

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

---

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

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

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

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

**Докторска програма: ИМУНОПАТОЛОГИЯ И АЛЕРГОЛОГИЯ**

**Научни ръководители:**

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

**Научен консултант:**

**Проф. д-р Марко Чикарди**

**София, 2018**



*На моите учители,  
На моето семейство и приятели,  
На пациентите и всички, които бяха до мен в това приключение...*

А

## і. Съкращения

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

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

## ii. Съдържание

<b>1. ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>8</b>
<b>2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР</b> .....	<b>10</b>
ИСТОРИЯ НА АНГИОЕДЕМА: От QUINKE ДО БРАДИКИНИН.....	12
КЛАСИФИКАЦИЯ НА АЕ .....	14
Наследствен ангиоедем (НАЕ) .....	15
Придобит ангиоедем (ААЕ) .....	16
ПАТОФИЗИОЛОГИЯ НА АНГИОЕДЕМА .....	19
Хистаминергичен ангиоедем.....	20
Брадикинин-медиран ангиоедем .....	22
КЛИНИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФЕНОТИПОВЕ НА АНГИОЕДЕМА.....	26
Наследствен ангиоедем с дефицит на C1 инхибитора, C1-INH-НАЕ: тип I и II .....	28
Наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитора, nC1-INH-НАЕ .....	30
Придобит ангиоедем, асоцииран с прием на ACEI, ACEI-AAE .....	32
Придобит ангиоедем с дефицит на C1-INH, C1-INH-AAE .....	32
Придобит идиопатичен ангиоедем: IH-AAE и InH-AAE .....	33
ДИАГНОЗА НА АНГИОЕДЕМА .....	35
Клинична диагноза .....	35
C1 ИНХИБИТОР – SERPIN VS. NON-SERPIN ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	40
ТЕРАПИЯ НА АНГИОЕДЕМА .....	42
Лечение при остри атаки на ангиоедем .....	44
Профилактично лечение .....	46
УРТИКАРИЯ.....	51
Определение.....	51
Патофизиология.....	53
Имунна дисрегулация при ХУ .....	54
Международни гайдлайни за лечение на ХУ .....	55
ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР: НЕРЕШЕНИ ПРОБЛЕМИ И БЪДЕЩИ НАСОКИ.....	57
<b>3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	<b>60</b>
ЦЕЛ .....	60
ЗАДАЧИ.....	60
<b>4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	<b>61</b>
МАТЕРИАЛИ .....	61
Брадикинин-медиран ангиоедем .....	64
Хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария .....	64
МЕТОДИ .....	65
Документален метод .....	65
Клинични методи.....	66
Лабораторни изследвания.....	66
Имунологични изследвания .....	67
Измерване на C1-INH (концентрация).....	68
Измерване на C1-INH (функция).....	68
Измерване на C4 .....	69
Измерване на C1q .....	70
Измерване на плазмения кининоген с високо-молекулно тегло (HMWK) .....	70
Имуноензимен метод (ELISA) за определяне на антитела срещу C1-INH.....	72
Имуноензимен метод (ELISA) за измерване интерлевкин IL-6 .....	73
Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на интерлевкин IL-10 .....	75
Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на интерлевкин IL-33 .....	75
Имуноензимен метод (ELISA) за измерване на химиокин CCL2/MCP-1 .....	75

Генетични изследвания.....	75
СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ.....	81
<b>5. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>83</b>
ГЛАВА 1.....	83
ПРЕДЛАГАНЕ НА СЪВРЕМЕННА КЛИНИЧНА И ПАТОФИЗИОЛОГИЧНА КЛАСИФИКАЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С АНГИОЕДЕМ.....	83
ГЛАВА 2.....	86
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПАЦИЕНТИ С ПРОЯВИ НА ХИСТАМИНЕРГИЧЕН АНГИОЕДЕМ И ХРОНИЧНА УРТИКАРИЯ ЧРЕЗ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛИ ЗА МИНИМАЛНО-ПЕРСИСТИРАЩО СИСТЕМНО ВЪЗПАЛЕНИЕ .....	86
ГЛАВА 3.....	98
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ С ПРОЯВИ НА РЕДКИ ФОРМИ НА БРАДИКИНИН-МЕДИИРАН АНГИОЕДЕМ, ЧРЕЗ ОЦЕНКА НА ТЕХНИТЕ ДЕМОГРАФСКИ, КЛИНИЧНИ И ИМУНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ.....	98
<b>Период 1971-2012</b> .....	98
Демографска характеристика .....	99
Смъртни случаи.....	101
<b>Период 2013-2018</b> .....	105
Демографска характеристика .....	106
Смъртни случаи.....	110
Клинични прояви на НАЕ.....	113
Инвазивни процедури.....	114
Клинична тежест на НАЕ .....	117
Терапевтично поведение при пациентите с НАЕ .....	121
Тригери на НАЕ .....	123
Продроми на НАЕ.....	125
Съпътстващи заболявания .....	126
Лабораторни изследвания .....	127
ГЛАВА 4.....	133
СЪЗДАВАНЕ НА КАРТА НА ПАЦИЕНТИТЕ С РЕДКИ ФОРМИ НА АНГИОЕДЕМ (C1-INH-НАЕ) НА ТЕРИТОРИЯТА НА Р. БЪЛГАРИЯ И ИЗЧИСЛЯВАНЕ ЧЕСТОТАТА НА ДИАГНОЗАТА В РАЗЛИЧНИТЕ АДМИНИСТРАТИВНИ ОБЛАСТИ НА СТРАНАТА.....	133
Честота на НАЕ .....	133
Честотата на диагнозата, според административните райони на Р. България и карта на C1-INH-НАЕ .....	134
ГЛАВА 5.....	137
ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИНОСИТЕ НА ГЕНЕТИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ И БИОБАНКИРАНЕТО ПРИ ПАЦИЕНТИ С АНГИОЕДЕМ .....	137
ГЛАВА 6.....	144
ПРЕДЛАГАНЕ НА КЛИНИЧЕН АЛГОРИТЪМ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ И ПОВЕДЕНИЕ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С ПРОЯВИ НА АНГИОЕДЕМ.....	144
<b>7. ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>147</b>
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 1 .....	147
ПРЕДЛАГАНЕ НА СЪВРЕМЕННА КЛИНИЧНА И ПАТОФИЗИОЛОГИЧНА КЛАСИФИКАЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С АНГИОЕДЕМ.....	147
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 2 .....	149
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПАЦИЕНТИ С ПРОЯВИ НА ХИСТАМИНЕРГИЧЕН АНГИОЕДЕМ И ХРОНИЧНА УРТИКАРИЯ ЧРЕЗ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛИ ЗА МИНИМАЛНО-ПЕРСИСТИРАЩО СИСТЕМНО ВЪЗПАЛЕНИЕ .....	149
ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 3 .....	153
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ С ПРОЯВИ НА РЕДКИ ФОРМИ НА БРАДИКИНИН-МЕДИИРАН АНГИОЕДЕМ, ЧРЕЗ ОЦЕНКА НА ТЕХНИТЕ ДЕМОГРАФСКИ, КЛИНИЧНИ И ИМУНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ.....	153
<b>Период 1971-2012</b> .....	154
Демографска характеристика .....	156
<b>Период 2013-2018</b> .....	159
Демографска характеристика .....	160
Смъртни случаи.....	162

Клинични прояви на НАЕ.....	163
Инвазивни процедури.....	164
Клинична тежест на НАЕ.....	165
Терапевтично поведение при пациентите с НАЕ.....	167
Тригери на НАЕ.....	168
Продроми на НАЕ.....	169
Съпътстващи заболявания.....	170
Лабораторни изследвания.....	172
<b>ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 4.....</b>	<b>176</b>
СЪЗДАВАНЕ НА КАРТА НА ПАЦИЕНТИТЕ С РЕДКИ ФОРМИ НА АНГИОЕДЕМ (С1-INH-НАЕ) НА ТЕРИТОРИЯТА НА Р. БЪЛГАРИЯ И ИЗЧИСЛЯВАНЕ ЧЕСТОТАТА НА ДИАГНОЗАТА В РАЗЛИЧНИТЕ АДМИНИСТРАТИВНИ ОБЛАСТИ НА СТРАНАТА.....	176
<b>ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 5.....</b>	<b>179</b>
ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИНОСИТЕ НА ГЕНЕТИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ И БИОБАНКИРАНЕТО ПРИ ПАЦИЕНТИ С АНГИОЕДЕМ.....	179
<b>ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 6.....</b>	<b>184</b>
ПРЕДЛАГАНЕ НА КЛИНИЧЕН АЛГОРИТЪМ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ И ПОВЕДЕНИЕ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С ПРОЯВИ НА АНГИОЕДЕМ.....	184
<b>8. ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ.....</b>	<b>186</b>
Изводи.....	186
ПРЕПОРЪКИ.....	187
<b>9. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>188</b>
ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ.....	188
ПОТВЪРДИТЕЛНИ ПРИНОСИ.....	189
<b>10. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ.....</b>	<b>190</b>
ПУБЛИКАЦИИ.....	190
НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ.....	191
<b>11. ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>194</b>
<b>12. БИБЛИОГРАФИЯ.....</b>	<b>195</b>

## 1. Въведение

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

Съвременната класификация разграничава наследствени и придобити форми на ангиоедем, свързани или независими от дефицита на С1 инхибитора. Напоследък се описват и допълнителни механизми в патогенезата на ангиоедема, включително неконтролираното активиране на фактор XII, генерирането на вазоактивни медиатори на плазмените каскадни системи, които причиняват дисрегулация на ендотелните клетки, както и съпътстващо взаимодействие между медиаторите, получени от активирането на мастоцитите и плазмената контактна система.

Всички тези конкурентни механизми могат да доведат до проявата на различни клинични фенотипове на заболяването. Честотата, тежестта и локализацията на пристъпите са различни сред различните пациенти, както и при един и същ пациент в различни периоди на живота му. Тежестта на клиничния фенотип силно влияе върху качеството на живот на пациентите. Независимо от големия



напредък в познанието за механизмите на рецидивирания ангиоедем, все още остават редица нерешени въпроси, които са причина за неудовлетворените нужди на пациентите и техните близки.

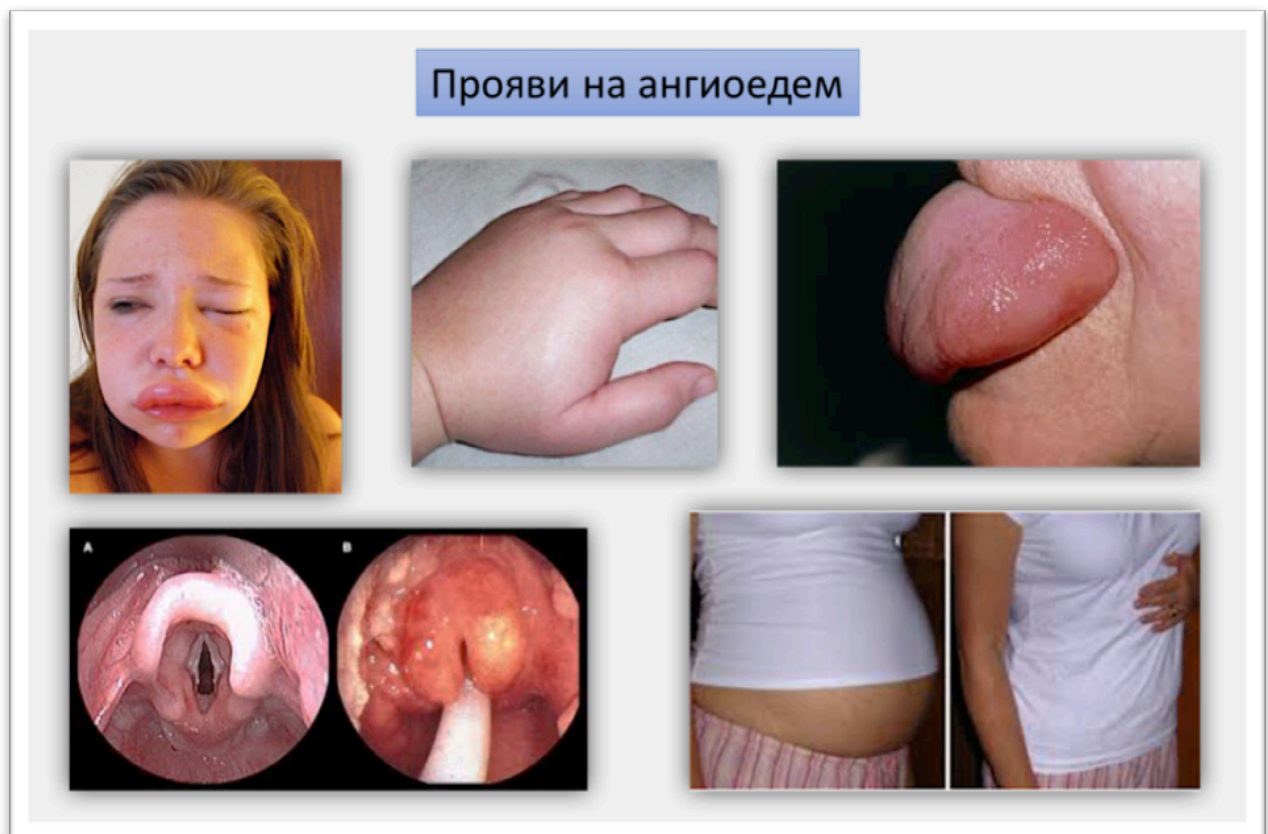
Уртикарията е състояние, характеризиращо се с развитие на уртики, ангиоедем или и двете. Хроничната спонтанна уртикария (ХСУ) е често и трудно за преодоляване заболяване в алергологичната практика. Клинично болестта се изразява с рецидивирани, бързопреходни, сърбящи обриви (уртики) по кожата, които се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

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

## 2. Литературен обзор

Ангиоедемът се дефинира като локализиран и самоограничаващ се едем на дълбоките слоеве на кожата или лигавиците, причинен от временно увеличение на съдовата пропускливост, под действието на вазоактивен(и) медиатор(и) (1). Ангиоедемът се проявява клинично с пристъпи на асиметрични отоци, обхващащи подкожни и/или лигавични повърхности. Засегнатите участъци обичайно са несърбящи, по-скоро болезнени. Диагнозата се поставя с просто око при подкожните форми или в областите на видими лигавици, докато отоците на тънкочревната мукоза, се проявяват клинично със силни коремни болки, със или без повръщане и/или диарийни изхождания.

Фигура 1. Клинични прояви на ангиоедем



Ангиоедемът може да възникне при отсъствие или при наличие на уртикария, да бъде наследствен или придобит и да бъде причинен от различни медиатори, включително хистамин и брадикинин.

Хистамин-медирианият ангиоедем често се свързва с уртикария при така наречения оточно-обривен синдром: клинична съвкупност с висока честота в ежедневната лекарска практика, която може да се провокира от алергични или неалергични стимули. Когато проявите на ангиоедем се асоциират с поява на спонтанни уртикариални обриви, състоянието се смята за част от спектъра на хроничната уртикария (2).

Рецидивирацият идиопатичен ангиоедем, протичащ без асоциация с уртикария (първичен ангиоедем), се разглежда като мистериозна болест, често диагностицирана на базата на изключването (3).

Брадикинин-медирианите ангиоедеми са с по-ниска честота и обикновено са по-трудни за диагностициране. Те са отговорни за непропорционално по-голям процент от потенциално сериозните усложнения и смъртност, свързани с проявите на ангиоедем (4-6).

Независимо от механизма, по който възниква ангиоедемът, основното патофизиологично събитие за появата му е преходна пароксизмална вазодилатация, свързана с повишена съдова пропускливост на съдовете в дълбоките слоеве на дермата, поради локалното освобождаване на вазоактивни медиатори (7). Причинните медиатори могат да бъдат освобождавани от клетки на възпалението, живеещи в тъканите, например мастоцити, или попаднали на мястото от системното кръвообращение, например базофили и еозинофили. Вазоактивните медиатори могат да бъдат генерирани също и чрез активиране на плазмени биоамплификационни компоненти като контактната система и

освобождаване на вазоактивен брадикинин, или каскадата на комплемента, с освобождаване на анафилатоксините C3a и C4a. Брадикининът е най-добре проученият вазоактивен медиатор на АЕ, но в момента се търсят и други молекули, допринасящи за проявите на пароксизмална съдова свръх-пропускливост.

