ ПЕТИЯ НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ И НАЦИОНАЛНИЯ КОНГРЕС ПО РЕВМАТОЛОГИЯ – МОСТ МЕЖДУ ДВЕ ДИСЦИПЛИНИ
Г. Василев 58

ПРОЛЕТНО УЧИЛИЩЕ ЗА ПЪРВИЧНИ ИМУННИ ДЕФИЦИТИ В KUTNA HORA, ЧЕХИЯ, 26-28 АПРИЛ 2018 г.
С. Лесичкова 60

СЪВРЕМЕННАТА ИМУНОТЕРАПИЯ НА РАКА – ДЕЛО НА ОНКОЛОЗИ И МНОГО ИМУНОЛОГИЯ
М. Милев 62

ПРОФ. МОРИЦ АЛБЕРТ ЙОМТОВ – УЧЕН, ПРЕПОДАВАТЕЛ, ПИСАТЕЛ (5.11.1921 г.-15.6.1992 г.) 64

ПРОГРАМА ЗА ДЕЙНОСТТА НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ” ПРЕЗ 2019 г. 67

ENGLISH VERSION

PROGNOSTIC ROLE OF SERUM VASCULAR ENDOTHELIAL FACTOR VEGF-A AND INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE ICAM-1 FOR EARLY POST-SURGICAL COMPLICATIONS IN PATIENTS AFTER THORACOTOMY AND LUNG CANCER
L. Paunov, M. Ivanovska, T. Popova, B. Haq, A. Uchikov, M. Murdjeva 69

ANTICARDIOLIPIN ANTIBODIES IN ULCERATIVE COLITIS AND THROMBOSIS
P. Nikolov, Z. Spassova, M. Baleva, K. Nikolov, Z. Krastev 76

CONTEMPORARY IMMUNE THERAPY OF CANCER: THE ACTIVITIES OF ONCOLOGISTS FOCUSING IMMUNOLOGY
M. Milev 84

PROF. MORITZ ALBERT YOMTOV: A SCIENTIST, A TEACHER AND A WRITER (5 November 1921–15 June 1992) 85

СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“

Уважаеми колеги,

Измина още една успешна година за членовете на Българската асоциация по клинична имунология, изпълнена с редица интересни и полезни събития. Основен фокус през изминалата 2018 г. беше организирането и провеждането на *Петия национален конгрес по имунология* през м. октомври в гр. Пловдив, съвместно със Секцията по имунология към СУБ. Програмата на конгреса включваше 11 сесии, 31 пленарни доклада и 16 устни съобщения, постерни сесии и три спонсорирани симпозиума. Събитието беше отразено широко от местни и национални медии и електронни здравни сайтове. В рамките на Конгреса се проведе и Петото международно училище по имунология за млади учени, които и тази година имаха удоволствието да чуят лекции от утвърдени български и чуждестранни учени. Бяха наградени и трите най-добри постера с грамоти и парични награди.

Международният ден на имунологията и седмицата на ПИД традиционно се отбелязаха по места с различни мероприятия. Безплатни медицински прегледи в контекста на подобряване на достъпа до оптимални грижи за всички пациенти с имуномедиирани болести бяха осъществени на различни места. Молебен за благословение и изцеление на всички, които страдат от първични имунни дефицити (ПИД), се отслужи в параклиса на УМБАЛ „Александровска”, след което се пуснаха балони в небето в подкрепа на страдащите от ПИД. Направи се имунизация на студенти от МУ – Пловдив, за вирусни хепатити А и В с противохепатитни ваксини, осигурени от студенти и с подкрепата на академичното ръководство на МУ – Пловдив. Проведе се семинар на тема “Уязвими ли сме днес от инфекциозните болети и как да се предпазваме?”, организиран от МУ – Пловдив. Той е насочен към студенти по медицина от V курс с глобалната инициатива на Световната здравна организация „Глобален план за действие 2011-2020” и Европейската имунизационна седмица от 23-29 април 2018 г. под надслов „Имунизирам”.

За трета поредна година Българската асоциация по клинична имунология, Медицински университет – Пловдив, Функционален експертен център „Джефри Модел“ и Експертен център по редки болести – ПИД, при УМБАЛ „Александровска” – София, организираха *Третото лятно училище по първични имунни дефицити*, което се проведе в планински рехабилитационен център на МУ – Пловдив, в Цигов чарк, в периода

8-10 юни 2018 г. На срещата присъстваха пациенти и техните семейства от експертните центрове в София и Пловдив, експерти имунолози и педиатри и представители на пациентските организации. Целта на лятното училище беше да се запознаят пациентите и родителите на деца с ПИД по-подробно с техните заболявания (социална интеграция, възможности за профилактика и лечение) и опита на българските лекари в тази насока.

За първи път тази година в рамките на училището се проведе експертна среща между специалисти по клинична имунология и педиатрия съвместно с Българската педиатрична асоциация по проблемите на ПИД в България. Експертната среща „Имунология и педиатрия" завърши с изработване на становище за диагностичен и терапевтичен подход при деца с имунен дефицит.

Третата тематична среща "Имунология и хранене" се проведе на 17.11.2018 г. в спа комплекса „Катарино". В спокойна и приятелска атмосфера лекарите имунолози бяха запознати с продукти на фирмите „Евромед", „Алпен фарма" и „Макслайф".

През месец ноември 2018 г. фирма „Диамед", заедно с дългогодишните си партньори BD Biosciences и БАКИ, организира двудневен *семинар по флоуцитометрия.* Мероприятието се проведе на 21-22 ноември 2018 г. в София, в Клиниката по клинична имунология при УМБАЛ „Александровска". В него взеха участие лекари, биолози, специализанти и докторанти от цялата страна, работещи с флоуцитометрия. В рамките на семинара участниците имаха възможността да се запознаят с историческото развитие на флоуцитометричната апаратура на BD и последните тенденции в анализа на стволови и Treg клетки, както и с най-новите клинични платформи на BD. В програмата на събитието беше включено и практическо обучение.

Външната оценка на качеството е една от важните дейности на БАКИ. През 2018 г. са проведени всички предвидени схеми за ВОК по имунология. Резултатите бяха отчетени и анализирани по време на Конференцията по качеството в клиничната имунология, която се проведе на 15 декември 2018 г.

В края на 2018 г. беше отчетен напредък по следните *предпрограмни проекти на "Програма за профилактика на имунологичното здраве"*, стартирала през 2017 г:

➢ Скринингово изследване на новородени за ТКИД посредством T-cell receptor excision circle (TREC) тест, с цел определяне на честотата на вродените нарушения на Т-клетъчния имунитет и икономическата ефективност от рутинното му прилагане като част от национална скринингова програма, с отговорник доц. Снежина Михайлова. Методиката

е въведена и апробирана. Изследвани са 1000 новородени (доносени и недоносени) бебета. При 26 се установиха ниски стойности на TRECs, като тези резултати не се дължат на недоносеност.

➢ Скрининг за хуморален дефицит на имунния отговор (IgG субкласове и поствакcинален имунен отговор) с отговорник д-р С. Лесичкова. Дефинирани са възрастовите групи, съобразени с имунизационния календар при децата. Обхванати са и възрастните индивиди над 65 г. Изработени са пробите на около 90 индивиди за следните показатели – IgG субкласове, поствакcинален отговор към полизахаридни антигени и протеинови антигени (дифтериен и тетаничен анатоксин). Предварителни резултати бяха изнесени на 5-ия национален конгрес по имунология.

➢ Скрининг за автоантитела при хора с фамилна обремененост и висок риск от автоимунно заболяване с отговорник проф. Д. Кюркчиев. Подготвени и внедрени са „Информация за пациента" и "Информирани съгласия". Двата вида документи са разпространени на ревматологични научни форуми под формата на флайъри, както и електронно, на страниците на Лаборатория по клинична имунология (ЛКИ), УМБАЛ „Св. Иван Рилски" и на Организация на пациентите с ревматични заболявания. На 28.06.2018 г. се проведе „Първа работна среща за предиктивна стойност на антинуклеарни антитела. Контакти и проблеми между пациентите с ревматични заболявания и ЛКИ", която беше директно излъчвана в страницата на двете организации. Събитието беше отразено доста широко и в медиите.

➢ Скрининг за клетъчен имунен дефицит – оценка на степента на „имунологично остаряване", включително маркери на хронично имунно възпаление при лица в активна възраст (29-65 г.) с отговорник проф. М. Николова. Целта на проучването е пилотна оценка на имунния статус на българското население в активна възраст за признаци на преждевременно имунологично остаряване. Предварителни резултати бяха изнесени на 5-ия национален конгрес по имунология.

През изминалата година успяхме да убедим ръководствата на МЗ, БЛС и НЗОК да включат към *Пакета медицински дейности в Приложение 2 на НРД специалността "Клинична имунология"* със съответните специализирани медицински дейности:

➢ Назначаване и интепретиране на лабораторни и специализирани имунологични изследвания на пациенти, които не подлежат на амбулаторно наблюдение/диспансеризация, съгласно наредбата по чл. 30, ал. 3 от Закона за здравето.

➢ Назначаване, започване и контролиране на специфична имунотерапия на пациенти.

През 2018 г. има само един новоприет член на БАКИ – д-р Наталия Христова – специализант по клинична имунология, на която казваме „добре дошла", а Цветелин Луканов придоби специалност по лабораторна имунология – „поздравления". Това, което бих искала да отбележа със задоволство, е значителният брой млади хора, които специализират клинична или лабораторна имунология.

През м. август 2018 г. се подписа меморандум за сътрудничество между Европейската федерация по имуногенетика и БАКИ.

Съществена дейност на БАКИ е учредяване и раздаване на стипендии и награди за подпомагане главно на млади учени и членове на БАКИ, като им се предоставят възможности за участия в различни национални и международни форуми. Тази година бяха дадени 5 стипендии и три награди.

В резултат на направения задълбочен анализ на настоящото и бъдещото развитие на нашата общност са набелязани следващи стъпки, които са залегнали в Програмата за 2019 г.

Не на последно място изказвам голямата си благодарност на съучредителите на БАКИ, акад. Богдан Петрунов и доц. Петрунка Петрова, за тяхната всеотдайна и професионална дългогодишна работа за развитието на имунологията и за утвърждаване авторитета на нашата организация. Добре дошли на новите членове на Управителния съвет на БАКИ – проф. Мария Николова и доц. Емилияна Конова.

Скъпи колеги,

От името на Управителния съвет на БАКИ бих искала да ви благодаря за доверието и желанието да бъдем заедно, защото само така сме силни и разпознаваеми и можем да постигнем целите си.

ПРОФ. Д-Р ЕЛИСАВЕТА НАУМОВА, ДМН
ПРЕДСЕДАТЕЛ НА УС НА БАКИ

НАУЧНИ СТАТИИ

ПРОГНОСТИЧНА РОЛЯ НА СЕРУМНИЯ ВАСКУЛАРЕН ЕНДОТЕЛЕН ФАКТОР VEGF-A И МЕЖДУКЛЕТЪЧНАТА АДХЕЗИОННА МОЛЕКУЛА ICAM-1 ЗА РАННИ СЛЕДХИРУРГИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ТОРАКОТОМИИ И БЕЛОДРОБЕН КАРЦИНОМ

Л. Паунов[1], М. Ивановска[2], Т. Попова[2], Б. Хак[3], А. Учиков[1], М. Мурджева[2]

[1]Катедра „Специална хирургия“ при Медицински факултет,
Медицински университет – Пловдив,
и Втора хирургична клиника на УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив
[2]Катедра „Микробиология и имунология“ при Фармацевтичен факултет
и Научноизследователски център по имунология
на Медицински университет – Пловдив
[3]Студент от Медицински факултет на Медицински университет – Пловдив

РЕЗЮМЕ

Целта на проучването е да се оцени прогностичната роля на серумните концентрации на съдовия ендотелен растежен фактор VEGF-A и вътреклетъчната адхезионна молекула ICAM-1 за развитието на ранни следоперативни усложнения при пациенти с торакотомии по повод на първичен рак на белия дроб. VEGF-A и ICAM-1 бяха изследвани с ELISA при 135 хоспитализирани пациенти с белодробен карцином преди (1 ден) и след хирургичната интервенция (между 3-ти и 7-и ден). Ранните постоперативни усложнения бяха предимно с възпалителен характер (инфекция на хирургичното място, хидроторакс, емпием). Средните серумни концентрации на VEGF-A преди- и следоперативно бяха сигнификантно по-високи при болните с усложнения в сравнение с тези без усложнения. При определянето на ICAM-1 се установиха сходни серумни концентрации при пациентите със и тези без усложнения, без сигнификантна разлика. В заключение, увеличението на пре- и постхирургичните нива на серумния VEGF-A могат да се асоциират с повишен риск за развитие на ранни възпалителни постхирургични усложнения при болни с торакотомии за белодробен рак.

Ключови думи: VEGF-A, ICAM-1, белодробен рак, торакотомия

Адрес за кореспонденция: Мариана Мурджева, e-mail: mmurdjeva@yahoo.com

PROGNOSTIC ROLE OF SERUM VASCULAR ENDOTHELIAL FACTOR VEGF-A AND INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE ICAM-1 FOR EARLY POST-SURGICAL COMPLICATIONS IN PATIENTS AFTER THORACOTOMY AND LUNG CANCER

L. Paunov[1], M. Ivanovska[2], T. Popova[2], B. Haq[3], A. Uchikov[1], M. Murdjeva[2]

[1]Department of Special Surgery at Medical Faculty, Medical University – Plovdiv, and Second Surgical Clinic at University Hospital "Sv. Georgi" – Plovdiv
[2]Department of Microbiology and Immunology at Faculty of Pharmacy, and Research Immunology Center, Medical University – Plovdiv
[3]Student, Medical Faculty, Medical University – Plovdiv

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the prognostic role of serum pre- and post-operative concentrations of vascular endothelial growth factor VEGF-A and the intercellular adhesion molecule ICAM-1for the development of early post-surgical complications in patients with thoracotomies due to primary lung cancer. SerumVEGF-A and ICAM-1levels were detected by ELISA in 135 hospitalized lung cancer patients prior and after surgical intervention (between days 3 and 7 after resection). Early post-surgical complications were mainly inflammatory (surgical site infection, hydrothorax, empyema, pneumonia). Mean serum pre- and post-surgical VEGF-A concentrations were significantly higher in patients with early post-surgical complications in comparison with those without complications. ICAM-1 measurement established similar serum levels in patients with and without any complications but the difference between the groups was not significant. We can conclude that the increase of pre-and post-surgical serum VEGF-A concentrations may be associated with higher risk for the development of early post-surgical inflammatory complications.

Key words: VEGF-A, ICAM-1, lung cancer, thoracotomy

Correspondence: Marianna Murdjeva, e-mail: mmurdjeva@yahoo.com

ВЪВЕДЕНИЕ

Въпреки терапевтичните усилия белодробният карцином остава водеща причина за смърт в целия свят. При пациентите с това заболяване се изследват редица прогностични фактори за метастазирането, но биомаркерите с прогностично значение за ранните пост-хирургични усложнения са слабо проучени. Те все още не се използват в клиничната практика, макар да могат да играят важна роля в бъдеще.

Увеличените серумни концентрации на васкуларния ендотелен растежен фактор-А (VEGF), продуциран от туморни, мезотелиални и инфилтриращи тумора имунни клетки, имат стимулиращ ефект върху пермеабилитета на съдовите ендотелни клетки, миграцията на туморните клетки и ангиогенезата [1, 2]. Клинични проучвания откриват, че серумният VEGF-A се увеличава след белодробни операции и играе важна роля в бързото метастазиране на белодробния карцином в ранния постоперативен период [2, 3].

Инвазивните белодробни тумори се асоциират с увеличена експресия на междуклетъчната адхезионна молекула-1 (ICAM-1) и метастатична способност. Ролята на ICAM-1 е проучвана и при възпалителни състояния, а така също и в развитието на нервната система, както и при лимфоцитната циркулация и активация [4]. Увеличените серумни концентрации на ICAM-1 са негативен прогностичен маркер за пациенти с недребноклетъчен карцином [5]. Допускаме връзка между серумните концентрации на ICAM-1 и VEGF-A и ранните постоперативни усложнения при пациенти с белодробен рак, подложени на торакотомия.

ЦЕЛ

Да се оцени прогностичната роля на серумните пред- и следоперативни концентрации на VEGF-A и ICAM-1 за развитието на ранни постоперативни усложнения при пациенти с белодробни резекции с торакотомия за белодробен карцином.

ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

Кръвни проби от 135 хоспитализирани пациенти с карцином на белия дроб и торакотомии бяха изследвани преди хирургичната интервенция и след нея. Критерии за включване на пациентите в проучването: болни с доказан патоанатомично белодробен карцином и извършена торакотомия (с лобектомия, пулмонектомия или сегментектомия). Предоперативно кръвта беше взета един ден преди операцията, а следоперативно – между 3-тия и 7-ия ден. Всички кръвни проби бяха събирани в епруветки без антикоагулант според изискванията на лабораторната процедура. До 60 минути след вземането кръвта се центрофугираше на 3000 rpm за 10 минути на стайна температура. Супернатантите бяха разпределяни в епруветки по 200 μl и съхранявани на t -80ºC преди изследването. Серумните концентрации на VEGF-A и ICAM-1 бяха определяни с ELISA (VEGF-A human ELISA, BioVendor и ELISA human ICAM-1, Abcam), а резултатите се отчитаха с помощта на ELISA TECAN reader (Tecan trading, Switzerland). Получените данни се сравняваха между пациенти без ранни постоперативни усложнения и такива с усложнения (възпалителни – инфекция на хирургичната рана, хидроторакс, емпием, пневмония) и летален изход.

Статистическата обработка беше извършена с помощта на SPSS vs. 19 софтуер. Бяха приложени вариационен анализ, t-тест на Student, екзактен Fisher тест и непараметричен аналог с Mann-Whitney u критерий, корелационен анализ. Данните са представени като средна аритметична ± стандартно отклонение (mean ± SD); средна грешка (SEM); средна разлика (mean difference), коефициенти на корелация rs и X^2. За ниво на значимост на нулевата хипотеза беше прието $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

При измерването на средните серумни концентрации на VEGF-A и ICAM-1 на изследваните пациенти се установиха следните резултати:

1. И при двете детекции VEGF-A показва най-високи средни нива при пациентите с инфламаторни усложнения (таблица 1). С най-ниски VEGF-A концентрации са болните без усложнения (376.83 ± 256.293 pg/ml) при следоперативното измерване в сравнение с двете подгрупи с възпалителни усложнения или с exitus letalis.

Таблица 1. Пред- и следоперативно изследване на серумни концентрации на VEGF-A при различни групи пациенти с белодробен рак – без и с постоперативни усложнения (възпалителни и exitus letalis)

Показател	Усложнения	Болни n	X	SD	X^2	p
VEGF-A pg/ml преоперативно	възпалителни	10	930,01	823,165		
	exitus letalis	5	720,04	513,726	11,979	0,000
	без	120	376,82	256,293		
	Общо	135	434,80	362,941		
VEGF-A pg/ml следоперативно	възпалителни	8	1700,01	432,176		
	exitus letalis	0	.	.	55,051	0,000
	без	55	596,07	293,832		
	Общо	63	718,67	447,533		

2. Следоперативните нива на ICAM-1 демонстрират увеличение в две от групите – с възпалителни усложнения и без усложнения (табл. 2). Преди и след оперативната интервенция ICAM-1 е с най-ниски нива в случаите с възпалителни усложнения (1-во измерване – 210.01 ± 42.76 pg/ml; 2-ро измерване – 270.04 ± 114.351 pg/ml) в сравнение с болните без усложнения (224,45 ± 75,606 pg/ml предоперативно и 330.04 ± 162.083 pg/ml следоперативно), както и при тези с exitus letalis (предоперативно 230.02 ± 36,151 pg/ml). Но и при двете измервания (пред- и следоперативно) вътрегруповите различия не са сигнификантни ($p > 0.05$).

3. Множественият вътрегрупов анализ на VEGF-A и ICAM-1 при предоперативното им измерване е представен на таблица 3. Стойностите на VEFG-A се различават значително между пациентите с ранни възпалителни постоперативни усложнения и тези без усложнения (разликата в концентрациите е 553.182 ± 121.251 pg/ml, p = 0,000). Различия има и между пациентите с exitus letalis и тези без усложнения (343.182 ± 167.865 pg/ml, p = 0,044). Не се установяват сигнификантни междугрупови разлики в серумните нива на ICAM-1.

Таблица 2. Пред- и следоперативно изследване на серумни концентрации на ICAM-1 при различни групи пациенти с белодробен рак – без и с постоперативни усложнения (възпалителни и exitus letalis)

Показател	**Усложнения**	**Болни n**	**X**	**SD**	**X^2**	**p**
ICAM-1 pg/ml предоперативно	възпалителни	10	210,04	42,762		
	exitus letalis	5	230,02	36,151	0,162	0,850
	без	120	224,45	75,606		
	Общо	135	223,52	71,902		
ICAM-1 pg/ml следоперативно	възпалителни	8	270,04	134,151		
	exitus letalis	0	.	.	0,534	0,470
	без	55	330,00	162,083		
	Общо	63	323,33	153,734		

Таблица 3. Множествен вътрегрупов анализ на предоперативното изследване на VEGF-A и ICAM-1 при пациенти с ранни постоперативни възпалителни усложнения, без усложнения и с exitus letalis

Показател	**Сравнение на VEGF-A и ICAM-1 между пациентите с различни усложнения**	**Средна разлика**	**SEM**	**p**	**95% CI**	
					Долна граница	**Горна граница**
VEGF-A pg/ml предоперативно	Възпалителни и exitus letalis	210,000	201,072	0,299	-189,07	609,07
	Възпалителни и без усложнения	553,182*	121,251	**0,000**	312,53	793,83
	Exitus letalis и възпалителни	-210,000	201,072	0,299	-609,07	189,07
	Exitus letalis и без усложнения	343,182*	167,865	**0,044**	10,02	676,35
	Без усложнения и възпалителни	-553,182*	121,251	**0,000**	-793,83	-312,53
	Без усложнения и exitus letalis	-343,182*	167,865	**0,044**	-676,35	-10,02
ICAM-1 pg/ml предоперативно	Възпалителни и exitus letalis	-20,000	44,408	0,653	-108,14	68,14
	Възпалителни и без усложнения	-14,455	26,779	0,591	-67,60	38,69
	Exitus letalis и възпалителни	20,000	44,408	0,653	-68,14	108,14
	Exitus letalis и без усложнения	5,545	37,074	0,881	-68,04	79,13
	Без усложнения и възпалителни	14,455	26,779	0,591	-38,69	67,60
	Без усложнения и exitus letalis	-5,545	37,074	0,881	-79,13	68,04

*Сигнификантна разлика при $p < 0.05$.

Следоперативното измерване на VEGF-A корелира положително със следоперативните усложнения, като връзката е умерена по сила (rs = 0,548, p = 0,001).

ОБСЪЖДАНЕ

В извършеното проучване средните серумни нива на VEGF-A са повишени както предоперативно, така и следоперативно при пациенти с възпалителни усложнения в сравнение с болните без усложнения. По-високите следоперативни нива на VEGF-A, които откриваме, са в съгласие с W. Tian и съавт., измерващи също най-високи концентрации в следоперативния период между 2-ия и 7-ия ден. Същите автори неустановяват значими статистически различия във VEGF между пациенти с VATS и такива с традиционния отворен достъп, който използваме ние [3]. Различни са резултатите, съобщавани от Y. Lai и съавт., че предоперативните нива на VEGF при болни с недребноклетъчен белодробен карцином са значимо по-високи, отколкото следоперативните, но те ги измерват по-късно – на 25-30-ия ден [6]. Нашето изследване открива, че серумните VEGF-A концентрации се повишават много по-рано в следоперативния период. Така VEGF-A може да служи като прогностичен маркер за ранни постоперативни, особено възпалителни усложнения.

С получените данни ние разширяваме познанията за ролята на VEGF-A не само върху туморната ангиогенеза, но и за връзката им с развитието на ранни следоперативни усложнения при пациенти с белодробен карцином. VEGF-A може да бъде атрактивна мишена за терапевтични стратегии при това заболяване и да покаже потенциал и в овладяването на ранните постхирургични усложнения [2, 7, 8].

Анализирайки резултатите за ICAM-1, може да се отбележи, че подобна тенденция на увеличение на следоперативните серумни нива се наблюдава и при тази молекула. Но докато значително увеличените следоперативни серумни VEGF-A са по-индикативни за следоперативно усложнение, диагностичната роля на ICAM-1 в тези случаи остава под въпрос. Пред- и следоперативното измерване на молекулата при пациенти със или без усложнения не може да открои ясно нейното значение като биомаркер за ранни постоперативни усложнения. Някои автори считат ролята на ICAM-1 в развитието на белодробния карцином за оспорвана. Въпреки че sICAM-1 се открива значително увеличена при пациенти с белодробен рак в сравнение със здрави индивиди, не винаги се доказва корелация между повишените ѝ нива и развитието на далечни метастази или преживяемостта на болните [9, 10]. Според други тази молекула има потенциал като диагностичен или прогностичен маркер, тъй като нейната увеличена експресия при прогресия на белодробния карцином се свързва с по-лоша прогноза за преживяемост в сравнение с пациентите с по-ниски нива на sICAM-1 [11, 12,

13]. ICAM-1 потенцира адхезията на белодробните ракови клетки към съдовия ендотел при хематогенното метастазиране, като по този начин избягва имунния отговор и осигурява ангиогенезата на тумора [14]. Подобно становище, че изходните ICAM нива могат да прогнозират преживяемостта и отговора към химиотерапия при пациенти с белодробен карцином, изразяват и други изследователи [15, 16]. В нито едно от проучванията обаче не се изследва потенциалната роля на ICAM-1 като прогностичен маркер за ранни усложнения след торакотомия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определянето на серумните концентрации на VEGF-A в динамика има прогностична роля при пациенти с белодробен карцином за ранни постоперативни възпалителни усложнения след торакотомия и може да бъде полезен маркер за тяхната поява. За разлика от VEGF-A серумното изследване на ICAM-1 молекулата не показва потенциал да прогнозира ранните следхирургични усложнения и нейното значение остава противоречиво.

