МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО УШНИ, НОСНИ И ГЪРЛЕНИ БОЛЕСТИ

Д-Р ЮЛИЯН СТЕФАНОВ ХАДЖИЕВ

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

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност: Оториноларингология

Научен ръководител: проф.д-р Диана Попова, дмн

РЕЦЕНЗЕНТИ: проф.д-р Иван Ценев, дмн
проф.д-р Спиридон Тодоров, дм

С О Ф И Я

2018

Дисертационният труд е написан на 120 машинописни страници и е онагледен с 16 фигури и 43 таблици.
Библиографският списък съдържа 124 литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по ушни, носни и гърлени болести при Медицински факултет на Медицински университет – София на 13 ноември 2017 г., съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на **16 март 2018 г. от 13.00 часа** в аудиторията на Клиниката по УНГ болести, УМБАЛ «Царица Йоанна – ИСУЛ» ЕАД, съгласно чл.76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и въз основа на заповед N РК36-2768/15.12.2017 г. на Ректора на МУ – София, пред научно жури в състав:

Председател: проф.д-р Спиридон Тодоров, дм – вътрешен член и рецензент
Членове:

1. проф.д-р Диана Попова, дмн – вътрешен член и научен ръководител
2. проф.д-р Иван Ценев, дмн – външен член и рецензент
3. проф.д-р Дичо Димов, д.м.н. – външен член
4. доц.д-р Петко Кабакчиев, дм. – външен член

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ – София и са на разположение в Катедра по УНГ болести при Медицински факултет на Медицински университет – София.

* Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. Въведение…….....5

2. Цел и задачи...……...……7

2.1 Цел..……..……..7

2.2 Задачи…….....7

3. Материали и методи……...……..…….…..8

3.1 Материали ……..……8

3.1.1 Клиничен материал…….....8

3.1.2 Критерии за включване на пациентите в проучването…….....…..8

3.1.2.1 Критерии при пациенти с хроничен риносинуит……..…..8

3.1.2.2 Критерии при пациенти с хроничен гноен отит…….....9

3.1.2.3 Критерии при контролните пациенти……..10

3.1.3 Биологичен материал……...……..……...10

3.2 Методи……..……..11

3.2.1 Клинични методи……..……..11

3.2.2 Генетични методи……...……12

3.2.3 Статистически методи……18

4. Резултати…….……...……19

4.1 Клинични характеристики на пациентите……..……19

4.2 Екпресионен анализ на BPIFA1…….27

4.2.1 Експресионен анализ на BPIFA1 при пациенти с хроничен риносинуит и контроли……..27

4.2.2 Експресионен анализ на BPIFA1 при пациенти с хроничен гноен отит и контроли……..36

4.2.3 Експресионен анализ на BPIFA1 при пациенти с хроничен гноен отит и хроничен риносинуит……46

5. Дискусия……..49

6. Изводи……..56

7. Приноси……57

1. Въведение

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

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

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

Към настоящия момент няма провеждани изследвания върху BPIFA1 при хроничния гноен отит, както и при здраво ухо. В това проучване си поставихме за цел да определим експресията на BPIFA1 при болни с хроничен риносинуит, хроничен гноен отит, при здрави контроли и да ги обвържем с клиничната картина, да установим клинично значима връзка между протичането, оперативното лечение на заболяването и BPIFA1 профила.

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

Смятаме, че определянето експресията на BPIFA1 гена ще спомогне за изясняване ролята на макроорганизма при хронични инфекции на горните дихателни пътища и ухото с голямо социално-икономическо значение.

2 Цел и задачи

2.1 Цел

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

2.2 Задачи

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

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

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

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

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

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

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

3 Материали и методи

3.1 Материали

3.1.1 Клиничен материал

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

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

3.1.2 Критерии за включване на пациентите в проучването

3.1.2.1 Критерии при пациенти с хроничен риносинуит

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

1.носна обструкция.

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

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

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

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

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

3.1.2.2 Критерии при пациенти с хроничен гноен отит

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

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

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

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

3.1.2.3 Критерии при контролните пациенти

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

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

3.1.3 Биологичен материал

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

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

3.2 Методи

3.2.1 Клинични методи

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

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

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

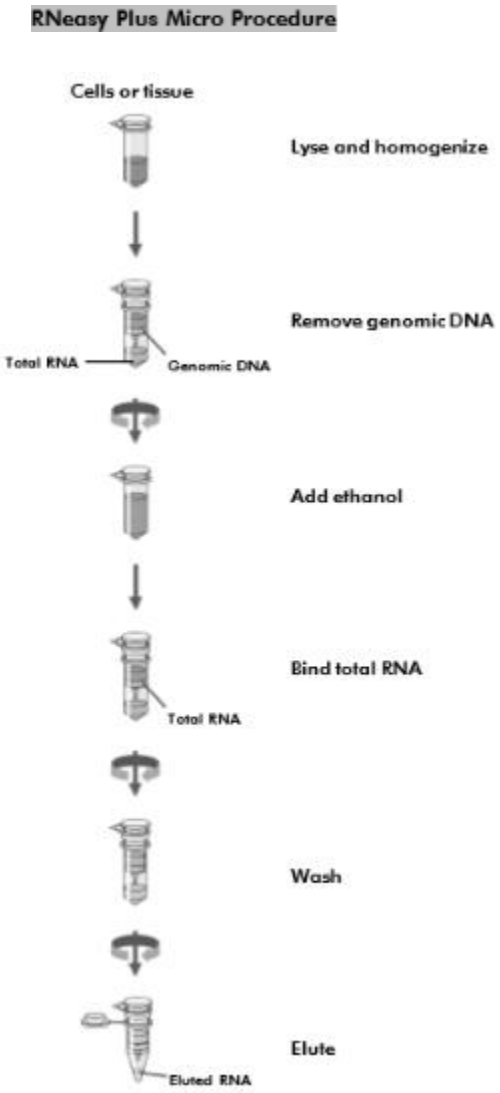
На болните с хроничен гноен отит и двустранна невросензорна глухота се извършваше микроотоскопия за определяне на статус локалис. При болните с хроничен гноен отит се описваше вида на тимпаналната перфорация-епитимпанит или мезотимпанит. На всички болни с хроничен гноен отит беше извършена аудиометрия.

3.2.2. Генетични методи

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

Изолиране на тотална РНК

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



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

Измерване на концентрацията на изолираната РНК

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

Синтез на кДНК от РНК чрез обратнотранскриптазна реакция:

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

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

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

Използвана Апаратура:

PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)

Микроцентрофуга Micro CL 21 (Thermo Scientific)

Принцип:

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

Етапи:

Подготовка на РНК пробата

Провеждане на реакция на обратна транскрипция

Процедура:

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

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

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

 Провеждане на обратна транскрипция на PCR апарат по следната програма:

Таблица 2

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

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

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

Използвана Апаратура:

 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)

 Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf);

 Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific)

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

 Сух стерилизатор MMM (Ecocell)

Етапи:

 Изолиране на РНК и определяне на качеството и концентрацията

 Обратна транскрипция за синтез на кДНК

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

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

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

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

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

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

3.2.3.Статистически методи.