Възможните причини за възникване на рецидивиращ ангиоедем са твърде хетерогенни, вариращи от наследствени или придобити причини, до асоциация с прием на някои групи лекарства. Правилният диагностичен подход и идентифицирането на конкретния фенотип на ангиоедема, е основна стъпка за доброто планиране на лечението при проява на пристъп или за профилактика на атаките при тези пациенти.

### ***История на Ангиоедема: От Quinke до брадикинин...***

Първото съвременно описание на ангиоедема е направено от Quinke през 1882 г (8), т.нар. “ангионевротичен” оток. Това наблюдение скоро е последвано от класическото описание на наследствения ангиоедем (НАЕ) от Osler, който първи документира наследствената природа на заболяването (1888) (9). Патофизиологичната основа на НАЕ като дефицит на C1-инхибитора (C1-INH) е открита в началото на 60-те години на 20ти век от екипа на Virginia Donaldson (10), като малко след това Fred Rosen et al. съобщават и за втора форма на заболяването, характеризираща се с количествено нормален, но дисфункционален C1-INH (11, 12). Въз основа на тези наблюдения, НАЕ се разделя на два отделни подтипа: **Тип I**, с количествено и функционално намален C1-INH и **Тип II**, с нормални количествени нива на C1-INH, но понижена

функционална активност. По-късно се установяват и фундаменталните аномалии при НАЕ Тип I и Тип II, а именно мутации в гена, отговорен за синтеза на C1-INH (*SERPING1* gene, намиращ се в дългото рамо на 11-та хромозома: 11q12-q13.1), и унаследяването на болестта, предаващо се по автозомно-доминантен път (13, 14).

В допълнение към наследствения дефицит на C1-INH се описват и придобити форми на недостиг на C1-инхибитора (C1-INH-AAE) (15, 16). Придобитите ниски нива на C1-INH се свързват най-често с наличие на друго подлежащо основно заболяване, най-често лимфопролиферативно разстройство (B-клетъчен лимфом, моноклонална гамопатия от неопределена значимост (MGUS) и др.) (17). Причинно-следствената връзка между придобития C1-INH дефицит и наличието на анти-C1-INH авто-антитела е открита през 1986г (18).

През 2000 г. Bork et al. описват и друга форма на НАЕ, характеризираща се с нормални количества и функция на C1-INH и без аномалии в *SERPING1*, описан първоначално като НАЕ **Тип III** (19). Тази форма се описва независимо по същото време и от Binkley et al. (20). Към момента третата форма на НАЕ се разглежда като хетерогенна съвкупност от различни генетични аномалии, водещи до фамилна предразположеност към прояви на нехистаминергичен ангиоедем, в някои случаи асоциирани с установени мутации на гените, отговорни за синтезата на Фактор 12 (F12) от коагулационната каскада, плазминоген (PLG) или ангиопоетин-1 (ANGPT1) (21-23).

АСЕ-инхибиторите (АСЕI) се явяват непредсказуеми и значими причинители на ангиоедем от въвеждането им в началото на 80-те години на миналия век като широко използвани антихипертензивни средства. Проявите се приемат като

класов ефект на тази група лекарства и са свързани с намаленото разграждане на брадикинина (24, 25).

Ангиоедем при пациенти без фамилна анамнеза, нормални C1-INH количествени и функционални нива, без данни за прием на ACE-инхибитори и терапевтично неповлияващи се от високи дози антихистамини +/- кортикостероиди се категоризира като идиопатичен нехистаминергичен ангиоедем (InH-AAE) (26).

Обединяване на всички тези различни състояния (HAE, придобит C1-INH дефицит, ACEI-асоцииран ангиоедем и идиопатичен нехистаминергичен ангиоедем), се допуска поради презумпцията, че повечето, ако не всички, са медиирани от действието на брадикинин.

### **Класификация на АЕ**

Настоящата класификация на ангиоедема без уртикария е разработена от Cicardi и Международната работна група за Наследствен ангиоедем (HAWK) (27), като в нея се разграничават две основни групи ангиоедем: наследствен (HAE) и придобит (AAE).

Напоследък се налага осъвременяване в частта отнасяща се към HAE с нормален C1-INH (**нIC1-INH-HAE**), поради бурното откритие на нови патогенни мутации през изминалата 2017-2018 година (21-23). Като отделни единици се описват 5 типа HAE и 4 типа AAE.

Фигура 2. Класификация на ангиоедема, адаптирана по Cicardi et al. (27)



### Наследствен ангиоедем (HAE)

HAE е рядко автозомно доминантно заболяване, което води до повтарящи се атаки на потенциално живото-застрашаващи отоци, които се срещат в членове на едно и също семейство. Независимо от това, в някои от случаите, HAE се развива в резултат на *de novo* (нововъзникнали) мутации. Тази подробност е много важна за клиничната практика, тъй като диагнозата на HAE не бива да се изключва с лека ръка при пациенти без фамилна анамнеза за ангиоедем.

При повечето пациенти с HAE се наблюдават мутации в гена *SERPING1*, отговорен за синтеза на плазмения протеин С1 инхибитор (C1-INH), което води до намален синтез на нормален C1-INH (**C1-INH-HAE тип I**) или експресия на дисфункционален C1-INH (**C1-INH-HAE тип II**) (28). Независимо от това, мутации в гена, кодиращ коагулационния фактор XII (FXII), са идентифицирани

в подгрупа от пациенти, които имат клинични прояви на HAE, но нямат аномалии в параметрите на комплемента и липсва мутация в гена *SERPING1* (**FXII-HAE**) (21). През последната година се откриха и два нови подтипа на HAE асоциирани с мутации в гените за плазминоген (**PLG-HAE**) (22) и ангиопоетин-1 (**ANGPT1-HAE**) (23). Въпреки този напредък, в много семейства с клинична изява на HAE и нормален C1-INH, не може да се установи генетична мутация и този вариант понастоящем се определя като unknown-HAE (U-HAE, неизвестен-HAE) (29).

### *Придобит ангиоедем (AAE)*

Най-честата форма на AAE е тази, която се отнася към групата на хистаминергичния ангиоедем. При голяма група пациенти причината за повтаряща се алергична реакция остава неясна (идиопатичен хистаминергичен ангиоедем, **IH-AAE**). По-малка част от идиопатичния ангиоедем се определя като нехистаминергичен (**InH-AAE**), базирано на липсата на подобрение на симптомите при продължителното лечение с висока доза антихистамини. При IH-AAE се предполага ролята на медиатори, получени при дегранулацията на мастоцити и базофили, докато в патогенезата на InH-AAE се обмисля участието на други вазоактивни медиатори, включително брадикинин или припокриване на различни медиатори и/или плазмени биоамплификационни системи.

Друга голяма група AAE е тази, асоциирана с приема на някои антихипертензивни лекарства: инхибиторите на ангиотензин-конвертиращия ензим (ACE инхибитори, ACEI). Те причиняват AAE без уртикария, поради инхибирането на ACE, който участва в разграждането на брадикинина до



неактивни пептиди. **ACEI-AAE** трябва да се счита за класов ефект от този вид лекарства и може да се появи по всяко време - седмици или дори години след започване на лечението. Преустановяването на приема на ACEI не винаги е свързано с незабавното понижаване честотата и тежестта на епизодите на ангиоедем. При някои пациенти се наблюдават спонтанни рецидиви, дори месеци след спиране на терапията с ACEI. Въпреки това, ако проявите на ангиоедем не изчезнат в рамките на няколко месеца след спирането на ACEI, трябва да се обмисли алтернативна диагноза [7].

Напоследък се описват и случаи на ангиоедем при съвместния прием на ACEI с антидиабетните средства, инхибитори на дипептидил пептидаза-4 (DPP-4). Описаното не е неочаквано предвид връзката на DPP-4 с разграждането на брадикинин и съвместния механизъм, по който заедно с ACEI водят до локално увеличение на последния (30-33). Последните антихипертензивни медикаменти, асоцииран с тежки прояви на брадикининов ангиоедем, са неприлизиновите инхибитори (34-36). Това е причина за неприемливото им комбиниране с медикаменти от класа на ACEI (37). От друга страна, даването на лекарства от класа на ангиотензин рецепторните антагонисти (ARB или сартани), се счита за значително по-безопасно с оглед риска от възникване на брадикининов ангиоедем (38).

Придобитият дефицит на C1-INH (**C1-INH-AAE**) е много рядко състояние, при което намалението на C1-INH най-често се свързва с автоимунни или лимфопролиферативни заболявания. Моноклоналната гамапатия с неопределено значение (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) често се свързва с C1-INH-AAE (39, 40). Неговата патогенеза е свързана с консумацията на C1-INH от неопластични лимфни тъкани и/или формирането

на неутрализиращи анти-C1-INH автоантитела (41). Интересното е, че първата атака на ангиоедем често предхожда с няколко години появата на хематологичното заболяване (39).

Настоящата класификация на ангиоедема има няколко ограничения, свързани най-вече със случаи от клиничната практика, които не могат да бъдат ясно класифицирани към някой от подвидовете ангиоедем. Основните затруднения се отнасят до групата на InH-AAE, тъй като патогенетичните аспекти на това състояние остават до голяма степен неизяснени и съществуват сериозни доказателства, че тази форма на ангиоедем е хетерогенна група и вероятно включва варианти с различни патогенетични механизми. Липсата на отговор към профилактичната терапия с висока доза антихистамини подкрепя ролята на нехистаминергичен ангиоедем и/или съучастие на други пътища за стимулиране на хиперпермеабилитет, в това число и брадикин. Въпреки това, положителният отговор на лечението с анти-IgE (омализумаб) при някои пациенти, предполага основна роля на мастоцитите при тази подгрупа от пациентите с InH-AAE (42-45).

Друга класификация, фокусирана върху патофизиологичните механизми на АЕ, е предложена от Giavina-Bianchi et al. (46). Тази класификация се основава на идентификацията от 2 основни групи, при които ангиоедемът се медира от мастоцитна и/или базофилна дегранулация, или съответно от продуцирането на брадикинин.

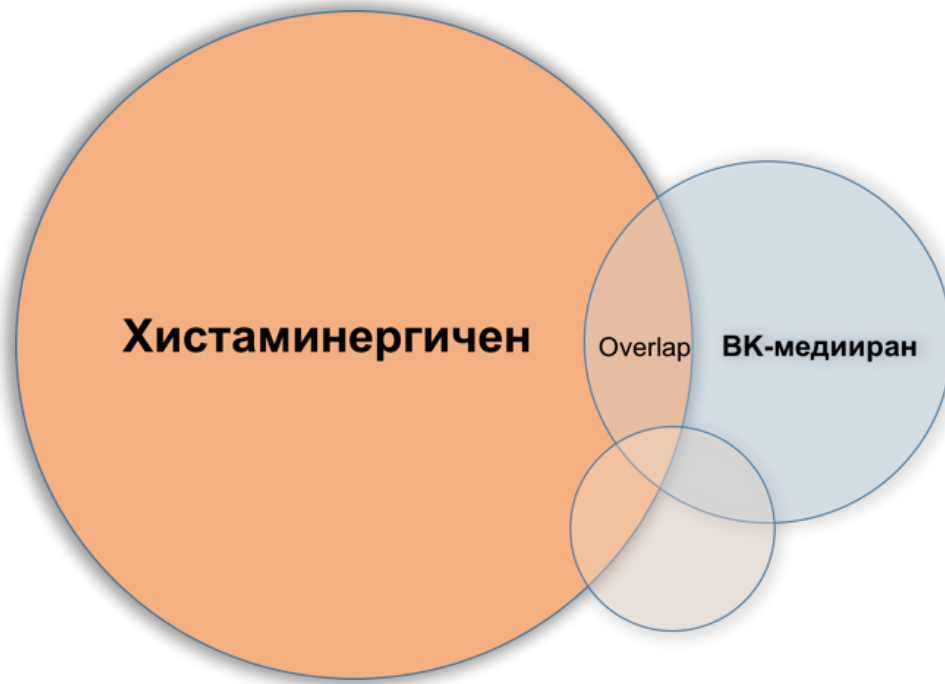
Въпреки това, класификация, основана на твърд патогенетичен дуализъм, продължава да затруднява категоризирането на определени форми идиопатичен ангиоедем, при който може да се предполага припокриване на

различни медиатори и/или активирание на плазмените биоамплификационни системи.

### **Патофизиология на ангиоедема**

Два основни молекулни механизма, водещи до ангиоедем, са идентифицирани до момента: 1) "алергичен" път, свързан с активирането на мастоцити и/или базофили, което води до освобождаване на хистамин и други медиатори като левкотрени, простагландини, както и фактора, активиращ тромбоцитите (PAF), и 2) "неалергичен" път, водещ до генерирането на брадикинин. Тези два пътя, обаче, могат да взаимодействат при определени обстоятелства, тъй като активирането на контактната система и генерирането на брадикинин могат да бъдат индуцирани от медиатори, получени при дегранулацията на мастоцитите, например хепарин (*in vitro* и *in vivo*) (47, 48). Zuraw и Christiansen, например, съобщават за активирание на контактната система и разпадане на високомолекулярния кининоген (high molecular weight kininogen, HMWK) при пациенти със забавена уртикария от натиск (*delayed pressure urticaria*) [лична комуникация]. Тези открития предполагат връзка между "алергичния" и "неалергичния" пъти на ангиоедема, като са необходими допълнителни изследвания, за да се потвърди тази хипотеза.

Фигура 3. Медиатори на ангиоедема

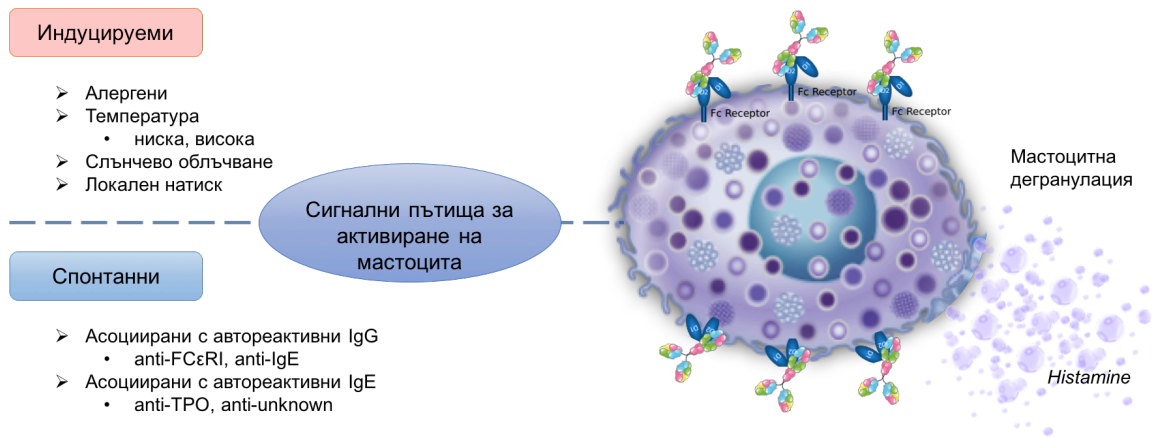


*BK: брадикинин; overlap: припокриване*

### *Хистаминергичен ангиоедем*

Хистаминергичният ангиоедем се асоциира със сигнални механизми (най-често активиране на високоафинитетния рецептор за IgE, FcεRI), водещи до дегранулация на мастоцити и/или базофили с последващо освобождаване на хистамин, триптаза и химаза, които съдържат "ранната фаза" на алергичната реакция и провокират транскрипцията на специфични цитокини (например интерлевкин [IL] -1, -2, -5, -6, -8, -9, -13), химиокини и растежни фактори (напр. васкуларен ендотелен растежен фактор, vascular endothelial growth factor, VEGF), които инициират "късната фаза" на алергичната реакция.