Ограничения в проучването. Относително малък брой пациенти с ранни постоперативни усложнения. Поради лимитирания брой на невъзпалителните усложнения те не са включени в проучването. Това насочва към необходимостта от валидиране на получените резултати с по-широко проспективно изследване.

Благодарност. Изследването е финансирано от вътреуниверситетски проект на МУ – Пловдив (3/2011) и проект ДУНК (01/2-2009).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bradshaw M, Mansfield A, Peikert T. The role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis, diagnosis and treatment of malignant pleural effusion. Curr Oncol Rep 2013;15 (3):207-216.
2. Chekhonin VP, Shein SA, Korchagin AA, et al. VEGF in tumor progression and targeted therapy. Curr Cancer Drug Targets 2013;13(4):423-43.
3. Tian W, Tong H, Sun Y, et al. Changes in serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 after video-assisted thoracoscopic surgery and thoracotomic lobectomy in the treatment of patients with non-small cell lung cancer. Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 2014; 17(1):24-9.
4. Frank GP, Lisanti MP. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008;295(3):H926-H927.
5. Uchikov A, Dimitrov I, Hadjiev B, Prisadov G, Uchikova E, Ganchevska P. Prognostic value of the molecular markers ICAM-1 and C-JUN in patients withlung cancer. Khirurgiia (Sofia). 2010; 1:36-9.
6. Lai Y, Wang X, Zenq T, et al. Serum VEGF levels in the earlydiagnosis and severityassessment of non-small cell lung cancer. J Cancer 2018, 6;9(9):1538-1547.
7. Chen Y, Mathy NW, Lu H. The role of VEGF in the diagnosis and treatment of malignant pleural effusion in patients with non-smallcelllung cancer. Mol Med Rep 2018; 17(6):8019-8030.

8. Frezzetti D, Gallo M, Maiello MR, et al. VEGF as a potentialtarget in lung cancer. Expert Opin Ther Targets 2017;21(10):959-966.
9. Gogali A, Charalabopoulos K, Zampira I, et al. Soluble adhesion molecules E-cadherin, intercellular adhesion molecule-1, and E-selectin as lung cancer biomarkers. Chest 2010;138(5):1173-9.
10. Guney N, Soydinc HO, Derin D, et al. Serum levels of intercellular adhesion molecule ICAM-1 and E-selectin in advanced stage non-small cell lung cancer. Med Oncol 2008;25(2):194-200.
11. Gu X, Ma C, Yuan D, et al. Circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 in lung cancer: asystematic review. Transl Lung Cancer Res 2012;1(1):36-44.
12. Kotteas AE, Boulas P, Gkiozos I, et al. The intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) in lung cancer: Implications for disease progression and prognosis. Anticancer Research 2014, 34: 4665-4672.
13. Shin HS, Jung CH, Park HD, et al. The relationship between the serum intercellular adhesion molecule-1 level and the prognosis of the disease in lung cancer. Korean J Intern Med 2004; 19 (1):48-52.
14. Aznavoorian S, Murphy A, Stetler-Stevenson WG, et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. Cancer 1993; 71: 1368-1383.
15. Dowlati A, Gray R, Sandler AB, et al. Cella dhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab. Clin Cancer Res 2008;14:1407-12.
16. Qian Q, Zhan P, Yu, L, et al. Baseline levels and decrease in serum soluble intercellularadhesion molecule-1 during chemotherapy predict objective response and survival in patients who have advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer 2011;12(2):131-7.

IgG-МЕДИИРАНА ИМУННА РЕАКТИВНОСТ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС СИНДРОМ НА РАЗДРАЗНЕНОТО ЧЕРВО – ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ

Ц. Великова[1], И. Алтънкова[1], А. Михова[1], В. Терзиева[1], В. Георгиева[2], М. Перухова[2], А. Куков[3], Н. Юрукова[2], Ц. Механджийска-Маринова[4,6], Г. Мизгова[4], Г. Железова[5], Л. Иванова[6]

[1]Клинична имунология, УБ „Лозенец“ – София
[2]Клиника по вътрешни болести, Отделение по гастроентерология, УБ „Лозенец“ – София
[3]“АА Медикъл България” – София
[4]Лаборатория по микробиология и вирусология, УБ „Лозенец“ – София
[5]Катедра по биология, медицинска генетика и микробиология, Медицински факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“ – София
[6]Катедра по неврология, психиатрия, физиотерапия и рехабилитация, превантивна медицина и обществено здравеопазване, Медицински факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“ – София

РЕЗЮМЕ

Синдромът на раздразненото черво (СРЧ) е често срещано функционално разстройство на червата с широк спектър гастроинтестинални и други симптоми, както и с документирано нискостепенно чревно възпаление. През последните години при такива пациенти все повече се обсъжда ролята на хранителната непоносимост, предизвикана чрез имунни и неимунни механизми. Целта на настоящото пилотно проучване е да изследва честотата на специфични IgG антитела към хранителни антигени при пациенти със СРЧ и при здрави лица. **Материал и методи.** В това едноцентрово проучване включихме петнадесет пациенти със СРЧ, диагностицирани съгласно критерии Рим IV, и осем здрави лица. В серума на болните бяха определени специфични IgG антитела към 24 хранителни антигена чрез ELISA, а фекална проба беше тествана за калпротектин и наличие на инфекциозни причинители. **Резултати.** Според анамнестичните данни 100% от пациентите със СРЧ са имали симптоми от стомашно-чревния тракт, като между 21.4-93.9% от тях са съобщили и за оплаквания от страна на една и няколко системи в организма. Специфични IgG антитела към определени хранителни антигени в стойности над 3,51 U/ml установихме при 6.7-53.3% от болните със СРЧ. Към някои от храните се прояви IgG хиперсенсибилизация във всички степени. При сравнение между болни и здрави лица

значими разлики бяха установени само по отношение на антителата срещу къри и свинско месо, както и гранична сигнификантност при антителата срещу чушки и хлебна мая. **Заключение.** Наличието на специфични антитела срещу различни хранителни антигени е възможен механизъм, чрез който храната може да медиира патофизиологичните промени при СРЧ. Тези данни изискват по-нататъшни изследвания.

Ключови думи: синдром на раздразненото черво, хранителна непоносимост, хранителна нетолерантност, IgG-медиирана свръхчувствителност, хранителен алерген

Адрес за кореспонденция: Д-р Цветелина Веселинова Великова; Клинична имунология, УБ „Лозенец“, ул. Козяк 1, 1407 София, моб. тел. 00359883306049, e-mail: tsvelikova@medfac.mu-sofia.bg

IgG-MEDIATED IMMUNE REACTIVITY IN PATIENTS WITH IRRITABLE BOWEL SYNDROME: A PILOT STUDY

Ts. Velikova[1], I. Altankova[1], A. Mihova[1], V. Georgieva[2], M. Peruhova[2], A. Kukov[3], N. Yurukova[2], T. Mehandzhiyska-Marinova[4,6], G. Mizgova[4], V. Terzieva[1], G. Zhelezova[5], L. Ivanova[6]

[1]Clinical Immunology, University Hospital Lozenetz – Sofia
[2]Clinic of Internal Medicine, Gastroenterology Ward, University Hospital Lozenetz
[3]AA Medical Bulgaria – Sofia
[4]Laboratory of Microbiology and Virology, University Hospital Lozenetz – Sofia
[5]Department of Biology, Medical genetics and Microbiology, Faculty of Medicine – Sofia University Sv. Kliment Ohridski – Sofia
[6]Department of Neurology, Psychiatry, Physiotherapy and Rehabilitation, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, Sofia University Sv. Kliment Ohridski – Sofia

ABSTRACT

Irritable bowel syndrome (IBS) is a common functional bowel disorder with a wide range of gastrointestinal and other symptoms, as well as the presence of low-grade intestinal inflammation. In recent years, the role of food intolerance caused by immune and non-immune mechanisms has been increasingly discussed. This pilot study aims to investigate the prevalence of specific IgG antibodies to food antigens in patients with IBS and healthy subjects. **Materials and Methods.** In this single-center study, we included fifteen patients with IBS-diagnosed via Rome IV criteria, and eight healthy subjects. In the serum samples of the patients, specific IgG

antibodies to 24 food antigens were determined by ELISA, and fecal samples were tested for calprotectin and the presence of infectious agents. **Results.** According to the anamnestic data, 100% of the patients with IBS had complaints from the gastrointestinal tract, and between 21.4-93.9% of them reporting symptoms of one or several systems in the body. Specific IgG antibodies to particular food antigens above 3.51 U/ml were found in 6.7-53.3% of patients with IBS. To some of the foods, IgG hypersensitization occurs at all stages. When compared patients and healthy subjects, significant differences were found only for IgG against curry and pork, as well as borderline significance was observed for antibodies against pepper and yeast. **Conclusion.** The presence of specific antibodies against various food antigens is a possible mechanism, by which food can mediate pathophysiological changes found in IBS. These data require further research.

Key words: irritable bowel syndrome, food intolerance, IgG-mediated hypersensitivity, food allergen

Correspondence: Tsvetelina Veselinova Velikova, MD, PhD; Clinical Immunology, University Hospital "Lozenetz", Kozyak 1 Str., Bg – 1407 Sofia, e-mail: tsvelikova@medfac.mu-sofia.bg, Mob. 00359883306049

ВЪВЕДЕНИЕ

Синдромът на раздразненото черво (СРЧ) е функционално разстройство на червата, което се среща често. При това състояние се наблюдава широк спектър симптоми както от страна на храносмилателната система, така и екстраинтестинални прояви. Независимо от преобладаващите симптоми при пациентите със СРЧ, качеството им на живот е повлияно значително и може да достигне до невъзможност за извършване на ежедневни дейности [1], поради което СРЧ има голямо медицинско и социално-икономическо значение [2]. Поради неизяснената „органична" причина за възникването на СРЧ лечението се основава на промени в начина на живот, храненето, психологическа терапия и справяне със съпътстващите симптоми чрез фармакологични средства [3].

Етиологията на СРЧ не е напълно изяснена, но има доказателства, че промяна в микробиома или диетата може да бъде свързана с патофизиологията на СРЧ [4-8]. Изследванията през последните години насочват вниманието към три основни патофизиологични изменения – променен гастроинтестинален мотилитет, висцерална свръхчувствителност и психопатология [9-11]. В парадигмата „взаимодействие мозък-черво" вече се включва и микробиомът, тъй като е установено, че чревната микрофлора може да повлияе мозъчната морфология и функция [9]. През последните години все повече се обсъжда и ролята на храни-

телната непоносимост при тези пациенти, предизвикана по имунни и неимунни механизми [12, 13].

Непоносимостта към различни храни, заедно с хранителната свръхчувствителност/алергии и други необичайни реакции при консумиране на храни се класифицират като нежелани реакции към хранителни антигени [14]. Непоносимостта към храни обхваща и неимунологично медиирани нежелани реакции като преки ефекти на фармакологично активните съставки на храни (напр. тирамин, кофеин), ензимни дефицити (напр. непоносимост към лактоза и фруктоза), докато хранителна алергия (свръхчувствителност) се използва за описание на състояния, основно медиирани чрез IgE антитела, които могат да бъдат доказани (напр. алергия към белтъка на кравето мляко, фъстъци, соя) [12, 15].

Счита се, че при пациентите със СРЧ честотата на нежелани реакции към храни е по-висока, отколкото в общата популация. Между 20 и 65% от пациентите със СРЧ свързват симптомите си с хранителна нетолерантност [16-18] и дори съобщават за влошаване на симптомите при консумиране на специфични храни [19]. Установено е обаче, че може да съществува несъответствие между субективната непоносимост към консумираните храни и наличие на хранителна алергия при тези пациенти.

Последните проучвания показват, че такива реакции могат да бъдат медиирани от IgG антитела, които възникват по-късно след експозиция на конкретен антиген [20-28].

Трябва да се има предвид, че при правилно функционираща чревна лигавица и орален толеранс количеството на IgG антитела срещу хранителни антигени е минимално [29]. Скорошни изследвания [30-32] дават основание да се преразгледа предположението, че повишените титри на IgG/IgG4 антителата към хранителни антигени представляват „нормална“ реакция без клинично въздействие [33].

Целта на настоящото пилотно проучване е да изследва честотата на специфични IgG антитела към хранителни антигени при пациенти със СРЧ и при здрави лица, както и да потърси асоциации между тях и някои анамнестични и клинични данни. С оглед търсене на възможен патогенен механизъм проучихме някои фекални маркери за възпаление.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Пациенти и здрави лица

В това едноцентрово проучване включихме петнадесет пациенти със СРЧ (трима мъже и дванадесет жени на средна възраст 36 ± 10 години – между 25-58 години) и осем здрави лица, съответни по възрастово и полово съотношение. Пациентите със СРЧ бяха диагностицирани съгласно критерии Рим IV (2016 г.) [34]

след провеждане на необходимите изследвания (физикален преглед, образни и лабораторни изследвания) за изключване на органично заболяване на гастроинтестиналния тракт. Пациентите бяха подбрани от Клиниката по гастроентерология към Университетска болница „Лозенец" – София.

Критериите за изключване на лица (пациенти и здрави) от проучването бяха: всяко клинично значимо системно заболяване, възпалително чревно заболяване, имунен дефицит, предишна коремна операция или текуща бременност. Всички участници бяха поканени да попълнят анкетна карта с данни за хранителни навици, оплаквания от страна на различни органи и системи (ако са налични), както и да отбележат дали свързват определени нежелани реакции (слаби, умерени, силни) с конкретни храни.

Всички участници в изследването бяха подробно информирани за целта и методите, използвани в проучването, след което подписваха документ за информираното си съгласие.

Имунологични методи

Специфични IgG към 24 хранителни антигена бяха изследвани в серумни проби от всички лица чрез използване на имуноензимен метод и търговски панел IgG Screen Nutritional 24 ELISA (ILE-SCG25; IMMUNOLAB GmbH, Германия) съгласно инструкциите на производителя. Получените резултати са представени като U/ml и реакционни класове (< 0.35 U/ml – клас 0; 0.36-0.70 U/ml – клас 1; 0.71-3.50 U/ml – клас 2; 3.51-17.50 U/ml – клас 3; 17.51-50 U/ml – клас 4; 51-100 U/ml – клас 5; > 100 U/ml – клас 6). В нашето изследване ние използвахме единиците реакционни класове като отразяващи релативно количество специфични IgG към даден хранителен антиген.

Фекални проби от участниците в проучването бяха изследвани чрез имунохроматографски методи за калпротектин (Calprotectin CerTest Biotec, Spain); за Clostridium difficile toxin A + B (CerTest Biotec, Spain); и за Helicobacter Pylori (Pilori-K-SeT, Coris BioConcept, Belgium).

Статистически анализ

Суровите данни бяха анализирани с помощта на софтуерния пакет за статистически анализ SPSS, v.19 (IBM). Установени и сравнявани бяха процентни честоти и степен на положителен резултат при болни и здрави лица. Бяха използвани Т-тестове за сравняване на нивата на специфичните IgG при болни и здрави лица след проверка на нормалността по Колмогоров-Смирнов. За търсене на асоциации между показателите използвахме корелационен анализ. Разликите счетохме за статистически значими при $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

Характеристики на пациентите със синдром на раздразненото черво по анамнестични данни

Според анамнестичните данни 100% от пациентите със СРЧ са имали едно или повече оплаквания от страна на стомашно-чревния тракт (гадене, повръщане, диария, запек, коремни болки, метеоризъм, проблеми с теглото). Болка при дефекация е съобщена от 53.3%, промяна в ритъма на дефекация – при 100%, а във формата на изпражненията – при 93.3%, подуване – при 92.9%, а наличие на мукорея е имало при 42.9%. Само 1 пациент е употребявал инхибитори на протонната помпа в рамките на три месеца непосредствено преди включването в изследването.

Бяха установени оплаквания и от други органи и системи при пациентите със СРЧ, както следва: 28.6% – кожно засягане (уртикария, обриви, сърбежи); 92.9% – неврологични оплаквания (мигрена, главоболие, безсъние, нарушена концентрация, безпокойство, умора), изразени в различна степен; 42.9% – оплаквания от страна на дихателната система (вкл. астма, ринит, синузит); при 50% са наблюдавани симптоми, свързани с мускулно-скелетната система (болки, схващания); изявен предменструален синдром е наблюдаван при 54.5% от жените; нарушения на съня – при 35.7%; нарушено зрение (напр. замъгляване на погледа) – при 21.4%, задръжка на вода, отоци – при 20%, шум в ушите, заглъхване, звън – при 21.4% от пациентите. За алергии към лекарства, полени, ухапване от оси са съобщили 40% от пациентите със СРЧ, като двама от тях са били с полиалергия.

Около 2/3 от пациентите са опитвали различни форми на елиминационни диети с цел подобряване на състоянието. Пробиотици са приемани редовно или инцидентно от 41.7% от пациентите, а при около 1/3 се е наложил прием на антибиотици през последните три месеца преди изследването. Само един пациент е употребявал инхибитори на протонната помпа в рамките на три месеца непосредствено преди включването в изследването.

Анамнестичните данни за реакции към храни при пациентите със синдром на раздразненото черво са представени на таблица 1.

От таблицата прави впечатление, че пациентите със СРЧ съобщават за най-силни реакции към краве мляко, пшеница, банани, соя, чесън, фъстъци, соя, чушки и хлебна мая.

Здравите контролни лица съобщават за значително по-малко субективни нежелани реакции към храни – по едно лице (12.5%) съобщава за умерена реакция към яйца, пшеница, мляко, слаба към портокал, ягоди, сусам, свинско месо. Две лица съобщават за умерена непоносимост към фъстъци.

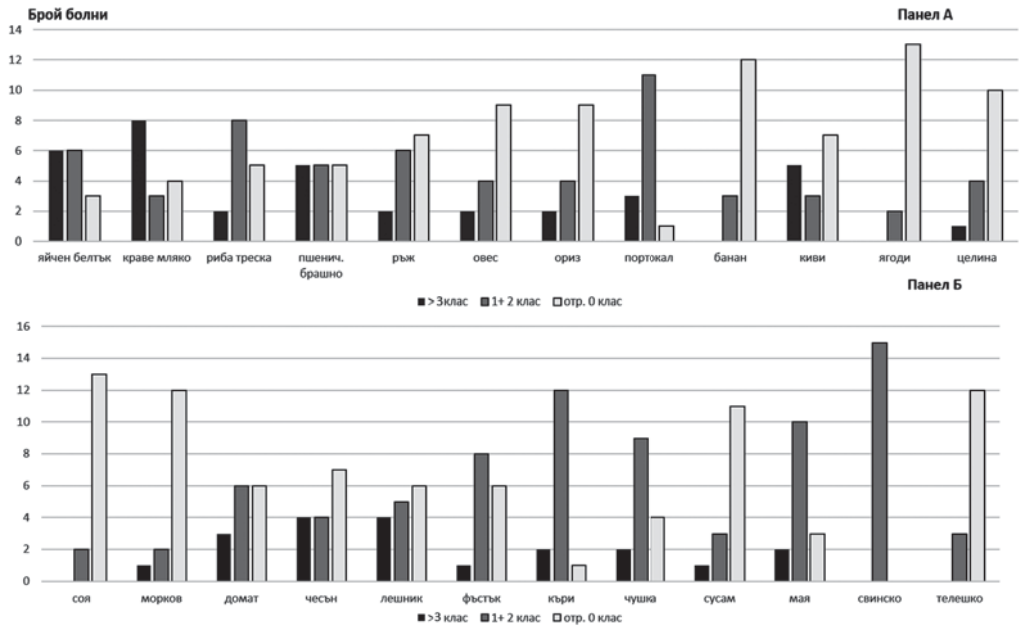
Таблица 1. Анамнестични данни за реакции към храни при пациентите със синдром на раздразненото черво. Данните са представени като процент лица от общия брой пациенти

Храна	Липса на реакция	Слаба реакция	Умерена реакция	Силна реакция
Яйце	71.4	28.6	–	–
Риба треска	100	–	–	–
Краве мляко	22.2	–	33.3	44.4
Пшеница	37.5	12.5	37.5	12.5
Ръж	57.1	42.9	–	–
Овес	42.9	57.1	–	–
Ориз	77.8	22.2	–	–
Портокал	55.6	11.1	33.3	–
Банан	55.6	22.2	11.1	11.1
Киви	77.8	11.1	11.1	-
Ягоди	88.9	11.1	–	–
Целина	71.4	28.6	–	–
Соя	37.5	12.5	37.5	12.5
Морков	88.9	–	11.1	–
Домат	55.6	–	44.4	–
Чесън	37.5	37.5	12.5	12.5
Лешник	50	33.3	16.7	–
Фъстъци	37.5	–	35	37.5
Къри	42.9	42.9	14.3	–
Чушки	50	25	12.5	12.5
Сусам	83.3	16.7	–	–
Мая	60	20	–	20
Свинско месо	100	–	–	–
Телешко месо	100	–	–	–

Специфични IgG към хранителни антигени при пациентите със синдром на раздразненото черво

Специфични IgG антитела в стойности над 3,51 U/ml установихме при различен процент от болните със СРЧ срещу следните храни: белтък на яйцето – 40%, краве мляко – 53,3%, пшеница – 33,3%, ръж – 13,3%, овес – 13,4%, ориз – 13,3%, портокал – 20%, киви – 33,3%, целина – 6,7%, моркови – 6,7%, домати – 20%, чесън – 26,7%, лешник – 26,8%, фъстък – 6,7%, къри – 13,4%, чушки – 13,3%, сусам – 6,7%, хлебна мая – 13,3% от изследваните пациенти.

Броят болни със специфични IgG към конкретни хранителни антигени са представени на фигура 1 (панел А и Б).



Фиг. 1. Честота на специфични IgG към хранителни антигени при пациентите със синдром на раздразненото черво (панел А и В) според реакциите, класифицирани като клас отрицателни (клас 0), клас 1+2 (стойности межу 0.36-3.50 U/ml) и над клас 2 (стойности над 3.51 до > 100 U/ml).

Както се вижда от фигура 1, при повечето от храните се прояви IgG хиперсенсибилизация във всички степени.

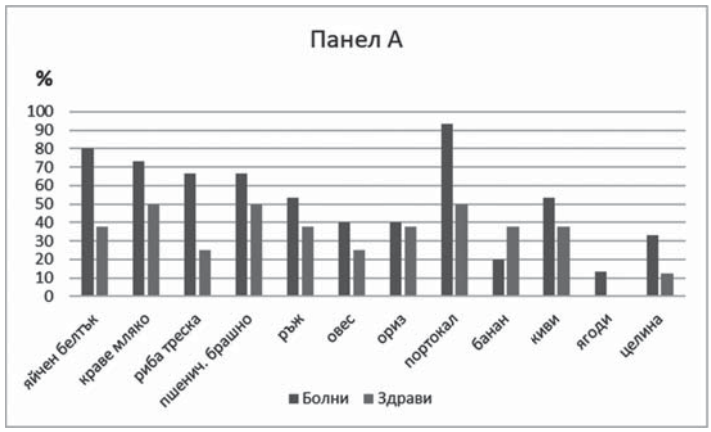
Потърсихме връзка между анамнестично определени като нетолерогенни храни и специфични IgG антитела към същите храни и не установихме сигнификантни корелации. Прави впечатление разминаването между субективните данни и обективното изследване на съответните специфични IgG.

Сравнение между пациентите със синдрома на раздразненто черво и здрави лица по отношение на специфичните IgG към определени храни

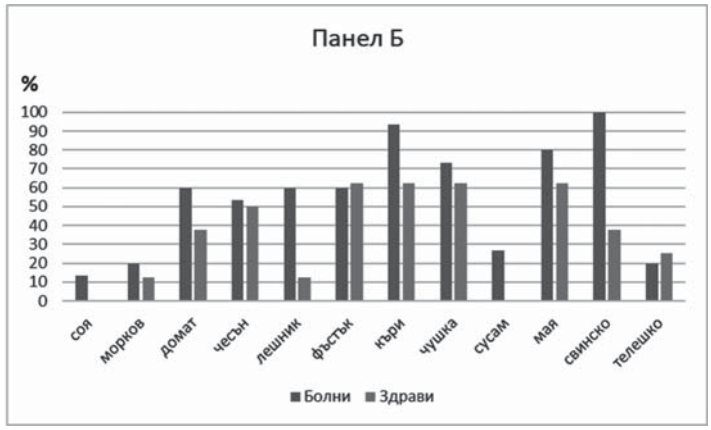
Паралелно изследвахме и контролна група здрави лица за IgG към същите храни.