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

Бяха приложени следните методи:

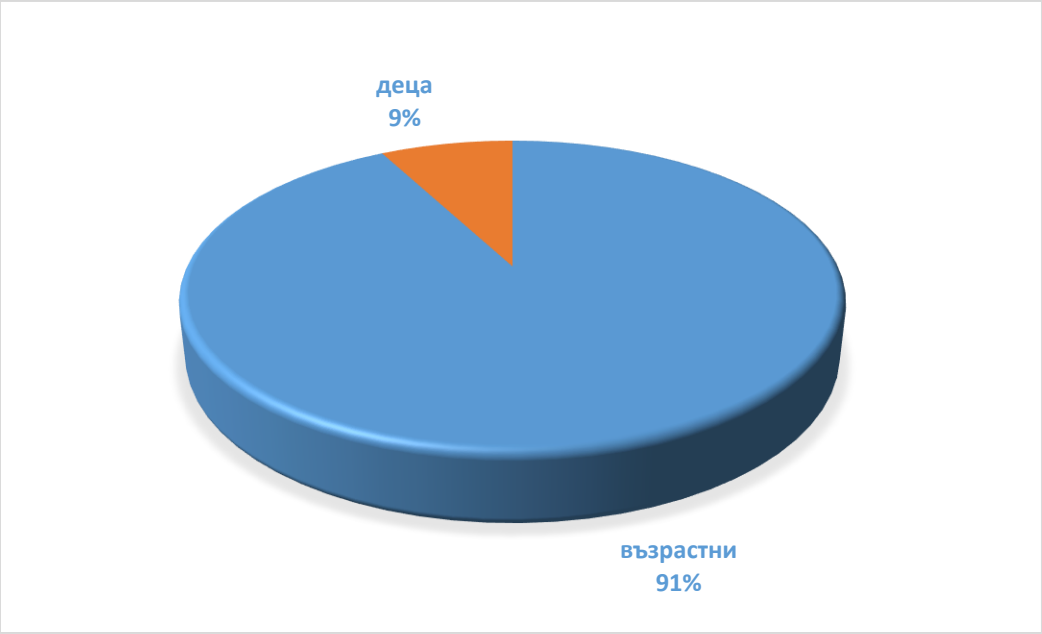
1. ***Дескриптивен анализ*** – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
2. ***Вариационен анализ*** – за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическо разсейване.
3. ***Графичен анализ*** – за визуализация на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

4. Резултати.

4.1 Клинични характеристики на пациентите.

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

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



Фиг. 2 Разпределение на пациентите по възраст

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

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

Табл. 3 Разпределение на пациентите според тютюнопушенето

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

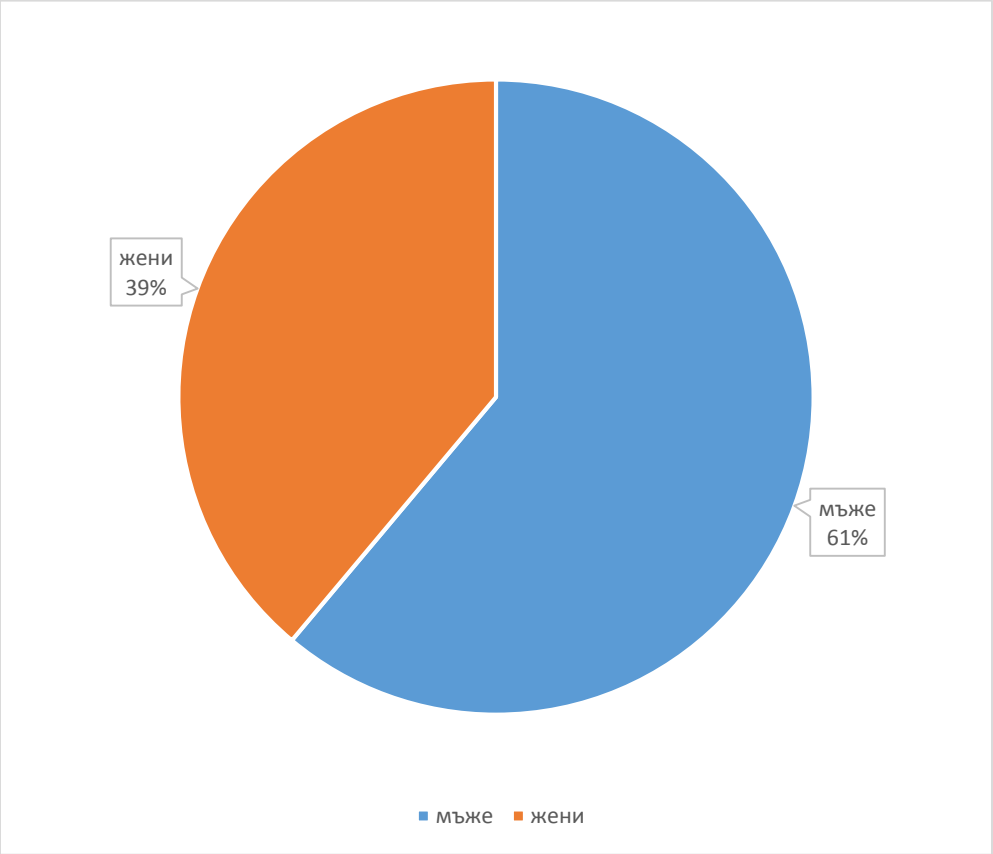
В таблицата по-долу е дадено разпределението на пациентите по възрастови групи.