Фигура 4. Активиране на мастоцитната клетка при хистаминергичен ангиоедем



Хистаминът се свързва със селективни H1-рецептори, предизвиквайки вазодилатация и увеличавайки кръвния поток и съдовата пропускливост на подкожните и субмукозните капилляри и/или пост-капилярните венули. Пропускливостта на съдовете зависи от целостта на свързването на ендотелните клетки и клетъчната повърхностна експресия на трансмембрания адхезионен протеин, наречен съдово-ендотелен кадхерин (VE-cadherin). Хистаминът фосфорилира VE-кадхерина, което отслабва тази здрава бариера (49-52).

В допълнение, хистаминът стимулира експресията на азотен оксид (NO), увеличавайки кръвния поток. Нетният резултат е повишена плазмена екстравазация в околните тъкани, което води до клиничен симптом на ангиоедем (53, 54). Основният механизъм при хистаминергичния ангиоедем и уртикария е един и същ: първият се появява в по-дълбоки слоеве на дермата и подкожните тъкани, докато уртикарията се среща в повърхностните папиларни и средно-дермални слоеве на кожата. Сърбежът, който по правило е съпътстващ, е в

резултат от стимулираните от хистамина аферентни влакна тип С и освобождаването на субстанция Р.

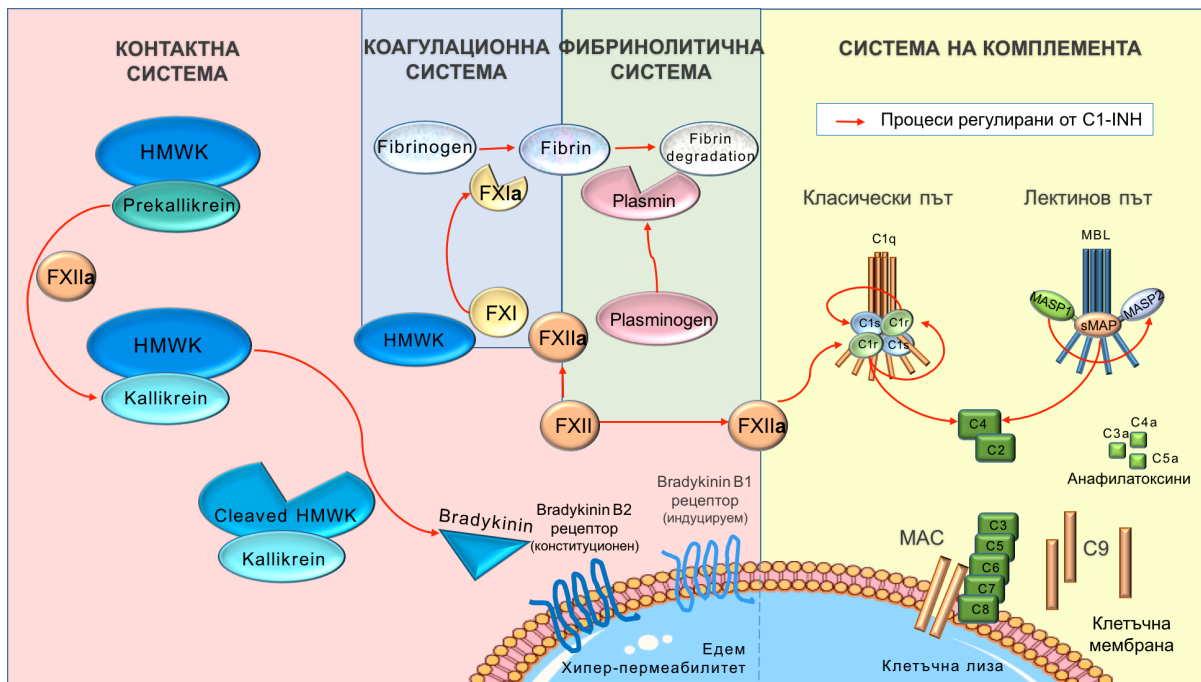
Има множество последващи ефекти от активирането на мастоцитите и базофилите, в това число и синтез на медиаторите на “късната” алергична реакция. Например, няколко клетъчни типа, включително неутрофили, еозинофили, макрофаги, базофили и CD41 Т-клетки, които образуват не-некротизираща локална инфилтрация в тъканите. Тази патология се различава от уртикариалния васкулит, при който има налична некроза на стената на съдовете (55). Активиране от неутрофилите може допълнително да увеличи съдовата пропускливост чрез освобождаване на левкотриен В4. Анафилактоксините С3а и С5а, човешкият антибактериален пептид В-дефензин и субстанция Р имат потенциала да дегранулират мастоцитите (56). В допълнение, изследвания при мишки показват, че инфлуенца А-специфични IgG2a, IgG2b и IgG1 индуцират мастоцитната дегрануляция (57).

Всички тези потенциални патомеханизми на хистаминергичния ангиоедем, не са добре изяснени и тяхното участие и значение като съпътстващ феномен: не са добре проучени.

### *Брадикинин-медиран ангиоедем*

C1-INH е основният инхибитор на компонентите на контактната система и се смята, че слабият контрол на активиране на тази система води до образуване на вазоактивен брадикинин.

Фигура 5. Биоамплификационни плазмени каскади по Valerieva et al. (58)



Контактната система се състои от белтъците FXII, прекаликерин, кининоген с високо молекулно тегло (high molecular weight kininogen, HMWK) и фактор XI. Активирането на контактната система започва с активирането на FXII, което впоследствие разцепва прекаликреина за генериране на каликреин. Каликреинът има 2 субстрата: 1) активира допълнително количество от FXII и 2) освобождава брадикинин при разцепването на HMWK (59-61). Брадикининът се счита за основен в патогенезата на C1-INH-НАЕ и представлява крайния продукт на активирането на контактната системата. Брадикининът е малък вазоактивен нанопептид (9 аминокиселини), действащ на 2 вида рецептори, които се експресират на повърхността на ендотелните клетки: B1R (B1 рецептор, индуцируем рецептор) и B2R (B2 рецептор), който се експресира конституционно на клетъчната повърхност. Брадикининът се свързва с B2R и активира различни проинфламаторни сигнални пътища, които повишават съдовата пропускливост.

Брадикининът причинява хипер-пермеабилитет главно чрез фосфорилиране на VE-кадхерина, експресиран върху клетъчната повърхност (62). В плазмата от пациенти с НАЕ, но не и от нормални донори, брадикинин може да се генерира директно от прекаликреин-НМWK комплекс без активиране на каликреин, медирано от FXIIa. C1-INH стабилизира комплекса прекаликреин-НМWK и предотвратява образуването на брадикинин (63).

Брадикининът не е единственият вазоактивен медиатор, който регулира пропускливостта и съдовия тонус на малките съдове. Други вазоактивни медиатори, като ендотелин-1, аргинин вазопресин, адреномодулин, съдови ендотелни растежни фактори (VEGF фактори) и ангиопоетини са повишени при пациенти C1-INH-НАЕ (64). Освен това, плазмените нива на VEGF и ангиопоетините, които са модулатори на съдовата пропускливост, показват повишение при пациенти с по-висока честота на атаки в безсимптомните периоди. Следователно, хипотезата е, че VEGF факторите и ангиопоетините могат да индуцират състояние на "съдово предразположение" за възникване на пристъп от ангиоедем (64).

Ендотелните клетки също са активни участници в процеса на генерирането на брадикинина. Плазмените нива на разтворим E-селектин и eNOS се повишават при пациенти с C1-INH-НАЕ, което предполага, че активирането на ендотелните клетки може да има роля в патогенезата на възникване на атаките (65, 66). Интересно е, че ендотелните клетки, стимулирани от цитокини и естроген, освобождават HSP-90 (heat shock protein-90), който на свой ред активира директно комплекса прекаликреин-НМWK без наличието на активоран FXII. Това е потенциално важен механизъм в хипотезите за локализираната природа на атаките от ангиоедем (67-69).



Хипотетично, системното активиране на контактната система би следвало да доведе до ангиоедем с множество локализации, което обаче не се потвърждава с данни от клиничната реалност, където ангиоедемът най-често има ясно ограничен характер и се появява на конкретно място от тялото. Освен това, текущата патогенетична хипотеза не обяснява защо някои органи, като например белия дроб, винаги са пощадени от възникване на брадикининов ангиоедем.

Продължителното подуване (часове), наблюдавано при пристъпи на НАЕ, не се вписва добре с бързото десенсибилизиране на B2R, който се счита отговорен за възникването на атаките. Zuraw и Christiansen наскоро предложиха, че B1R, индуцируемият брадикининов рецептор, вероятно има роля в поддържането на атаките (62). Този рецептор се индуцира лесно от различни възпалителни стимули, включително самият брадикинин, и бавно се десенсибилизира или намалява своята експресия. Интересно е, че активирането на B1R от брадикинин възниква конститутивно, но значително се увеличава чрез свързване на брадикининовия метаболит des-Arg-кининов лиганд (des-Arg-bradykinin). Участието на B1R в острите атаки на ангиоедем е привлекателна хипотеза, която изисква по-нататъшно разследване.

Брадикининовият ангиоедем може да се предизвиква и от лекарства, използвани за лечение на редица често срещани заболявания. Най-добре характеризираната форма са ACEI, очевидно поради тяхната интерференция с разграждането на брадикинин. Последните съобщения показват също, че нов клас перорални антидиабетни средства може да опосредстват прояви на ангиоедем (70). Инхибиторите на дипептидил пептидаза IV (DPP-4) (наричани още глиптини) са съвременни лекарства, използвани при лечението на захарен

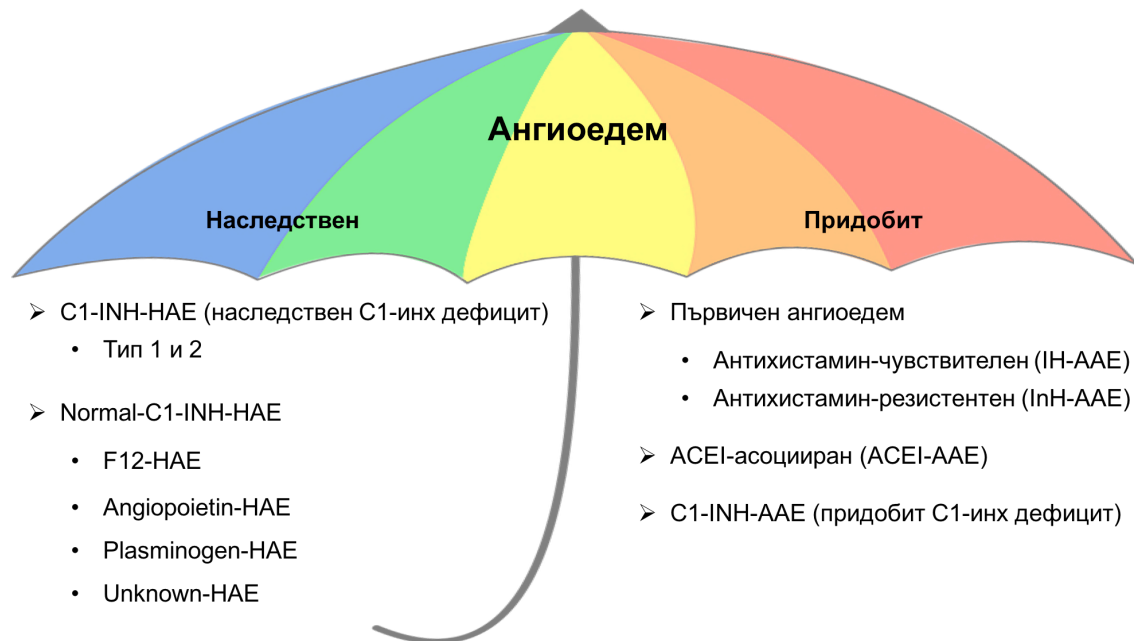
диабет тип 2, които инхибират разграждането на глюкагон-подобен пептид-1 (GLP-1), фактор стимулиращ освобождаването от инсулин от панкреатичните клетки. DPP-4 не е специфичен за GLP-1, но също така играе роля в разграждането на брадикинина. Предполага се, че намаляването на активността на DPP-4, било генетично, или лекарствено индуцирано, може да бъде рисков фактор за поява на АЕ.

По-задълбоченото разбиране на описаните тук механизми би осигурило нови средства за подобряване на диагностиката и лечението на различните видове ангиоедем.

### ***Клинични характеристики и фенотипове на ангиоедема***

Ангиоедемът е хетерогенна съвкупност от различни състояния, водещи до локализиран пароксизмален хиперпермеабилитет и прояви на оток на дълбоките слоеве на дермата и/или субмукозата. Тази съвкупност от различни състояния може да бъде разгледана според клиничните белези или според патофизиологичните механизми, които ги обуславят.

Фигура 6. Фенотипове на ангиоедема



Рецидивиращият ангиоедем се характеризира клинично с появата на окръглени отоци, без еритем и сърбеж, които са по-скоро болезнени. Той може да ангажира едно или повече места по тялото, засягайки участъци на кожата и/или лигавиците (най-вече оро-фаринкс, горни дихателни пътища и стомашно-чревен тракт). Отокът може да трае от няколко часа до няколко дни, след което изчезва без последствия.

Клиничният спектър на пристъпите, като възрастово разпределение, локализация, честота и тежест, се различават значително сред различните видове ангиоедем. Големи различия се наблюдават и сред пациентите, засегнати от един и същ вид ангиоедем и още повече: при един и същ пациент в различни етапи от живота му. В зависимост от основния патогенетичен механизъм, ангиоедемът може да се прояви рано или късно в живота, може преобладаващо да засяга определено място на тялото (език, лице, горен

респираторен тракт, корем, кожа) и може да бъде спорадичен или рецидивиращ с различна степен на тежестта на изява (27).

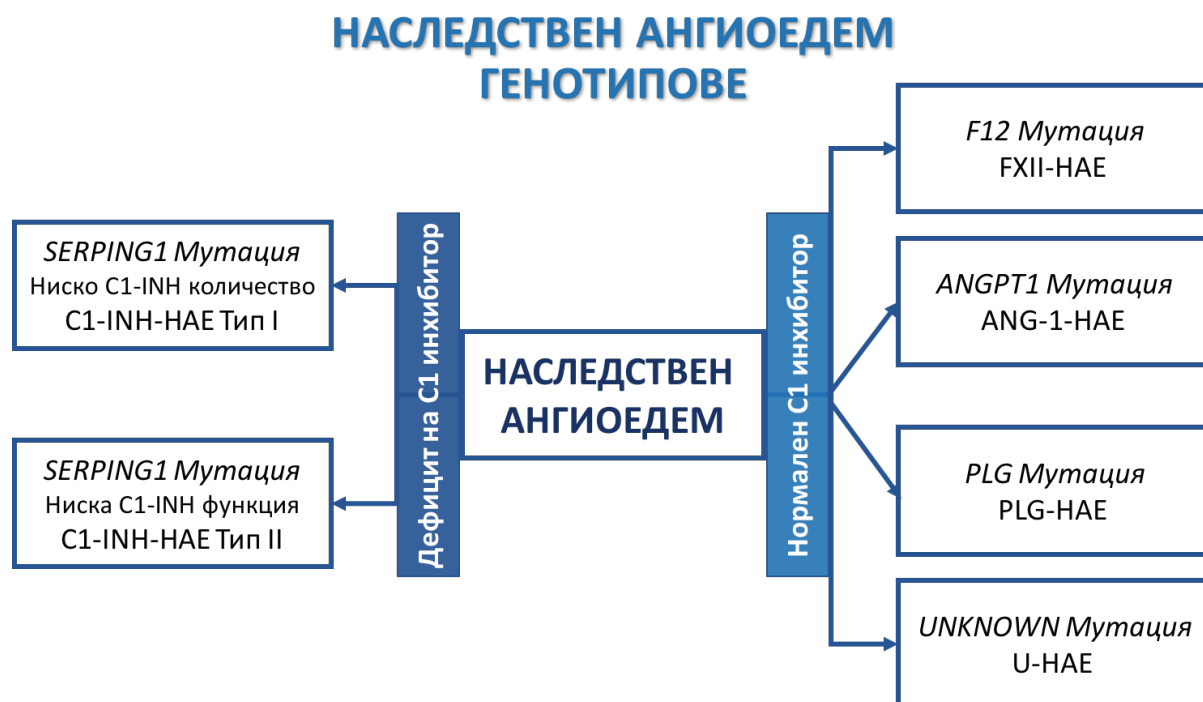
### *Наследствен ангиоедем с дефицит на C1 инхибитора, C1-INH-НАЕ: тип I и II*

C1-INH-НАЕ, както тип I, така и тип II, обикновено започва в първото или второто десетилетие от живота. Отокът може да засегне кожата, стомашно-чревния тракт и лигавицата на горните дихателни пътища. Някои пациенти имат предимно периферни кожни пристъпи (ръце, крака, лице, устни и др.) или лигавични (чревни, ларингеални) локализации. Атаките на НАЕ може да бъдат предшествани от гадене, неразположение, умора и/или специфична кожна проява: еритема маргинатум (EM). Развитието на отока е бавно (часове) и пълната спонтанна ремисия настъпва обикновено в рамките на 72-96 часа. При много пациенти, особено при децата, пристъп може да бъде предизвикан от минимална механична локална травма, спонтанна или свързана с диагностични или хирургични процедури. В тези случаи местоположението на ангиоедема обикновено е, макар и не винаги, ограничено до мястото на травмата. Пациентите също могат да проявяват значителна вариабилност в честотата на пристъпите с течение на времето, което не винаги се отнася до разпознаваеми фактори. Освен това, честотата или тежестта на атаките може да се влоши от психо-емоционален стрес, естрогенна контрацептивна терапия или естествени хормонални колебания, лечението с ACEI и/или от остри, или хронични инфекции.