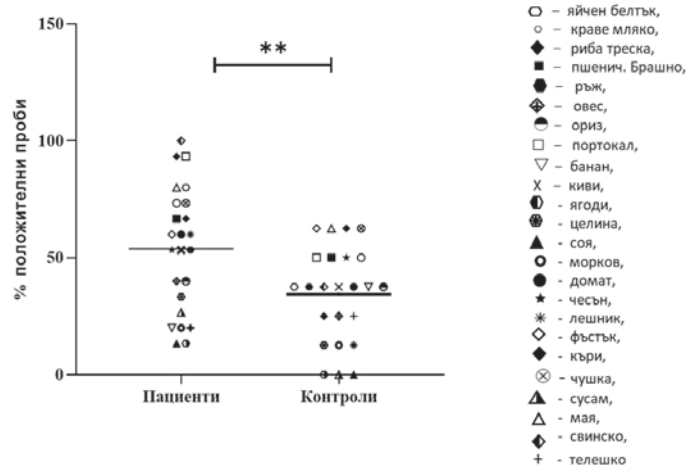
Получните резултати за честотата на положителните за IgG са представени на фигура 2. Вижда се, че честотата на IgG положителните проби (> 0.35 U/ml) е по-голяма при болните при почти всички изследвани храни (фигура 2, А и Б).

Статистическото сравнение на положителнита IgG за хранителните антигени като цяло (IgG хиперсенсибилизация) между болни със СРЧ и здрави контролни лица показа статистически значимо по-висока IgG сенсибилизация при болните със СРЧ ($p < 0.007$, фигура 3).



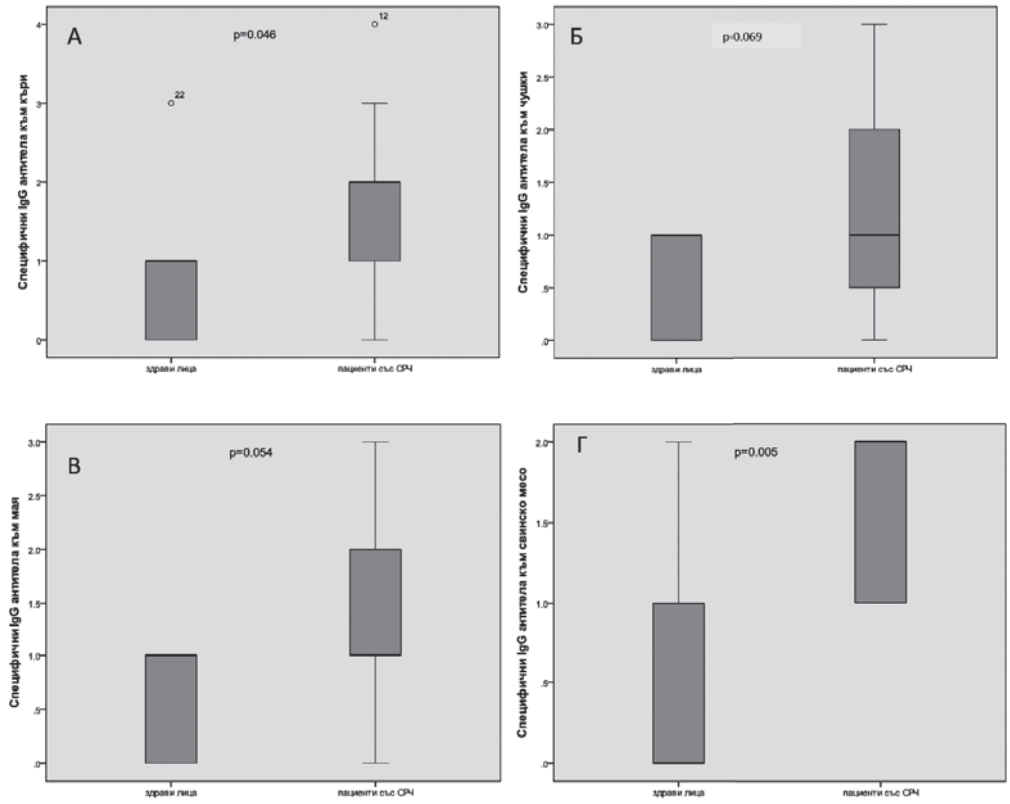
Фиг. 2. Честота на положителните за специфични IgG болни със СРЧ и здрави контроли (панел А и Б)





Фиг. 3. Сравнение на положителните IgG за хранителните антигени между болни със СРЧ и здрави контроли. Всеки антиген е представен с отделен символ, представена е медианата за всяка група

Сравнението по отделните антигени не бе реално поради малкия брой участници в групите. Сравнението по медиани за целите групи показа значими разлики само по отношение на антителата срещу къри и свинско месо (съответно $p < 0.046$ и $p < 0.005$), както и гранична сигнификантност при антителата срещу чушки и хлебна мая (съответно $p < 0.069$ и $p < 0.054$). Значимите и граничните разлики са представени и на фигура 4.



Фиг. 4. Специфични антитела от клас IgG срещу къри (А), чушки (Б), хлебна мая (В) и свинско месо (Г) при здрави лица и пациенти със синдром на дразнимото черво

Изследване на фекални проби

Изследванията, които извършихме с фекалните проби, имаха за цел търсене на активни локални маркери за възпаление. Хронично възпаление, главно медиирано от неутрофили, бе търсено чрез изследване на фекален калпротектин. При 4/14 изследвани болни установихме слабо до умерено положителна реакция за фекален калпротектин, което е 26,7% от изследваните болни със СРЧ. Никой от положителните за калпротектин болни не съобщава за прекарани в миналото или понастоящем по-чести чревни инфекции, алергии или

други възпалителни или инфекциозни заболявания. Двама от тях редовно са приемали пробиотици.

При единия пациент (46-годишен мъж) установихме IgG сенсибилизация срещу множество храни, а при останалите трима – IgG антитела в по-висока степен срещу мляко или яйца, а при един установихме само нискостепенна сенсибилизация (клас 1 или 2) към други 7 храни.

При никой от изследваните 15 болни със СВЧ за Clostridium difficile toxin A + B и Helicobacter Pylori не бяха установени положителни резултати.

В обобщение смятаме, че при около 1/3 от болните със СРЧ се установява нискостепенно възпаление на чревната лигавица.

ОБСЪЖДАНЕ

Въпросите, свързани с непоносимост към храна и ролята ѝ при различни заболявания, са обект на множество дискусии и изследвания с неоднозначни резултати. В нашето пилотно проучване изследвахме пациенти със СРЧ с цел да установим значението на един от възможните механизми за клинични изяви на непоносимост към храни – специфични IgG. Проучихме както наличието, количеството, така и честотата на разпространение на специфичните антитела към 24 хранителни антигена. Същите параметри изследвахме и при здрава контролна група с цел база за сравнение с болестната група. Чрез събран широк спектър от анамнестични данни за субективни оплаквания на пациентите, евентуално свързани с различни храни, както и различни клинични оплаквания потърсихме връзка между анамнестичните данни и обективните имунологични резултати от специфични IgG срещу различни храни. Различията в честотата на специфичните IgG между болни и здрави недвусмислено показват по-висока IgG сенсибилизация при болните със СРЧ срещу множество антигени, макар и проявена в различна степен. Като цяло това бе потвърдено и статистически, но поради пилотния характер на проучването и недостатъчния брой на изследваните лица тази зависимост не се потвърди поотделно за всеки един от хранителните алергени.

На този етап дефинирането на патогенетичен механизъм е трудно. Както и други автори, и ние не установихме корелация между субективните, анамнестично споделени оплаквания и лабораторното изследване на IgG свръхчувствителност. Това обаче не отменя възможността IgG антителата да участват във възможен патогенетичен механизъм. В тази връзка проучихме и някои маркери за хронично възпаление във фецес, характерни за болните с други хронични възпалителни заболявания на червата (синдром на Крон и язвен колит). Сред тези маркери бяха фекален калпротектин и показатели за наличие на C. difficile и H. pylori. При около 1/3 от пациентите открихме калпротектин, насочващ към

нискостепенно възпаление, но са необходими и други изследвания, които да го потвърдят. Хипотетично е възможно такова възпаление да е свързано с имуномедиирана реакция с участие на специфични IgG и формиране на имунни комплекси със съответните хранителни антигени.

Редица епидемиологични и неконтролирани проучвания потвърждават IgG хиперреактивността към хранителни антигени при пациенти със СРЧ [22, 36, 38-43]. Какво е тяхното значение и дали имат патофизиологична роля не може да се каже със сигурност. При 1/3 от пациентите установихме данни за нискостепенно хронично възпаление (положителен фекален капротектин) без наличие на инфекциозен причинител. Хипотетично е възможно такова възпаление да е свързано с имуномедиирана реакция с участие на специфични IgG и формиране на имунни комплекси със съответните хранителни антигени. Възможно е участието и на други имунни механизми в създаването на т.нар. непоносимост към храни, като се има предвид, че чрез промени в пропускливостта на чревната мукоза от различни дразнители теоретично може да се увеличи антигенното натоварване и представяне на антигени в мукозната имунна система [13]. Представянето на антигените от дендритните клетки води до активиране на В-лимфоцитите, продуциращи IgE/IgG антитела, и Т-лимфоцитите, които от своя страна секретират цитокини. Активирането на мастоцити и еозинофили води до освобождаването на различни медиатори. Всички тези събития могат да доведат до изменения в червата, свързани с нискостепенно възпаление и абнормна чувствителност на лигавицата при пациентите със СРЧ. Освен това комплексите IgG-хранителни антигени могат да се разпространят в други тъкани и органи и да предизвикат възпалителни реакции. Има много изследвания, които показват наличието на IgG антитела срещу храни при СРЧ [44, 45], възпаление и хипертония [42], мигрена [43, 46], болест на Крон [47], поведенчески проблеми [8] и астма [48]. Много често премахването на храните, към които пациентите има повишени титри IgG, води до подобряване на техните симптоми. Допълнителни изследвания са необходими, за да се установи точно при кои пациенти IgG тестовете за хранителна непоносимост биха играли важна роля за определянето на диетата им [33, 39, 40].

Kvehaugen и сътр. не успяват да намерят връзка между предполагаемата от пациентите непоносимост към мляко и пшеница и съответните антитела (IgG и IgA) [41]. Ние също не установихме асоциации между анамнестичните данни и получените резултати за специфични IgG антитела към едни и същи храни. Съществуват още редица такива проучвания с различни резултати [20, 44, 49, 59].

В систематичен анализ на Niec и колеги като най-чести храни, причиняващи обостряне на симптомите, са идентифицирани мляко, пшеница и яйца, общият фактор при които е съдържанието на салицилат или амин [19].

Zar и колеги също така демонстрират, че при пациентите със СРЧ са повишени специфични IgG4 антитела към храни [37, 38]. Авторите спекулират, че тестването на серумни IgG4 антитела може да бъде обективен и бърз метод за избор кога пациентите със СРЧ да бъдат подложени и на елиминираща диета освен подлежащата терапия.

Необходими са още проучвания, за да се установи какво е биологично-клиничното значение на повишените титри на IgG антителата и могат ли да се използват като база за подготвяне на хранителен режим.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установените от нас отклонения в специфичния IgG отговор при болни със СРЧ поставят въпроса дали те могат да се обяснят с абнормен отговор на имунната система в стомашно-чревния тракт, поддържане на хронично нискостепенно мукозно възпаление и загуба на оралния толеранс, или с хранителна алергия/непоносимост. Установяването на основните механизми, чрез които храната може да медиира патофизиологичните промени при СРЧ, изисква по-нататъшни изследвания.

Благодарности

Пилотното проучване беше финансирано с научен проект No 80-10-160/25.04.2018 към Медицински факултет, Софийски университет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li FX, Patten SB, Hilsden RJ, et al. Irritable bowel syndrome and health-related quality of life: A population-based study in Calgary, Alberta. Can J Gastroenterol Hepatol 2003, 17, 259-263.
2. Farndale R, Roberts L. Long-term impact of irritable bowel syndrome: A qualitative study. Prim Health Care Res Dev, 2011, 12, 52-67.
3. Foxx-Orenstein AE. New and emerging therapies for the treatment of irritable bowel syndrome: An update for gastroenterologists. Ther Adv Gastroenterol 2016, 9, 354-375.
4. Bercik P, Verdu EF, Collins SM. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? Gastroenterol Clin North Am, 2005, 34(2), 235-45, VI-VII.
5. Spiller, R.C. Infection, immune function, and functional gut disorders. Clin Gastroenterol Hepatol. 2004, 2, 445-455.
6. Rodriguez LA, Ruigomez A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. BMJ, 1999, 318, 565-566.
7. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD. et al. Functional bowel disorders. Gastroenterology 2006, 130, 1480-1491.
8. Karakula-Juchnowicz H, Gałęcka M, Rog J, et al. The Food-Specific Serum IgG Reactivity in Major Depressive Disorder Patients, Irritable Bowel Syndrome Patients and Healthy Controls. Nutrients, 2018, 10(5), pii: E548.
9. Quigley EMM. The gut-brain axis and the microbiome: clues to pathophysiology and opportunities for novel management strategies in irritable bowel syndrome (IBS). J Clin Med, 2018, 7(1), pii: E6.

10. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abdollahi M, Rahimi R. The role of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: pharmacological targets and novel treatments. J Neurogastroenterol Motil, 2016, 22(4), 558-74.
11. Hulisz D. The burden of illness of irritable bowel syndrome: current challenges and hope for the future. J Manag Care Pharm, 2004, 10 (4), 299-309.
12. Choung RS, Talley NJ. Food Allergy and Intolerance in IBS. Gastroenterol Hepatol, 2006, 2(10), 756-760.
13. Великова Ц, Георгиева В, Куков А, Перухова М, Юрукова Н, Михова А, Механджийска-Маринова Ц, Мизгова Г, Терзиева В, Железова Г, Иванова Л, Алтънкова И. Синдром на раздразненото черво и хранителна непоносимост. Медицински преглед 2019; 55(1):5-13.
14. Elsenbruch S. Abdominal pain in irritable bowel syndrome: a review of putative psychological, neural and neuro-immune mechanisms. Brain Behav Immun, 2011, 25 (3), 386-94.
15. Velikova Ts, Kukov Al, Georgieva V, Peruhova M, Yurukova N, Mihova A, Mehandziyska-Marinova Ts, Mizgova G, Terzieva V, Zhelezova G, Altankova I, Ivanova L. Methods for detection of food intolerance; Recent Advances in Food Science; 2018; 1(3): 106-119.
16. Simren M, Mansson A, Langkilde AM, et al. Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome. Digestion, 2001, 63, 108-115.
17. Locke GR 3rd, Zinsmeister AR, Talley NJ, et al. Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. Am J Gastroenterol, 2000, 95, 157-165.
18. Zar S, Kumar D, Benson MJ. Food hypersensitivity and irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther, 2001, 15, 439-449.
19. Niec AM, Frankum B, Talley NJ. Are adverse food reactions linked to irritable bowel syndrome? Am J Gastroenterol, 1998, 93, 2184-2190.
20. Dainese R, Galliani EA, De Lazzari F, et al. Discrepancies between reported food intolerance and sensitization test findings in irritable bowel syndrome patients. Am J Gastroenterol, 1999, 94, 1892-1897.
21. Stefanini GF, Saggioro A, Alvisi V, et al. Oral cromolyn sodium in comparison with elimination diet in the irritable bowel syndrome, diarrheic type. Multicenter study of 428 patients. Scand J Gastroenterol, 1995, 30, 535-541.
22. Stefanini GF, Prati E, Albini MC, et al. Oral disodium cromoglycate treatment on irritable bowel syndrome: an open study on 101 subjects with diarrheic type. Am J Gastroenterol, 1992, 87, 55-57.
23. Gwynn CM, Smith JM, Leon GL, Stanworth DR. Role of IgG4 subclass in childhood allergy. Lancet, 1978, 1, 910-911.
24. Husby S, Oxelius VA, Teisner B, et al. Humoral immunity to dietary antigens in healthy adults. Occurrence, isotype and IgG subclass distribution of serum antibodies to protein antigens. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1985, 77, 416-422.
25. Barnes RM, Harvey MM, Blears J, et al. IgG subclass of human serum antibodies reactive with dietary proteins. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1986, 81, 141-147.
26. Hunter JO. Food elimination in IBS: the case for IgG testing remains doubtful. Gut, 2005, 54(8), 1203.
27. Okahata H, Nishi Y, Mizoguchi N, et al. Development of serum Dermatophagoides farinae-, ovalbumin- and lactalbumin-specific IgG, IgG1, IgG4, IgA and IgM in children with bronchial asthma/allergic rhinitis or atopic dermatitis. Clin Exp Allergy, 1990, 20, 39-44.
28. Barnes RM, Lewis-Jones MS, Allan S, et al. Development and isotype diversity of antibodies to inhalant and dietary antigens in childhood atopic eczema. Clin Exp Dermatol, 1993, 18, 211-216.
29. Brandtzaeg, P. Food allergy: separating the science from the mythology. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7, 380-400.

30. Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. J Clin Invest, 2011, 121(4), 1484-96.
31. Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, et al. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglob- ulin-E-mediated systemic anaphylaxis. Immunity, 2008, 28(4), 581–589.
32. Ishikawa R, Tsujimura Y, Obata K, et al. IgG-mediated systemic anaphylaxis to protein antigen can be induced even under conditions of limited amounts of antibody and antigen. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 402(4), 742-6.
33. AAAAI support of the EAACI Position Paper on IgG4. Position Statement, 2010.
34. Schmulson MJ, Drossman DA. What is new in Rome IV. J Neurogastroenterol Motil, 2017, 23(2), 151-63.
35. Velikova Ts, Altankova I, Reruhova M, et al. Prevalence of Specific IgG to Food Antigens in Bulgarian IBS Patients: A Preliminary Study. M J Nutr. 2018; 3(1): 017;1-3.
36. Bentley SJ, Pearson DJ, Rix KJ. Food hypersensitivity in irritable bowel syndrome. Lancet, 1983, 2, 295-297.
37. Zar S, Benson MJ, Kumar D. Food-specific serum IgG4 and IgE titers to common food antigens in irritable bowel syndrome. Am J Gastroenterol, 2005, 100, 1550-1557.
38. Zar S, Mincher L, Benson MJ, Kumar D. Food-specific IgG4 antibodyguided exclusion diet improves symptoms and rectal compliance in irritable bowel syndrome. Scand J Gastroenterol, 2005, 40, 800-807.
39. Zeng Q, Dong SY, Wu LX, et al. Variable food-specific IgG antibody levels in healthy and symptomatic Chinese adults. PLoS ONE, 2013, 8, e53612.
40. Ligaarden SC, Lydersen S, Farup PG. IgG and IgG4 antibodies in subjects with irritable bowel syndrome: a case control study in the general population. BMC Gastroenterol, 2012, 12, 166.
41. Kvehaugen AS, Tveiten D, and Farup PG. Is perceived intolerance to milk and wheat associated with the corresponding IgG and IgA food antibodies? A cross sectional study in subjects with morbid obesity and gastrointestinal symptoms. BMC Gastroenterol, 2018, 18, 22.
42. Wilders-Truschnig M, Mangge H, Lieners C, et al. IgG antibodies against food antigens are correlated with inflammation and intima media thickness in obese juveniles. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 116(4), 241-5.
43. Aydinlar EI, Dikmen PY, Tiftikci A, et al. IgG-based elimination diet in migraine plus irritable bowel syndrome. Headache, 2013, 53(3), 514-25.
44. Drisko J, Bischoff B, Hall M, McCallum R. Treating irritable bowel syndrome with a food elimination diet followed by food challenge and probiotics. J Am Coll Nutr, 2006, 25, 514-522.
45. Atkinson W, Sheldon TA, Shaath N, et al. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. Gut, 2004, 53, 1459-1464.
46. Alpay K, Ertaş M, Orhan EK, Üstay DK, et al. Diet restriction in migraine, based on IgG against foods: A clinical double-blind, randomised, cross-over trial. Cephalalgia, 2010, 30(7), 829-837.
47. Bentz S, Hausmann M, Piberger H, et al. Clinical relevance of IgG antibodies against food antigens in Crohn‘s disease: a double-blind cross-over diet intervention study. Digestion, 2010, 81(4), 252-64.
48. Vance GHS, Thornton CA, Bryant TN, et al. Ovalbumin-specific immunoglobulin G and subclass responses through the first 5 years of life in relation to duration of egg sensitization and the development of asthma. Clinical and Experimental Allergy, 2004, 34(10), 1542-1549.
49. Jones VA, McLaughlan P, Shorthouse M, et al. Food intolerance: a major factor in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. Lancet, 1982, 2, 1115-1117.
50. Petitpierre M, Gumowski P, Girard JP. Irritable bowel syndrome and hypersensitivity to food. Ann Allergy, 1985, 54, 538-540.

АНТИКАРДИОЛИПИНОВИ АНТИТЕЛА ПРИ УЛЦЕРОЗЕН КОЛИТ И ТРОМБОЗА

П. Николов[1], З. Спасова[1,2], М. Балева[3], К. Николов[3], З. Кръстев[2]

[1]Медицински университет – София, [2]Клиника по гастроентерология, Университетска болница „Св. Иван Рилски" – София, [3]Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, Университетска болница „Александровска" – София

РЕЗЮМЕ

Цел на настоящата работа е да се изследват нивата на серумните антикардиолипинови антитела (aCL) при болни с улцерозен колит (UC), със и без данни за тромбоза, и да се сравнят с тези при здрави лица. aCL са изследвани при 20 пациенти (11 мъже и 9 жени) с ендоскопски и морфологично диагностициран UC. Данните са сравнени с тези при 30 здрави лица. Антителата са определени с ELISA метод, като резултатите са представени като U/ml. Cut off стойностите за IgG aCL са 10 U/ml, а за IgM aCL – 7 U/ml. Средните стойности на aCL в серума на болни с UC са сигнификантно по-високи от тези при контролната група ($p < 0.05$), но само 3 болни имат анамнестични данни за прекарани в миналото тромботични инциденти – 2 с миокарден инфаркт, 1 с феморопоплитеална тромбоза. Позитивните aCL при UC са израз на автоимунно нарушение и ендотелна дисфункция и вероятно има други причини за тромбоза, като ендотелната дисфункция в комбинация с протромбогенни фактори, вкл. aCL, е суспектен фактор за тромботично заболяване.

Ключови думи: улцерозен колит, антикардиолипинови антитела, тромбоза

Адрес за кореспонденция: Проф. д-р М. Балева, дмн, Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, Университетска болница „Александровска", 1431 София, ул. „Г. Софийски" 1, e-mail: marta_baleva@yahoo.com

ANTICARDIOLIPIN ANTIBODIES IN ULCERATIVE COLITIS AND THROMBOSIS

P. Nikolov[1], Z. Spassova[1,2], M. Baleva[3], K. Nikolov[3], Z. Krastev[2]

[1]Medical University – Sofia, [2]Clinic of Gastroenterology, University Hospital „Sv. Ivan Rilsky" – Sofia, [3]Clinic of clinical immunology with a stem cell bank, University Hospital "Alexandrovska" – Sofia

ABSTRACT

The aim of our study was to measure the levels of serum anticardiolipin antibodies (aCL) in patients with ulcerative colitis (UC) with and without history of thrombosis

and to compare these with a control group. aCL were tested in 20 patients (11 male and 9 female) with endoscopically and histologically verified UC. Data in UC was compared to 30 age and sex matched controls. aCL were tested using ELISA and results were measured in U/ml. Cut off values for IgGa CL were 10 U/ml and for IgM aCL – 7 U/ml. Mean values of aCL in UC were significantly higher than controls ($p < 0.05$), but only 3 UC patients had history of thrombosis incidents – 2 with myocardial infarction, 1 with femoropopliteal thrombosis. Positive aCL in UC are a sign of autoimmune damage and endothelial dysfunction and possibly there are other causes of thrombotic disease as well however the endothelial dysfunction in combination with pro-thrombogenic factors including aCL are suspected to be a leading causes of thrombotic disease.

Key words: ulcerative colitis, anticardiolipin antibodies, thrombosis

Correspondence: Prof. M. Baleva, MD, PhD, DSc, Clinic of clinical immunology with a stem cell bank, University Hospital "Alexandrovska", 1. G. Sofijski Str., 1431 Sofia, e-mail: marta_baleva@yahoo.com

ВЪВЕДЕНИЕ

Антифосфолипидните антитела (aPL) са хетерогенна група от антитела срещу различни анионни фосфолипиди, гликопротеини и протеини. Продължителното им присъствие в серума се асоциира с висок риск от артериална и венозна тромбоза и гинекологични проблеми по време на бременността [1]. Антикардиолипиновите антитела (aCL) са част от aPL. Определянето на aCL в серума е един от лабораторните критерии за диагностика на антифосфолипидния синдром (APS) [1]. APS е първичен (Primary APS – PAPS) и вторичен (Secondary APS – SAPS). SAPS е характерен за болните с автоимунни заболявания и особено за тези със системен лупус (SLE).