Табл. 4 Разпределение на пациентите по възрастови групи

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

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

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



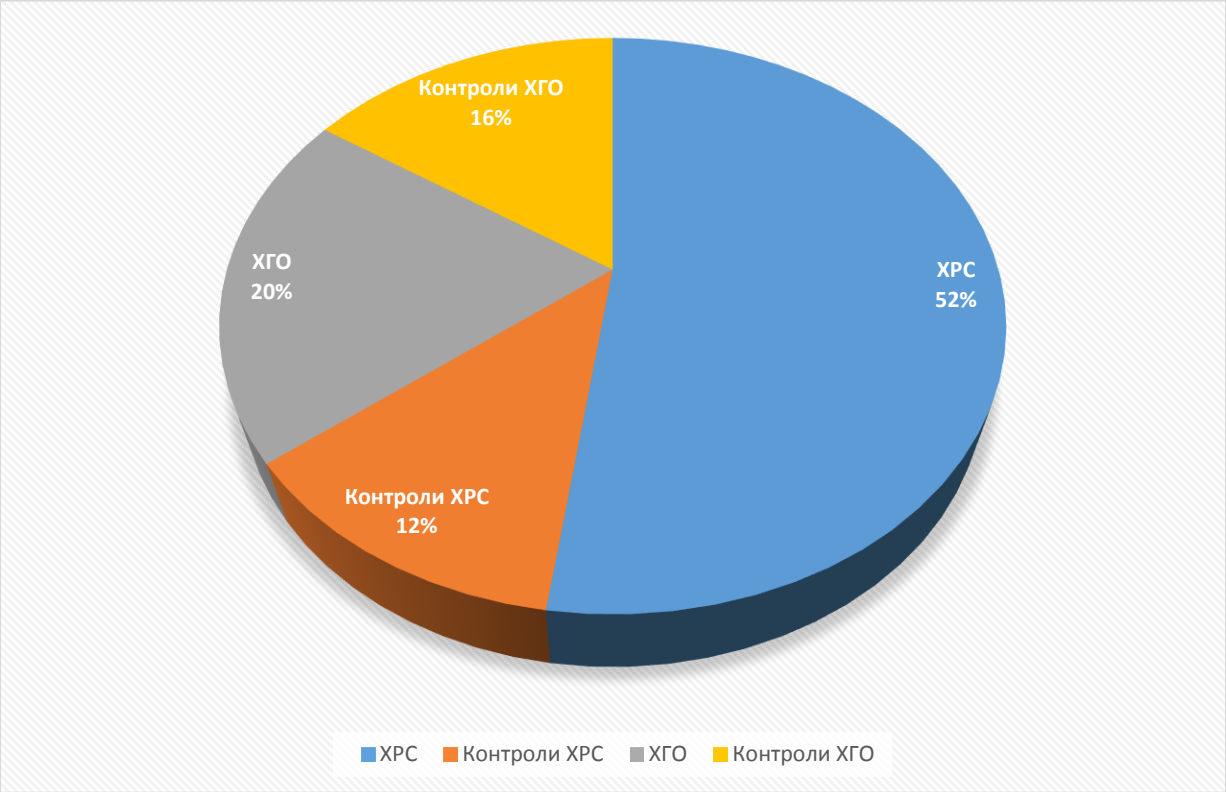
Фиг. 3 Разпределение на пациентите по пол

Табл. 5 Разпределение на пациентите по области в България

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

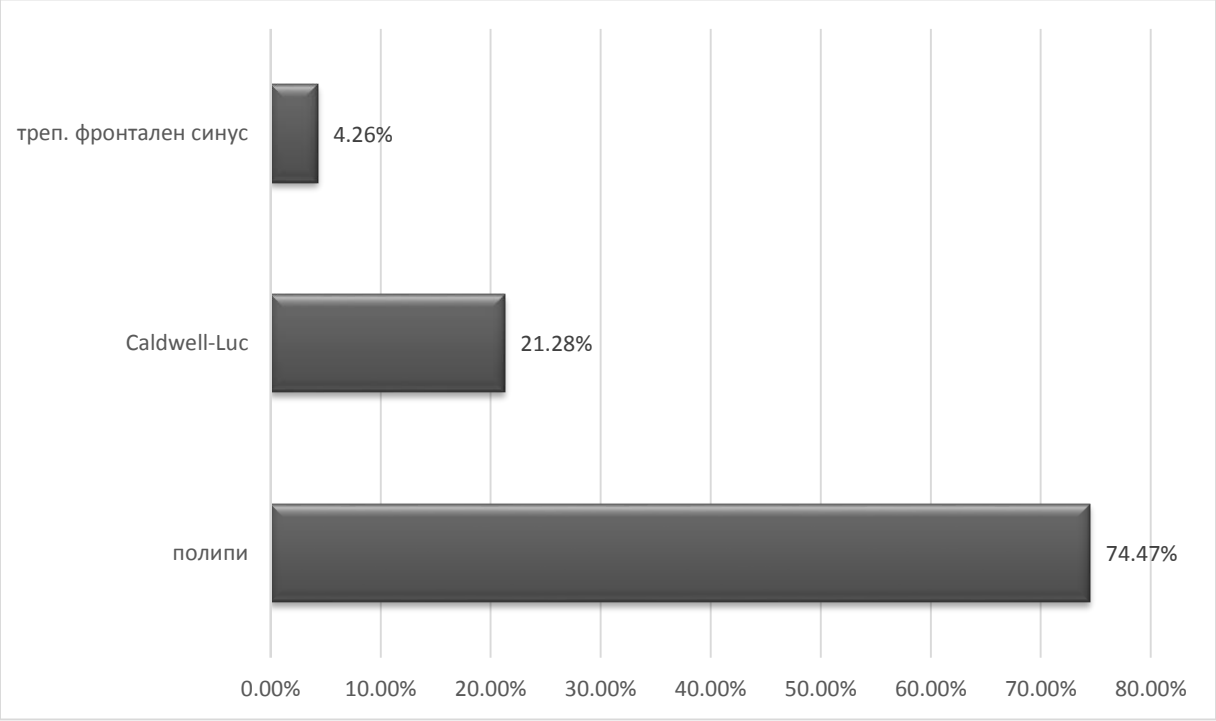
Съгласно табл. 5, изследваните пациенти са главно от област София-57(63.3%), а следващи са съответно област Благоевград (6.67%) и област Враца (5.56%). От 10 области нямаме нито един пациент, а от останалите по един или двама пациенти.