Към днешна дата са идентифицирани повече от 450 мутации на C1-INH гена (*SERPING1*). Допуска се хипотезата за корелация на генотип-фенотип, но досега

нито една мутация не е била тясно свързана с клиничния фенотип на НАЕ (71). Дори в рамките на едно и също семейство пациентите могат да представят различен клиничен курс по отношение на местоположението на атаките, техния броя и тежестта на изява: някои пациенти могат да бъдат напълно безсимптомни през целия си живот, дори когато са изложени на потенциални провокиращи фактори. Тези данни и докладваните географски различия в Европа по отношение на някои клинични прояви на НАЕ (напр. по-късно начало на симптомите при румънските пациенти; по-редките коремни атаки при унгарските пациенти; по-честата употреба на дългосрочна профилактика при гръцките пациенти и др.) предполагат, че факторите на околната среда могат да повлияят на разнообразието на клиничната изява на мутациите в *SERPING1* (72). Също така е възможно, полиморфизмите в рецептора на брадикинин, протеините на контактната система или вариациите в образуването и/или метаболизма на вазоактивните кинини, да имат роля в променливостта на фенотипната експресия на НАЕ.

Фигура 7. Генотипове на НАЕ по Cicardi и Zuraw (73)



### *Наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитора, nC1-INH-НАЕ*

През 2000 г. Binkley и Davis, и Bork et al. описват нова форма на НАЕ, характеризираща се с нормални C1-INH количествени и функционални нива (19, 20). nC1-INH-НАЕ е преобладаващ при жените и се характеризира с по-късна възраст на проява (20-30 години), по-малко на брой атаки и/или по-дълги интервали между атаките в сравнение с C1-INH-НАЕ. Отокът най-вече ангажира лицето, устните, езика и лигавицата на горните дихателни пътища. Атаки с множество локализации са рядкост. Естрогените и бременността често утежняват заболяването или са причина за клиничното му манифестиране.

Няколко признаци предполагат, че nC1-INH-НАЕ, подобно на C1-INH-НАЕ, вероятно е медиран от брадикинин, включително липсата на отговор на високи

доза антихистамини, кортикостероиди и адреналин, както и благоприятният терапевтичен отговор към лекарства, насочени към повлияване на брадикинина.

Въпреки това, данните, свързващи  $\text{pIC1-INH-HAE}$  с брадикинин, не са толкова силни, колкото тези за  $\text{C1-INH-HAE}$ . Първият научен пробив е от 2006 г. с констатацията, че малка част от тези пациенти имат мутация в екзон 9 на гена, отговорен за синтеза на фактор 12 (F12) (74). Тази форма на  $\text{pIC1-INH-HAE}$  сега е класифицирана като  $\text{FXII-HAE}$ . През последната година при някои пациенти с  $\text{pIC1-INH-HAE}$  са откриха мутации в гените за плазминоген (PLG) и ангиопоетин-1 (ANGPT1):  $\text{PLG-HAE}$  и  $\text{ANGPT-HAE}$  (22, 23).

Възможният механизъм на брадикиновата дисрегулация във всеки един от  $\text{pIC1-INH-HAE}$  е описан в следващите редове:

Най-честата форма на  $\text{FXII-HAE}$ ,  $\text{p.Thr309Lys}$ , показва, че предизвиква повишена активационна чувствителност на контактната система *ex vivo* и *in vivo* (75). Други мутации на F12, свързани с  $\text{FXII-HAE}$  също показват, че повишават чувствителността на  $\text{FXII}$  за активирането му от плазмин (76), което дава потенциално обяснение за ефикасността на анти-фибринолитичните лекарства при лечението на  $\text{pIC1-INH-HAE}$ , включително  $\text{FXII-HAE}$ .

Патомеханизмът на ангиоедем при пациенти с наскоро описания  $\text{PLG-HAE}$  все още не е известен. Въпреки това, имайки предвид важната роля на плазмин в биоамплификационните плазмени каскадни системи, обяснението на  $\text{PLG-HAE}$  ще бъде в уточняване на способността на мутантния плазмин да активира контактната система.

Известно е, че мутацията  $\text{p.Ala119Ser}$ , свързана с  $\text{ANGPT1-HAE}$ , взаимодейства със способността на мутантния  $\text{ANGPT1}$  да приеме мултимерната си форма,

която е най-ефективния лиганд за Tie-2 рецептора (рецептор, важен за регулацията на равновесието на съдовия пермеабилитет) (23). Доказано е, че Tie-2 сигнализирането намалява чувствителността към усилване на съдовата пропускливост, следователно тази мутация вероятно поставя носителите ѝ в състояние на по-голям риск от развитие на ангиоедем под действието на множество вазоактивни медиатори, включително брадикинин.

### *Придобит ангиоедем, асоцииран с прием на ACEI, ACEI-AAE*

ACEI-AAE е придобит тип ангиоедем, преобладаващ при жени, представители на негроидната раса и пушачи. Обикновено този фенотип засяга езика. Латентната фаза между началото на терапията с ACEI и началото на отока е силно променлива: в 50% от случаите това се случва в рамките на първия месец от началото на лечението, но може да се прояви и >10 години след инициране на терапията. Най-често преустановяването на приема на ACEI води до ремисия на симптомите, макар рецидивите да не са рядкост. Ако ангиоедем продължава да се появява продължително време след спирането на медикамента (напр. >6 месеца): редно е да се преразгледа диагнозата и да се обсъдят други вероятни форми на ангиоедем (77).

### *Придобит ангиоедем с дефицит на C1-INH, C1-INH-AAE*

Началото на C1-INH-AAE обикновено е късно (> 40 години) и често е свързано с друго съпътстващо заболяване, например лимфопролиферативно заболяване, злокачествено заболяване, антитела срещу C1-INH (anti-C1-INH-Ab). Пристъпите на ангиоедем засягат главно лицето, горната част на респираторния



тракт или корема. Честотата на атаките е непредсказуема, като вероятността за появата им обикновено намалява в хода на успешното лечение на основното заболяване (39). Тази форма на ангиоедем не е свързана с мутации на *SERPING1*. Вместо това, C1-INH се секретира напълно нормално при тези пациенти, но се катаболизира значително по-бързо, отколкото може да се произведе. При повечето пациенти с придобит C1-INH дефицит, повишеният катаболизъм на C1-INH е резултат от автоантитела срещу C1-INH, съпътстващо злокачествено заболяване или комбинация от двете.

### *Придобит идиопатичен ангиоедем: IH-AAE и InH-AAE*

Когато ангиоедемът се развива едновременно, или се редува с уртикария, ние сме в областта на хроничната уртикарията, индуцирана или спонтанна. Ангиоедем без уртикария, обаче се обособява като отделна нозологична единица, определена тук като първичен ангиоедем. Придобитите форми на ангиоедем с неизвестни причини могат да бъдат разделени на два вида: хистаминергичен и нехистаминергичен, в зависимост от клиничния отговор на продължителна терапия с високи дози антихистамини. Понякога е трудно да се направи разграничение между тези два фенотипа ангиоедем, главно когато клиничните характеристики (време, отговор на лечението, честота на атаките) не са категорични за оценката на клиничния отговор към антихистамини.

Идиопатичният хистаминергичен ангиоедем (IH-AAE) се проявява под действието на освободените от мастоцитите медиатори. Това представлява най-честата форма на първичен ангиоедем, съставляващ около 70% от случаите в специализиран център за ангиоедем (78). Въпреки това, в дефиницията на термина хистаминергичен се има предвид ангиоедем,

отговарящ на продължителна терапия с антихистамини. При това определение се ограничава групата от пациенти, при които симптомите много вероятно също са медиирани от мастоцитите, но отговарят единствено на терапия с кортикостероиди или омализумаб (42). Отделянето на ангиоедема, причинен от медиатори на мастоцитите е от решаващо значение за терапевтичния подход, но за съжаление критериите при тази категория остават неясни. Основен проблем е и определянето на отговора към лечението с кортикостероиди. Съотношението риск/полза от дългосрочна кортикостероидна терапия е неблагоприятно и липсват проучвания, които да подкрепят това като възможен критерий. По подобен начин, използването на отговора към лечение с кортикостероиди по време на остри атаки изисква контролирани проучвания, които никога не са били правени или сериозно обмислени. Въпреки това, никой не поставя под съмнение доказателствата в реалния живот, че повечето атаки на ангиоедем отговарят на кортикостероидна терапия. Клиничните характеристики, които характеризират идиопатичния ангиоедем, индуциран от мастоцити, показват сходства с уртикарията, включително сърбеж, еритем, демаркация на локализацията, предилекционно анагжиране на клепачите и устни, и спонтанна обратна еволюция често в рамките на 24 часа (79). Патофизиологията на хистаминергичния ангиоедем изглежда идентична с IgE-медираните алергични реакции с разликата, че липсва конкретен причинен фактор (1).

Фигура 8. Клинични и лабораторни характеристики на фенотиповете ангиоедем

Вид ангиоедем		Патофизиология	Засегнати; мъже : жени	Разпространение	C4	C1-INH, количество	C1-INH, функция	C1q
Наследствени форми	Тип I C1-INH-HAE	Мутация в SERPING1: понижени количество и функция на C1-INH	1 : 1	≈1 : 50 000 (85% от HAE)	Силно понижен ↓	Силно понижен ↓	Силно понижен ↓	Нормален
	Тип II C1-INH-HAE	Мутация в SERPING1, ведеща до понижена функция на C1-INH	1 : 1	≈1 : 250 000 (15% от HAE)	Силно понижен ↓	Нормален	Силно понижен ↓	Нормален
	HAE с нормален C1-INH	Неясна; Хетерогенна група в зависимост от откритите мутации (FXII, PLG, ANGPT)  F12-HAE, PLG-HAE, ANGPT-HAE и U-HAE	Не добре познат клиничен ход  По-честа проява при жени  Непълна пенетрантност на гените	Липсват данни	Нормален	Нормален	Нормален	Нормален
Придобити форми	Придобит C1-INH-AAE	C1-INH конзумация в хода на аутоимунно, лимфопролифератив но, злокачествено заболяване, ведеща до дефицит на C1-INH	Мъже и жени;  По-често се наблюдава при по-възрастни пациенти	≈1 : 250 000	Силно понижен ↓	Силно понижен ↓	Силно понижен ↓	Често се открива понижен
	Асоцииран с ACE-I ACEI-AAE	Инхибиране катаболизма на брадикинин	Мъже и жени;  По-често при афро- американци	≈1 : 250 (лекувани с ACEI)  ≈0.7-2.6 : 10 000 (обща популация)	Нормален	Нормален	Нормален	Нормален
	Идиопатичен нехистаминергичен InH-AAE	Неясни;  Най-вероятно хетерогенна група	Мъже и жени;	Липсват данни	Нормален	Нормален	Нормален	Нормален

## Диагноза на ангиоедема

### Клинична диагноза

Когато говорим за ангиоедем, става въпрос за прояви на рецидивиращи отоци, причинени от въздействието на различни вазоактивни медиатори, сред които най-добре дефинирани са формите, медириани от хистамин или брадикинин. Когато ангиоедемът се съпровожда с прояви на спонтанни рецидивиращи уртикариални обриви, най-честата форма е тази на хроничната уртикария, съпроводена с ангиоедем, (исторически познат като рецидивиращ спонтанен оточно-обривен синдром). Съвременното определение за хронична уртикария

дефинира, че за състоянието се касае, в случай, когато симптомите се наблюдават за >6 седмици (80, 81). При друга част от случаите хистаминергичния оток се причинява под въздействието на конкретен алергичен стимул, като това са случаите на алергичен ангиоедем (+/- уртикария, +/- белези на системна анафилаксия) (73, 82, 83).

Клиничната диагноза на ангиоедема е лесна, когато симптомите се наблюдават в момента на прегледа. В тези случаи диагнозата е съсредоточена върху моментните прояви, но е препоръчително да следва логическа последователност, подsigуряваща адекватна оценка на съществуващия риск за пациента (84, 85).

#### *Първоначална оценка*

Първоначалната оценка започва с оценката на нивото на съзнание и жизнените показатели, в това число: кръвно налягане, сърдечна честота, кислородна сатурация и периферни пулсации. При изследването на кожата се установява наличието на оток и / или уртикария. Повечето пациенти с остра проява на ангиоедем имат нормални хемодинамични параметри, макар в някои случаи това може да не е така. Както хистоминергичният, така и нехистаминергичният ангиоедем потенциално могат да причинят хиповолемичен шок поради преминаването на течности в третото пространство (екстравазация) и / или остра респираторна недостатъчност в резултат на оток на дихателните пътища (86).

#### *Оценка на глава, шия и дихателна функция*

При пациентите с ангиоедем е от съществено значение подробното орофарингеално изследване. Лекарите трябва да обърнат специално внимание

на оток, ангажиращ устните, езика, мекото небце и ларинкса. Индиректната ларингоскопия е оптималният метод за оценка на горните дихателни пътища, но ако това не може да се осъществи, засягането на дихателните пътища може да бъде предсказано по клинични признаци като диспнея, дрезгавост на гласа или стридор. Орофарингеалното ангажиране може да възникне при всяка форма на ангиоедем. Въпреки това, ангиоедемът, индуциран от ACE инхибитори, има предилекционно засягане на езика и устните (87-90).

### *Корем*

Стомашно-чревни симптоми могат да настъпят при брадикинин- или хистамин-медираните форми на ангиоедем. Повръщане и интензивна коремна болка, силна палпаторна болезненост, дефанс на коремната стена, болка при отдръпване след дълбока палпация (симптом на Блумберг), могат да заблудят лекарите и състоянието да се интерпретира като остър хирургичен корем. Стомашно-чревните симптоми са характерни и се наблюдават по-често при пациентите с наследствен ангиоедем (91).

### *Диагностичен подход*

Диагностичният подход може да бъде синтезиран в три основни стъпки:

1. Истинският ангиоедем трябва да се различава от другите форми на псевдоангиоедем, като синдромите с проява на аназарка (при заболявания на черния дроб, бъбреците, сърцето или червата), хипотиреоидизъм (микседем), синдрома на вена кава, тежките прояви от страна на кожата (дерматомиозит, медикамент-асоциирана еозинофилия със системни симптоми [DRESS]) и синдрома на системно капилярно изтичане (болест на Кларксън, CLS). Идентифицирането на

тези форми е от съществено значение, тъй като конвенционалното лечение на ангиоедем при тях е неефективно (92).