При пациентите с възпалителни заболявания на червата (IBD) – улцерозен колит (UC) и болест на Крон (CD), има висок риск от развитие на тромбоемболизъм. Тромбоемболичните усложнения при IBD са честа причина за смърт при тези болни [2]. Етиологичната и патогенетичната връзка между тромбозата и IBD не е напълно изяснена, но се обсъждат както някои протромбогенни генетични фактори – мутации във фактор V и фактор II на кръвосъсирването, мутации на гена за метилентетрахидрофолатредуктаза, дефицит на протеин C и S и др., така и множество придобити рискови фактори – хирургични манипулации, централен венозен катетър, прием на кортикостероиди, на контрацептиви или хормон-заместващи медикаменти, тютюнопушене, продължителна имобилизация, дехидратация и др. От значение са някои проблеми в коагулационната и фибринолитичната каскада, тромбоцитемията, увреденият ендотел, възпалителни и автоимунни причини. Ролята на aCL в патогенезата на IBD със или без тромбоемболични събития не е изяснена напълно.

Цел на настоящата работа е да се изследват нивата на серумните aCL при болни с UC, със и без данни за тромбоза, и да се сравнят с тези при здрави лица.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Антикардиолипиновите антитела са изследвани при 20 пациенти (11 мъже и 9 жени) с ендоскопски и морфологично диагностициран UC, лекувани в Клиниката по гастроентерология на Университетска болница „Св. Иван Рилски" – София, както и при 30 здрави на възраст между 30-40 г. За оценка на разпространението на възпалението при болните с UC използвахме Монреалската класификация [3]. При всички пациенти и контроли бяха търсени анамнестични данни за тромбоемболични събития (дълбоки венозни тромбози, белодробен тромбемболизъм, миокарден инфаркт, инсулт), както и проблемна бременност в миналото. Всички болни с UC бяха лекувани съобразно активността на болестта. Засегнатите участъци на червата са показани на табл. 1.

Табл. 1. Демографски данни и разпространение на болестта при изследваните болни с UC

Пациенти (n)	Възраст	Пол (м/ж)	Засегнат участък (n)
20	22-76	11/9	L1 – Proctitis – 10
			L2 – Left colitis – 7
			L3 – Pancolitis – 3

aCL бяха определени с ELISA метод (Orgentec-Germany), като резултатите се представяха като U/ml. Cut off стойностите за IgG aCL бяха 10 U/ml, а за IgM aCL – 7 U/ml.

РЕЗУЛТАТИ

Средните стойности на aCL в серума на болни с UC бяха сигнификантно повисоки от тези при контролната група (табл. 2, фиг. 1 и 2).

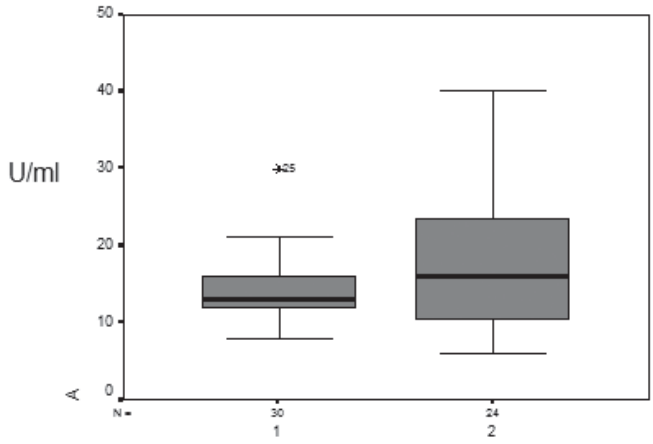
Табл. 2. Средни стойности на aCL при болни с UC и контроли

	Пациенти	Контроли	p
IgG aCL (U/ml)	20,9 ± 8,84	11,38 ± 4,86	< 0,05
IgM aCL (U/ml)	30,6 ± 17,76	7,24 ± 4,81	< 0,05

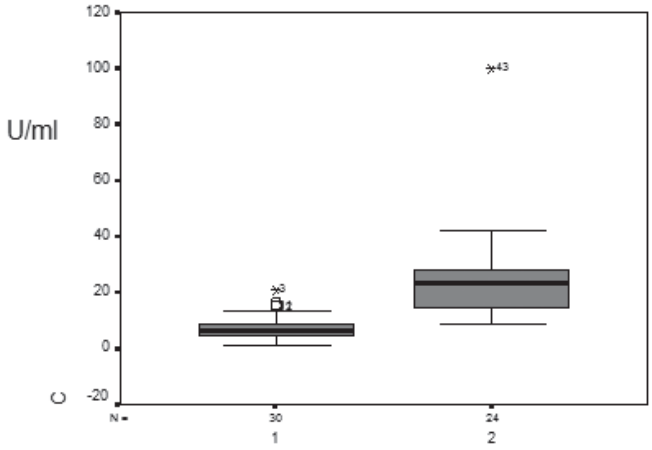
Разделихме пациентите на 3 групи според нивата на aCL на: високо, средно и слабопозитивни (табл. 3 и табл. 4).

Табл. 3. Групи болни според концентрацията на IgG aCL

	Високо (+) > 80 U/ml	Средновисоко (+) 15-80 U/ml	Ниско (+) < 15 U/ml
IgG aCL U/ml	0	16/20	3/20



Фиг. 1. IgG aCL при здрави (ляво) и болни с UC



Фиг. 2. IgM aCL при здрави (ляво) и болни с UC

Табл. 4. Групи болни според концентрацията на IgM aCL

	Високо (+) > 50 U/ml	Средновисоко (+) 6-50 U/ml	Ниско (+) < 6 U/ml
IgM aCL (U/ml)	1/20	19/20	0

Установихме, че както при IgG aCL, така при IgM aCL преобладават пациентите със средновисоки концентрации на антителата. Според съвременните критерии [1] за поставяне на диагнозата APS е необходимо нивото на антителата да е повисоко от 40 U/ml за IgG aCL и/или IgM aCL. С такива стойности беше 1 болна

с IgG aCL 40U/ml и 3 болни със следните нива на IgM aCL: 1 мъж и 1 жена с 42 U/ml и 1 жена с 100 U/ml. Никой от тях нямаше клинични и анамнестични данни за прекарана тромбоза.

Анамнестични данни за тромбоемболични събития намерихме при други 3-ма болни със средновисоки нива на IgG и IgM aCL (таблица 5).

Табл. 5. Болни с тромбоза

Болни	Възраст	Пол	Засягане на червото	Тромбоза	IgG aCL U/ml	IgM aCL U/ml
N 1	72	m	Left colitis	Миокарден инфаркт	24	27
N 2	48	f	Pancolitis	Феморопоплитеална венозна тромбоза	8	24
N 3	53	f	Left colitis	Миокарден инфаркт	20	22

ОБСЪЖДАНЕ

Редица клинични и епидемиологични проучвания показват, че автоимунните болести са свързани не само с автоимунните възпалителни процеси, но представляват и състояния с повишен хиперкоагулационен риск [5, 6]. Възпалението, коагулацията и фибринолизата в тези случаи са тясно свързани. Двете големи възпалителни заболявания на червата – болест на Крон и улцерозен колит, се характеризират именно с автоимунно възпаление и хиперкоагулационен статус. C. N. Bernstein и сътр. [7] установяват, че при болните с IBD има трикратно повишен риск за поява на БТЕ или ДВТ в сравнение с контролната група, според W. Miehsler и сътр. [8] – 3,6 пъти по-висок риск, а B. Zoller и сътр. докладват за 6.4 пъти по-висок риск от белодробен тромбемболизъм при пациентите с UC, особено през първата година след поставяне на диагнозата [9]. Според W. Miehsler и сътр. [8] 8.8% от болните с IBD са с радиологично потвърден венозен тромбоемболизъм. Тромботичните усложнения са по-чести при мъже [10] и по-често при болните с UC [5, 11]. Съществуват и публикации, според които тромбоемболичните усложнения не са по-чести при болните с IBD в сравнение с общата популация [12]. Важно е да се отбележи, че при 13-29% от болните с IBD, лекувани по повод различни прояви на венозен тромбоемболизъм, се наблюдава нова тромбоза през следващите 5 години [8, 13, 14]. Освен това проктоколектомията не е гаранция за предотвратяване на последваща тромбоза [14].

Няма категорично становище доколко повишеният риск от тромбоза е елемент от клиничната картина на IBD или е свързан с хроничното възпаление и/или с имуномедиирания процес при тези заболявания. По-чести са венозните тромботични усложнения, отколкото засягащите артериалната система. Послед-

ните обикновено имат емболичен произход и са свързани с повишен риск за смъртен изход.

Счита се, че aPL са сигнификантен лабораторен тест в диагностиката на APS и риска от тромбоза [1]. Те често се установяват при болни и с автоимунни заболявания [15-21], вирусни и бактериални инфекции [22, 23, 24], различни неоплазии [25, 26 27], след лечение с някои медикаменти [28, 29, 30], но рядко при здрави. Не винаги това е свързано с тромбоза. Засягане на червата може да се наблюдава както при първичен, така и при вторичен APS, а също и при катастрофален APS (CAPS). Причина за това са тромбозата на v. mesenterica sup., a. mesenterica sup., v. cava inf., aorta abdominalis и др., като чревното засягане допълва общата картина на APS, но не е от водещите предилекционни места на APS. При CAPS се установява ангажиране на червата при над 30% от аутопсираните, като за разлика от първичния и вторичния APS характерно е засягането на малките съдове и наличието на микротромби в по-голямата част от некропсиите. Освен това при пациентите с IBD се описват и чести тромботични усложнения извън червата.

Важно е да се отбележи, че обсъждането на резултатите от определянето на aCL при различните автори зависи до голяма степен от приетите нива на референтните стойности. Така напр. N. Sipeki и сътр. [31] считат за позитивни стойностите както на IgG aCL, така и на IgM aCL над 20U/ml; B. W. Aichbichler и сътр. [2] – 5.3 U/ml; I. E. Koutroubakis и сътр. [32] – над 10 U/ml за IgG aCL и над 7 U/ml за IgM aCL. Ако приемем за граница между положителни и отрицателни резултати стойностите над 40 U/ml [1], само 4/20 (20%) от изследваните от нас пациенти имат високи нива на aCL, което съответства на данните на повечето автори – 15,9% [33], 18,1 [32], 23,4 [31], 26,3% [27].

Не установихме връзка между aCL и тромботичните усложнения при изследваните от нас болни, което се потвърждава и от други автори [2, 31, 32, 34]. Към момента на проведеното от нас изследване никой от болните нямаше данни за тромботичен инцидент. Анамнестични данни за такъв имаха 3 болни (табл. 5) – двама с миокарден инфаркт и 1 с ДВТ.

Някои автори установяват връзка между aCL и активността на болестта и приложената терапия [32], но според други няма такава връзка [2, 13, 27, 31, 34]. Ние не сме изследвали тези зависимости. Все пак трябва да се отбележи, че средните нива както на IgG aCL, така и на IgM aCL в нашето проучване бяха по-високи от тези при здравите.

В заключение – антикардиолипиновите антитела са един от лабораторните критерии за поставяне на диагнозата APS. 36.2% от болните с клинични и лабораторни критерии за APS имат SLE [35]. Засягането на червата е сравнително рядко. В същото време тромботичните инциденти извън червата при тези болни не са рядкост. При част от изследваните от нас пациенти с UC установихме високи нива

на aCL. В същото време само 3 от тези болни имаха анамнестични данни за тромбоемболични усложнения в миналото, но нивата на aCL при тях не бяха по-високи от 40 U/ml. Известно е, че пациентите с исхемична болест на сърцето, особено във възрастта под 50 г., често имат позитивни IgG aCL [36]. Двама от нашите болни също имаха анамнестични данни за прекаран в миналото миокарден инфаркт – мъж на 72 г. и жена на 53 г.

В серума на болните с UC освен aCL са установени и много други антитела като ANA, ANCA, RF, dsDNA Ab [37], без това да се свързва с определена клинична изява или активност на болестта. Интерес в тази насока представляват данните за по-висока честота на aPL при болните с автоимунен панкреатит без данни за тромбоза [38]. Според нас установяването на aCL при пациенти с UC е по-скоро израз на наличните при това заболяване автоимунни нарушения и увреждане на съдовата стена и не е единствената причина за тромбоемболизъм. Наред с това обаче именно нарушенията в ендотела при наличие и на други протромбогенни фактори, вкл. aPL, биха могли да причинят тромбемболични инциденти при някои пациенти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. J Thrombosis Haemost 2006; 4: 295-306.
2. Aichbichler BW, Petritsch W, Reicht GA, et al. Anti-cardiolipin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1999; 44 (4): 852-856.
3. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. Gut. 2006;55(6):749-753.
4. Harris EN, Ghavari AS, Patel S. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 april 1986. Clin Exp Immunol. 1987; 68: 215-222.
5. Ando K, Mikihiro F, Nomura Y, et al. The incidence risk factors of venous thromboembolism in Japanese in patients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study. Intest Res 2018; 16: 416-4125.
6. Ramagopalan SV, Wotton CS, Handel AE et al. Risk of venous thromboembolism in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record-linkage study. BMC Med 2011; 9: 1-8.
7. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, et al. The incidence ofdeep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. Thromb Haemost 2001;85:430-434.
8. Miehsler W, Reinisch W, Valic E, et al. Is inflammatory boweldisease an independent and disease specific risk factor forthromboembolism? Gut 2004;53:542-548.
9. Zoller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden. Lancet 2012; 379: 244-249.
10. Bernstein CN, Nabalamba A. Hospitalization-based major comorbidity of inflammatory bowel disease in Canada. Can J Gastroenterol. 2007; 21(8): 507-511.
11. Nguyen GC, Sam J. Rising prevalence of venous thromboembolism and its impact on mortality among hospitalized inflammatory bowel disease patients.Am J Gastroenterol. 2008; 103(9):2272-80.
12. Grip O. Inflammatory Bowel Disease Promotes Venous Thrombosis Earlier in Life. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2000; 35:6,619-623.

13. Jackson LM, O'Gorman PJ, O'Connell, et al. Thrombosis in inflammatory Bowel Disease: clinical setting, procoagulant profile and factor V Leiden. QJM 1997; 90:183-188.
14. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, et al. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2004; 99: 97-101.
15. Cervera R, Serano R, Pons-Estel GJ, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during 10-year period: a multicenter prospective study of 1000 patients Ann Rheum Dis doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204838.
16. Николов К, Николова М, Рашков Р, Балева М. Хабитуални аборти и антифосфолипиден синдром при болни със системен лупус еритематозус. Ревматология 2004; 12: 43-45.
17. Монов С, Рашков Р, Алтънкова И, Балева М, Монова Д. Лупусен антикоагулант и други антифосфолипидни антитела при пациенти с невролупус. Ревматология 2005; 13: 74-78.
18. Sherer Y, Livneh A, Levy Y, et al. Dermatomyositisand polymyositis associated with the antiphospholipid syndrome – a novel overlap syndrome. Lupus 2000; 9: 42-46.
19. Pope JE, Thompson A. The frequency and significance of anticardiolipinantibodies in scleroderma. J Rheumatol 2000; 27: 1450-2.
20. Cervera R, García-Carrasco M, Font J, et al. Antiphospholipid antibodies in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 80 patients.Clin Exp Rheumatol. 1997;15:361-5.
21. Николов К, Рашков Р, Коларов Зл, Янкова З и сътр. Антифосфолипидни антитела – значение на определянето на антителата срещу фосфолипиди. Мед преглед 2003; 39 (1): 32-35.
22. Nikolov K, Baleva M, Boyadjian H, et al. Anticardiolipin antibodies in viral hepatitis. Acta med bulg 1999; 26: 9-14.
23. Cervera R, Asherson RA, Acevedo ML, et al. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics of 100 patients. Ann Rheum Dis 2004; 63: 1312-1317.
24. Blank M, Krause I, Magrini L, et al. Overlapping humoral autoimmunity links rheumatic fever and the the antiphospholipid syndrome. Rheumatology 2006; 45: 833-841.
25. Lyman GH. Venous thromboembolism in the patient with cancer: Focus on burden of disease and benefits of thromboprophylaxis. Cancer 2011;117: 1334-1339.
26. Pham C, Shen Y. Antiphospholipid antibodies and malignancy. Hematol Oncol Clin North Am 2008;22:121-30.
27. Zuckerman E, Toubi E, Golan TD, et al. Increased thromboembolic incidence in anti-cardiolipin-positive patients with malignancy. Br J Cancer 1995; 72: 447-451.
28. Canoso RT, de Oliveira RM. Chlorpromazine-induced anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant: absence of thrombosis. Am J Hematol 1988;27:272-275.
29. Merrill JT, Shen C, Gugnani M, et al. High prevalence of antiphospholipid antibodies in patients taking procainamide. J Rheumatol. 1997;24:1083-8.
30. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Soto MJ, et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. Best Pract Res Clin Rheumatol 2008;22:847-61.
31. Sipeki N, Davida L, Palyu E, et al.Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies in Crohn`s disease. World J Gastroenterol 2015; 21 (22): 6952-6954.
32. Koutroubakis IE, Petinaki E, Anagnostopoulou E, et al. Anti-cardiolipin antibodies and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1998; 43:2507-2512.
33. Kraiem I, Hadhri S, Rejeb MB, Ifa L, et al. Antiphospholipid antibodies and procoagulant profile in Tunisians with Inflammatory bowel diseases. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis 2016; 22 (8): 734-742.

34. Chiarantini E, Valanzano P, Liotta AA, et al. Hemostatic abnormalities in inflammatory bowel disease. Thromb Res 1996; 82 (2): 137-146.
35. Cervera R, Piette J-Ch, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome. Clinical and immunologic manifestations and patherns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. Arthr Rheum 2002; 46 (4): 1019-1027.
36. Pastori D, Bucci T, Triggiani M, et al. Immunoglobulin G (IgG) anticardiolipin antibodies and recurrent cardiovascular events. A systematic review and Bayesian meta-regression analysis. Autoimmun Rev 2019 pii: S1568-9972(19)30058-8. doi: 10.1016/j.autrev.2019.03.005.
37. Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, et al. Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophilcytoplasmic antibodies, and other autoantibodies inpatients with ulcerative colitis. Gut 1993; 34:658-664.
38. Zeng X-P, Liu T-T, Hao L, et al. Autoantibody detection is not recommended for chronic pancreatitis: a cross-sectional study of 557 patients. BMC Gastroenterology 2019;19:31.

МЯСТОТО НА КЛЕТЪЧНИЯ ИМУНОЛОГИЧЕН МОНИТОРИНГ В ПЕРСОНАЛИЗИРАНЕ НА ИМУНОСУПРЕСИВНАТА ТЕРАПИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ТРАНСПЛАНТИРАН БЪБРЕК – НАШИЯТ ОПИТ

А. Михайлова, П. Янкова, Ц. Луканов, В. Атанасова, Н. Гешева, С. Лесичкова, Д. Маринова, Е. Наумова

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки,
УМБАЛ „Александровска“,
Медицински факултет, Медицински университет – София

РЕЗЮМЕ

Терапевтичният лекарствен мониторинг е от съществено значение за осигуряване на адекватна доза с максимален терапевтичен и минимални странични ефекти при бъбречна трансплантация. Въпреки това продължава търсенето и на други биомаркери с оглед индувидуализирането на имуносупресивната (ИС) терапия. Целта на настоящото проучване е да анализираме влиянието на ИС терапия върху нейния таргет – имунната реактивност при пациенти с трансплантиран бъбрек, за да преценим доколко промените ѝ могат да подпомогнат по-прецизната оценка на ефекта от терапията в ранния следтрансплантационен период. Изследвани са 94 реципиенти с трансплантиран бъбрек и 29 неродствени здрави индивиди от българската популация. Всички пациенти са били на тройна имуносупресия (такролимус/микофенолат мофетил/стероиди). Клетъчният имунен отговор е определян чрез флоуцитометрично имунофенотипиране на цяла кръв преди (ден 0) и на 7-и, 14-и, 21-ви ден след трансплантацията. Нашите данни показаха значим относителен и абсолютен дефицит на Т-лимфоцити, техните субпопулации и на В-лимфоцити при реципиентите преди трансплантация (ден 0) в сравнение със здравите. За разлика от това NK клетките са сигнификантно повишени по процент, но абсолютните им стойности са в норма. В ранния следтрансплантационен период се наблюдава значимо намаляване на абсолютните стойности на Т-клетките и техните субпопулации на 7-ия ден (Д7) след трансплантацията, последвано от постепенното им увеличаване до 21-вия ден (Д21), но без достигане на стойностите преди трансплантацията. Намаленият абсолютен брой на NK клетките (CD3-CD16/56+) на Д7 не се променя съществено до Д21. Абсолютният брой на В-клетките не търпи промени, но процентът им се повишава и остава по-висок в сравнение с този преди трансплантацията. В заключение, използването на комбиниран подход, включващ терапевтичен ле-

карствен и имунологичен мониторинг в ранния следтрансплантационен период, дава възможност за персонализиране и оптимизиране на имуносупресивната терапия при пациенти с трансплантиран бъбрек.

Ключови думи: бъбречна трансплантация, имунологичен мониторинг, имуносупресивна терапия

Адрес за кореспонденция: Проф. А. Михайлова, Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска", ул. „Св. Г. Софийски" 1, 1431 София, e-mail: mihaylova_ap@abv.bg

THE IMPACT OF CELLULAR IMMUNOLOGICAL MONITORING FOR PERSONALIZATION OF IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY IN KIDNEY TRANSPLANTED PATIENTS – OUR EXPERIENCE

A. Mihaylova, P. Yankova, T. Lukanov, V. Atanasova, N. Gesheva, S. Lesichkova, D. Marinova, E. Naumova

Department of Clinical Immunologyand Stem Cell Bank,
University Hospital "Alexandrovska",
Medical Faculty, Medical University – Sofia

ABSTRACT

Therapeutic drug monitoring is essential to provide an adequate dose with maximum therapeutic and minimal side effects in kidney transplantation. However, additional biomarkers continue to be explored in order to personalize the immunosuppressive therapy (IST).The purpose of this study is to analyze the impact of IST on its target-immune reactivity in kidney transplant patients in order to assess the extent to which its changes can contribute to a more accurate assessment of the effect of therapy in the early post-transplant period. Ninety four kidney transplant recipients and 29 healthy individuals from the Bulgarian population were investigated. All patients received triple IST (tacrolimus, mycophenolate and corticosteroids).The cellular immune response was assessed by immunophenotyping of whole blood before (day 0) and at 7, 14, 21 days post-transplant using combinations of monoclonal antibodies and multicolor flow cytometry (FACSCanto, BD). Our data showed a significant absolute and relative deficiency of T lymphocytes, their subpopulations and B lymphocytes in the patients before transplantation (day 0) in comparison to healthy subjects. On the contrary, NK cells are significantly increased in percentage, but their absolute values are within the reference ranges. In the early post-transplant period, a marked

reduction of absolute values of T cells and their subsets was observed on day 7 (D7) after transplantation followed by a gradual increase until day 21 (D21), but without reaching the pre-transplant values. The decreased absolute number of NK cells (CD3-CD16/56 +) on D7 did not change significantly to D21. The absolute B-cell count does not change significantly, but their percentage increases and remains higher compared to pre-transplant values.In conclusion, the use of a combined approach including therapeutic drug and immunological monitoring in the early post-transplant period allows for personalization and optimization of therapy in kidney transplant patients.

Key words: kidney transplantation, immune monitoring, immunosuppressive therapy

Correspondence: Prof. A. Mihaylova, Department of Clinical Immunology and Stem Cell Bank, University Hospital "Alexandrovska", Medical Faculty, 1 Sv. G. Sofijski Str., 1431 Sofia, e-mail: mihaylova_ap@abv.bg

Значимият напредък в терапевтичната имуносупресия при органна трансплантация доведе до сигнификантно намаляване на честотата на Т-клетъчно медиираните реакции на отхвърляне. В този контекст инхибиторите на калциневрина (протеин фосфатаза, необходима за Т-клетъчното активиране) [1, 2] продължават да бъдат основните имуносупресори в повечето терапевтични протоколи, прилагани при бъбречна трансплантация, независимо от токсичните им ефекти. Това се дължи основно на значимото намаляване на острите реакции на отхвърляне и повишаване на успеваемостта от трансплантацията [3, 4]. Понастоящем такролимусът (ТАК) прогресивно замести циклоспорина и все още е един от най-често предписваните имуносупресивни (ИС) медикаменти в много трансплантационни центрове при бъбречна, чернодробна и панкреасна трансплантация [5, 6, 7] поради значимия му ефект върху предотвратяване на реакциите на отхвърляне. Около 90% от пациентите с трансплантиран бъбрек в България получават комбинация от такролимус и микофенолат мофетил (ММФ). Трябва да се има предвид обаче, че прилагането на такролимус изисква често мониториране и ажустиране на дозата поради неговия метаболизъм и тесен терапевтичен прозорец. Терапевтичният лекарствен мониторинг (ТЛМ) е от съществено значение за осигуряване на адекватна доза с максимален терапевтичен и минимални странични ефекти. Въпреки това продължава търсенето и на други биомаркери с оглед индувидуализирането на имуносупресивната терапия.

В настоящото проучване ние си поставихме за цел да анализираме влиянието на имуносупресивната терапия върху нейния таргет – имунната реактивност при пациенти с трансплантиран бъбрек, за да преценим доколко промените ѝ могат да подпомогнат по-прецизната оценка на ефекта от терапията в ранния следтрансплантационен период.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Пациенти: В проучването са включени 94 реципиенти с трансплантиран бъбрек в периода януари 2015 – май 2018 г. и 29 неродствени здрави индивиди от българската популация, съпоставими по пол и възраст с изследваните болни. Демографските характеристики на пациентите са представени в табл. 1. Всички, включени в проучването индивиди, са подписали информирано съгласие.