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



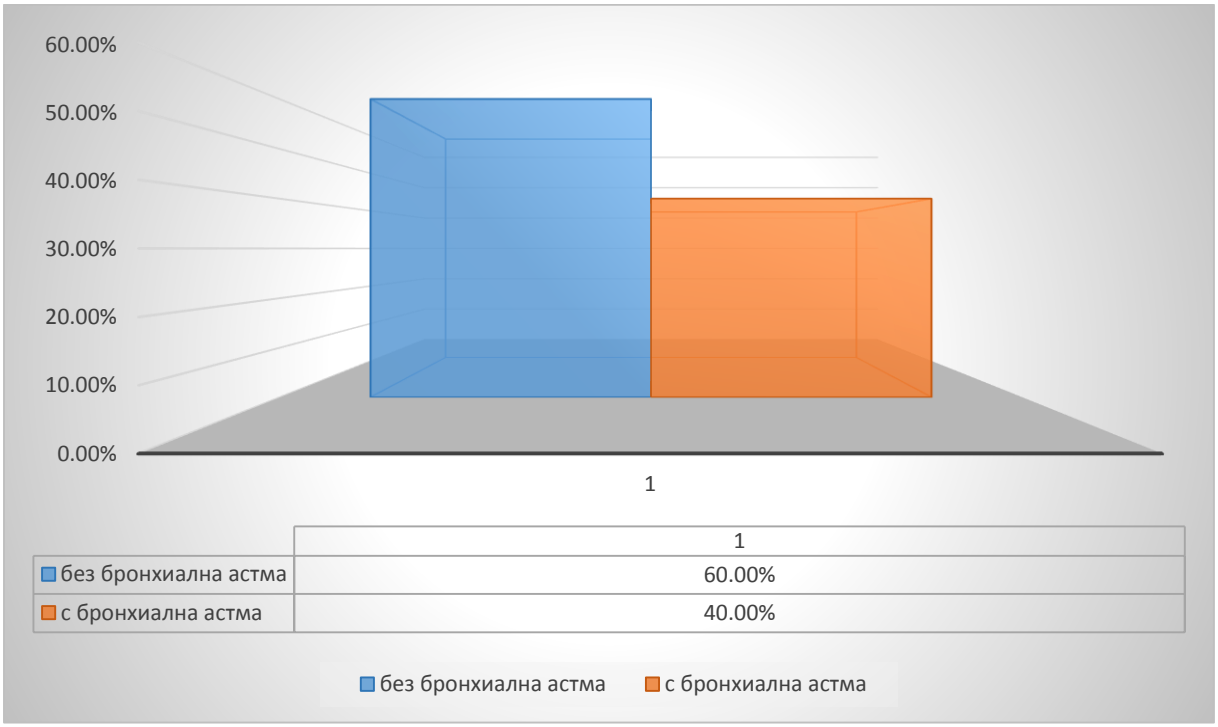
Фиг. 4 Разпределение на пациентите по клинична диагноза

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



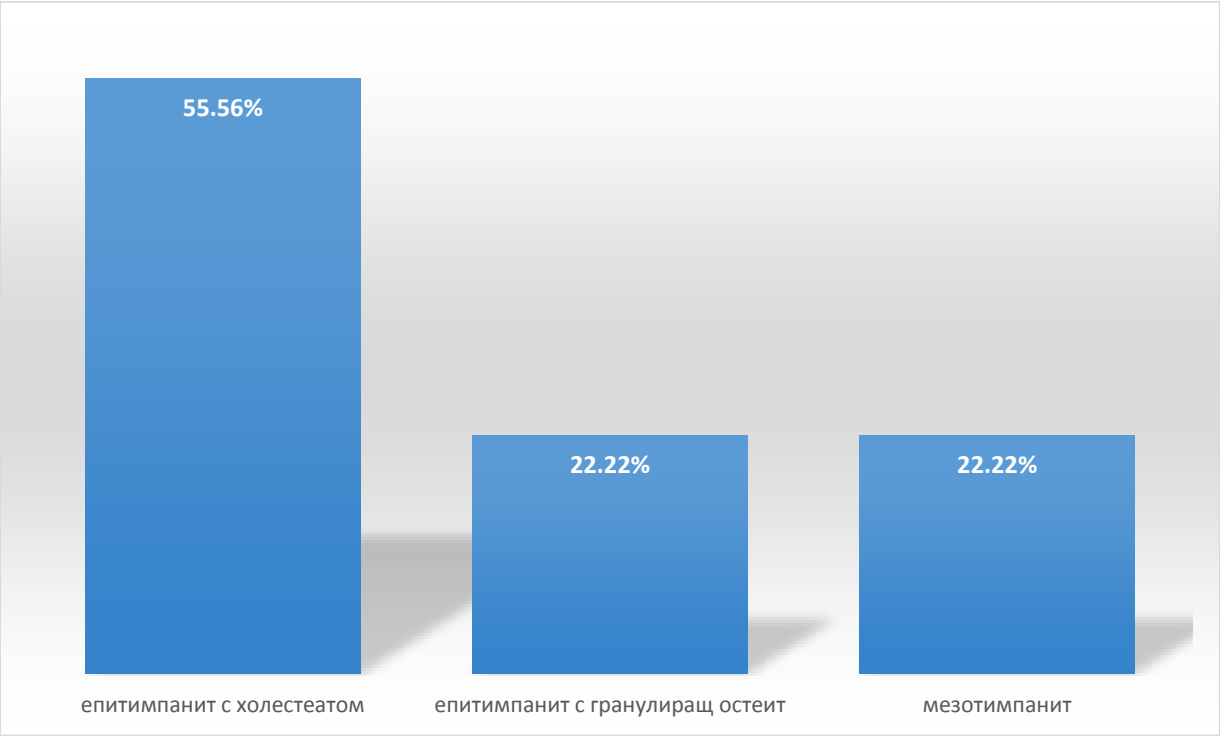
Фиг. 5 Разпределение на болните с хроничен риносинуит

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



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

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



Фиг. 7 Разпределение на пациентите с хроничен гноен отит

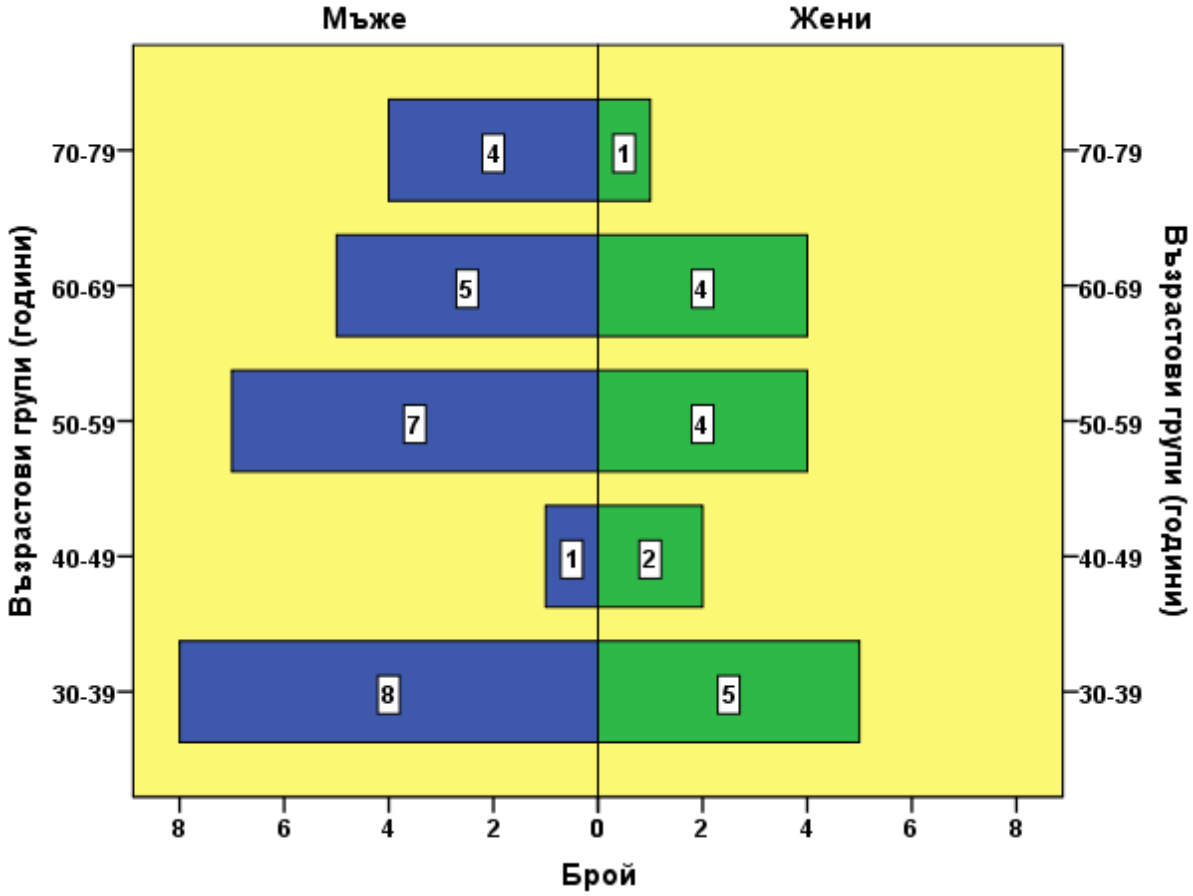
4.2 Експресионен анализ на BPIFA1.