2. След като се потвърди, че пациентът има истински ангиоедем, трябва да се направи усилие за диференциране на хистаминергичния от нехистаминергичния ангиоедем. Наличието на уртикария силно предполага хистаминергичен произход, докато брадикинин-медиацията ангиоедем не се проявява в асоциация с уртикария. Трябва да се има предвид, че еритема маргинатум може да бъде подвеждаща в случаите на НАЕ (93). Трябва да се обърне внимание и на други симптоми като интензивен сърбеж, зачервяване, бронхоспазъм, повръщане и болка в корема, тъй като те могат да бъдат показателни при системна алергична реакция (анафилаксия). Хистаминергичният ангиоедем има бързо начало, развиващо се често дори в рамките на няколко минути, и може да прогресира до анафилаксия, която може да бъде живото-застрашаваща. Като заключение, пациентите със симптоми на системна алергична реакция трябва да бъдат внимателно разпитани за скорошно излагане на специфичен алерген (храни, ужилване от насекоми, лекарства или алергени от околната среда).

3. Симптомите на не-хистаминергичния ангиоедем имат по-бавно начало и се развиват в продължение на няколко часа, като и тяхната продължителност обичайно е по-дълга: около 48-72 часа. Епизоди на рецидивиращи отоци и/или коремна болка, особено асоциирани с положителна фамилна анамнеза за подобни симптоми: силно предполагат наследствен ангиоедем (27). Ако симптомите не са свързани с фамилна анамнеза, може да се предположи придобит ангиоедем, въпреки че спорадични случаи на наследствен ангиоедем (*de novo* мутации) трябва да се имат предвид (82).

В помощ на диагнозата е пациентите да бъде разпитвани за излагане на потенциални външни задействия, като стоматологични и хирургични процедури, стрес или травма, менструация, определени лекарства (главно АСЕ инхибитори, нестероидни противовъзпалителни средства и естрогени), бременност или подлежащи инфекции. Като допълнение, оценката на съпътстващите заболявания е важна, особено предхождаща диагноза на злокачествени, хематологични или аутоимунни заболявания.

4. Не на последно място, отговорът към емпирично приложено лечение може да помогне за поставяне на диагнозата. Например, предизвиканият от алергия ангиоедем най-често добре отговаря на терапия със стандартни противоалергични медикаменти като адреналин, глюкокортикостероиди или антихистамини, докато брадикинин-медиацията ангиоедем по правило е резистентен към тези лекарства.

## ***C1 инхибитор – Serpin vs. Non-serpin характеристики***

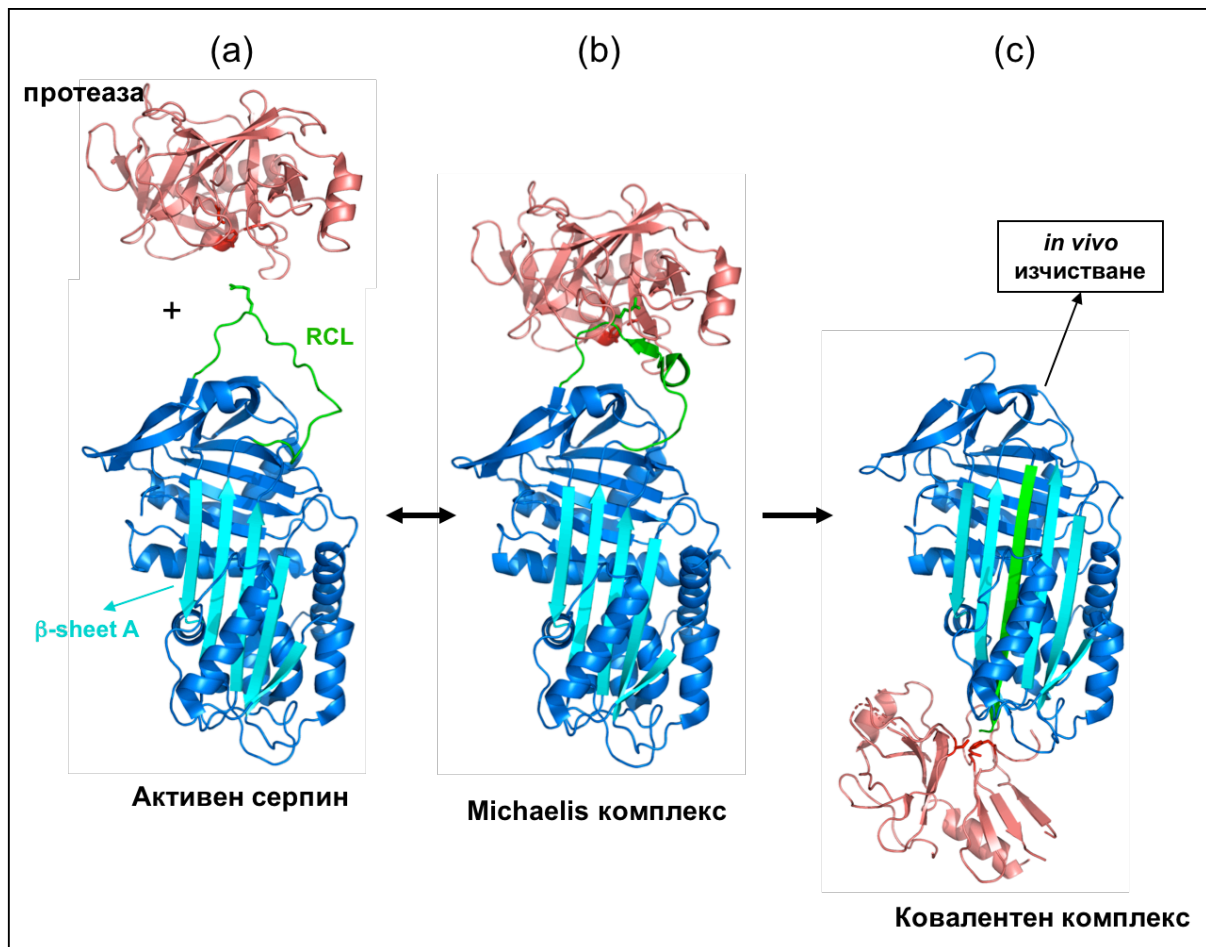
Анализът на притеина показва, че C1 инхибиторът е член на суперфамилията на серин протеазните инхибитори (Serpin). Молекулата му се състои от два отделни домена, които могат да бъдат наблюдавани чрез електронна микроскопия (94): 1) Серпиновият домен се намира от страната на карбоксилния край, съдържайки реактивния сайт на молекулата и е отговорен за инхибиращата му функция върху плазмените протеази; 2) Амино-терминалът има форма на котва от около 100 аминокиселини и представлява несерпиновият домен. Последният не показва значителна хомология с нито един известен до сега протеин като най-забележителната му характеристика е наличието на 10 участъка за гликозилиране (95).

Що се отнася до другите серпини, C1-INH се състои от алфа-спирали и бета-листове, както и силно експониран мобилен реактивен център, който се разцепва при контакт с целева протеаза (96). Тази реакция води до образуването на стабилна ковалентна връзка, като съответно свързването с таргетната протеаза причинява необратими конформационни промени в C1-INH, водещо до смачкване на протеазата към долния полюс на C1-INH и инактивиране на ензима. Това определя серпините като "суицидни" протеазни инхибитори. (Фигура 9)



Фигура 9. Инхибиторен механизъм на серпина (адаптирано по Valerieva et al.)

(58):



(a) активните серпини (синьо) се характеризират с главни бета-листове (*β*-sheet A, тюркоаз) и експониран реактивен център (Reactive Centre Loop, RCL, зелено) и таргетна протеаза (розово). Първата стъпка на инхибиторния процес е свързването на свободната протеаза с активния серпин и формирането на Michaelis комплекс, в който ензимът обратимо се свързва с реактивния център (RCL) (b). След това, протеазата разцепва RCL, което води до драматична конформационна промяна на серпиновата молекула: RCL срязва връзка в тялото на протеина и вмести част от молекулата между нишките 3 и 5 на *β*-лист A като нишка 4. По този начин протеазата се смачква към противоположния полюс на серпина, което необратимо я инхибира. (c).

C1-INH инактивира множество протеази, включително протеази на комплемента (C1r, C1s, MASP2), протеази на контактна система (фактор XII, плазмен каликреин), вътрешна коагулационна протеаза (фактор XI) и фибринолитични протеази (плазмин) (97).

Високо подвижният N-терминал на протеина се състои от 97 аминокиселини, като прикрепените към него захари вероятно са с по-голямо биологично значение, отколкото неговата некомпактна, отпусната полипептидна верига. Този N- удължен домен вероятно играе ролята на "котва", помагайки на молекулата C1-INH да "се прилепва" към различни повърхности. N-терминалът не допринася директно за инхибирането на протеазите, като осъществява единствено нековалентни взаимодействия с други протеини, клетъчни повърхности или липиди (98-100).

### ***Терапия на ангиоедема***

Честотата и тежестта на пристъпите на ангиоедем са силно променливи и непредсказуеми, представлявайки основните двигатели на тежестта на заболяването. Съществуват различни аспекти при управлението на лечението в зависимост от броя и тежестта на атаките, влиянието върху качеството на живот и наличието на различни медикаменти за лечение на болестта. Ефикасността на лечението е различна, в зависимост от причинния дефект за състоянието. Няма пълно съгласие относно терапевтичната стратегия: терапия при нужда (on demand therapy, ODT), срещу профилактично лечение (prophylactic treatment, PT). Лекарствата, ефективни за лечение при нужда, представляват основният инструмент за борба със смъртността, свързана с животозастрашаващите атаки. Профилактичното лечение може да намали

общата тежест на заболяването, намалявайки силата и продължителността на атаките, както и честотата на атаките. Подходът при лечението на НАЕ трябва да бъде разглеждан от клинична гледна точка, вземайки предвид индивидуални и икономически съображения, както и съображения относно сигурността и безопасността на лечението. Действително, въздействието на преките и косвените разходи върху обществото е значително, рецидивите на ангиоедем причиняват сериозно засягане на индивида с последващо хуманистично и икономическо въздействие на болестта, дължащи се на намалените резултати в училище или работата за пациентите и техните близки (27, 101-103).

Терапията при нужда намалява тежестта и продължителността на атаките при повечето пациенти, като качеството на живот значително се подобрява от момента, когато такива лекарства стават достъпни за пациентите (104). C1-INH (добит от човешка плазма или рекомбинантен), ecallantide или icatibant са подходящи медикаменти за лечение на острите атаки.

Оценката и осигуряването на проходимост на горните дихателни пътища е първата и най-важна стъпка за пациента в случай на остра атака, ангажираща която и да е част от дихателните пътища, тъй като нито една от наличните терапии не е универсално ефективна и може да се наложи животоспасяваща инвазивна медицинска процедура за осигуряване на дишането (например интубация, спешна трахео- или крикотомия). Следователно, осигуряването на проходимостта на дихателните пътища трябва внимателно и бързо да бъде оценено, тъй като ефикасността на медикаментите изисква време.

Всеки пациент трябва да има индивидуален спешен план, вземащ предвид най-доброто лечение в зависимост от специфичната среда на пациента, неговите предпочитания и възможност за самостоятелно приложение на медикамент или

наличието на близък, който е на разположение в случай на спешност. Най-доброто лечение при нужда може да варира между различните атаки и трябва да бъде преоценено с течение на времето за даден пациент, тъй като честотата и тежестта на атаките е вероятно да бъдат различни през неговия живот.

### *Лечение при остри атаки на ангиоедем*

Лечението на острите атаки на наследствен ангиоедем с недостиг на C1 инхибитора става достъпно през последните 10 години, водейки до значително подобрение в качеството на живот на пациентите. Налични са две търговски форми на добит от човешка плазма C1-INH (Berinert® и Cinryze®), един рекомбинантен C1-INH (Conestat alpha / Ruconest®), инхибитор на каликреина за подкожно приложение (Ecallantide / Kalbitor®) и един брадикининов B2 рецепторен антагонист (Icatibant / Firazyr®) (105-110). Ефикасността на лекарствата не е сравнявана между отделните медикаменти, като е установен устойчиво добър отговор при многократно приложение за всеки един от тях. Досъпът до медикамент при нужда е необходим за всеки пациент, независимо от съпътстващата профилактична терапия. Ефикасността на човешката плазма за лечение на остри атаки на НАЕ е съобщена в множество доклади на клинични случаи, като контролирани проучвания никога не са провеждани (111).

Основните характеристики на лекарствата за лечение на острите атаки на НАЕ са обобщени в Таблица (адаптирана по Valerieva et al. 2018: in press).

Таблица 1: Терапевтични възможности за лечение на остри прояви на НАЕ.

Лекарство (молекула), Път на администрация	Търговско име	Пациентска група, доза	Нежелани реакции	Съображения	Референция
pdC1-INH * I.V.	Berinert 500 и 1500 IU, CSL Behring	Възрастни, подрасващи и деца; 20 IU/кг I.V.	Главоболие, гадене, обрив, повръщане и температура	Теоретичен риск за трансмисия на инфекции. Тромботични и тромбоемболични усложнения. Алергични реакции. Потенциална имуногенност.	(104-106)
pdC1-INH, I.V.	Cinryze, Shire	Възрастни и подрасващи; 1000 IU, I.V. (допълнително 1000 U по преценка на лекар)	Главоболие, гадене, обрив, повръщане и температура	Теоретичен риск за трансмисия на инфекции. Тромботични и тромбоемболични усложнения. Алергични реакции. Потенциална имуногенност.	(112)
rhC1-INH * Conestat alfa I.V.	Ruconest Pharming	Възрастни и подрасващи; 50 IU/кг до общо 4200 U (при ≥ 84 кг) S.C.	Главоболие, гадене, диария, кихане, усещане за парене на кожата или обрив, болка в областта на гърба, промени в усещането за вкус или вертиго	Алергични реакции	(109)
Брадикинин В2 рецепторен антагонист Icatibant S.C.	Firazyr Shire	Готова доза за подкожно приложение 30 mg S.C.	Локални реакции на мястото на приложение	Да се избягва при остра тромбоза	(108)
Ecallantide Каликреинов антагонист S.C.	Kalbitor Dyax Corp.	Флакон 10 mg; 30 mg (3 mL) S.C. при нужда (инжектирани като 3 отделни инжекции от 10 mg, 1 mL); Допустима е допълнителна доза за 24 часа по лекарска преценка	>10% главоболие, гадене, умора, диария	Самоприложението не е разрешено поради риск от анафилактоиди реакции.	(110)
Перорална молекула, насочена срещу плазмения каликреин #, P.O.	BCX7353, Avorlastat, Biocryst	Възрастни 750 mg P.O.	Гастроинтестинални оплаквания (гадене, повръщане, диария, коремна болка), обрив, повишени чернодробни ензими, умора, главоболие, насофарингит.	По-високите дози са асоциирани с повече оплаквания от ГИТ. Теоретична предпазливост към кардиоваскуларни инциденти. Очаквани взаимодействия с лекарства, повлияващи CYP2 фамилията.	(113)

\*- налични за лечение на НАЕ в България

## *Профилактично лечение*

Клиничните съображения за дългосрочна профилактика (long-term prophylaxis, LTP) на C1-INH-НАЕ са се променили значително през последните години: от строго определени критерии за броя на атаките или дните на нетрудоспособност поради АЕ, до индивидуализиран подход, отчитащ множество фактори (114). Съвременното разбиране е, че C1-INH-НАЕ е многофакторно заболяване, което засяга живота на всеки пациент по различен начин и дори с различна тежест при един и същи пациент с течение на времето (115).