Таблица 1. Демографски показатели на пациентите

Показател	**Брой (%) или средна стойност (от-до)**
Възраст (год.) при трансплантацията	43.1 ± 11.7 (21-70)
Пол – Мъже – Жени	 65 (69.15%) 29 (30.85%)
Донор – Жив родствен – Трупен	 16 (17.0%) 78 (83.0%)
Основно бъбречно заболяване – Хроничен гломерулонефрит – Хроничен интерстициален нефрит – Хроничен пиелонефрит – Диабетна нефропатия – Подагрозна нефропатия – Хипертензивна нефропатия – Хроничен нефрозен синдром (неуточнен) – ХБН* (неизяснена етиология) – Бъбречна поликистоза – Рефлуксна нефропатия – Двустранна нефросклероза – Лупусна нефропатия – Вродени аномалии	 38 3 9 6 5 10 5 3 8 3 1 1 2
Анти-HLA антитела преди трансплантация – Клас I – Клас II – Клас I+II	 4 1 2
Тъканна несъвместимост по HLA-A, B, DR, DQ локусите	0-61%

*ХБН – хронична бъбречна недостатъчност

HLA типизирането е извършено с ДНК-базирани методи (PCR-SSP, PCR-SSOP). Степента на HLA съвместимост между донора и реципиента е определяна със съответния програмен продукт на Изпълнителната агенция по трансплантация (ИАТ) на базата на несъвместими HLA-A, B, DR и DQ локусни специфичности.

Хуморалният алоимунен отговор е оценяван чрез изследване наличието на HLA антитела с микросферова флуориметрична технология (Luminex) и съответните китове за скрининг и спецификация на антителата (Lifecodes LifeScreen Deluxe; Single antigen bead solid-phase assay – Lifecodes LSA, Immucor, USA).

Пробата за кръстосана реактивност (кросмач реакция) е извършвана с флоуцитометричен метод съгласно рутинния протокол за кросмач при спешност.

Клетъчният имунен отговор е определян чрез имунофенотипизиране на цяла кръв преди трансплантация (ден 0 – Д0), на 7-и (Д7), 14-и (Д14) и 21-28-и (Д21) ден след трансплантацията с използване на многоцветна флоуцитометрия и разширен панел от моноклонални антитела. Анализът е извършен с флоуцитометър FACSCanto и FACSDiva софтуер (Becton Dickinson, USA). Изследвани са следните клетъчни популации и субпопулации: общи Т (CD3+) клетки; хелперно-индусерни (CD3+CD4+) и супресорно-цитотоксични (CD3+CD8+) Т-клетъчни субпопулации; В (CD19+) и NK (CD3-CD16+56+) клетки; Т-лимфоцити с различни етапи на диференциация и функционални характеристики: ефекторни (цитотоксични и/или паметови Т-клетки – CD8+CD28+), крайно диференцирани клетъчни субпопулации с паметова/ефекторна функция (CD8+CD28-, CD8+CD57+), клетки с цитотоксичен (CD8+CD11b-) и супресорен (CD8+CD11b+) потенциал; активирани Т-клетки (CD3+HLA-DR+, CD8+HLA-DR+ и CD8+CD38+); Т-лимфоцити с NK-подобна активност [NKT клетки – CD3+CD(16+56+)].

Имуносупресивната терапия след бъбречна трансплантация е стандартна тройна комбинация от такролимус, микофенолат мофетил и стероиди.

Статистически анализ

Използвани са параметрични (Student's t test) и непараметрични (Mann-Whitney) методи и софтуер SPSS v16.0 (IBM Corp.) Ниво на доверие $P < 0.05$ е прието за статистически значимо.

РЕЗУЛТАТИ

Сравнителният анализ на изследваните от нас клетки между пациенти и здрави контроли показа значим относителен и абсолютен дефицит на Т-лимфоцити и техните субпопулации (CD3+CD4+, CD3+CD8+), на В-лимфоцити и на цитотоксични ефекторни субпопулации (CD8+CD11b-, CD8+CD28+) при реципиентите преди трансплантация (ден 0) в сравнение със здравите (табл. 2). За разлика от това NK клетките и CD8+CD11b+ субпопулацията са сигнификантно повишени по процент, но абсолютните им стойности са в норма. При болните на хемодиализа (ХД) се установи и намален абсолютен брой на CD8 клетки, експресиращи CD38 активационен маркер (CD8+CD38+) и на крайно диференцираните ефекторни CD57+CD8+ клетки. Стойностите на активираните (CD3+HLA-DR+, CD8+HLA-DR+) и регулаторните (CD8+CD28-) Т-клетки са като тези при здравите контроли.

Таблица 2. Клетъчни популации на бъбречно трансплантирани (преди трансплантацията) и здрави индивиди

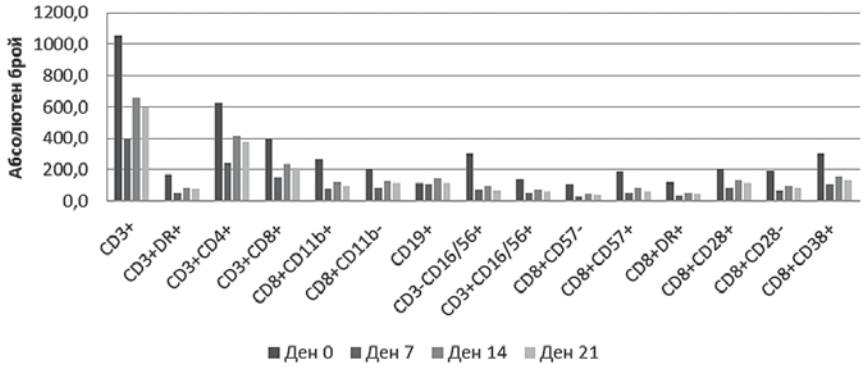
Клетъчни популации %/абс. брой*	**Пациенти** (n = 94)	**Здрави** (n = 29)	**P**
Общи Т-лимфоцити (CD3+)	70.0 ± 9.9 973 ± 457	74.51 ± 6.31 1512 ± 439	< 0.02 < 0.001
Активирани Т-клетки (CD3+HLA-DR+)	10.0 ± 6.9 170 ± 139	9.00 ± 4.74 166 ± 65	> 0.5 > 0.5
Хелперно/индусерни Т-клетки (CD3+CD4+)	42.0 ± 8.6 576 ± 287	46.08 ± 6.64 965 ± 313	< 0.01 < 0.001
Супресорно/цитотоксични Т-клетки (CD3+CD8+)	25.0 ± 7.8 349 ± 213	29.76 ± 5.97 624 ± 167	< 0.01 < 0.001
CD4/CD8 ratio	1.6 ± 0.7	1.65 ± 0.48	> 0.5
В-клетки (CD19+)	7.0 ± 3.9 115 ± 71	9.24 ± 2.81 192 ± 82	< 0.01 < 0.001
NK клетки (CD3-CD16/56+)	18.0 ± 10.5 238 ± 207	14.00 ± 6.41 289 ± 149	< 0.02 > 0.5
NKT клетки (CD3+CD16/56+)	8.0 ± 4.5 120 ± 86	6.56 ± 4.68 137 ± 113	> 0.5 > 0.5
CD57+CD8- клетки	5.5 ± 4.1 106 ± 89	5.30 ± 3.77 115 ± 99	> 0.5 > 0.5
CD57+CD8+ клетки	12.0 ± 5.8 147 ± 124	12.74 ± 6.20 267 ± 151	> 0.5 < 0.001
CD8+CD11b+ клетки	17.0 ± 6.6 228 ± 154	10.71 ± 4.09 220 ± 104	< 0.001 > 0.5
CD8+CD11b- клетки	13.0 ± 5.3 180 ± 117	19.30 ± 6.10 388 ± 138	< 0.001 < 0.001
CD8+CD28+ клетки	13.0 ± 4.9 176 ± 111	17.34 ± 3.80 340 ± 115	< 0.001 < 0.001
CD8+CD28- клетки	12.5 ± 6.2 187 ± 120	12.58 ± 5.89 245 ± 141	> 0.5 > 0.5
CD8+CD38+ клетки	19.5 ± 7.0 263 ± 162	21.70 ± 7.04 425 ± 123	> 0.5 < 0.001
Активирани (CD8+HLA-DR+) клетки	7.0 ± 5.2 120 ± 97	6.78 ± 4.14 132 ± 70	> 0.5 > 0.5

* клетки/мкл

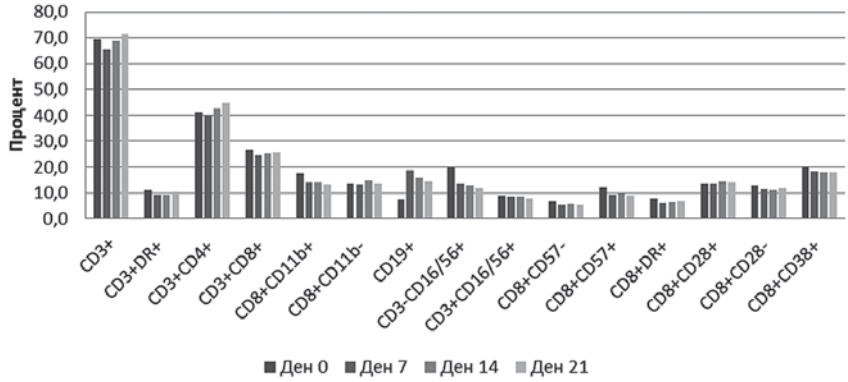
Проследяването на клетъчния имунен статус на реципиентите в ранния следтрансплантационен период показа по-силно изразени промени в абсолютния (клетки/мкл) в сравнение с относителния (%) брой на клетъчните популации. Те се изразяват в сигнификантно намаление на абсолютните стойности на Т-клетките на 7-ия ден (395 ± 310 vs. 973 ± 457; p < 0.001)

след трансплантацията, последвано от постепенното им нарастване до 21-ия ден (593 ± 539 кл/мкл), но оставащи значимо по-ниски в сравнение с изходните ($p < 0.001$) (фиг. 1), като не се установяват съществени различия ($p = 0.454$) между Д14 и Д21. Подобна е и динамиката на двете основни Т-клетъчни субпопулации – CD3+CD4+, CD3+CD8+, на CD8+CD11b+, CD8+CD11b-, CD8+CD28+ и CD8+CD28- клетки, както и на активираните Т-клетки (CD3+HLA-DR+, CD8+HLA-DR+, CD8+CD38+). NK клетките (CD3-CD16/56+) също намаляват значимо по абсолютен брой на Д7 (51 ± 52 vs. 238 ± 207; $p < 0.001$), но не се променят съществено до Д21 (60 ± 60 кл/мкл, Д7 vs. Д21 кл/мкл – $p = 0.852$). NKT (CD3+CD16/56+), крайно диференцираните ефекторни (CD57+CD8+) и CD57+CD8- клетки следват същия ход на промени. За разлика от горепосочените клетъчни популации абсолютният брой на В-лимфоцитите не търпи значими промени в ранния следтрансплантационен период.

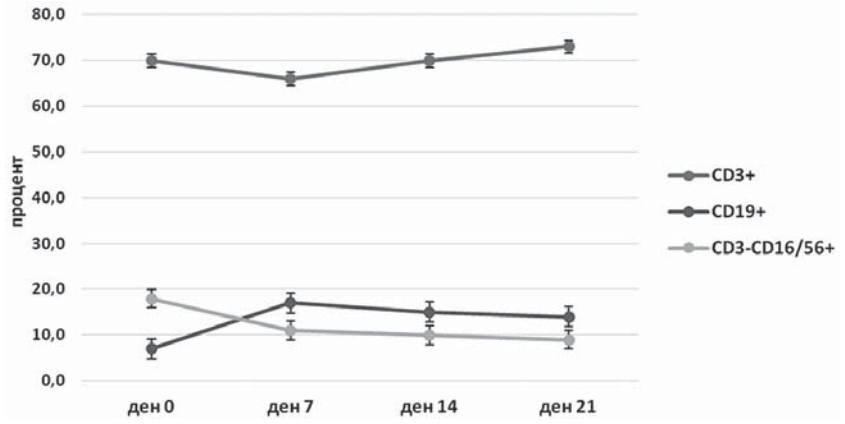
Отклоненията в относителния брой варират за различните клетъчни субпопулации. Процентът на Т-лимфоцитите (CD3+) намалява на 7-ия ден след трансплантацията, но на 14-ия ден се възстановява до изходните стойности, а на 21-вия ден става по-висок от този на Д0 и е съпоставим с процента при здравите (73.0 ± 9.9 vs. 74.51 ± 6.31). Тази динамика в общите Т-лимфоцити се дължи на промени основно в хелперно-индусерната им субпопулация (CD3+CD4+), която на Д21 достига по-високи от изходните относителни стойности (46.0 ± 11.3 vs. 42.0 ± 8.6; $p = 0.02$; фиг. 2). Като резултат към 21-вия ден CD4/CD8 индексът (фиг. 5) е с тенденция към по-вискоки стойности (1.9 ± 0.9 vs. 1.6 ± 0.7). Най-изразени промени се наблюдават при В-клетките, чийто процент се повишава значително на 7-ия ден след трансплантацията (17.0 ± 9.4 vs. 7.0 ± 3.9; $p < 0.001$), след което се наблюдава тенденция към намаляване (Д14 – 15.0 ± 6.7; Д21 – 14.0 ± 6.0), но остава по-висок в сравнение с този преди трансплантацията (фиг. 2, 3). Тази динамика се отразява върху абсолютните им стойности, чието намаляване не е значимо в сравнение с тези на Т-клетъчните популации и субпопулации (фиг. 1, 4). За разлика от В-лимфоцитите относителните стойности на NK клетките (11.0 ± 8.8%, фиг. 3), крайно диференцираните ефекторни (CD8+CD57+) клетки (8.0 ± 5.4%) и CD8+CD11b+ клетки със супресорно-ефекторен потенциал (8.0 ± 5.4%) намаляват сигнификантно на 7-ия и остават непроменени до 21-вия следтрансплантационен ден (фиг. 2). Не се установяват съществени промени в процента на цитотоксичните ефекторни субпопулации (CD8+CD28+, CD8+CD11b-), на регулаторните CD8+CD28- клетки и на Т-клетките с NK-подобна активност (фиг. 2). С тенденция към намаляване е процентът на клетките, експресиращи активационни маркери.



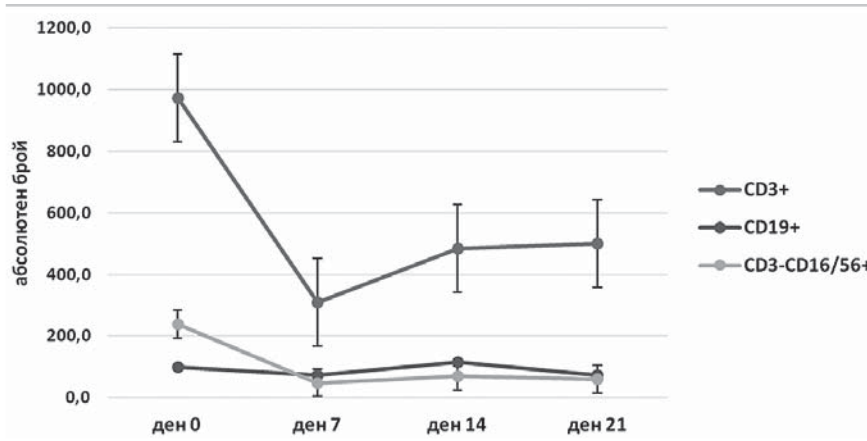
Фиг. 1. Промени в абсолютните стойности на изследваните клетъчни популации и субпопулации в ранния следтрансплантационен период



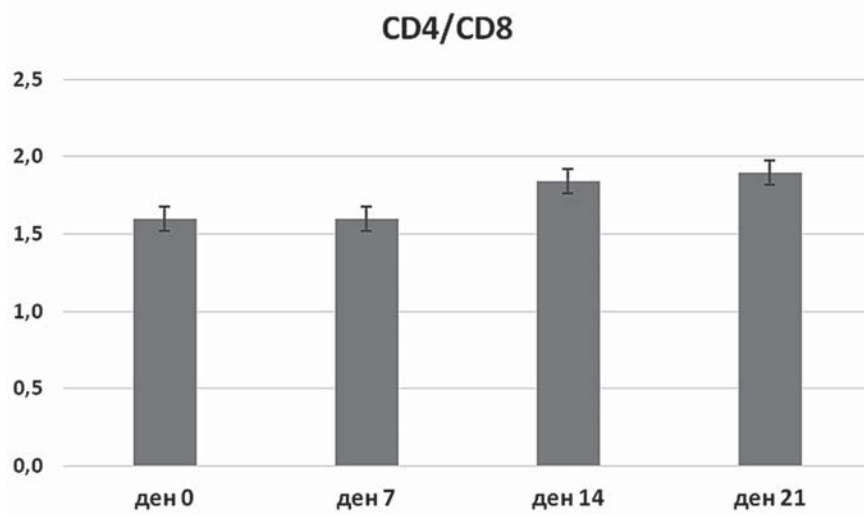
Фиг. 2. Промени в процентите на изследваните клетъчни популации и субпопулации в ранния следтрансплантационен период



Фиг. 3. Динамика на относителните стойности на Т (CD3+), В (CD19+) и NK (CD3-CD16/56+) клетки



Фиг. 4. Динамика на абсолютния брой на Т (CD3+), В (CD19+) и NK (CD3-CD16/56+) клетки



Фиг. 5. Промени в имунобиологичния индекс в ранния следтрансплантационен период

При 7 реципиенти са открити недонор-специфични HLA антитела преди трансплантацията (при 4 срещу HLA клас I, при 1 срещу клас II и при 2 срещу клас I+II антигени), които персистират и в ранния посттрансплантационен период. При 3-ма трансплантирани е установена de novo продукция на алоантитела след трансплантацията. При един от тях тези антитела са недонор-специфични, насочени към HLA клас I и II антигени. При другите двама пациенти се установи както донор-специфична, така и недонор-специфична хуморална алореактивност срещу HLA клас II специфичности.

ОБСЪЖДАНЕ

В продължение на много години инхибиторите на калциневрина са формирали гръбнака на имуносупресивната терапия за предотвратяване на отхвърлянето на алографта след трансплантация на бъбрек, а такролимусът е изборът за повечето пациенти [8-11]. Независимо от регулярния терапевтичен лекарствен мониторинг индивидуализирането на дозите и достигането на адекватни лекарствени нива отнема дни до седмици поради влиянието на допълнителни фактори като прилагането и на други медикаменти, и промените във физиологията на трансплантирания пациент. Индивидуализирането на имуносупресивната терапия е изключително важно за постигане на оптимален баланс между риска от отхвърляне и риска от усложнения. За оптимизиране на имуносупресорната терапия е необходимо, от една страна, да се разберат факторите, които допринасят за вариабилността на терапевтичния отговор, а от друга – да се потърсят допълнителни биомаркери за оценка на ефекта от нея. В тази насока обещаваща стратегия за преодоляване ограниченията на традиционния ТЛМ може да бъде определянето на промените в имунните клетъчни популации в резултат на биологичните ефекти на ИС. Ето защо ние използвахме разширен панел от стандартизирани и общодостъпни имунологични биомаркери, за да мониторираме различните имунологични параметри през първия месец след бъбречна трансплантация и да оценим доколко те могат да подпомогнат ТЛМ в модулиране на дозата на ИС терапия в ежедневната клинична практика. За целта изследвахме имунокомпетентните клетъчни популации и субпопулации и хуморалния алоимунен отговор непосредствено преди и на 7-и, 14-и и 21-ви ден след бъбречната трансплантация. Поради това че има значителен брой публикации, показващи промени в имунния отговор при пациенти на хемодиализа, като първа стъпка съпоставихме клетъчния имунен отговор на реципиентите преди трансплантация (Ден 0) с този на здрави лица. Настоящите ни данни показаха намален брой на Т-лимфоцити, CD4+ и CD8+ Т-клетъчни субпопулации и В-клетки при пациенти на ХД в сравнение със здравите, което е установено в по-голямата част от изследванията [12, 13, 14, 15, 16] и в предходни наши проучвания [17]. За разлика от значимо намалените NK клетки, докладвани от T. Eleftheriadis и сътр. [18] и M.I. Fuhro и сътр. [19] при болни с терминална ХБН, ние установихме сигнификантно повишени относителни NK клетъчни стойности при изследваните от нас пациенти. Във връзка с това е уместно да посочим съобщението на F. F. Xiang и сътр. [20], според които имунните нарушения започват в ранните стадии на ХБН, а намалението на В-клетките и повишението на NK клетките са свързани с по-бързо прогресиране на нарушената бъбречна функция и достигане до терминална бъбречна недостатъчност. В допълнение, нашите резултати показаха дефицит (процент и абсолютен брой) на цитотоксични ефекторни субпопула-

ции (CD8+CD11b-, CD8+CD28+), както и понижени абсолютни стойности на активирани CD8+CD38+ и на крайно диференцираните ефекторни CD57+CD8+ клетки при реципиентите преди трансплантация. Видно е, че пациентите с терминална ХБН имат дисфункционална имунна система, проявяваща се в нарушения както във вродения, така и в придобития имунен отговор. Така изследването на клетъчния имунен статус преди трансплантация, се очертава като подход за подпомагане на персонализирането на имуносупресията.

Данните за промени в имунокомпетентните клетъчни популации и ефекта на ИС терапия при органна трансплантация в ранния следтрансплантационен период са ограничени, поради факта че индивидуализирането на ИС терапия се основава главно на ТЛМ. Освен това основните проучвания са фокусирани върху регулаторните Т-клетки (Tregs – CD4+CD25+FoxP3+), които имат съществена роля в индуцирането на толеранс. В настоящото проучване ние се опитахме да направим комплексна оценка на имунната реактивност при бъбречно трансплантирани в първия месец след трансплантацията. Нашите данни показаха значимо намаляване на абсолютния брой на Т-клетки, техните субпопулации и NK клетки след трансплантацията, като редукцията е най-изявена на 7-ия ден, а стойностите остават по-ниски от изходните до края на първия месец. Подобни находки са описани при лекувани с ТАК пациенти с чернодробна трансплантация, при които дефицитът е най-силно изразен на 3-тия следтрансплантационен ден, но с последващо бързо възстановяване до 7-ия ден [21]. Намаляването на активираните Т-клетки при нашите реципиенти можем да обясним с факта, че ТАК селективно инхибира свързаната с IL-2 Т-клетъчна активация [22]. Една от клетъчните популации, считана за важна при органна трансплантация поради имунорегулаторните ѝ супресорни функции, са CD8+CD28- Т-клетки. Предполага се, че неефективна инхибиция на тези клетки от ИС медикаменти може да има благоприятен ефект за преживяемостта на присадката след трансплантация [23]. Нашите резулати показват, че през първия месец след трансплантацията тази клетъчна популация намалява по абсолютни стойности поради лимфопенията, но не търпи сигнификантни промени в относителния брой. Известно е, че основният биологичен ефект на ТАК в Т-клетките е калциневриновият път, в който нуклеарният фактор на активираните Т-клетки (NFATc1) е един от най-важните сигнални протеини [24], но ефектът на този ИС върху NFATc1 амплификацията е все още неясен. Има данни, че ТАК базираната терапия няма ефект върху амплификацията на NFATc1 в CD28- клетки, което е потвърждение, че те са по-малко чувствителни на ИС медикаменти, вероятно поради по-ниската експресия на нуклеарния фактор в ядрата им [25]. Същите автори подчертават, че по-високите дози на ТАК могат да доведат до намаляване на NFATc1 амплификацията, но

едновременно с това инхибират CD28- Т-клетки, което е основание за проследяването на CD8+CD28- клетки след трансплантация с оглед балансиране на ефекта от терапията. В нашето проучване установихме повишение на относителните стойности на В-клетките, но абсолютният им брой не търпи значими промени. Динамичните промени в В-клетъчните субпопулации при бъбречна трансплантация все още са слабо разбрани. Имуносупресивната терапия може да повлияе на пропорциите на различните В-клетъчни субпопулации в периферната кръв на пациентите непосредствено след бъбречна трансплантация. Нашите резултати са в съответствие с тези на V. Svachova и сътр. [26], които наблюдават повишаване на общата популация на В-лимфоцитите през първата седмица след бъбречна трансплантацията при пациенти, лекувани с ТАК в комбинация с МФМ и КС. Същите автори установяват, че периферните кръвни прекурсори на плазматичните клетки (плазмобласти) са даунрегулирани през първата седмица след трансплантацията. Освен това има данни, че тяхната диференциация е потискана in vitro чрез инхибитори на калциневрина, включително такролимус [27]. Тези находки са в подкрепа на нашите резултати от хуморалния алоимунен отговор, демонстриращи липса на de novo синтез на донор-специфични анти-HLA антитела при почти всички (92/94) пациенти в първия месец след трансплантацията.

В заключение, използването на комбиниран подход, включващ терапевтичен лекарствен и имунологичен мониторинг в ранния следтрансплантационен период, дава възможност за персонализиране и оптимизиране на терапията при пациенти с трансплантиран бъбрек.