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

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

Изследван контингент

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



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

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

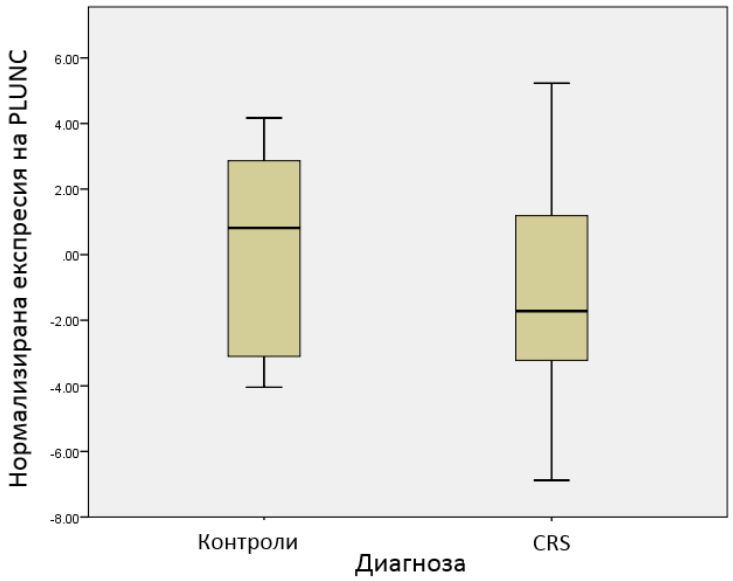
Таблица 6: Сравнителен анализ на показателите пол и възраст при случаи и контроли

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

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

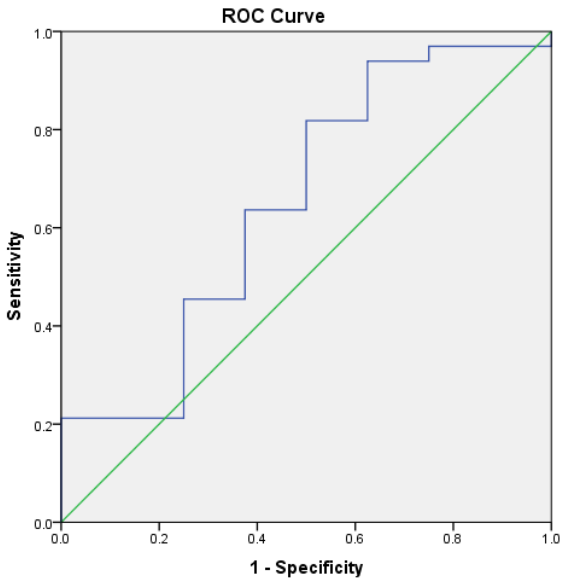
Таблица 7. Резултати от BPIFA1 експресионния анализ в тъкан на пациенти с CRS и контроли, служещи за калибратори

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



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

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



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

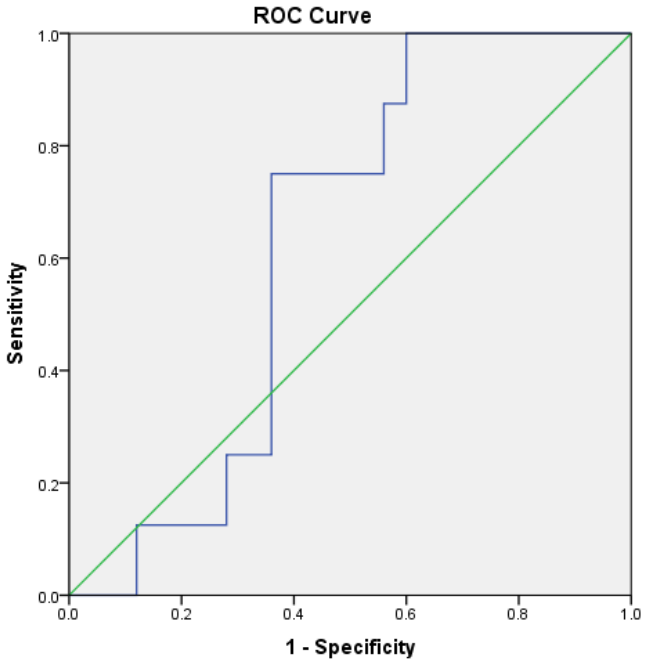
Площта под кривата (AUC) е 0.652 с чувствителност и специфичност съответно 81.8% и 50%, но резултатът недостига статистическа значимост (p=0.19). Тези резултати показват, че експресионните нива на BPIFA1 не могат да разграничат надеждно пациентите от контролите. Това трябва да се потвърди в по-голяма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

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

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

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

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



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

При пациентите с ХРС и с полипи средната стойност на експресията е по-ниска спрямо тази на пациентите с ХРС без полипи, като разликата има гранично сигнификантен характер (p<0,1) (табл. 9).

От табл. 10 става ясно, че:

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

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

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

Таблица 10: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) според наличието на астма

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

Средните стойности на експресията при пушачите и в двете изследвани групи (случаи и контроли) са по-ниски в алгебричен план, но при случаите разликата няма статистически достоверен характер, а при контролите липсва необходимата статистическа представителност за направата на достоверен статистически извод (табл. 11 и 12).

На табл. 13 се вижда, че:

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

Аналогични са резултатите от сравнителния анализ на непушачите в двете изследвани групи (табл. 14).