Тежестта на заболяването трябва да бъде оценявана в контекста на въздействието върху качеството на живот и способността за провеждане на ежедневни дейности и/или развлечения (116). Броят на атаките, дните с нетрудоспособност или хоспитализациите са противоречиви фактори, които може да не са непременно най-значимите показатели за въздействието на заболяването върху индивидуалния пациент (117). Първите ефективни лекарства за профилактика на НАЕ са пероралните андрогени. Ефикасността им се установява още през 1960 г., преди да е известно, че именно дефицитът на C1-INH е в основата на НАЕ (118). Десет години по-късно, при липса на силна патофизиологична обосновка, антифибринолитични медикаменти започват да бъдат използвани за профилактика на НАЕ. Ефикасността им никога не е била ясно доказана и употребата им не е така значителна. По този начин, в продължение на 40 години, атенюираните андрогени (АА) остават крайъгълен камък в профилактиката на НАЕ. Ниската им цена предполага употребата им от пациенти по целия свят, макар достъпността им в различните страни (включително България), да не е подсигурана поради множество фактори

(лекарствена регистрация и наличност на локалния фармацевтичен пазар). Необходимостта от алтернатива идва от очевидните странични ефекти, асоциирани с това лечение. През последното десетилетие се появяват първите проучвания за интравенозно приложение на добити от човешка плазма С1-ИНН продукти (pdС1-ИНН) за лечение на остри пристъпи на НАЕ. Вирусната безопасност на тези продукти значително е подобрена при модерните медикаменти, което предполага първите проучвания с интравенозно приложение pdС1-ИНН за дългосрочна профилактика, предоставяйки доказателства за тяхната ефикасност, безопасност и благоприятно въздействие върху качеството на живот на пациентите. Днес вирусната безопасност на добитите от човешка кръв С1-ИНН е почти напълно гарантирана чрез съвременни биотехнологии и строг мониторинг на производствените процеси (119-121).

Въпреки това, известно е, че съществуват редица проблеми, асоциирани с всяко интравенозно прилагано лекарство за профилактика. Голям процент от пациентите имат проблеми с венозния достъп, както и със само-приложението на С1-ИНН. Пациентите с проблеми с венозния достъп исторически са използвали подкожни венозни портове, които се свързват с повишен риск от инфекция и/или тромбоза (122-124). Новите профилактични терапии демонстрират значително подобрение на ефикасността, по-благоприятен профил на съотношението полза/риск и намалени усложнения във връзка с приложението на лечението. Всичко това предполага промяна в съображенията за провеждане на профилактична терапия (125, 126). Медикаментите за профилактика, прилагани подкожно, избягват необходимостта от венозен достъп и намаляват затрудненията, асоциирани с честите венозни инжекции. Развитието на безопасна и ефективна перорална терапия би удовлетворило

допълнително потребността от гледна точка на още по-лесния път на въвеждане на лекарството. С тези подобрения в терапевтичните възможности, профилактичната терапия вероятно ще започне да се използва все по-често при пациентите с НАЕ, водейки до индивидуализирано лечение, съобразено с потребностите на всеки отделен пациент.

Интересен, обещаващ и напълно различен подход за осигуряване на дългосрочна защита от атаките на ангиоедем при засегнати индивиди, наскоро бе подложен на изследване в C1 хетерозиготен модел на мишки с C1-INH дефицит. Еднократното лечение с интравенозно приложен ген-трансфериращ вектор на адено-асоцииран вирус (AAV), експресиращ генетичната последователност на нормалния човешки C1-естеразен инхибитор (AAVrh.10hC1EI) е ефективен при осигуряване на поддържани циркулиращи нива на C1-INH, достатъчни за предотвратяване на епизоди на ангиоедем (127). Понастоящем програмата за развитие на този вектор в НАЕ е в изчакване, тъй като последните данни от проучването му при дефицит на алфа1 анти-трипсин не са успели да наблюдават клинично значимо покачване на нивото на протеинова експресия (Adverum press release 2018).

Пациентите с НАЕ с нормален C1-INH не отговарят на лечение с епинефрин, антихистамини или глюкокортикоиди, подобно на тези с C1-INH-НАЕ. Въпреки това, при липса на ясни познания за патомеханизмите при това хетерогенно състояние, изброените медикаменти остават средство на първи избор, докато не се заключи категорично тяхната неефективност.

Възможностите за лечение на пациентите с НАЕ с нормален C1-INH не са ясно дефинирани. Предполага се, че патогенезата на атаките преминава през каликреин-медирано освобождаване на брадикинин или припокриване



действието на мастоцитни медиатори и такива на контактната система. Въз основа на тази предпоставка се опитва подход с медикаменти, насочени към брадикинина, както при C1-INH-HAE. Опитът от лечението в тези случаи е ограничен и води до епизодични съобщения за наличие или липса на ефективност при отсъствие на контролирани клинични проучвания.

Няколко нови области за изследване намаляването на производството на брадикинин са в предклинична фаза: 2 РНК-интерфериращи лекарства, повлияващи производството на фактор XII, ALNF12 и ARC-F12; моноклонално антитяло анти-фактор XIIa, CSL 312; и гenna терапия.

Лекарствата, използвани понастоящем за профилактика на C1-INH-HAE, са обобщени в Таблица 2.

Таблица 2: Терапевтични възможности за профилактика на НАЕ

Лекарство (молекула), Път на въвеждане	Търговско име	Пациенти, терапевтичен режим	Нежелани реакции	Предупреждения	Референции
Андрогени, Р.О.	Danazol	Възрастни, Най-ниска терапевтично ползотворна доза (50-200 мг/дневно, Р.О.)	Hepatotoxicity, virilization, hepatocellular carcinoma, lipid abnormalities, weight gain, mood effects	Предпочитано е да не се използва при жени и момчета преди пубертета. Потенциална вирилизация на плода при бременност. Препоръчва се да не се използва доза >200 мг/дн. Да не се използва при пациенти със злокачествени заболявания (рак на простата или гърда).	(128-131)
Транексамова киселина, Р.О.	Tranex	Възрастни и подрастващи, 500-3000 мг/дн Р.О.	Диария, гадене, повръщане, сърбеж, главоболие, болки в мускулите	Липсват данни за ефикасност. Да се внимава за тромботични усложнения при предразположени пациенти	(132, 133)
pdC1-INH, I.V.	Berinert ¥ 500 и 1500 IU, CSL Behring	Възрастни, подрастващи и деца; 20 IU/kg, два пъти седмично, I.V.	Главоболие, гадене, обрив, повръщане и треска	Теоретичен риск от вирусна трансмисия. Тромботични и тромбоемболични инциденти. Алергични реакции. Потенциална имуногенност.	(134-136) КХП
pdC1-INH, I.V.	Cinryze, Shire	Възрастни, подрастващи; 1000 IU, два пъти седмично, I.V. (до 2500 IU, но не повече от 100 IU/kg)	Главоболие, гадене, обрив, повръщане и треска	Теоретичен риск от вирусна трансмисия. Тромботични и тромбоемболични инциденти. Алергични реакции. Потенциална имуногенност.	(106, 119) КХП
pdC1-INH* с намален обем, S.C.	HAEGARDA, CSL Behring	Възрастни и подрастващи; 60 IU/kg, два пъти седмично, S.C.	Локални нежелани реакции, хиперсензитивност, назофарингит и замаяност	Теоретичен риск от вирусна трансмисия. Потенциални тромботични инциденти. Потенциална тахифилаксия.	(137) КХП NCT01576523 NCT01912456 NCT02316353
Рекомбинантно моноклонално антитяло, насочено срещу плазмения каликреин, S.C.	Lanadelimab * Shire	Възрастни и подрастващи; 300 mg, два пъти или веднъж в месеца, S.C.	Локални нежелани реакции, хиперсензитивност, назофарингит и замаяност	Потенциална имуногенност. Теоретично внимание за кардиоваскуларни инциденти, кървене или автоимунни заболявания.	(126) КХП NCT02586805
Перорална молекула, насочена срещу плазмения каликреин, Р.О.	BCX7353 # Avorlastat, Biocryst	Възрастни 110-150 мг дневно Р.О.	Гастроинтестинални ефекти (гадене, повръщане, диария, коремна болка), кожен обрив, повишени чернодробни ензими, умора, главоболие, назофарингит.	По-високите дози са асоциирани с по-голям риск за оплаквания от ГИТ. Теоретично внимание за кардиоваскуларни инциденти. Очаквани лекарствени взаимодействия с лекарства, повлияващи CYP2 суперфамилията.	(113)

¥ - никога не е регистриран като медимамент за ЛТР, но исторически и широко използван в клиничната практика

\* - Процес на регистрация в Европа

# - във фаза 3 на клинично проучване

## Уртикария

### Определение

Уртикарията е състояние, характеризиращо се с развитие на уртики, ангиоедем или и двете. Уртикарията трябва да се разграничи от други медицински състояния, при които може да се появят уртики, ангиоедем или и двете, например анафилаксия, авто-инфламаторни синдроми, уртикария-васкулит или брадикинин-медиран ангиоедем, включително наследствен ангиоедем (НАЕ).

А. При пациентите с уртикария се наблюдават три типични признака:

- централно подуване с различен диаметър, почти винаги заобиколено от еритем,
- сърбеж или понякога усещане за парене,
- бързо-преходен характер на промените (кожата се връща към нормалния си вид, обикновено в рамките на 30 минути до 24 часа).

Б. Ангиоедемът при пациентите с уртикария се характеризира с:

- внезапно, видимо еритемно подуване на дълбоката дерма, подкожието или лигавиците,
- по-скоро усещане за болка, а не сърбеж,
- резолюция по-бавна от тази на уртиките (може да отнеме до 72 часа).

Спектърът на клиничните прояви на различните подтипове уртикария е много широк. Освен това могат да съществуват два или повече различни подтипа уртикария при всеки отделен пациент.

Острата спонтанна уртикария се определя като появяване на спонтанни уртики, ангиоедем или и двете за по-кратък от 6 седмици период от време.

Уртикарията да се класифицира като хронична, когато симптомите се появяват за период по-дълъг от 6 седмици, като допълнително уртикарията се класифицира като спонтанна (когато няма специфичен предизвикващ фактор) или индуцируема (когато има известен специфичен предизвикващ фактор).

Хроничната спонтанна уртикария (ХСУ) е често и трудно за преодоляване заболяване в алергологичната практика. Клинично болестта се изразява с рецидивиращи, бързопреходни, сърбящи обриви (уртики) по кожата, които се наблюдават от 6 или повече седмици. По литературни данни при около 40% от случаите кожните обриви се комбинират с ангиоедем (оток) на кожа и лигавици – най-често в областта на лицето (устни, клепачи). В определен времеви момент уртикарията обхваща около 0,6-0,8% до 1% от общата популация, по-често, засягайки жени на възраст между 20 и 40-годишна възраст. ХСУ засяга тежко качеството на живот на пациентите. Ходът на заболяването е персистиращ или хронично-рецидивиращ. Като негативни прогностични фактори се обсъждат наличието на автоантитела, наличие на ангиоедем, по-тежкият ход на болестта и комбинацията с белези на физикална уртикария.

## Патофизиология

Уртикарията е заболяване, причинено от мастоцитите. Хистаминът и други медиатори, като тромбоцит-активиращият фактор (PAF) и цитокини, освободени от мастоцитните клетки, водят до дразнене на периферни сензорни нерви, пароксизмална вазодилатация и плазмена екстравазация, както и привличане на имунни клетки в уртикариалните лезии. Сигналите за активиране на мастоцитите в уртикарията са недостатъчно дефинирани и по всяка вероятност твърде разнообразни. Хистологично, уртиките се характеризират с оток на горната и средната част на дермата, с вазодилатация и хиперпермеабилитет на посткапилярните венули, както и лимфните съдове на повърхностната част на дермата, водещи до изтичане на серум в тъканта. При ангиоедем подобни промени се проявяват предимно в дълбоката част на дермата и подкожната тъкан. Кожата, засегната от уртики, практически винаги проявява регулиране на ендотелиалните клетъчни адхезионни молекули, невропептиди и растежни фактори и смесен възпалителен периваскуларен инфилтрат с променлива интенграция, състоящ се от неутрофили със или без еозинофили, базофили, макрофаги и Т клетки, но без некроза на стената на съдовете е отличителен белег на уртикариалния васкулит.<sup>13-17</sup> Пациентите с нелекувана кожа на пациенти с хронична спонтанна уртикария (CSU) показват повишена регулация на адхезионните молекули, <sup>18</sup> инфилтриращи еозинофили и променена цитокинова експресия.<sup>19</sup> Леко до умерено увеличение на броя на мастоцитите също е съобщено от някои автори. Тези открития подчертават сложната природа на патогенезата на уртикарията, която има много признаци в допълнение към освобождаването на хистамин от дермалните

мастоцити.20-22 Някои от тези признаци на уртикария също се наблюдават при голямо разнообразие от възпалителни състояния и по този начин не е специфична или с диагностична стойност. Необходимо е търсене на по-специфични хистологични биомаркери за различни подтипове уртикария и за разграничаване на уртикарията от други състояния.23

### *Имунна дисрегулация при ХУ*

Често наблюдаваната неспецифична автореактивност (установена чрез автоложен тест със собствен серум) при пациентите с хронична идиопатична уртикария поставят въпроса за наличието на хронично, неспецифично, минимално-персистиращо системно възпаление. Редица водещи изследователи описват наблюденията си, свързани с наличието на различни маркери за системно възпаление, които се откриват повишени при пациентите с хронична уртикария. Макар все още да не е открита първопричината за болестта, данните говорят, че привидно повърхностното, бързо-преходно засягане на кожата, крие зад себе си сложни, не добре проучени имунологични феномени, белези за системния характер на болестта.

Редица автори обсъждат наличието на хистамин-освобождаващите фактори с различни показатели за системна възпалителна активност – острофазови белтъци - CRP, прокалцитонин; СУЕ; цитокини- IL-6, IL-4; матриксни металопроотеинази (MMP-9), тъканен инхибитор на матриксна металопроотеиназа-1 (TIMP-1); химиокини- CCL2, CCL5, CXCL8; активиране на био-амплификационните системи на коагулация/фибринолиза и комплемент. В процес на проучване и оценка е клиничната значимост за

наличието на недостиг/дефицит на 25-ОН-Вит.Д и ролята му на имуномодулятор в хода на болестта.

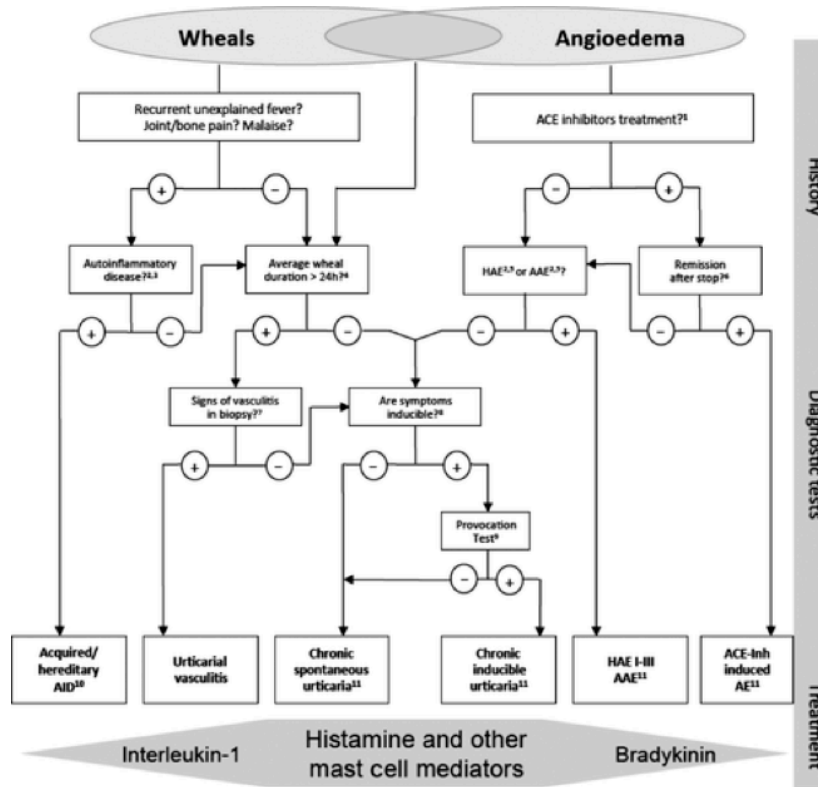
Съществуването на цитокинен дисбаланс, оксидативен стрес и нарушения в сигналната трансдукция биха могли да способстват за поддържане на неспецифично минимално-персистиращо системно възпаление при пациентите с хронична уртикария. Обсъждат се и различни невроимунологични (SP и други тахикинини) и генетични фактори, които обвързват ролята на про-инфламаторната среда с хода и тежестта на болестта.