Благодарности: Настоящото проучване е подпомогнато от проект ДН13/13/20.12.2017, МОН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wallemacq P, Goffinet JS, O'Morchoe S, et al. Multi-site analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT tacrolimus assay. Ther Drug Monit. 2009;31(2):198-204.
2. McShane AJ, Bunch DR, Wang S. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressants by liquid chromatography–mass spectrometry. Clin Chim Acta. 2016;454:1-5.
3. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tarolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. Transplantation 1998; 66(12): 1736-40.
4. Vanhove T, Annaert P, Kuypers DRJ. Clinical determinants of calcineurin inhibitor disposition: a mechanistic review. Drug Metabolism. Rev. 2016,48:88.
5. Port FK, Dykstra DM, Merion RM, Wolfe RA. Trends and results for organ donation and transplantation in the United States, 2004. Am J Transplant. 2005;5(4 Pt 2):843-849.

6. Gounden V, Soldin SJ. Tacrolimus measurement: building a better immunoassay. Clin Chem. 2014;60(4):575-576.
7. Ekberg H. Calcineurin inhibitor sparing in renal transplantation. Transplantation 2008; 86(6): 761-7.
8. Andreoni KA, Brayman KL, Guidinger MK, et al. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1996-2005. Am J Transplant. 2007;7:1359-75.
9. Bia M, Adey DB, Bloom RD, et al. KDOQI US commentary on the 2009 KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. Am J Kidney Dis. 2010;56(2):189-218.
10. Baker R, Jardine A, Andrews P. Renal Association clinical practice guideline on post-operative care of the kidney transplant recipient. 2011. http://www.renal.org/guidelines/modules/post-operative-care-of-the-kidney-transplant-recipient#sthash.os51dKSI. YEhzIzOT.dpbs. Accessed 13 Oct 2014.
11. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. Am J Transplant. 2009;9(Suppl 3):S1-155.
12. Cavaillon JM, Poignet JL, Fitting C, Delons S. Serum of interleukin-6 in long-term hemodialysis patients. Nephron. 1991;60:307-13.
13. Ueki Y, Nagata M, Miyake S, Tominaga Y. Lymphocytes subsets in hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. J Clin Immunol. 1993;13:279-87.
14. Hasbold J, Gett AV, Rush JS et al. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Immunol Cell Biol. 1999;77:516-22.
15. Borges A, Borges M, Fernandes J et al. Apoptosis of peripheral CD4(+) T-lymphocytes in end-stage renal disease patients under hemodialysis and rhEPO therapies. Ren Fail. 2011;33:138-43.
16. Molina M, Allende LM, Ramos LE et al. CD19+ B-Cells, a New Biomarker of Mortality in Hemodialysis Patients. Front Immunol. 2018 Jun 15;9:1221. doi: 10.3389/fimmu.2018.01221. eCollection 2018.
17. Наумова, Е. Имунологични проучвания за бъбречна трансплантация и в ранния следтрансплантационен период. Автореферат, София, Медицинска академия, 1990.
18. Eleftheriadis T, Kartsios C, Yiannaki E, et al. Decreased CD3+CD16+ natural killer-like T-cell percentage and zeta-chain expression accompany chronic inflammation in haemodialysis patients. Nephrology (Carlton). 2009 Aug;14(5):471-475.
19. Fuhro MI, Dorneles GP, Andrade FP et al. Acute exercise during hemodialysis prevents the decrease in natural killer cells in patients with chronic kidney disease: a pilot study. Int Urol Nephrol, 2017, DOI 10.1007/s11255-017-1747-z
20. Xiang FF, Zhu JM, Cao XS, et al. Lymphocyte depletion and subset alteration correlate to renal function in chronic kidney disease patients. Ren Fail, Early Online: 1-8, 2015 Taylor & Francis. DOI: 10.3109/0886022X.2015.1106871
21. Iovino L, Taddei R, Bindi ML et al. Clinical use of an immune monitoring panel in liver transplant recipients: A prospective, observational study. Transpl Immunol, 2019,52:45-52.
22. Ponseti JM, Azem J, Fort JM, et al. Benefits of FK506 (tacrolimus) for residual, cyclosporin- and prednisone-resistant myasthenia gravis: one-year follow-up of an open-label study. Clin Neurol Neurosurg 2005;107:187-90.
23. Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 negative T cells: is their loss our gain? Am J Transplant. 2014; 14(11):2460-6.

24. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. Nat Rev Immunol. 2005; 5 (6):472-84.
25. Kannegieter NM, Hesselink DA, Dieterich M et al. Analysis of NFATc1 amplification in T cells for pharmacodynamic monitoring of tacrolimus in kidney transplant recipients. PLoS ONE 2018,13(7): e0201113. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0201113
26. Svachova V, Sekerkova A, Hruba P, et al. Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection. Transpl Int. 2016 May;29(5):540-548.
27. De Bruyne R, Bogaert D, De Ruyck N, et al. Calcineurin inhibitors dampen humoral immunity by acting directly on naive B cells. Clin Exp Immunol 2015; 180: 542.

НАГРАДИ И СТИПЕНДИИ ОТ БАКИ ЗА УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

АКЦЕНТИ ОТ ПЕТИЯ ЕВРОПЕЙСКИ КОНГРЕС ПО ИМУНОЛОГИЯ

Е. Куртева

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София

Петият европейски конгрес по имунология, **5th European Congress of Immunology (ECI 2018)**, се проведе от 2-ри до 5-и септември, в Амстердам, Холандия. Конгресът протече под надслов “изграждане на мостове” както между имунолозите от цял свят, така и в посока засилване на интердисциплинарната колаборация с генетици и клиницисти, с цел успешно внедряване на разработки от базисната наука в клиничната имунодиагностика и имунотерапия. Ключовите лекции на Конгреса обхванаха класически теми като: “Co-ordination of the local and systemic immune response to infection and injury”, “T-cell metabolism”, “Serendipities of acquired immunity”, обогатени с най-новите достижения в съответната област и пречупени през призмата на водещи изследователи като носителя на Нобеловата награда за физиология и медицина за 2018 г. Tasuku Honjo, Judi Allen, Adrian Liston. В същото време изключителен интерес предизвикаха две иновативни концепции по актуални и интензивно изследвани сфери: “Centrosomes and exosomes: molecular pacemakers of immune synapse and T cell activation” на Francisco Sánchez и “The unsuspected role of gut microbiota in cancer therapy”, представена от Laurence Zitvogel, носител на престижната награда на ESMO Immuno-Oncology Award, 2017. Организаторите предоставиха три обучителни сесии в рамките на Конгреса. Първата бе с акцент върху обработката и анализа на “big data” в имунологията, като бяха представени практически подходи за успешно разбиране и обобщаване на огромното количество натрупана информация в базите данни по отношение на десетките хиляди молекули, свързани помежду си в комплексни мрежи, и тяхното отражение върху равновесната система здраве/болестно състояние. Втората обучителна сесия бе посветена на приложението на различните теории, възприети от съвременната имунологична наука, при оформянето на научна хипотеза за построяване и провеждане на експериментални постановки, чиито резултати формират разбирането ни за имунната система. Сесията обхвана „валидационната теория в имунологията“, теорията за „две ниши на Т-клетъчната памет“, „равновесния модел в имунитета“ и „дисконтинуитетната теория за имунитета“. Тема на третата обучителна сесия бе имунологията на екстрацелуларните везикули, с акценти:

изолиране и детекция на екстрацелуларни везикули, тяхната роля по отношение имунния отговор и значението им за процесите на остро и хронично възпаление.

Конгресът предложи голямо разнообразие от уъркшопи, обособени в пет големи сесии. Сесия А бе с акцент върху "Развитие и стареене на имунната система от люлката до гроба", "Имуномониторинг и биомаркери", "Герминативни центрове и В-клетъчна диференциация", "Инициация на имунния отговор", както и върху "Научените уроци от генетичните дефекти". По последната тема бяха представени следните актуални и силно дискутирани разработки: „В-клетъчна CLIP регулация, асоциирана с дебют на мултиплена склероза и ръководена от рисковия за развитие на автоимунитет алел CLEC16A"; "Дефект в Th-17 клетъчнатата специфична миграция осигурява протекция от развитието на експериментален енцефаломиелит при DOCK8-дефицитни мишки"; "Съвпадение на нововъзникнала NFKB1 мутация при пациент с Crohn-асоцииран NOD2 рядък вариант може да обясни фенотипната изява на общ вариабилен имунодефицит (CVID) с необичайно тежки стомашно-чревни прояви". Сесия В бе фокусирана върху ваксини и имунотерапия при туморни заболявания, Т-клетъчна регулация, Т-клетъчна активация и изчерпване. Сесия С бе изключително обширна и обхвана "Поддържане на локалната имунорегулация и тъкан-специфичен имунитет"; "Имунен сигналинг и терапия при автоимунитет"; "Трансплантационна имунология"; "Алергия, астма и терапия"; "Вроден контрол на възпалението и тъканната репарация". Участието на Лабораторията по клинична имунология (ЛКИ) бе изцяло насочено към автоимунитета, поради което основна сфера на интерес бе сесията, посветена на имунния сигналинг и терапията в автоимунитета. Тя бе тематично разделена на: "Сигналинг в автоимунитета", "Невроинфламаторни заболявания", "Патофизиология на автоимунните заболявания" и "Терапия на автоимунните болести", като в последната имаше и българско участие. Доц. д-р Андрей Чорбанов от Института по микробиология към БАН представи орална презентация на тема "Suppression of autoreactive T and B lymphocytes by selective therapy in humanized murine SCID model of systemic lupus erythematosus".

Сесия D бе посветена на значението на микробиома и различни метаболити за имунната система, вродени лимфоидни клетки и нови подходи във ваксинологията. Теми на сесия Е бяха визуализация на имунния отговор, междуклетъчна комуникация и сигналинг, както и подходи за успешно боравене с "big data" – от единични клетки до ниво популационна динамика.

Постерът, който бе представен от екипа на ЛКИ, бе в рамките на постерната сесия "Имунен сигналинг и терапия при автоимунитет". Разработката на тема „Adipose-derived mesenchymal stem cells alter the Th17/Tregs axis in patients with rheumatoid arthritis yet not in patients with systemic sclerosis – preliminary data" е резултат от съвместната работа на екипа на ЛКИ и Клиниката по ревматология на

УМБАЛ "Свети Иван Рилски", София. Изследвано бе влиянието на среда от мезенхимни стволови клетки, изолирани от мастна тъкан, върху Th17 и Т-регулаторни лимфоцити в периферна кръв от пациенти с ревматоиден артрит и прогресивна системна склероза.

По отношение на системните автоимунни ревматични заболявания бе реализирана съвместна сесия с водещи експерти от Европейската лига за борба с ревматизма, EULAR. Timothy Radstake, един от големите експерти в областта на системните колагенози, представи иновативната идея за молекулярна рекласификация на имуномедиираните инфламаторни заболявания като успешен подход по пътя на внедряване на персонализираната медицина в клиничната практика. Andrea Cerutti припомни на аудиторията "забравените антитела на чревната мукоза: IgM и IgA2", а Martha Alarcon-Riquelme обхвана в своята презентация нов подход за стратификация на пациентите със системен лупус еритематодес.

Участието в този престижен научен форум бе ценна възможност за екипа на ЛКИ да представи на европейско и световно ниво разработка, пряко свързана с научната насоченост на лабораторията, както и представляваща обект на дисертационния труд на д-р Екатерина Куртева по актуална тематика в сферата на системните ревматични заболявания. Освен това конгресът даде благодатна възможност както за обогатяване на теоретичните познания по актуални имунологични въпроси, така и за активна дискусия и обмяна на опит, а и отвори врати към "създаване на мостове" за бъдеща колаборация в международен план, каквото бе и мотото на събитието.

ВПЕЧАТЛЕНИЯ ОТ ПЕТИЯ НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ И НАЦИОНАЛНИЯ КОНГРЕС ПО РЕВМАТОЛОГИЯ – МОСТ МЕЖДУ ДВЕ ДИСЦИПЛИНИ

Г. Василев

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София, Катедра по клинична имунология, Медицински университет – София

През изминалата 2018 г. имах възможност да взема участие и да сравня две от големите национални научно-клинични събития. Едното от тях бе с изцяло клинична насоченост: Националният конгрес по ревматология, а другият – Петият национален конгрес по клинична имунология, провел се от 25 до 28 октомври 2018 г., бе фокусиран върху представяне на актуалните новости, засягащи фундаментални имунопатогенетични механизми, както и върху инкорпорирането на новите достижения в клиничната практика, с цел създаване на нови стратегии за терапевтично повлияване. Настоящият материал няма за цел да преразказва и пресъздава съдържанието на съответните научни събития, а да ориентира, да съпостави и да даде някои бъдещи насоки. В Националния конгрес по ревматология взех участие с 15-минутен пленарен доклад на тема „Влияние на мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан върху Th17 и Treg, добити от пациенти с ревматоиден артрит“, обобщаващ в голяма степен част от резултатите на работата по моя дисертационен труд. В Петия национален конгрес по имунология участвах в постерната сесия с постерна презентация на тема „Имуносупресивен ефект, осъществяван от среди от мезенхимни стволови клетки върху моноцити, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит“. И двете презентации на нашия екип предизвикаха силен интерес с въпроси и дискусии относно клиничното приложение и базовите механизми на имуносупресия, които впоследствие продължиха в кулоарите на конференцията.

И двете научно-клинични събития се характеризираха със засилено международно участие, присъстваха световно признати научни авторитети, експерти и гост-лектори, като това забележимо бе по-изразено на Петия национален конгрес по имунология. Засиленият чуждестранен интерес демонстрира по недвусмислен начин значението и отзвука на въпросните научни форуми. Официален работен език на Петия национален конгрес по имунология беше английският, като това засягаше както пленарните доклади, така и участието в постерната сесия и всички възникващи дискусии. На Националния конгрес по ревматология се допускаше изнасянето на презентациите и докладите както на български, така и на английски. Изборът за английски като работен език на Петия национален конгрес по

имунология допринесе за подобряване на комуникацията с чуждестранните гост-лектори и улесни значително преноса на идеи, както и допринесе за утвърждаване на научния форум в международен план. В не по-малка степен помогна и за осъществяването на нови контакти с цел бъдеща научна колаборация, като това отново бе по-силно изразено на Националния конгрес по имунология точно поради по-засиленото чуждестранно участие и правилния избор на работен език.

Пленарните сесии и на двата конгреса се отличиха с изключително високо научно ниво и напълно отговориха на изискванията на присъстващите клинични имунолози и ревматолози, свидетелство за което бяха продължителните дискусии и въпроси от страна на публиката. В програмата на Конгреса по ревматология акцентът се падна на затвърждаването на терапевтични стратегии и консенсуси, засягащи лечението на системните автоимунни заболявания, а частта, свързана с представянето на нови средства за терапевтично повлияване, беше сравнително съкратена. От друга страна, на Конференцията по имунология представянето на нови терапевтични подходи и стратегии за лечение бе залегнало като основен топик, пример за което бяха презентаците на Любомир Арсениев (Германия) и Juan Ballesteros (Испания), засягащи инкорпорирането на новите подходи: Т-клетъчен химерен антигенен рецептор (CAR T-cell) и НК клетъчно базирани терапии при лечението на хематологични неоплазии. Много добро впечатление направи перфектната организация на Конгреса по имунология и наличието на пет постерни сесии, като всеки участник имаше 10 минути, за да представи своя постер пред тричленна комисия, задължително включваща и чуждестранен гост-лектор. Впоследствие най-добре представилите се бяха наградени. Постерната сесия послужи като подходящо поле за изява на млади учени или за представяне на проекти в начална фаза, непокриващи изискванията за орална презентация или пленарен доклад.

Не на последно място по важност беше и засиленото участие на млади докторанти, специализанти и дипломанти както лекари, така и биолози на Националния конгрес по имунология, кореспондиращо с актуалността и растящия интерес към имунологичната наука.

В заключение, и двата конгреса бяха организирани на високо ниво, подобно на водещи международни научни форуми в сферата на двете дисциплини, и недвусмислено отвориха врата за изграждане на бъдещи успешни модели за международна колаборация.

ПРОЛЕТНО УЧИЛИЩЕ ЗА ПЪРВИЧНИ ИМУННИ ДЕФИЦИТИ В KUTNA HORA, ЧЕХИЯ, 26-28 АПРИЛ 2018 Г.

С. Лесичкова

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки,
УМБАЛ „Александровска“ – София

Благодарение на стипендията, получена от Българската асоциация по клинична имунология, имах възможността да участвам в пролетно училище за първични имунни дефицити в Kutna Hora, Чехия, 26-28 април 2018 г. Традиционно такова училище се организира всяка година в Република Чехия от проф. Anna Sediva, под патронажа на фондация Jeffrey Modell. Целта на мероприятието е да бъдат представени и дискутирани интересни от диагностична и терапевтична гледна точка клинични случаи на първични имунни дефицити от различните ПИД центрове в Европа. Присъстваха 20 участници от седем европейски държави. Презентациите бяха разпределени в три дни. В първия ден имаше тържествено откриване от домакините в лицето на проф. Anna Sediva и уводна лекция „NGS in the diagnosis of PID”, Sinisa Savic, UK. През втория ден презентациите бяха разделени в три сесии: ПИД на вродения имунитет, дефицити, засягащи имунната дисрегулация, автоимунни усложнения при хуморални имунни дефицити (CVID и селективен IgA дефицит). В рубриката на имунните дефицити, засягащи вродения имунитет, особено голям интерес предизвикаха клиничен случай на тип 1 интерферонопатия, представен от S. Kasinskaite, Литва, и случай на хронична кожно-лигавична кандидоза и ролята на Th17 клетките в патогенезата и диагностиката на тези дефицити. По темата за имунни дефицити, дължащи се на имунна дисрегулация, бяха представени следните актуални и силно дискутирани разработки: „IL-10 deficiency”, M. Zeleskova, Словакия, и „Лимфопролиферация при пациент с общ вариабилен имунен дефицит”, J. Gabzdilova, Словакия. Изключително полезни в клинико-терапевтично отношение бяха темите в третата рубрика за автоимунни компликации при пациенти с ПИД. Бяха презентирани четири случая на пациенти с CVID и селективен IgA и развитие на автоимунни усложнения (IBD, цитопении). Обучителната сесия през втория ден бе посветена на комбинираните имунни дефицити (CID) и други добре дефинирани имунни дефицити. Истинско диагностично предизвикателство беше представеният клиничен случай „Рибозомални дефекти при ПИД”, E. Shuayb, UK. Изключително любопитен и интересен беше клиничен случай на Wiskott-Aldrich syndrome и IgG4-свързано заболяване. Бяха представени случаи на RAG1 и Artemis дефицити с атипичен фенотип, при които се подчерта основната роля на генетичната диагностика.

Заключителната лекция беше изнесена от проф. Anna Sediva на изключително актуална тема – SCID screening, чрез който в неонаталния период се извършва ранна диагностика на тежки комбинирани имунни дефицити (SCID) и последващо адекватно терапевтично поведение.

Нашето участие беше в сесията за ПИД, засягащи вродения имунитет, с представянето на клиничен случай на 21-годишен пациент с Х-свързана хронична грануломатозна болест (ХГБ). Представеният случай показва постигане на добро клинично състояние с приложение на продължителна антибактериална профилактична и регулярна терапия (вкл. гама-интерферон). До навършване на пълнолетие пациентът е лекуван и проследяван в Клиниката по педиатрия и генетични болести на УМБАЛ ”Св. Георги” – Пловдив, след което от март 2017 г. проследяването му продължава в Клиниката по клинична имунология с банка за стволови клетки на УМБАЛ “Александровска” и Експертния център за ПИД. Понастоящем качеството и продължителността на живота на пациентите с ХГБ са значително подобрени. Въпреки това нерядко настъпват животозастрашаващи усложнения или те са първа проява и повод за диагностицирането на ХГБ, особено в ранната детска възраст. Повишената информираност на медицинската общност прави диагностицирането все по-възможно. Тук е мястото и на съответните експертни центрове, съществуващи и в България, за специализирана диагностика и лечение на такива пациенти. Случаят е пример за добра колаборация и приемственост между педиатри и клинични имунолози, работещи в двата експертни центъра за ПИД в България.

Участието в такива форуми води до по-добро познаване на характерните клинико-лабораторни прояви и възможни усложнения. Това улеснява поставянето на диагнозата, своевременното консултиране и насочване на пациента към съответния специализиран център за лечение на редки заболявания. Освен това училището за ПИД даде възможност както за обогатяване на теоретичните познания по актуални имунологични въпроси, така и за дискусия, обмяна на опит и възможност за бъдеща колаборация в международен план.

СЪВРЕМЕННАТА ИМУНОТЕРАПИЯ НА РАКА – ДЕЛО НА ОНКОЛОЗИ И МНОГО ИМУНОЛОГИЯ

М. Милев

СБАЛОЗ – София област
e-mail: drmilev@abv.bg

Употребата на моноклонални антитела в онкологията отдавна не е новост. Нови моменти са мишените, срещу които са насочени.

Така днес имунотерапията на рака се свързва с нови лекарствени средства – cheskpoint инхибитори (инхибитори на потискането на имунния отговор) – посрещнати с надежда от пациентите онкоболни и възторг от лекарите онколози.

Checkpoint (контролни пунктове) са регулатори на имунната система. Молекулите, участващи в тях, са стимулиращи или инхибиторни. Инхибиторните молекули запазват имунните реакции под контрол (гаранция, че имунната система се активира само в подходящо време и ще се сведе до минимум възможността за хронично автоимунно възпаление), но така могат да спрат или да ограничат развитието на Т-клетъчния антитуморен отговор.

Checkpoint инхибиторите като Ipilimjmab (Yervoy) потискат инхибиторни молекули и така дават предимство на стимулиращите, а други (Pembrolizumab, Atezolizumab, Nivolumab) блокират взаимодействието между PD-1 и PD-L1. Това позволява на Т-клетките да атакуват туморни клетки, преодолявайки механизми, с които туморите избягват имунната система.

Какво прави оптимизма на имунолозите за лечението с Checkpoint инхибитори по-сдържан?

Действието на cheskpoint инхибиторите е свързано с въздействие върху молекулите, които участват в подаване на допълнителен сигнал за лимфоцитно активиране. Но не бива да се забравя,че освен допълнителните антиген-неспецифични костимулаторни сигнали за активирането на лимфоцита, е необходим и сигнал от Т-клетъчния рецептор за разпознатия специфичен антиген, представен му от MHC комплекса.

Как това може да саботира ефекта при приложение на checkpoint инхибитори?

1) Известно е, че един MHC клас II може да свързва определен брой пептиди. Туморните неоантигени може да не са сред тях.

2) Вирусни инфекции могат да влияят на антигенното представяне. HSV 1 и 2 чрез протеина ICP47 потискат транспортния комплекс TAP за пренасяне на антигени и тяхното представяне от MHC комплекса; Човешкият CMV, чрез експресираните от него протеини US2 и US11, води до бърза деградация на MHC молекули.

3) Туморът може да загуби някой антиген от MHC. Като че ли най-често се губи HLA B7. По такъв начин MHC молекулата става неразпознаваема от собствените Т-лимфоцити.

Изложеното не отрича терапията с cheskpoint инхибитори, но показва, че е възможна допълнителна персонализация на тази терапия.

ПРОФ. МОРИЦ АЛБЕРТ ЙОМТОВ – УЧЕН, ПРЕПОДАВАТЕЛ, ПИСАТЕЛ

5.11.1921 г.-15.6.1992 г.

В началото на 70-те години на XX век двама студенти по медицина в Медицинския университет – София, започват да работят по проблемите на клиничната имунология под ръководството на д-р Михаил Левов Огнянов (по-късно професор) в Лабораторията на Първа вътрешна клиника в Александровска болница. Това са д-р Красимир Николов (по-късно доцент) и д-р Марта Балева (по-късно професор). Двамата млади учени през 1973 г. завършват своето висше образование и започват работа в същата лаборатория на Александровска болница. По настояване на проф. Огнянов през следващите 2 години те периодично специализират в областта на имунологията в Научния институт по епидемиология и микробиология (НИЕМ), понастоящем – Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ) в София.



СПОМЕН ЗА МОРИЦ ЙОМТОВ

Ето ни пред мраморното стълбище на НИЕМ. Тръгваме към кабинета на проф. Мориц Йомтов. Не го познаваме, не знаем нищо за него. Още преди да отворим вратата на Лабораторията по биохимия и имунохимия, усещаме много приятния мирис на хубав тютюн. Посреща ни сърдечно засмян и малко пълен човек на средна възраст със запалена лула. Това е проф. Мориц Йомтов. Започва нашето обучение по имунология в НИЕМ, което с малки прекъсвания ще продължи почти две години. По това

време в България с тази дисциплина се занимават малко учени – в тогавашния ИСУЛ (днес болница „Царица Йоанна"), в болница „Пирогов" – по проблемите на органната трансплантация, в НИЕМ – главно във връзка с ваксините и ваксинопрофилактиката, в някои от Институтите на БАН – по биохимия, по микробиология, по имунология на размножаването, както и в някои от катедрите на Софийския университет.