Таблица 11: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пушачи и непушачи при контролите

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

Таблица 12: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с хроничен риносинуит (ХРС) според показателя тютюнопушене

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

Таблица 13: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пушачите от групата с хроничен риносинуит (ХРС) и контролите

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

Таблица 14: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между непушачите от групата с хроничен риносинуит (ХРС) и контролите

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

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

От всички тъканни проби на (n=32) бе изолирана РНК. За първи път се изследва експресия на BPIFA1 гена в лигавицата на средно ухо при човек и при хроничен гноен отит. За първи път се направи сравнение на експресията на BPIFA1 при хроничен гноен отит и при контроли. Установихме експресия при всички изследвани болни (n=32) независимо от състоянието на лигавицата- както при патологично променена мукоза при ХГО така и в нормална мукоза на средно ухо при контроли (двустранна невросензорна глухота) (Таб.15).

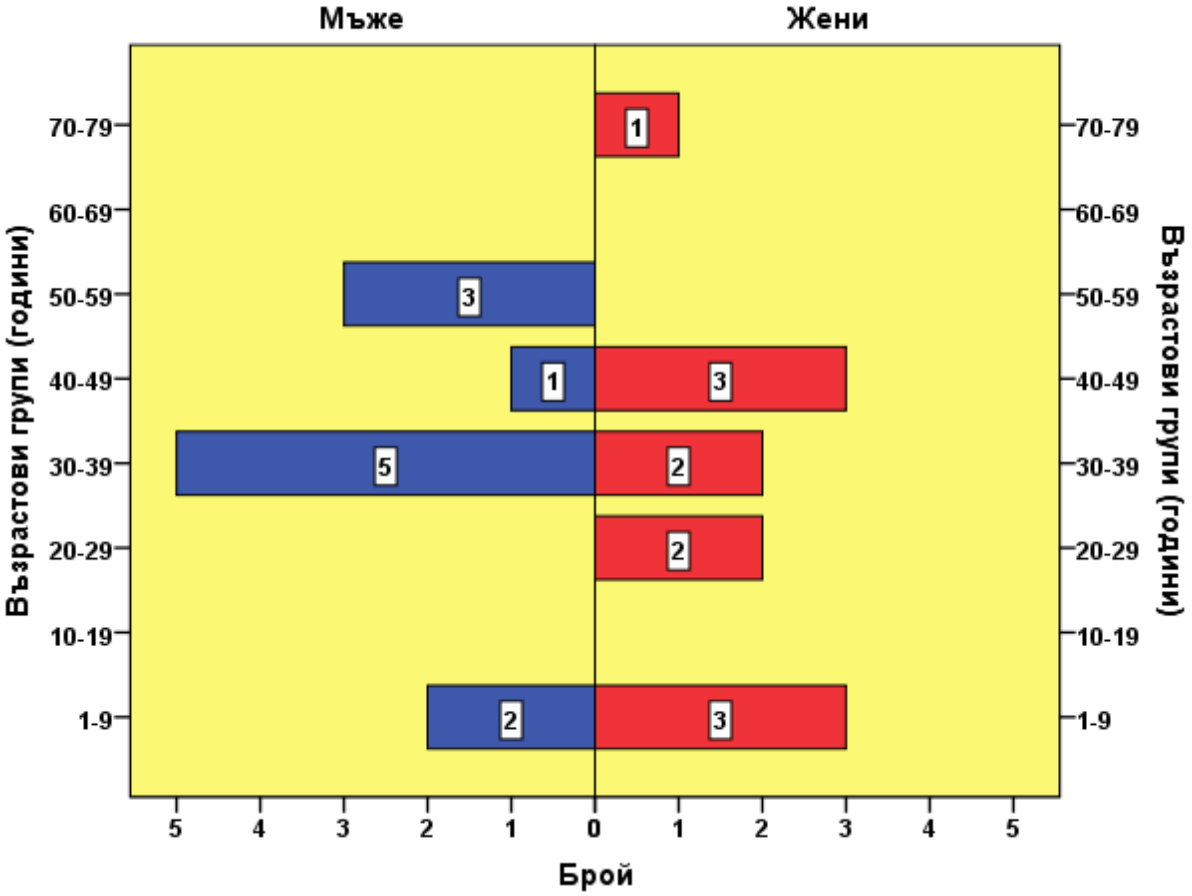
Таб. 15 Сравнение между пациенти с ХГО и контроли

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

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

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

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



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

За целите на настоящето проучване изследваната извадка е разделена на две групи – случаи с гноен отит и контроли с глухота или фрактура на темпоралната кост. Двете групи са изравнени по известните замъгляващи фактори пол и възраст (табл. 16):

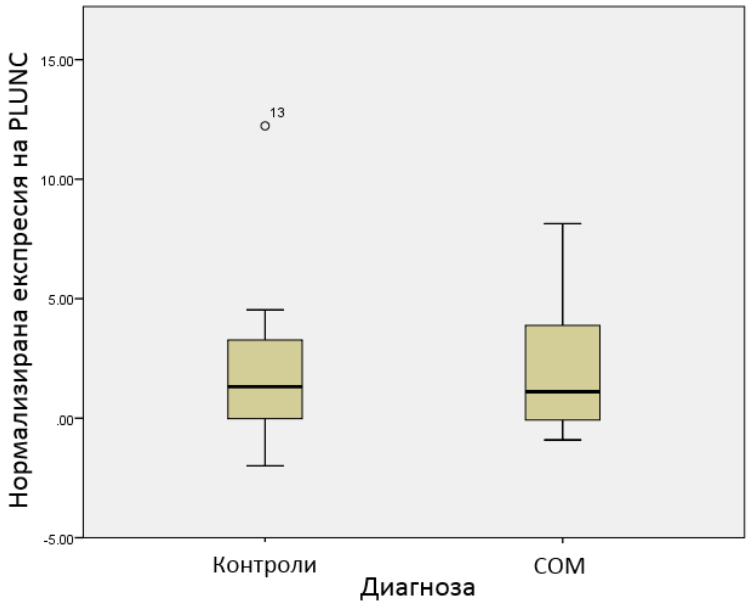
Таблица 16: Сравнителен анализ на показателите пол и възраст при случаи и контроли

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

Таблица 17 демонстрира, че при 16,67% (n=2) от болните с ХГО няма съществена разлика в BPIFA1 експресията спрямо контролите Половината от болните с ХГО показват повишена експресия, а 33,33% (n=4) понижена.