### *Международни гайдлайни за лечение на ХУ*

Съществуват няколко международни гайдлайни за лечение на ХУ, които съдържат в себе си известни различия (80, 81).

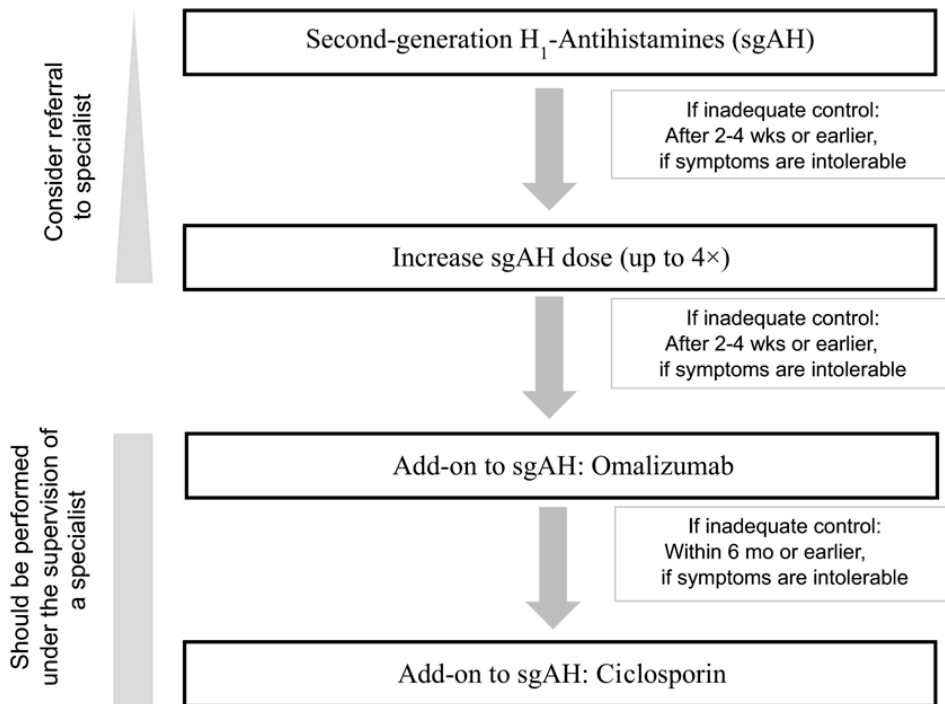
### ***Гайдлайн на EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO за лечение на хронична уртикария***

Уртикарията е състояние, характеризиращо се с развитие на уртики, ангиоедем или и двете. Уртикарията трябва да се разграничи от други медицински състояния, при които може да се появят уртики, ангиоедема или и двете, например анафилаксия, авто-възпалителни синдроми, уртикариен васкулит или брадикинин-медиран ангиоедем, включително наследствен ангиоедем (HAE).  
Фигура 10. EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO гайдлайн за дефиниция, класификация, диагностика и лечение на уртикария (2018).



Съвременните разбирания за оптимално лечение на ХУ (ревизия 2018) са представени в следващата фигура.

Фигура 11.





## **Изводи от литературния обзор: нерешени проблеми и бъдещи насоки**

Ангиоедемът е идентифициран в края на 19<sup>ти</sup> век от Quinke и Osler. От първите описания се разграничават в 2 отделни форми: асоцииран с уртикария и алергични реакции, или като рядко генетично заболяване. Днес разпознаваме първичния ангиоедем като група от заболявания, при които ангиоедемът е основен признак при липса на уртикария. Генетични фактори, специфична терапия и все още неизяснените патогенетични механизми създават среда, в която наблюдаваните остри “окръглени” отоци на Quinke, същите, които сега наричаме ангиоедем, се развиват при минимални стимули или спонтанно.

През последните 20 години са постигнати значителни подобрения в диагностиката и лечението на рецидивирация ангиоедем. Някои признаци (фамилна анамнеза, локализация, възраст на поява, време на еволюция на АЕ, влошаването от ACEI, естроген или бременност, съпътстващо злокачествено заболяване, отговор на терапия със стероиди и антихистамини) могат да ръководят диагнозата, въпреки това, клиничната хетерогенност не винаги е лесно разпознаваема, което води до забавено поставяне на правилна диагноза и неоптимално терапевтично поведение.

Няколко нови лекарства за профилактика и лечение на остри пристъпи на ангиоедем са вече налични, особено за наследствените форми, дължащи се на C1-INH дефицит. Клинични и експериментални изследвания допринасят за изясняването на различните механизми, които са отговорни за развитието на ангиоедем, включително нови пътища, водещи до неконтролирано активиране на FXII, мутации в гените за плазминоген и ангиопоетин-1, нови медиатори,

които нарушават функцията на ендотелните клетки, както и припокриване действието на мастоцитните медиатори и контактната система.

Рецидивиращият ангиоедем може да бъде свързан с множество причини и патофизиологични механизми, като дори при един и същи вид може да демонстрира разнообразни характеристики. Честотата, тежестта и локализацията на атаките силно се различават от пациент до пациент, както и при един и същ пациент в различни периоди от живота му. По-доброто разбиране на механизмите, водещи до появата на атаки на ангиоедем ще ни помогне да обясним защо АЕ се развива само в определени часове или на определени места на тялото при някои пациенти. Тази информация ще бъде полезна за разработването на нови средства за ефективна профилактика на различните форми на ангиоедем. Необходими са допълнителни проучвания за идентифицирането на биомаркери, способни да разграничат вида на ангиоедем и да предскажат тежестта на болестта. Видимо, необходимо е да се идентифицират клинични и лабораторни параметри, които да позволяват ранно разпознаване на острите пристъпи, което е съществено за прилагането на бързо и ефективно лечение. По-доброто познаване на патогенезата на ангиоедема ще доведе до по-бързо поставяне на правилната диагноза, намаляване на асоциираните рискове и усложнения, и идентифицирането на подходяща терапия при пациентите с различни клинични фенотипове на заболяването.

От своя страна хроничната спонтанна уртикария +/- хистаминергичен ангиоедем е друга загадъчна болест, при която подлежащите патогенетични механизми остават не добре дефинирани. Макар в повечето случаи добър контрол над симптомите да се постига с оптимална доза на съвременните медикаменти за лечение, в не малък процент такъв контрол не може да се постигне. Безспорно,

съпътстващите епизоди на хистаминергичен ангиоедем са сред основните проблеми водещи до страх от непредсказуемостта на болестта и причина за намаленото качество на живот на тези болни.

Въпреки значителния напредък в разбирането за ангиоедема, остават все още много нерешени въпроси. Съвременните познания за патофизиологията на ангиоедема са достатъчни, за да се осигурят модерни специфични лекарства, които през последните 10 години напълно промениха живота на пациентите с C1-INH-НАЕ. Разработването на подходящ терапевтичен подход при другите форми на ангиоедем е предизвикателство за бъдещото.

### 3. Цел и задачи

#### Цел

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

#### Задачи

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

1. Да се предложи съвременна клинична и патофизиологична класификация при пациентите с ангиоедем.
2. Да се характеризират пациенти с прояви на хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария като се изследват показатели за минимално-персистиращо системно възпаление.
3. Да се характеризират пациенти с прояви на редки форми на брадикинин-медиран ангиоедем, в това число пациенти с наследствен и придобит C1-инхибиторен дефицит в българската популация като се изследват техните клинични, демографски и имунологични показатели.
4. Да се създаде карта на пациентите с редки форми на ангиоедем на територията на Р. България и да се изследва честотата на диагнозата в различните административни области на страната.
5. Да се оценят приносите на генетичното изследване и биобанкирането при пациентите с ангиоедем.
6. Да се предложи клиничен алгоритъм за диагностициране и поведение при пациентите с прояви на ангиоедем.

## 4. Материли и методи

### *Материали*

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

Писмено информирано съгласие се съхранява и в новосъздадената генетична биобанка към Центъра по молекулна медицина към МУ-София, съпровождаща всяка проба, съхранена за целите на биобанкирането.

В дисертационния труд са включени ретроспективни и проспективни данни като се изследваха пациенти преминали през стационара и амбулаторната практика на Клиниката по алергология на УМБАЛ “Александровска”, София. Пациентите са разделени в две групи според предполагаемата патогенеза на състоянието:

- 1) брадикинин-медиран ангиоедем и
- 2) рецидивиращ хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария.

➤ **Пациенти с брадикинин-медиран ангиоедем**

Пациентите са разделени в четири групи според наследствения характер на заболяването и наличието или отсъствието на C1-инхибиторен дефицит, използвайки номенклатурата на HAWK групата (27):

- наследствен ангиоедем (HAE), дължащ се на C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-HAE)
- наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитор (nlC1-INH-HAE)
- придобит ангиоедем, дължащ се на C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-AAE)
- придобит идиопатичен не-хистаминергичен ангиоедем (InH-AAE)

Таблица 3.

	C1-INH дефицит	C1-INH нормален
Наследствен	C1-INH-HAE	nlC1-INH-HAE
Придобит	C1-INH-AAE	InH-AAE

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

Пациентите са разделени в две групи според тежестта на заболяването: 1) *лека до средно тежка* и 2) *тежка до много тежка* форми, като те са дефинирани спрямо терапевтичния отговор на съвременната терапия, препоръчана според международните гайдлайни за лечение на хроничната уртикария (80):

Таблица 4.

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

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

### *Брадикинин-медиран ангиоедем*

Включващи критерии:

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

Исключващи критерии

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

### *Хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария*

Включващи критерии

- Лица с прояви на хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария (давност >6 седмици)
- Лица с нормални стойности на С1 инхибитора



- Лица с хистаминергичен ангиоедем и уртикария при липса на разпознаваем причинен фактор за появата на симптомите (прием на лекарства, експозиция на алергени)

#### Исключващи критерии

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

## Методи

За провеждането на изследванията бяха използвани следните методи:

### Документален метод

Изследванията в групата на брадикинин-медирания ангиоедем са структурирани като ретроспективно-проспективно проучване. Ретроспективно са анализирани и обобщени данните за пациенти, лекувани и проследявани в Клиниката по алергология на УМБАЛ “Александровска” за периода 1972-2012 г: Използваните пациентски данни са част от Регистъра за НАЕ, създаден от поставянето на първата диагноза в България на брадикинин-медиран ангиоедем (C1-INH-НАЕ) от проф. д-р Божко Божков (Фамилия 1, 1972 г).

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

## *Клинични методи*

### **а) Анамнеза**

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

### **б) Медицински статус**

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

## *Лабораторни изследвания*

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

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

инструкциите на производителя на разработената методика. За референтни граници бяха приети стойностите от 0 – 5 mg/l.

### *Имунологични изследвания*

Част от изследванията са извършени с участието на докторанта (изследването на C1 инхибитора /количество и функция/, C1q, C4, HMWK cleavage /разграждане на кининогена с високо молекулно тегло/, anti-C1-INH антитела) при обучението ѝ в Лабораторията за изучаване на Комплекента, ръководена от Prof. Marco Cicardi, Университет на Милано, Италия. Част от изследванията са сравнени с такива, извършени от независима лаборатория, в която стандартно се провежда проследяването на пациентите с НАЕ; имуноензимните методи за измерване на цитокини и химиокини (IL-6, -10, -33 и CCL2/MCP-1) бяха извършени в Лабораторията по клинична имунология на Университетска болница “Св. Иван Рилски”, София.

Генетичните изследвания (таргетна NGS) при пациентите с брадикинин-медиран ангиоедем бяха извършени в Центъра по клетъчна и молекулна приложна имунология (CeMIA) към Катедрата по Имунология и клетъчна съвместимост, Медицински факултет на Университета на Тесалия, Лариса, Гърция.

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

### *Измерване на C1-INH (концентрация)*

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

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

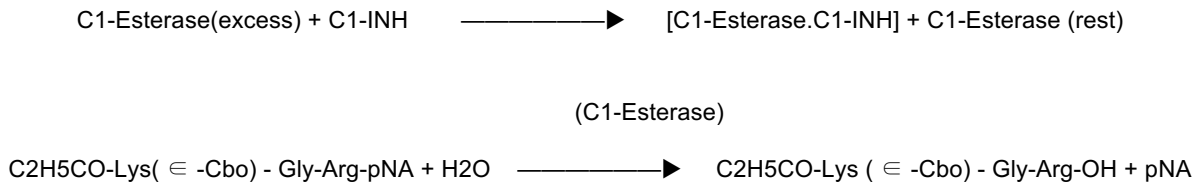
### *Измерване на C1-INH (функция)*

#### **Предназначение**

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

## Принцип на изследването

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



## Измерване на C4

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

Радиалната имунодифузия определя концентрацията на серумните протеини (C4) чрез еднократна плака. Количество серум се поставя в агароза, съдържащо моно-специфично антицяло. Серумът се разпространява в агарозата и плазменият антиген образува имунен комплекс с антицялото. Наблюдава се пръстен, чийто размер е пропорционален на концентрацията на протеин в

серума. За отчитане на концентрацията на протеина се измерва диаметъра на пробата на утаяване спрямо таблица с референтната стойност.

#### *Измерване на C1q*

Концентрацията на C1q е измервана с помощта на два метода: чрез нефелометричен метод (използван, според инструкциите на производителя) или радиална имунодифузия чрез имунодифузионни плаки (според описанието на производителя). Нефелометричният метод измерва прозрачността на пробата, предизвикана от образуването на неразтворими имунни комплекси, когато към пробата се добави антитяло насочено към C1q. Пробата, съдържаща C1q предварително се инкубира с буфер и контролно се измерва нейната прозрачност преди прибавянето на анти-C1q антитялото. В присъствието на достатъчно антитяло в излишък, концентрацията на C1q се измерва като функция на мътността.

Радиалната имунодифузия определя концентрацията на серумните протеини (C1q) чрез еднократна плака. Количество серум се поставя в агароза, съдържащо моно-специфично антитяло. Серумът се разпространява в агарозата и плазменият антиген образува имунен комплекс с антитялото. Наблюдава се пръстен, чийто размер е пропорционален на концентрацията на протеин в серума. За отчитане на концентрацията на протеина се измерва диаметъра на пробата на утаяване спрямо таблица с референтната стойност.

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

Брадикининът е вазоактивен възпалителен медиатор, който играе ключова роля в наследствения ангиоедем (HAE). Той се освобождава от неговия прекурсорен

киноинген с висока молекулна маса (HMWK) от плазмения каликреин, като HMWK се разцепва (сHMWK) като страничен продукт. Прякото определяне на брадикинина е доказано полезно, но е технически сложно поради нестабилността и малкия размер на нанопептида. За целта на доказване производството на сHMWK ние използвахме методика на Western blotting, която подкрепя неговата потенциална стойност като клиничен биомаркер за брадикинин-медирана патология.

Разцепването на HMWK беше оценено чрез електрофореза с натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел (SDS-PAGE) и имуноблот анализ (модификация на метода) (138). След електрофоретично разделяне и трансфера на протеини от гела към поливинилидна дифлуоридна мембрана (Immobilon, EMD Millipore Corp, Billerica, MA, САЩ), сHMWK се идентифицира като се използва поликлонална anti-HMWK light chain антитяло от коза (Nordic, Tilburg, Холандия) и се визуализира с използване на биотинилирано анти-козе антитяло от заек (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, САЩ). Видимите молекулни маси на протеините се оценяват чрез сравняване с маркерите за нативен HMWK (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Използвайки този метод, нативният HMWK се явява като единична ивица с Mг от 130 000, но при максималното му разцепване той постепенно се заменя с две ивици с Mг стойности от 107 000 и 98 000. Плътността на лентите се измерва като се използва биодензитометър GS800. Плазмата инкубирана с каолин се използва в електрофорезата като контролна проба. Количеството на разцепените HMWK (с Mг от 107 000 и 98 000) се изразява като процент от общия HMWK (сумата от трите ленти) (139).