В Лабораторията цари приятелска и дружелюбна атмосфера. Всички работят много внимателно и компетентно и въпреки огромната си натовареност успяват да ни покажат много техники. Постепенно започваме да работим и самостоятелно. Първата ни задача е да отделим алфа-1-антитрипсин от човешки серум. Пълним колони, отделяме фракции, измерваме екстинции, получаваме нещо, което изследваме с имуноелектрофореза... И да, в продукта има от този белтък, но има и замърсявания. Проф. Йомтов се засмива и казва: „Ха сега, излейте това в канала и започнете отново". След няколко такива опита и след много препоръки продуктът е налице и е достатъчно чист. Минаваме нататък: изучаваме имунодифузионните методи на Ouchterlony и на Mancini, имуноелектрофорезата, реакцията за свързване на комплемента, пасивната хемаглутинация, опитваме се да маркираме антисеруми с пероксидаза и да възпроизведем имуноензимните техники... Четем много в богатата библиотека на Института. И навсякъде чувстваме загриженото отношение на проф. Йомтов към нашите проблеми. Постепенно научаваме, че проф. Йомтов е не само известен имунохимик, но и известен филмов сценарист и писател, че е един от братята Мормареви. Научаваме и много неща от неговата биография:

Проф. Мориц Йомтов е роден на 5.11.1921 г. в София. Прогимназиално образование завършва в Бургас, а гимназия – в Американския колеж през 1940 г. и постъпва като студент по химия в Софийския университет „Св. Климент Охридски". Завършва висше образование през 1949 г. Работи в редакция „Предавания за чужбина" на Българското национално радио. Изключителен ерудит, става професор по биохимия, дълги години е на различни изборни длъжности във Федерацията на европейските биохимични дружества (FEBS), става и неин генерален секретар в продължение на 2 мандата. В периода юли 1948 г. – март 1949 г. работи 2 години в българската легация във Вашингтон като аташе по печата.

От 1951 г. до пенсионирането си през 1987 г. в продължение на 36 г. създава и ръководи Биохимичната лаборатория на НИЕМ. Под неговото ръководство тази лаборатория става методичен и учебен център, в който се обучават както служители на НИЕМ, така и лекари, биолози, химици и биохимици от цялата страна. През 1968 г. е хабилитиран като старши научен сътрудник I ст., а от 1971 г. е професор по имунохимия към Катедрата по биохимия в Биологичния факултет на Софийския университет. Специализира биохимия на микроорганизмите и имунология в Института „Пастьор" – Париж, при проф. Грабар, и в Институт „Гамалея" в Москва. Научните му изследвания са в областта на имунохимичната характеристика

на антигените и тяхното пречистване, имунохичните проблеми, свързани с ензимите и др. За първи път у нас въвежда имунодифузията в агар и имуноелектрофорезата. Участва във внедряването на методи за пречистване на бактериални антигени, на методи за характеризиране на токсини и серуми, произведени у нас. С неговата подкрепа, със съдействието на проф. Д. Страхилов и участието на проф. Хр. Тасков започва и производството на моноклонални антитела в България. Всяка негова дейност е оригинална, много прецизна и значима. Дългогодишен член е на Специализирания научен съвет по микробиология, вирусология и имунология към Висшата атестационна комисия (ВАК). Има повече от 100 научни труда, съавтор е на монографиите „Експериментална микробиология" и „Диспротеинемии". Участва в редица научни конгреси и симпозиуми у нас и в чужбина, има много цитирания. Говори английски, френски, немски и руски език.

Много сполучливо в своето слово по повод удостояването си с титлата „Доктор хонорис кауза" на СУ акад. Евгени Головински причислява проф. Йомтов към плеядата на многостранните таланти – химици, които стават писатели: Теодор Фонтане, Роберт Нойман, Ъруин Чаргаф, Айзък Азимов, Агата Кристи, Елиас Канети, Карл Джераси, Асен Златаров, Георги Данаилов, Емил Зидаров, Георги Марков.

Незабравими остават филмите на Мориц и Марко (братя Мормареви): „Златната монета", „Два диоптъра далекогледство", „Таралежите се раждат без бодли", „С деца на море", „Изпити по никое време", „Двойникът" и много други, а също и романите, издадени от тях – „Васко да Гама от село Рупча", „Рапончо", „Задача с много неизвестни", „Войната на таралежите", „Дневникът на Асен Газурков" и много други... Девизът на братя Мормареви е „Животът е смешен и затова си заслужава да се живее".

***

В следващите десетилетия ние продължихме своите контакти с проф. Йомтов. Винаги беше готов да ни помогне, да ни даде съвет. Не се страхуваше да изкаже личното си мнение публично, въпреки че много често това не беше в унисон с възприетите норми на онова време. Все още се помни крилатата му фраза: „Има литри, но няма титри, има титри, но няма литри", изказана по повод затрудненията в производството на антисеруми в края на 50-те и началото на 60-те години на XX век, което по-късно е преодоляно.

Проф. Йомтов беше достъпен, обаятелен и обичан от всички, душа на всяка компания, с богата обща култура и прекрасно чувство за хумор, учен, писател и приятел. Сега, когато и двамата сме работили вече повече от 45 години като лекари клинични имунолози, искаме отново да изкажем своята признателност към проф. Мориц Йомтов и да припомним на обществеността в нашата страна за този забележителен човек, който ни напусна на 15.6.1992 г.

Марта Балева и Красимир Николов

ПРОГРАМА

ЗА ДЕЙНОСТТА НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ” ПРЕЗ 2019 ГОДИНА

1. Организационна дейност

1.1. Провеждане на заседание на УС на 3 месеца, а при необходимост по-често.

1.2. Уебстраница на БАКИ.

ПРЕДЛОЖЕНИЕ: за всяка от предстоящите дейности да се определи отговорник/отговорници

- Попълване на подразделите в новата уебстраница
- Учебна дейност – *отговорник:* д-р Калина Томангелова-Юзеир
- Нормативни документи – *отговорник:* д-р Симеон Петков
- Да се публикуват научни разработки под общо заглавие „Профилактика на имунното здраве”
- Скринингово изследване на новородени за ТКИД посредством T-cell receptor excision circle (TREC) – *отговорник:* доц. д-р Снежина Михайлова
- Скрининг за хуморален дефицит на имунния отговор – *отговорник:* д-р Спаска Лесичкова
- Скрининг за автоантитела при хора с фамилна обремененост и висок риск от автоимунно заболяване – *отговорник:* проф. д-р Доброслав Кюркчиев
- Скрининг за клетъчен имунен дефицит – оценка на степента на „имунологично остаряване“ – *отговорник:* проф. д-р Мария Николова
- Създаване на версия на английски език – *отговорници:* Леда Самсонова и д-р Марио Танев
- През 2019 г. ще продължи отразяването на дейността на БАКИ, в т.ч. информация за национални и международни форуми в областта на имунологията, трансплантологията, печатните издания и другите новини.
- Ще се публикува информация, насочена към младите специалисти, желаещи да специализират и да придобият специалност в България, както и информация за награди и стипендии за участие в национални и международни форуми.

1.3. Набиране на нови членове, включително и от други специалности

2. Публикационна дейност

- Издаване на годишник – 13-и брой на Сдружението с материали, изнесени на проведените курсове и конференции през 2019 година.

3. ВОК:

- Продължаване на схемите:

Схема 1 за определяне на имуноглобулини (G, A, M, E), C3 и C4 фракции на комплемента, СРП – 2 цикъла с по 3 проби;

Схеми 2А (АНА и анти-ДНК антитела), *2Б* (ЕНА антитела); *2В* (ANCA), 2Г – антикардиолипинови и β2-GP антитела – 1 цикъл с 3 проби; *2Д* – CCP6, РФ – 1 цикъл с 2 проби от INSTANT и по възможност 1 наша;

Схема 3 – определяне на HLA-B27 – 1 цикъл с 5 проби.

4. Провеждане на мероприятия:

- Отбелязване на **седмицата на ПИД** (22-29 април 2019 г.) по места с различни прояви.
- Честване на **Международния ден на имунологията** по места.
- **Плевенски имунологични дни** (10-12 април 2019, Плевен)
- **Лятно училище за ПИД пациенти** съвместно с МУ – Пловдив, Джефри модел център – България, и J Project, **Експертна среща между педиатри и имунолози, организирана съвместно с Българската педиатрична асоциация** – 07-09 юни 2019 г., Почивна база на МУ – Пловдив, в Цигов чарк
- **Четвърта тематична среща „Имунология и хранене”** (м. октомври 2019 г.)
- **Клинико-диагностични работни срещи (кръгли маси) по определена патология** – срок: постоянен

Теми: “Синдром на хроничната умора” или ”Хронична лаймска болест”.

Отговорник – проф. д-р Мария Николова

- Продължаване **участието на имунолози като лектори в националните семинари на Алианса за редки болести** в различни градове на страната – срок: постоянен

ENGLISH VERSION

PROGNOSTIC ROLE OF SERUM VASCULAR ENDOTHELIAL FACTOR VEGF-A AND INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE ICAM-1 FOR EARLY POST-SURGICAL COMPLICATIONS IN PATIENTS AFTER THORACOTOMY AND LUNG CANCER

L. Paunov[1], M. Ivanovska[2], T. Popova[2], B. Haq[3], A. Uchikov[1], M. Murdjeva[2]

[1]Department of Special Surgery at Medical Faculty, Medical University – Plovdiv, and Second Surgical Clinic at University Hospital "Sv. George" – Plovdiv
[2]Department of Microbiology and Immunology at Faculty of Pharmacy, and Research Immunology Center, Medical University – Plovdiv
[3]student, Medical Faculty, Medical University – Plovdiv

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the prognostic role of serum pre- and post-operative concentration of vascular endothelial growth factor VEGF-A and the intercellular adhesion molecule ICAM-1 for the development of early post-surgical complications in patients with thoracotomy due to primary lung cancer. SerumVEGF-A and ICAM-1 levels were detected using ELISA in 135 hospitalized lung cancer patients before and after surgical intervention (between 3 to 7 days after resection). The main early post-surgical complications observed were associated with inflammatory conditions (surgical site infection, hydrothorax, empyema, pneumonia). Mean serum pre- and post-surgical VEGF-A concentrations were significantly higher in patients with early post-surgical complications in comparison to those without complications. ICAM-1 measurement detected similar serum levels in patients with and without any complications but the difference between the groups was not significant. Furthermore, it can be concluded that the increase of pre-and post-surgical serum VEGF-A concentrations may be associated with higher risk for the development of early post-surgical inflammatory complications.

Key words: VEGF-A, ICAM-1, lung cancer, thoracotomy

Corresponding: Marianna Murdjeva, e-mail: mmurdjeva@yahoo.com

INTRODUCTION

Despite the therapeutic efforts lung cancer remains to be the leading cause of death worldwide. A wide variety of markers have been investigated as prognostic indicators for metastatic dissemination in this disease, but the prognostic significance of biomarkers for the evaluation of the early post-surgical complication remains unclear. These biomarkers are not routinely used in the clinical practice, however they are expected to play an important role in the management of lung cancer in the future.

Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by the tumor mesothelial cells and by the immune cells infiltrating the tumor, increases the permeability of the vascular endothelial cells, the migration of the tumor cells and angiogenesis [1, 2]. Several studies have proven that VEGF-A serum levels are increased after lung surgery, playing a crucial role for the fast metastatic dissemination of lung cancers in the early post-surgical period [2, 3].

Invasive lung tumors are associated with increased expression of the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and increased metastatic potential. The role of ICAM-1 has been investigated in inflammatory conditions, in neurodevelopment, lymphocyte circulation and activation [4]. The increased serum levels of ICAM-1 are considered to be a negative prognostic marker in patients with non-small cell lung cancer [5]. On the one hand a possible link between ICAM-1 and VEGF-A serum levels may coincide, while on the other hand the early post-surgical complications after thoracotomy in lung cancer patients may exist.

AIM

The aim of the study was to evaluate the prognostic role of VEGF-A and ICAM-1 serum levels (before and after surgery), for the development of early post-surgical complications in thoracotomy in patients with lung resection due to lung cancer.

PATIENTS AND METHODS

Blood samples of 135 in-patients with lung cancer who underwent thoracotomy were investigated before and after surgery. The following inclusion criteria were used: patients with biopsy-proven lung cancer who underwent thoracotomy surgical intervention – lobectomy, pulmonectomy or segmentectomy. The pre-operative blood samples were collected one day before surgery, and the post-operative blood samples were collected – 3 to 7 days after surgery. In accordance with the test requirements, all blood samples were collected in tubes without anticoagulant. Up to 60 minutes after the collection, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at room temperature. The serum was divided in aliquots of 200 mcl and were subsequently preserved at -80^{o}C to be investigated later. The serum levels of VEGF-A were ICAM-1 were detected using an ELISA method (VEGF-A human ELISA, BioVendor и ELISA human ICAM-1,

Abcam) and the results were determined using ELISA-TECAN reader (Tecan trading, Switzerland). Two groups of patients were compared – with and without early post-operative complications (inflammatory – wound infections, hydrothorax, empyema, pneumonia) and/or death.

The statistical analysis was performed using a standard SPSS version 19 software: variation analysis, Student's t-test, Fisher's exact test, and nonparametric Mann-Whitney u-analysis, correlation analysis. The data were presented as mean ± standard deviation (mean ± SD); standard error (SEM); mean difference; correlation coefficient r and X2. All p values below 0.05 were assumed statistically significant.

RESULTS

The determination of the mean serum levels of VEGF-A and ICAM-1 from the samples collected showed:

High VEGF-A serum levels were detected in both time points in individuals with inflammatory complications (table 1). At the post-surgery investigation, lower VEGF-A serum levels were detected in individuals without inflammatory complications (376.83 ± 256.293 pg/ml) as compared to those with inflammatory complications or death.

Table 1. Pre- and post-operative investigations of VEGF-A levels in different groups of lung cancer patients – with and without post-surgical early complications (inflammatory or exitus letalis)

Marker	Complications	Patients n	X	SD	X^2	p
VEGF-A pg/ml Pre-operative	Inflammatory	10	930,01	823,165		
	Exitus letalis	5	720,04	513,726	11,979	0,000
	None	120	376,82	256,293		
	Total	135	434,80	362,941		
VEGF-A pg/ml Post-operative	Inflammatory	8	1700,01	432,176		
	Exitus letalis	0	.	.	55,051	0,000
	None	55	596,07	293,832		
	Total	63	718,67	447,533		

Post-operative ICAM-1 levels were increased in both groups – with and without inflammatory complications (table 2). The lowest ICAM-1 levels both before and after surgery were detected in patients with inflammatory complications (210.01 ± 42.76 pg/ml vs. 270.04 ± 114.351 pg/ml, before and after the intervention, respectively), compared with the levels in complication-free patients (224.45 ± 75.606 pg/ml vs. 330.04 ± 162.083 pg/ml, before and after the intervention, respectively), and in exitus letalis (230.02 ± 36,151 pg/ml before surgery). In both time points (before and after surgery) the differences within the groups did not reach statistical significance ($p > 0.05$).

Table 2. Pre- and post-operative investigations of serum ICAM-1 levels in different groups of patients with lung cancer – with and without postoperative early complications (inflammatory and exitus letalis)

Marker	Complications	Patients n	X	SD	X^2	p
ICAM-1 pg/ml Pre-operative	Inflammatory	10	210,04	42,762		
	Exitus letalis	5	230,02	36,151	0,162	0,850
	None	120	224,45	75,606		
	Total	135	223,52	71,902		
ICAM-1 pg/ml Post-operative	Inflammatory	8	270,04	134,151		
	Exitus letalis	0	.	.	0,534	0,470
	None	55	330,00	162,083		
	Total	63	323,33	153,734		

The multiple within group analysis of pre-operative VEGF-A and ICAM-1 levels is shown in table 3. The levels of VEFG-A showed significant difference between the subjects with and without early post-operative complications (difference of 553.182 ± 121.251 pg/ml, p = 0.0001). Furthermore, a significant difference was observed between the deceased patients (exitus letalis) and those without complications (343.182 ± 167.865 pg/ml, p = 0.044). No significant differences in ICAM-1 levels between the groups were detected.

T able 3. Multiple within group analysis of pre-operative levels of VEGF-A and ICAM-1 in patients with and without early post-operative inflammatory complications and in exitus letalis (deceased)

Marker	Complications	Complications	Mean difference	SEM	p	95% CI	
						Lower limit	Upper limit
VEGF-Apg/ml Pre-operative	Inflammatory vs.	Exitus letalis	210,000	201,072	0,299	-189,07	609,07
		None	553,182*	121,251	0,000	312,53	793,83
	Exitus letalis vs.	Inflammatory	-210,000	201,072	0,299	-609,07	189,07
		None	343,182*	167,865	0,044	10,02	676,35
	None vs.	Inflammatory	-553,182*	121,251	0,000	-793,83	-312,53
		Exitus letalis	-343,182*	167,865	0,044	-676,35	-10,02
ICAM-1pg/ml Pre-operative	Inflammatory vs.	Exitus lethalis	-20,000	44,408	0,653	-108,14	68,14
		None	-14,455	26,779	0,591	-67,60	38,69
	Exitus letalis vs.	Inflammatory	20,000	44,408	0,653	-68,14	108,14
		None	5,545	37,074	0,881	-68,04	79,13
	None vs.	Inflammatory	14,455	26,779	0,591	-38,69	67,60
		Exitus letalis	-5,545	37,074	0,881	-79,13	68,04

*The difference is significant at $p < 0.05$

The post-operative levels of VEGF-A showed positive correlation with the presence of post-operative complications (moderate correlation, rs = 0.548, p = 0.001).

DISCUSSION

The results of the study revealed increase in both pre- and post-operative serum VEGF-A levels in patients with early post-surgical inflammatory complications in comparison to those without inflammatory ones (as presented above). The increase in post-surgical VEGF-A levels in the cohort, is in accordance with the results of W. Tan et al. These authors showed that serum VEGF-A reached the highest levels between post-operative days 2 and 7 and found no statistically significant differences in VEGF-A between patients who underwent video-assisted thoracoscopy (VATS) and conventional thoracotomy [3] (the latter is the surgical approach in our patients' series). Y Lai et al. [6] reported different results – the pre-operative levels of VEGF in patients with non-small cell lung cancer were significantly higher than that of post-operative. However, the post-surgical studies were performed much later – on days 25-30. The results of the study showed, serum VEGF-A concentration tends to increase much earlier in the post-operative period. Therefore, VEGF-A can be used as a prognostic marker for the development of early post-operative complications, especially those associated with inflammatory conditions.

Data obtained from the study widen the knowledge on the participation of VEGF-A not only in tumor angiogenesis, but also on its role for the development of early post-operative complications in patients with lung cancer. VEGF-A is an attractive possible candidate for target treatment in lung cancer and has potential in the prediction and treatment of early post-surgical complications [2, 7, 8].

The result of ICAM-1 investigation presents a tendency towards an increase of this biomarker in the post-operative period. While the post-surgical increase in serum VEGF-A levels is more indicative for the development of post-operative complications, the diagnostic significance of ICAM-1 in these cases is disputable. The pre- and post-surgical investigation of ICAM-1 levels in patients with and without complications clearly reveals its significance as a biomarker of early post-surgical complications. Several authors state that the role of ICAM-1 in the development and progression of lung cancer is questionable [8, 9]. Despite the detection of significant increase in ICAM-1 in lung cancer patients compared with the levels in healthy individuals, there is no clear correlation with the levels of this marker and the development of distant metastases and patients' survival [9, 10]. Other authors state that ICAM-1 is a potential diagnostic and prognostic marker in lung cancer due to its increased expression in lung cancer, progression is associated with more unfavourable prognosis in relation to survival compared with patients with lower sICAM-1 levels [11, 12, 13]. ICAM-1 potentiates the adhesion of lung cancer cells to the vascular endothelium in hematogenic

metastatic dissemination and therefore avoids the immune response and ensures tumor angiogenesis [14]. The hypothesis that the basic levels of ICAM could predict survival and response to chemotherapy in patients with lung cancer has been stated by many authors [15, 16]. So far, no studies have investigated the potential role of ICAM-1 as a prognostic marker for the development of early complications after thoracotomy.

CONCLUSION

The determination of serum levels of VEGF-A in dynamics can be used as a diagnostic and prognostic parameter for the development of early post-thoracotomy inflammatory complications in lung cancer patients and can be a useful marker for the development of the latter. Unlike VEGF-A, the investigation of the serum levels of ICAM-1 cannot be used as a prognostic marker for the development of early post-surgical complications and its role remains controversial.

Study limitations. The main limitation of this study is the relatively small number of patients with early postoperative complications. Moreover, due to the limited number of non-inflammatory complications, those patients were not included in the current study. Therefore, our results should be validated in a larger prospective trial.

Acknowledgements

The investigation was funded by a university project grant – Medical University of Plovdiv, Bulgaria (3/2011) and a DUNC project grant (01/2-2009).

REFERENCES

1. Bradshaw M, Mansfield A, Peikert T. The role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis, diagnosis and treatment of malignant pleural effusion.Curr Oncol Rep 2013; 15 (3):207-216.
2. Chekhonin VP, Shein SA, Korchagin AA, et al. VEGF in tumor progression and targetedtherapy. Curr Cancer Drug Targets 2013;13(4):423-43.
3. Tian W, Tong H, Sun Y, et al. Changes in serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 after video-assisted thoracoscopic surgery and thoracotomic lobectomy in the treatment of patients with non-small cell lung cancer. Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 2014; 17(1):24-9.
4. Frank GP, Lisanti MP. ICAM-1:role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008;295(3):H926-H927.
5. Uchikov A, Dimitrov I, Hadjiev B, Prisadov G, Uchikova E, Ganchevska P. Prognostic value of the molecular markers ICAM-1 and C-JUN in patients withlung cancer. Khirurgiia (Sofiia). 2010; 1:36-9.
6. Lai Y, Wang X, Zenq T, et al. Serum VEGF levels in the earlydiagnosis and severity assessment of non-small cell lung cancer. J Cancer 2018, 6;9(9):1538-1547.
7. Chen Y, Mathy NW, Lu H. The role of VEGF in the diagnosis and treatment of malignant pleural effusion in patients with non-small cell lung cancer. Mol Med Rep 2018; 17(6):8019-8030.

8. Frezzetti D, Gallo M, Maiello MR, et al. VEGF as a potentialtarget in lung cancer. Expert OpinTher Targets 2017; 21(10):959-966.
9. Gogali A, Charalabopoulos K, Zampira I, et al. Soluble adhesion molecules E-cadherin, intercellular adhesion molecule-1, and E-selectin as lung cancer biomarkers. Chest 2010;138(5):1173-9.
10. Guney N, Soydinc HO, Derin D, et al. Serum levels of intercellular adhesion molecule ICAM-1 and E-selectin in advanced stage non-small cell lung cancer. Med Oncol 2008;25(2):194-200.
11. Gu X, Ma C, Yuan D, et al. Circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 in lung cancer: a systematic review. Transl Lung Cancer Res 2012;1(1):36-44.
12. Kotteas AE, Boulas P, Gkiozos I, et al. The intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) in lung cancer: Implications for disease progression and prognosis. Anticancer Research 2014, 34: 4665-4672.
13. Shin HS, Jung CH, Park HD, et al. The relationship between the serum intercellular adhesion molecule-1 level and the prognosis of the disease in lung cancer. Korean J Intern Med2004; 19 (1):48-52.
14. Aznavoorian S, Murphy A, Stetler-Stevenson WG, et al. Molecular aspects of tumorcell invasion and metastasis. Cancer 1993; 71: 1368-1383.
15. Dowlati A, Gray R, Sandler AB, et al. Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab. Clin Cancer Res2008;14:1407-12.
16. Qian Q, Zhan P, Yu, L, et al. Baseline levels and decrease in serum soluble intercellular adhesion molecule-1 during chemotherapy predict objective response and survival in patients who have advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer 2011;12(2):131-7.

ANTICARDIOLIPIN ANTIBODIES IN ULCERATIVE COLITIS AND THROMBOSIS

P. Nikolov[1], Z. Spassova[1,2], M. Baleva[3], K. Nikolov[3], Z. Krastev[2]

[1]Medical University – Sofia, [2]Clinic of Gastroenterology, University Hospital „Sv. Ivan Rilski"– Sofia, [3]Clinic of clinical immunology with a stem cell bank, University Hospital "Alexandrovska" – Sofia

ABSTRACT

The aim of our study was to measure the levels of serum anticardiolipin antibodies (aCL) in patients with ulcerative colitis (UC) with and without history of thrombosis and to compare these with a control group. aCL were tested in 20 patients (11 male and 9 female) with endoscopically and histologically verified UC. Data in UC was compared to 30 age and sex matched controls. aCL were tested using ELISA and results were measured in U/ml. Cut off values for IgGa CL were 10 U/ml and for IgM aCL – 7 U/ml. Mean values of aCL in UC were significantly higher than controls ($p < 0.05$), but only 3 UC patients had history of thrombosis incidents – 2 with myocardial infarction, 1 with femoropopliteal thrombosis. Positive aCL in UC are a sign of autoimmune damage and endothelial dysfunction and possibly there are other causes of thrombotic disease as well however the endothelial dysfunction in combination with pro-thrombogenic factors including aCL are suspected to be a leading causes of thrombotic disease.