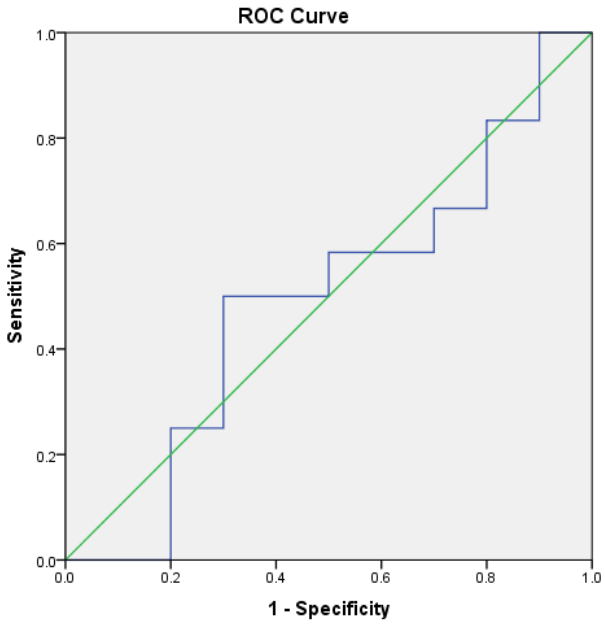
Таблица 17. Резултати от *BPIFA1* експресионния анализ в тъкан на пациенти с ХГО и контроли, служещи за калибратори

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



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

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



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

Сравнителният анализ на RQ value (експресия) на пациентите с гноен отит (ХГО) според извършената операция показа, че (табл. 18):

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

Таблица 18: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) според извършената операция

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

От табл.19 става ясно, че:

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

На табл. 20 се вижда, че:

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

Средната стойност на експресията при пушачите в групата на контролите и случаите е по-ниска от тази на непушачите, но липсва необходимата статистическа представителност на повечето от подгрупите за направата на достоверен статистически извод (табл. 21 и 22).

На табл. 23 се вижда, че:

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

Аналогични са резултатите от сравнителния анализ на непушачите в двете изследвани групи (табл. 24).

Таблица 19: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) и МААТ, и контролната група

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

Таблица 20: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) и радикална трепанация, и контролната група

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

Таблица 21: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пушачи и непушачи при контролите

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

Таблица 22: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) при пациентите с гноен отит (ХГО) според показателя тютюнопушене

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

Таблица 23: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между пушачите от групата с гноен отит (ХГО) и контролите

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

Таблица 24: Сравнителен анализ на RQ value (експресия) между непушачите от групата с гноен отит (ХГО) и контролите

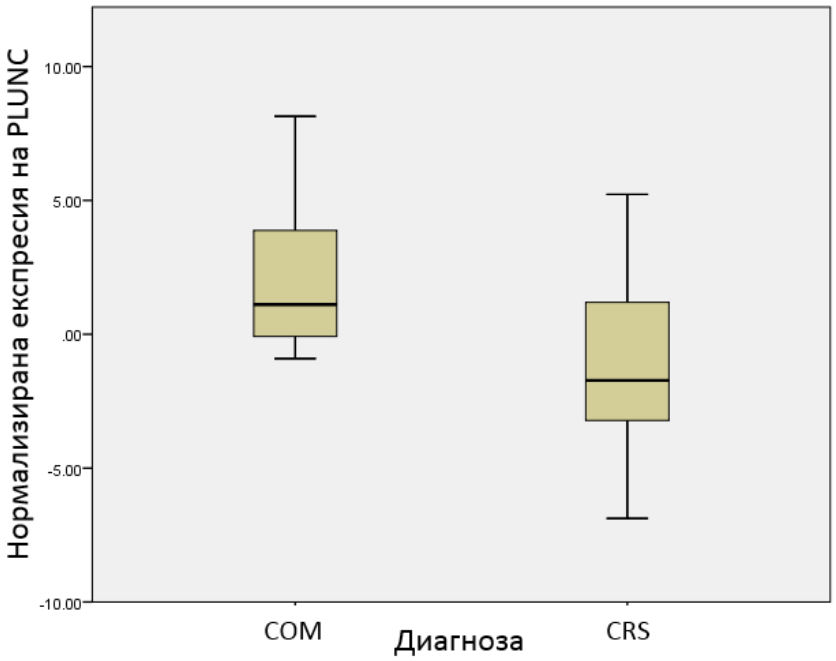
Контроли непушачи			Пациенти с ХГО непушачи			P
n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
6	2,05	1,34	8	2,92	2,92	-

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

За да определим дали има разлика в експресията на BPIFA1 при двете изследвани от нас заболявания направихме сравнение между пациентите с ХРС (CRS) и ХГО(COM). Статистически значима повишена експресия бе наблюдавана в 72.73% от пациентите с CRS в сравнение с пациентите с COM (Таблица 25, Фигура 15).

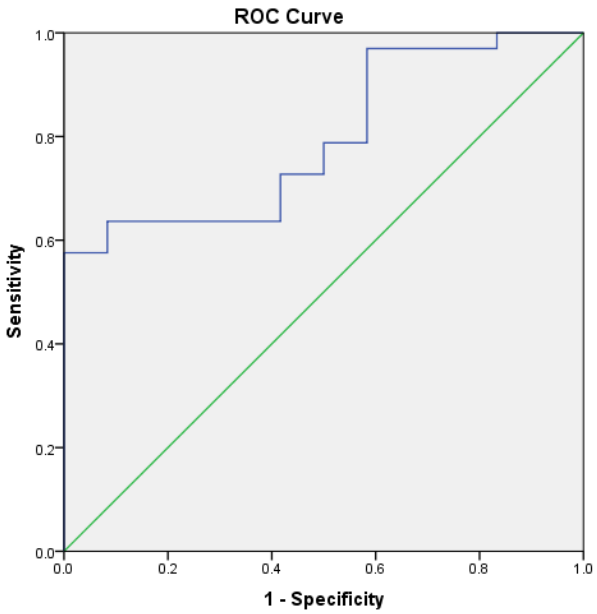
Таблица 25. Резултати от BPIFA1 експресионния анализ в тъкан на пациенти с CRS и COM, служещи за калибратори

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



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

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



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

5. Дискусия

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

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

BPIFA1 играе ролята на негативен регулатор на ЕНаК (епителният натриев канал)**.** Повишената експресия на BPIFA1 води до по-добро очистване на лигавицата от патогени. Също така е възможно да допуснем, че повишаването на експресията на BPIFA1 е отговор на организма към бактериална инфекция с цел подобрение на мукоциларния клирънс чрез втечняване на ASL (airway surface liquid). В 50% (n=6) от нашите болни с ХГО (хроничен гноен отит) се доказа повишена експресия на BPIFA1 спрямо контролната група. Вероятно

е това повишение да е отговор на хроничното възпаление на мукозата на средното ухо. Установено е, че при генно модифицирани мишки, които свръхекспресират BPIFA1, белият дроб на тези мишки показва значително по-слабо изразена фиброза след прекараното възпаление. Това предполага, че BPIFA1 има протективен ефект спрямо фиброзата **.** Така че повишената експресия на BPIFA1 при половината от болните с ХГО е във връзка с ограничаване на фиброзните промени в мукозата на средното ухо. По-слабо изразените фиброзни промени ще бъдат белег за по-доброто състояние на мукозата. Пациенти с ХГО и повишена експресия на BPIFA1 вероятно ще имат по-добре функционираща мукоза и следователно по-добри постоперативни резултати (като разбира се върху хирургичните резултати оказват влияние множество фактори).При болни с ХГО и понижена BPIFA1 експресия ще бъде валидно противоположното.

При 33.33% (n=4) от болните с ХГО беше налична понижена експресия. Предполагаме, че пониженатa експресия е резултат от настъпилите промени в лигавицата на средното ухо с намаление на секреторните елементи и разрастване на фиброзна тъкан. Също така установихме значително повишена средна стойност на BPIFA1 експресия при пациентите с МААТ в сравнение с болните, при които е извършена радикална трепанация на мастоида.Съществува разлика в BPIFA1 експресията между двете групи. По принцип BPIFA1 експресията се променя при инфекция като в едни случаи е повишена, а в други понижена **.** Тази флуктуация в концентрацията на BPIFA1 има важно клинично значение за протекцията на организма. При пациенти подлежащи на МААТ тежестта на патологичния процес е по-малка в сравнение с болните за радикална трепанация.Следователно BPIFA1 има определено отношение към „възпалителното натоварване“ на мукозата на средното ухо аналогично на ХРС (хроничен риносинуит). По-ниската концентрация на BPIFA1 при болните с радикална трепанация е белег за по-сериозното патологично увреждане на лигавицата. В бъдеще могат да бъдат направени опити за използване на BPIFA1 като прогностичен маркер при хроничния гноен отит.

Установено е значително структурно сходство между BPIFA1 и един протеин при конете, наречен латерин. Той е изолиран от конска пот и слюнка. Латеринът упражнява силно изразен сърфактантен ефект на въздушно-водната повърхност **..**Вероятно сърфактанта на горните дихателни пътища разрушава и предотвратява формирането на биофилми.

Вероятно част от стратегията на горните дихателни пътища за борба с бактериалната колонизация е образуването на сърфактант. Установено е при ин витро опити, че в присъствие на BPIFA1 значително намалява формирането на биофилм от *Ps. Aeruginosa* **.** BPIFA1 участва в неспецифичния имунитет на ГДП като намалява повърхностното напрежение на повърхността екстрацелуларен матрикс/бактерии. По този начин BPIFA1 нарушава началните етапи на образуването на биофилм-бактериалната агрегация и формирането на микроколония. В мукозата на средното ухо BPIFA1 ще ограничава формирането на биофилми, ще предотвратява развитието и хронифицирането на възпалителните заболявания на средното ухо.

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

Според McGillivary и Bakaletz , BPIFA1 като сърфактант играе съществена роля в хомеостазата и протекцията на средното ухо при чинчила. Техните резултати демонстрират важната функция на BPIFA1 като сърфактант на дихателните пътища, Евстахиевата тръба и вероятното му участие в патогенезата на възпалителните заболявания на дихателните пътища и средното ухо. При блокиране експресията на BPIFA1 при чинчила настъпва дисфункция на Евстахиевата тръба-нарушено изравняване на налягането и промени в мукоцилиарния клирънс в сравнение с контроли. При опитните животни с блокирана BPIFA1 експресия се наблюдава отрицателно налягане в кавум тимпани с ретракция на тъпанчевата мембрана в сравнение със здрави контроли.

Тези резултати получени експериментално при чинчила и доказаната експресия на BPIFA1 в мукоза на средно ухо при човек, предполагат аналогична роля на BPIFA1 протеина при нормална мукоза на средно ухо и при хроничен гноен отит при хора. BPIFA1 протеина

определено е част от неспецифичната имунна система на средното ухо и е твърде вероятно участието му в патогенезата на възпалителните заболявания на средното ухо. BPIFA1 ще влияе върху функцията на нормалната коменсална микрофлора на средното ухо.

Нивата на BPIFA1 могат да варират в отговор на активиране на различни пътища на неспецифичния имунитет. Тази флуктуация в концентрацията на BPIFA1 вероятно участва в инициирането на имунния отговор и активиране на други протективни механизми, които са по ефективни за елиминиране на бактериалната инфекция. BPIFA1 бързо се променя по време на инфекция. В нашите болни с ХГО установихме понижена експресия на BPIFA1 при 33,33% (n=4), а повишена при 50% (n=6) и без значима разлика са 16, 67% (n=2). Общо при 80,33% от болните с ХГО установихме, че съществува разлика в BPIFA1 експресията спрямо контролната група. Разликата между двете групи не достигна статистическа значимост (p=0.947), което вероятно се дължи на малкия брой изследвани лица. Смятаме, че евентуални бъдещи изследвания в тази насока ще покажат съществуваща значима разлика между болни с хроничен гноен отит и контроли, както и участие на BPIFA1 в патогенезата на възпалителните заболявания на средното ухо.

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

Установихме експресията на BPIFA1 във всички изследвани от нас 33 болни с хроничен риносинуит и в 8 контролни пациенти, което потвърждава провежданите до момента различни проучвания за значително изразената експресия на BPIFA1 в мукозата на дихателните пътища в норма и патология. При 21.21% от пациентите с хроничен

риносинуит доказахме изключително понижена експресия спрямо контролната група. Manea et al. през 2015 год. са изследвали 34 болни с хроничен риносинуит и 10 контроли. Те установяват значително понижена експресия на BPIFA1 във 23,52% от пациентите спрямо контролната група**.** Вероятно съществува връзка между промяната в експресията на BPIFA1 и промяната от нормална към патологична лигавица при хроничен риносинуит. Тази възможна връзка към момента остава неясна. Друг съществен момент е, че всички тези 21.21% от нашите пациенти със значително понижена експресия на BPIFA1 са болни, които са подложени на поредна оперативна интервенция поради рецидив на хроничния възпалителен процес на синусната лигавица. Следователно всяка следваща оперативната намеса води до влошаване на локалния неспецифичен имунитет и цялостното състояние на синусната мукоза. Напоследък като най-важен индикатор за дългосрочния резултат от операцията се приема хипотезата за „възпалителното натоварване“. Следователно намаляването на това „възпалително натоварване“ (например по определен начин чрез използване на рекомбинантен BPIFA1) при пациенти с по-радикална хирургична интервенция ще доведе до по-малка нужда от реоперация и до по-добър краен резултат **.**

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

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

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

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

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

6. Изводи.

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

2. BPIFA1 експресията се променя при хроничен гноен отит.

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

4. BPIFA1 експресията се променя при хроничен риносинуит.

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

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

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

8. Приноси.

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

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

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

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

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

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

Списък с публикациите свързани с дисертационния труд:

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

Участия в конгреси свързани с дисертационния труд:

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

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

БЛАГОДАРНОСТИ

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

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