Key words: ulcerative colitis, anticardiolipin antibodies, thrombosis

Correspondence: Prof. M. Baleva, MD, PhD, DSc, Clinic of clinical immunology with a stem cell bank, University Hospital "Alexandrovska", 1. G. Sofijski Str., 1431 Sofia, e-mail: marta_baleva@yahoo.com

INTRODUCTION

Antiphospholipid antibodies (aPL) are a heterogeneous group of antibodies against different anionic phospholipids, glycoproteins and proteins. Their persistent elevation in the serum is associated with high risk of arterial and venous thrombosis and gynecological problems during pregnancy [1]. Anticardiolipin antibodies (aCL) are part of aPL family. Determination of aCL in the serum is one of the laboratory criteria for the diagnosis of Antiphospholipid syndrome [1]. APS can be primary (Primary APS – PAPS) and secondary (Secondary APS – SAPS). SAPS is common in patients with autoimmune disease and particularly in systemic lupus erythematosus (SLE).

Patients with inflammatory bowel diseases (IBD) – Ulcerative colitis (UC) and Crohn disease (CD) have an increasing tendency for thromboembolism. Thromboembolic complications are a common cause of death in patients with IBD [2].

The etiological and pathologic link between IBD and thrombosis is not fully understood, however there are some inborn pro-thrombogenic factors that are being currently considered: mutations in coagulation factors V and II, mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene, protein C and S deficiency as well as multiple secondary exogenous risk factors: surgery, central venous catheter, corticosteroid treatment, hormonal contraceptive and replacement therapy, tobacco smoking, continuous immobilization, dehydration, disturbances in the coagulation and fibrinolysis cascade, thrombocytosis, endothelial dysfunction, inflammatory and autoimmune disease, etc. The role of aCL in pathogenesis of IBD with or without thromboembolic events is not fully elucidated yet.

The aim of our study was to investigate the levels of serum aCL in patients with UC with and without thrombosis and compare these levels with those in controls.

MATERIAL AND METHODS

Anticardiolipin antibodies were tested in 20 patients (male 11, female 9) with endoscopically and histologically verified UC treated in the Clinic of Gastroenterology, University Hospital "Sv. Ivan Rilski" – Sofia. aCL were also tested in 30 age and sex matched controls. Montreal classification was used for the assessment of UC [3]. All UC patients and controls were interviewed and evaluated for thromboembolic events (deep venous thromboses (DVT), pulmonary thromboembolism (PT), myocardial infarction, stroke) as well as problems during pregnancy in the past. All UC patients were treated according to the disease activity and the local standard of care. The disease location is presented in table 1.

Table 1. Demographics and disease location in patients with UC.

Patients (n)	Age (range)	Sex (m/f)	Disease location (n)
20	22-76	11/9	L1 ─ Proctitis ─ 10
			L2 ─ Left colitis ─ 7
			L3 ─ Pancolitis ─ 3

aCL was tested using ELISA (Orgentec-Germany) and measured in U/ml. Cut off values used were 10 U/ml for IgG aCL and 7 U/ml for IgM aCL.

RESULTS

The mean levels of aCL in the sera of patients with UC were higher as compared to controls (table 2, fig. 1 and 2).

Table 2. Mean levels of aCL in UC patients and controls

	patients	controls	p
IgG aCL (GPL/ml)	20,9 ± 8,84	11,38 ± 4,86	< 0,05
IgM aCL (MPL/ml)	30,6 ± 17,76	7,24 ± 4,81	< 0,05

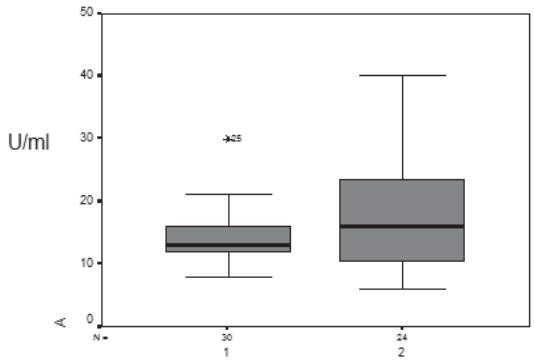


Fig. 1. IgG aCL in controls (left) and UC

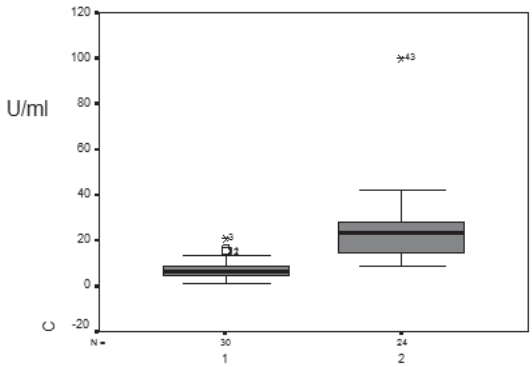


Fig. 2. IgM aCL in controls (left) and UC

UC patients were grouped depending on aCL values: high, medium and low aCL (table 3 and 4).

Table 3. UC patients with high, medium and low IgG aCL

	High > 80 U/ml	Medium 15-80 U/ml	Low < 15 U/ml
IgG aCL U/ml	0	16/20	3/20

Table 4. UC patients with high, medium and low IgM aCL

	High > 50 U/ml	Medium 6-50 U/ml	Low < 6 U/ml
IgM aCL (U/ml)	1/20	19/20	0

We found that UC patients mostly had medium levels of both IgG and IgM aCL. According to current criteria for APS diagnosis [1] the levels of IgG aCL and/or IgM aCL should be above 40 U/ml. Such APS threshold values were found in 1 female UC patient with IgG aCL 40 U/ml, 1 male and 1 female with IgM aCL 42 U/ml and 1 female with IgM aCL of 100 U/ml. None of these patients had current or past history of thrombosis.

History for thromboembolic events was found in 3 other UC patients with again medium levels of IgG and IgM aCL (table 5).

Table 5. Patients with a history of thrombosis

Patients	Age	Sex	Disease location	Thrombotic events	IgG aCL U/ml	IgM aCL U/ml
N 1	72	m	Left colitis	Myocardial infarction	24	27
N 2	48	f	Pancolitis	Femoropopliteal venous thrombosis	8	24
N 3	53	f	Left colitis	Myocardial infarction	20	22

DISCUSSION

Numerous clinical and epidemiological studies have demonstrated that autoimmune diseases are linked not only to autoimmune inflammation but also to increased thrombotic risk [5, 6]. Inflammation, coagulation and fibrinolysis in such cases are intimately related. Different forms of IBD – UC and CD are characterized by autoimmune inflammation and hypercoagulation. C. N. Bernstein et al [7] found that patients with IBD have a 3 fold increased risk of PT or DVT as compared to controls. W. Miehsler et al [8] even speak of a 3,6 fold increased risk, whereas B. Zoller et al report of a 6.4 fold increased risk of PT in UC, especially during the first 1 year following the initial diagnosis [9]. According to W. Miehsler et al [8] 8.8% of patients with IBD have a radiologically verified thromboembolism. Thrombotic complications are more common in male patients with IBD [10] and UC in particular [5, 11]. According to other authors thrombosis in IBD is not more common as compared to the general population [12]. It is worth noting that 13-29% of patients with IBD that were treated for venous thromboembolism developed a new thrombosis within the next 5 years [8, 13, 14]. Proctocolectomy in UC was not considered protective for new thromboembolic incidents [14].

It has not been fully established whether the increased risk of thrombosis is an integral part of IBD's clinical picture or whether it is linked to the chronic inflammation and/or the immune mediated disease. Venous thromboses are more common than the arterial ones. The arterial thromboses are usually of embolic nature and also go with increased mortality risk.

Antiphospholipid antibodies are a significant laboratory parameter for the diagnosis of APS and thrombotic risk [1]. They are often detected in patients with autoimmune

diseases [15-21], viral and bacterial infections [22, 23, 24], different malignancies [25, 26, 27], drug induced [28, 29, 30], but rare in the healthy general population. Often the detection of APS is not associated to a thrombosis. Intestinal involvement can be seen in PAPS, SAPS and catastrophic APS (CAPS). The main reason of intestinal involvement in such cases is the thrombosis of superior mesenteric vein, superior mesenteric artery, inferior vena cava, abdominal aorta, etc. and the intestinal involvement in APS supplements the general clinical picture of APS but still the intestine is not a predilection site for APS. In CAPS there is an intestinal involvement in more than 30% of autopsy reports and in contrast with PAPS and SAPS there is a small vessels involvement with the presence of microthrombi in the majority of necropsies. Extraintestinal thrombosis is commonly described in IBD.

Different authors have set different thresholds for aCL, meaning that conclusions in different publications can vary. N. Sipeki et al [31] assumed positive IgG and IgM aCL at levels > 20 U/ml; B.W. Aichbichler et al [2] assumed 5.3 U/ml; I.E. Koutroubakis et al. [32] assumed > 10 U/ml for IgG aCL and > 7 U/ml for IgM aCL. If we assume a positive threshold of > 40 U/ml [1] only 4/20 (20%) of our patients would have evelated aCL, which also corresponds to most findings by different authors – 15.9% [33], 18.1% [32], 23.4% [31], 26.3% [27].

We found no association between aCL and thrombotic complications in our patients and this finding is also confirmed by other authors [2, 31, 32, 34]. By the completion of our study no new thrombotic incidents were detected and there was historical data for 3 previous incidents (table 5): 2 myocardial infarctions and 1 DVT.

Some authors have found a link between aCL, IBD disease activity and therapy [32], however according to others there is no such link [2, 13, 27, 31, 34]. We did not investigate such a relationship. It is worth noting that the mean levels of IgG and IgM aCL in UC patients were higher than the ones in controls.

CONCLUSION

aCL antibodies are one of the laboratory criteria for APS. It has been estimated that 36.2% of patients with positive clinical and laboratory criteria for APS have SLE [35]. Intestinal involvement in APS is rare and at the same time extraintestinal thrombosis in IBD is not uncommon. We found elevated aCL in some of our patients with UC and only 3 of these patients had historical data of thromboembolic incidents, however their aCL levels were below 40 U/ml. It has been well established that patients with ischemic heart disease aged below 50 years often present with positive IgG aCL [36]. Two of our patients with UC had historical data of myocardial infarction: 72 years old male and 53 years old female.

Numerous other autoantibodies have been detected in patients with UC: ANA, ANCA, RF, dsDNA Ab [37] and this is not necessarily associated to a particular

clinical presentation or disease activity. Patients with autoimmune pancreatitis have a higher incidence of positive aPL and this is not associated with an elevated risk of thrombosis [38]. We believe that the detection of positive aCL in UC is more likely a sign of autoimmune disease and endothelial dysfunction and is not the solitary reason for thrombosis. Endothelial dysfunction in combination with other pro-thrombogenic factors, icl. aPL could trigger thromboembolic incidents in some subjects.

REFERENCES

1. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. J Thrombosis Haemost 2006; 4: 295-306.
2. Aichbichler BW, Petritsch W, Reicht GA, et al.Anti-cardiolipin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1999; 44 (4): 852-856.
3. Satsangi J et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. Gut 2006; 55(6): 749–753.
4. Harris EN, Ghavari AS, Patel S. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 april 1986. Clin Exp Immunol. 1987; 68: 215-222.
5. Ando K, Mikihiro F, Nomura Y, et al. The incidence risk factors of venous thromboembolism in Japanese in patients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study. Intest Res 2018; 16: 416-4125.
6. Ramagopalan SV, Wotton CS, Handel AE et al. Risk of venous thromboembolism in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record-linkage study. BMC Med 2011; 9: 1-8.
7. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, et al. The incidence ofdeep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. ThrombHaemost2001;85:430–434.
8. Miehsler W, Reinisch W, Valic E, et al. Is inflammatory boweldisease an independent and disease specific risk factor forthromboembolism? Gut 2004;53:542–548.
9. Zoller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden. Lancet 2012; 379: 244-249.
10. Bernstein CN, Nabalamba A, Hospitalization-based major comorbidity of inflammatory bowel disease in Canada. Can J Gastroenterol. 2007; 21(8): 507–511.
11. Nguyen GC, Sam J.Rising prevalence of venous thromboembolism and its impact on mortality among hospitalized inflammatory bowel disease patients.Am J Gastroenterol. 2008; 103(9):2272-80.
12. Grip O. Inflammatory Bowel Disease Promotes Venous Thrombosis Earlier in Life.Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2000; 35:6,619-623.
13. Jackson LM, O'Gorman PJ, O'Connell, et al.Thrombosis in inflammatory Bowel Disease: clinical setting, procoagulant profile and factor V Leiden. QJM 1997; 90:183-188.
14. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, et al. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2004; 99: 97-101.

15. Cervera R, Serano R, Pons-Estel GJ, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during 10-year period: a multicenter prospective study of 1000 patients Ann Rheum Dis doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204838.
16. Николов К, Николова М, Рашков Р, Балева М. Хабитуални аборти и антифосфолипиден синдром при болни със системен лупус еритематозус. Ревматология 2004; 12: 43-45.
17. Монов С, Рашков Р, Алтънкова И, Балева М, Монова Д. Лупусен антикоагулант и други антифосфолипидни антитела при пациенти с невролупус. Ревматология 2005; 13: 74-78.
18. Sherer Y, Livneh A, Levy Y, et al. Dermatomyositisand polymyositis associated with the antiphospholipidsyndrome – a novel overlap syndrome. Lupus 2000; 9: 42-46.
19. Pope JE, Thompson A. The frequency and significance of anticardiolipin antibodies in scleroderma. J Rheumatol 2000; 27: 1450-2.
20. Cervera R, García-Carrasco M, Font J, et al. Antiphospholipid antibodies in primary Sjögren‘s syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 80 patients.Clin Exp Rheumatol. 1997;15:361-5.
21. Николов К, Рашков Р, Коларов З, Янкова З и сътр. Антифосфолипидни антитела – значение на определянето на антителата срещу фосфолипиди. Мед преглед 2003; 39 (1): 32-35.
22. Nikolov K, Baleva M, Boyadjian H, et al. Anticardiolipin antibodies in viral hepatitis. Acta med bulg 1999; 26: 9-14.
23. Cervera R, Asherson RA, Acevedo ML, et al. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics of 100 patients. Ann Rheum Dis 2004; 63: 1312-1317.
24. Blank M, Krause I, Magrini L, et al. Overlapping humoral autoimmunity links rheumatic fever and the the antiphospholipid syndrome. Rheumatology 2006; 45: 833-841.
25. Lyman GH. Venous thromboembolism in the patient with cancer: Focus on burden of disease and benefits of thromboprophylaxis. Cancer 2011; 117: 1334-1339.
26. Pham C, Shen Y. Antiphospholipid antibodies and malignancy. Hematol Oncol Clin North Am 2008;22:121-30.
27. Zuckerman E, Toubi E, Golan TD, et al. Increased thromboembolic incidence in anti-cardiolipin-positive patients with malignancy. Br J Cancer 1995; 72: 447-451.
28. Canoso RT, De Oliveira RM. Chlorpromazine-induced anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant: absence of thrombosis. Am J Hematol 1988;27:272-275.
29. Merrill JT, Shen C, Gugnani M, et al. High prevalence of antiphospholipid antibodies in patients taking procainamide. J Rheumatol. 1997;24:1083-8.
30. Ramos-CasalsM, Brito-Zeron P, SotoMJ, et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. Best Pract Res Clin Rheumatol2008;22:847-61.
31. Sipeki N, Davida L, Palyu E, et al. Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies in Crohn`s disease. World J Gastroenterol 2015; 21 (22): 6952-6954.
32. Koutroubakis IE, Petinaki E, Anagnostopoulou E, et al. Anti-cardiolipin antibodies and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1998; 43:2507-2512.
33. Kraiem I, Hadhri S, Rejeb MB, Ifa L, et al. Antiphospholipid antibodies and procoagulant profile in Tunisians with Inflammatory bowel diseases. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis 2016; 22 (8): 734-742.

34. Chiarantini E, Valanzano P, Liotta AA, et al. Hemostatic abnormalities in inflammatory bowel disease. Thromb Res 1996; 82 (2): 137-146.
35. Cervera R, Piette J-Ch, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome. Clinical and immunologic manifestations and patherns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. Arthr Rheum 2002; 46 (4): 1019-1027.
36. Pastori D, Bucci T, Triggiani M, et al. Immunoglobulin G (IgG) anticardiolipin antibodies and recurrent cardiovascular events. A systematic review and Bayesian meta-regression analysis. Autoimmun Rev 2019 pii: S1568-9972(19)30058-8. doi: 10.1016/j.autrev.2019.03.005.
37. Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, et al. Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophilcytoplasmic antibodies, and other autoantibodies inpatients with ulcerative colitis. Gut 1993; 34:658-664.
38. Zeng X-P, Liu T-T, Hao L., et al. Autoantibody detection is not recommended for chronic pancreatitis: a cross-sectional study of 557 patients. BMC Gastroenterology 2019;19:31.

CONTEMPORARY IMMUNE THERAPY OF CANCER: THE ACTIVITIES OF ONCOLOGISTS FOCUSING IMMUNOLOGY

M. Milev

Hospital Specialized in Active Treatment of Oncology Diseases – Sofia District
e-mail: drmilev@abv.bg

The use of monoclonal antibodies in oncology is not a novelty any more. The new aspects are the targets, aimed by them.

Now the cancer immune therapy is associated with new medication – check-point inhibitors (inhibitors of suppressing the immune response), being the hope of the patients and met with enthusiasm by physicians – oncologists.

Check-points (control points) are regulators of the immune system. The molecules involved are stimulants or inhibitors. The inhibiting molecules keep the immune reactions under control (guaranteeing that the immune system is activated only at the right time, minimizing any eventual chronic autoimmune inflammation), but they can stop or restrict the development of the T-cell antitumor response.

Checkpoint Inhibitors such as Ipilimjmab (Yervoy) suppress inhibitory molecules and thus benefit the stimulants, and others (Pembrolizumab, Atezolizumab, Nivolumab) block the interaction between PD-1 and PD-L1, enabling T-cells to attack tumor cells by overcoming the mechanisms with which tumors avoid the immune system.

What makes the immunologists less optimistic in treatment with check-point inhibitors?

The activity of check-point inhibitors is associated with an effect on molecules involved in the delivery of an additional signal for activation of lymphocytes. However, it should not be forgotten that, in addition to the supplementary non-specific co-stimulating signals for lymphocyte activation, a specific signal from the T-cell receptor for the recognized specific antigen delivered by the MHC complex is also required.

How could it curb the effect of applying check-point inhibitors?

1) It is well-known that MHC class II can bind a certain number of peptides. Tumor neoantigens may not be among them.

2) Viral infections can affect the antigen presentation.

HSV 1 and 2 via the protein ICP47 suppress the TAP transport complex in delivering antigens and their presentation by the MHC complex; human CMV, via its expressed proteins US2 and US11, results in rapid degradation of the MHC molecules.

3) The tumor may lose some antigen from MHC. HLA B7 seems to be most commonly lost. Thus, the MHC molecule becomes unrecognizable by its own T-lymphocytes.

The above does not reject the therapy with checkpoint inhibitors, but shows that additional personalization of this therapy is also possible.

PROF. MORITZ ALBERT YOMTOV: A SCIENTIST, A TEACHER AND A WRITER

5 November 1921–15 June 1992

In the beginning of the 1970s two medical students at the Medical University of Sofia started working in the field of clinical immunology under the guidance of Dr. Mikhail Levov Ognyanov (later professor) in the Laboratory of the First Clinic of Internal Medicine in the University Alexandrovska Hospital. These two students were Dr. Krasimir Nikolov (later associated professor) and Dr. Marta Baleva (later professor). In 1973 the two young scientists graduated and started working at the same laboratory in the Alexandrovska Hospital. In the next two years, under the guidance of Prof. Ognyanov, they specialized in Immunology at the Research Institute of Epidemiology and Microbiology, RIEM, now – the National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD) in Sofia.



A MEMORY OF MORITZ YOMTOV

Here we are, standing, in front of the marble stairs of RIEM. We are headed towards the study of Prof. Moritz Yomtov. We do not know him, actually we know nothing about him. Before we open the door of the Biochemical laboratory we could smell fine tobacco. A smiling and chubby middle-aged man with a smoking pipe greets us. This is Prof. Moritz Yomtov. Our immunology specialization at the RIEM begins. With short breaks, the duration of this specialization will be two years. At that time, very few scientists worked in the field of Immunology, mainly in ISUL (now, the Queen

Giovanna Hospital), Pirogov Hospital – in the field of organ transplantation, in RIEM – in the field of vaccines and vaccine prophylaxis, in several Institutes at the Bulgarian Academy of Sciences – Biochemistry, Microbiology, Immunology of Reproduction, and in some Departments at the Sofia University.

The atmosphere at Prof. Yomtov's lab is friendly and detached. All the staff is meticulous and competent in their work, despite the remarkable work-load, and show us many different techniques. Gradually we start working unaided. Our first task is to purify alpha-1-antitrypsin from human serum. We fill up columns, measure extinctions, and finally purify some substance that we examine electrophoretically… YES! There is alpha-1-antitrypsin in this product, but still many impurities are present. Prof. Yomtov smiles and says: "Right! Now, pour this down the drain and start all over again!" After several attempts and after many advices, the pure product is extracted and we go on with our next tasks – we have to learn the immune diffusion methods of Ouchterlony and Mancini, immunoelectrophoresis, complement binding reaction, passive hemagglutination, we try to mark antisera with peroxidase and to reproduce immunoenzyme techniques… We read a lot in the huge Library at the RIEM and everywhere we could sense the care of Prof. Yomtov for our problems. Gradually we understand that he is not only a famous immunochemist, but a screenplay writer and a novelist, one of the Mormarevi brothers. We learn a lot about his life.

Prof. Moritz Yomtov was born on November 5, 1921 in Sofia. He finished his primary school in the city of Burgas, and his high school – in the American College in Sofia in 1940 and started his university studies at the Chemical Faculty of the Sofia University St. Kliment Ohridski. He graduated from the Sofia University in 1949. He worked in the Editorial office for Broadcasting abroad at the Bulgarian National Radio. As an exceptional erudite, he was elected Professor of Biochemistry and a long-term member of the management staff of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS) and Secretary of the latter for two consecutive mandates. From July 1948 until March 1949 he worked as press attaché at the Bulgarian legacy in Washington.

For 36 years, from 1951 until his retirement in 1987 he had created and directed the Biochemical laboratory at RIEM. Under his direction, this laboratory became a methodical and educational center for qualification of RIEM staff and for physicians, biologists, chemists and biochemists from Bulgaria. In 1968 he was elected Senior Research Associate I degree, and in 1971 – Professor of Immunochemistry at the Department of Biochemistry at the Biological Faculty of the Sofia University. He specialized biochemistry of microorganisms and immunology at the Pasteur University in Paris (at the Laboratory of Prof. Grabar) and at the Gamaleya Institute in Moscow, Russia. His research was in the field of the immunochemical characteristics of antigens and their purification, immunochemistry of enzymes, etc. Prof. Yomtov first introduced in Bulgaria agar-agar immunodiffusion and immunoelectrophoresis. He participated

in the introduction of methods for purification of bacterial antigens, methods for characterization of toxins and sera produce in Bulgaria. With the help of Prof. Yomtov, Prof. D. Strahilov and Prof. Hr. Taskov, the fist monoclonal antibody production in Bulgaria was started. All activities of Prof. Yomtov are original and very precise and important. He was a long-time member of the Specialized Scientific Council of Microbiology, Virology, and Immunology at the Higher Attestation Committee in Bulgaria. He has more than 100 scientific publications and is co-author of the monographs "Experimental microbiology" and "Dysproteinemias". Prof. Yomtov participated in many scientific meetings, congresses and symposia in Bulgaria and abroad and has multiple citations. He was fluent in English, French, German and Russian language.

In his speech delivered at the Sofia University for receiving the award Doctor honoris causa Acad. E. Golovinski added Prof. Yomtov to the long list of chemist-writers, along with Theodor Fontane, Robert Neumann, Erwin Chargaff, Isaac Asimov, Agatha Christie, Elias Canetti, Carl Djerassi, Asen Zlatarov, Georgi Danailov, Emil Zidarov, Georgi Markov.

The films of Moritz and Marko (the Mormarevi brothers) are unforgettable: "The golden coin", "Two diopters of long-sightedness", "The hedgehogs are born without prickles", "At the seaside with children", "Exams out of time", "The doppelganger", and many others. Unforgettable are their novels: "Vasco Da Gama of the Rupcha village", "Raponcho", "A task with many unknowns", "The war of the hedgehogs', "The diary of Asen Glazurkov", etc. The Mormarevi brothers' motto was "Life is funny and that is why it is worth living!".

***

In the next decades we remained in touch with Prof. Yomtov. He was always there to help us and to give us advice. He was not afraid to make his stand in public, to say what he thought, despite the fact that his position was often outside the mainstream lines of the time. We still can remember his golden words "There are liters but there are no titers, there are titers but there are no liters." that he said in relation to the shortage of antisera in the end of the 1950s and the beginning of the 1960s, that was later surmounted.

Prof. Yomtov was easily accessible, amicable and loved by everyone, the soul of each company, with a vast culture and beautiful sense of humor, a scientist, a writer and a friend. Now that we have worked for more than 45 years as physicians and clinical immunologists, we would like to express once again our gratitude to Prof. Moritz Yomtov and to remind to Bulgarian public of this amazing man who left us on June 15, 1992.

Marta Baleva and Krasimir Nikolov