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

Методът служи за определяне на антитела срещу C1-INH от клас IgG, IgA и IgM, установени с помощта на предварително определени силно положителни контроли. Изследвахме наличието или отсъствието на неутрализиращите anti-C1-INH антитела в пациентски серум по метод на ELISA, дизайнерски модифициран вариант на Alsenz et al. (140, 141).

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

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

#### **Протокол**

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



8. Добавят се по 100 µl от Субстратния разтвор за няколко минути до получаване на цветна реакция в контролните гнезда.

9. Добавя се по 100 µl от Стопиращия разтвор във всяко гнездо.

Отчита се на ELISA четец на 450/630 nm.

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

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

#### **Принцип на метода:**

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

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

**Използвани реагенти, предоставени в кита:**

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

**Използвана апаратура:**

ELISA четец Stat fax 2100

**Изпълнение на метода:**

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

Предварителна подготовка на реагентите:

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

- Пробите на пациентите се разреждат 1:2 с разредител за процедурата директно в плаката.

#### **Интерпретация на резултатите:**

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

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

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

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

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

#### *Генетични изследвания*

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

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

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

**Използвана апаратура:**

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

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

с  $pH > 7.5$  е необходимо да бъде избягвана.

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

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

#### **Етапи:**

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

- Няколкократно промиване с етанол съдържащи буфери;
- Освобождаване на пречистената ДНК от магнитните частици;

**Процедура:**

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

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

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

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

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

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

Конструира се ДНК библиотека за всяка проба с помощта на Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Scientific). Накратко, 10 ng gDNA за праймерен пул е амплифициран и индексирен с уникален адаптер, използващ комплект адаптори за баркод Ion Xpress (Thermo Scientific). Равномерните обеми на двата пула се комбинират и баркодните библиотеки се пречистват с помощта на Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter), количествено определено с Qubit 2.0 флуорометър (Thermo Scientific), разрежено до 100 pM и обединено в еквимоларно съотношение. Подготовката на шаблона беше извършена върху система OneTouch2, използвайки комплекта шаблони Ion OT2 HI-Q (Thermo Scientific) и обогатяването на йонните сферични частици (ISPs) върху Ion One Touch ES (Thermo Scientific). Секвенирането се провежда върху PGM, като се използва комплект за секвениране Ion PGM Hi-Q (Thermo Scientific) на 318 чип. Всички процедури са извършени съгласно инструкциите на производителя.

Секвенирането на необработените данни беше анализирано за базова последователност, демултиплексиране, привеждане в съответствие с hg19

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

### **Верифициране на вариантите**

Всички идентифицирани варианти бяха потвърдени чрез секвениране по Sanger, както е описано по-рано от Speletas (72). Разкритите CNVs бяха потвърдени от комерсиално наличния MLPA кит (MRC-Holland за *SERPING1*) и от PCR с голям диапазон. В MLPA бяха анализирани 60 ng gDNA от всяка проба. Три референтни проби (без CNV), една положителна и една отрицателна контрола бяха включени. Всички процедури се извършиха съгласно инструкциите на производителите. Анализът на фрагментите беше извършен чрез ABI 3730xl



(Applied Biosystems) и MLPA анализ на данните в софтуера Coffalyser.Net (MRC-Holland). Провеждането на PCR-а с голям диапазон се проведе, както е описано от Pappalardo (142).

### *Статистически методи*

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

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

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

#### **1. Дескриптивен анализ**

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

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

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

#### **3. Вариационен анализ**

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

#### **4. Корелационен анализ**

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

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

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

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

## 5. Резултати

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

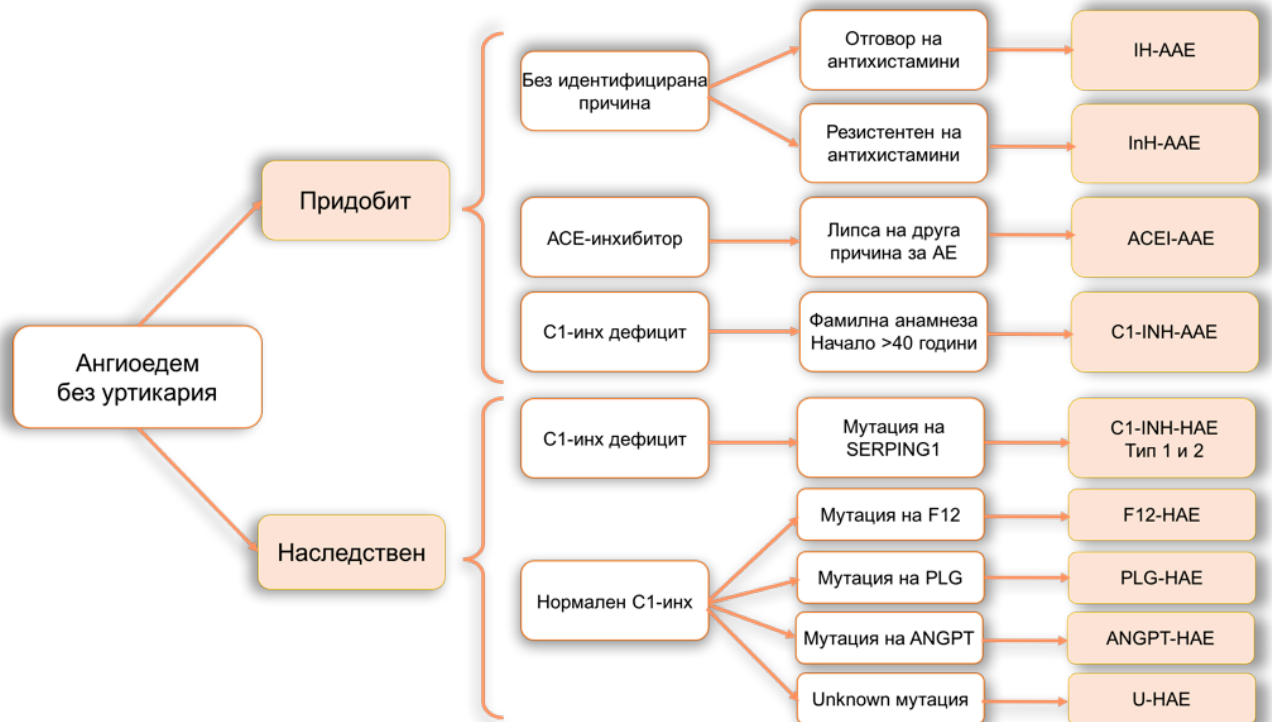
### **ГЛАВА 1**

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

Настоящата класификация на ангиоедема без уртикария е разработена от Cicardi и Международната работна група за Наследствен ангиоедем (HAWK) (27), като в нея се разграничават две основни групи ангиоедем: наследствен (HAE) и придобит (AAE).

Налага се осъвременяване в частта отнасяща се към HAE с нормален C1-INH (**nIC1-INH-HAE**), поради бурното откритие на нови патогенни мутации през изминалите години: Фактор 12, плазминоген и ангиопоетин-1 (21-23). Предлагаме актуализиране на клиничната класификация на Cicardi и Международната работна група за Наследствен ангиоедем (HAWK).

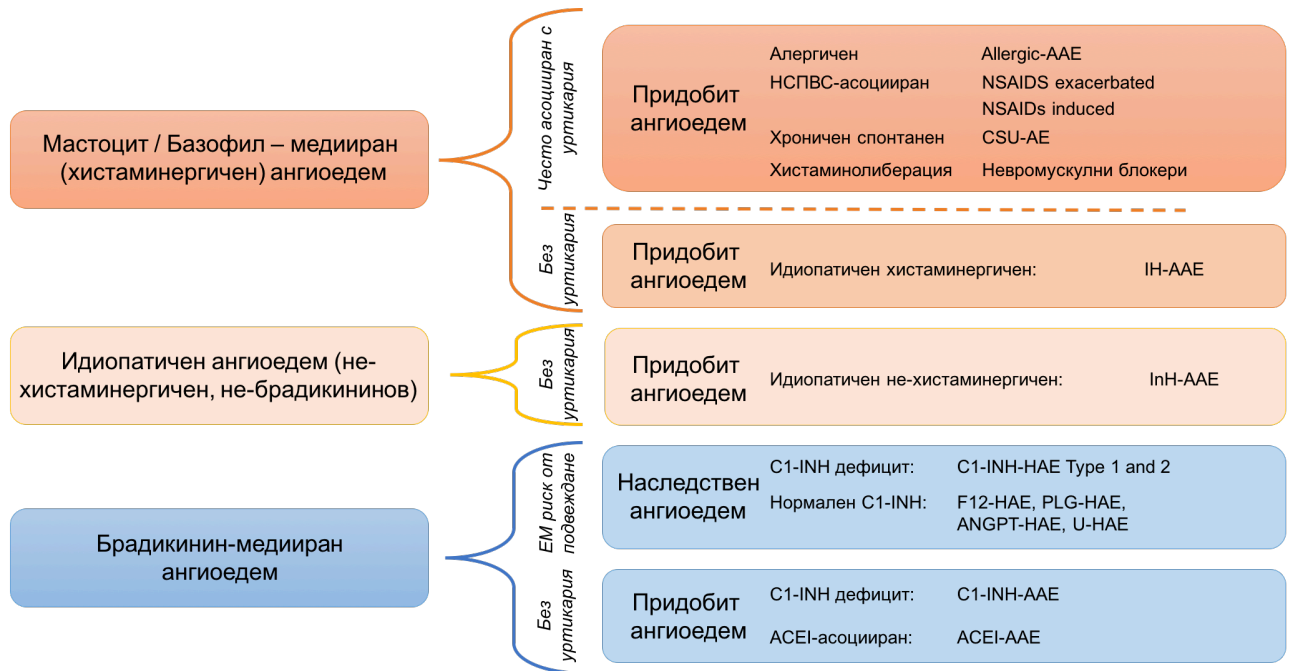
Фигура 12. Клинична класификация на ангиоедема: предложена актуализация според Cicardi et al. (27)



Легенда: наследствен ангиоедем (HAE), дължащ се на C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-HAE); наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитор (nC1-INH-HAE); придобит ангиоедем, дължащ се на C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-AAE); придобит идиопатичен не-хистаминергичен ангиоедем (InH-AAE); асоцииран с прием на ACE инхибитори придобит ангиоедем (ACEI-AAE); HAE с мутация на Фактор 12 (F12-HAE); HAE с мутация на плазминоген (PLG-HAE); HAE с мутация на ангиопоетин-1 (ANGPT1-HAE); HAE с неясна мутация (U-HAE, unknown).

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

Фигура 13. Патофизиологична класификация на ангиоедема



Легенда (допълнение): CSU-AAE – хронична спонтанна уртикария и ангиоедем;

NSAIDs – НСПВС, нестероидни противовъзпалителни средства.

## ГЛАВА 2

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

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

### Пациентска група

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

Таблица 5. Характеристики на изследваните пациенти с ХУ

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

Според клиничните белези и съпътстваща медикаментозна терапия, болните бяха групирани в 2 групи: лека/средно тежка и тежка/много тежка ХУ. Тези групи бяха

определени според нуждата от редовна контролираща терапия (1, 2, 3 или 4 таблетки неседативен антихистамин) и/или липсата на контрол при оптимална антихистаминова терапия (според приетите международни гайдлайни за лечение на болестта (80), употребата на биологична терапия (анти-IgE, omalizumab) и/или редовна употребата на системен кортикостероид.

Таблица 6. Характеристики на изследваните пациенти с ХУ според тежестта на болестта

	Лека/средно тежка	Тежка/много тежка
Брой	24 (53,3%)	21 (26,7%)
Възраст (години) ± SD	29.33 ± 24.86	45.00 ± 28.16
Пол		
Мъже	9 (37.5)	3 (14.3%)
Жени	15 (62.5%)	18 (85.7%)

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

### Клинични и имунологични резултати

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

Таблица 7. Стойности на изследваните лабораторни показатели

Нивата на изследваните показатели са изследвани според изискванията на

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

клиничната лаборатория, при различните групи болни. Разликите между болните лица са приети за сигнификантни при  $p < 0.05$ .

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

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

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



Таблица 8. Болни според наличието на ангиоедем, автоимунен тиреоидит, положителен автоложен тест със собствен серум.

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

ASST – *Autologous Serum Skin Test*

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

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

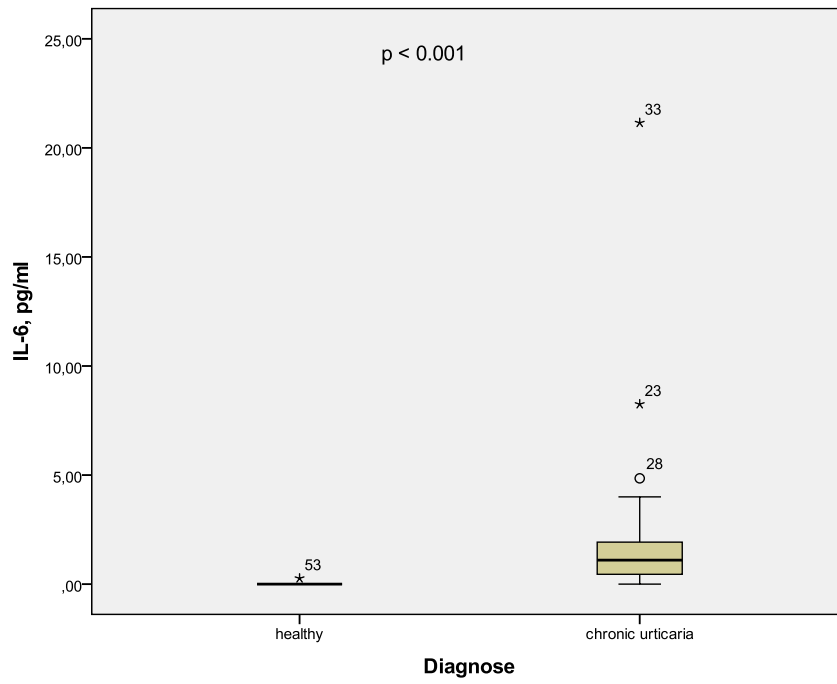
Таблица 9. Стойности на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ и при здрави контроли.

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

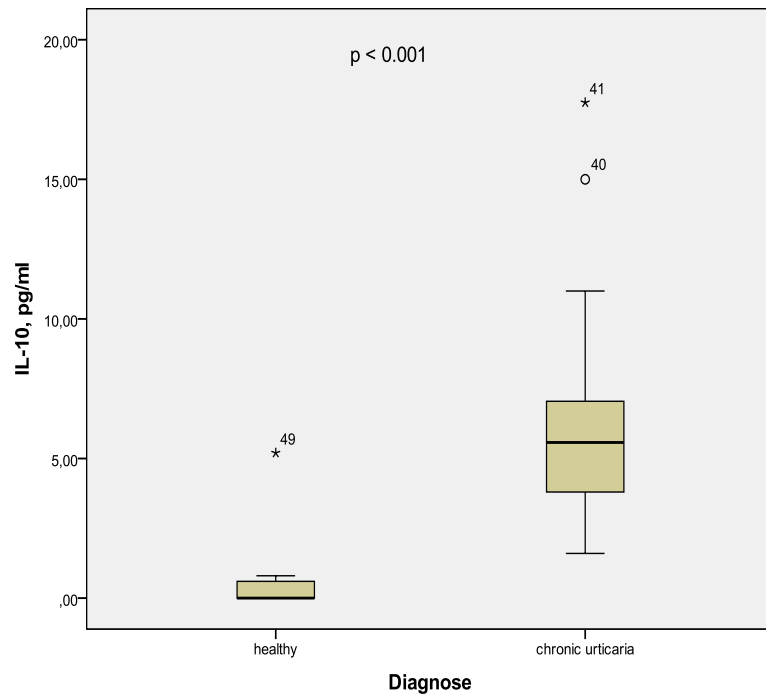
Установените разлики в нивата на IL-6, IL-10, IL-33 пациенти с ХУ и здрави са статистически значими. Данните за IL-6 имат потвърдителен характер, както е установено и от други международни изследователски екипи. **Установените разлики в нивата на IL-10 и IL-33 не са съобщавани в реферираната медицинска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

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

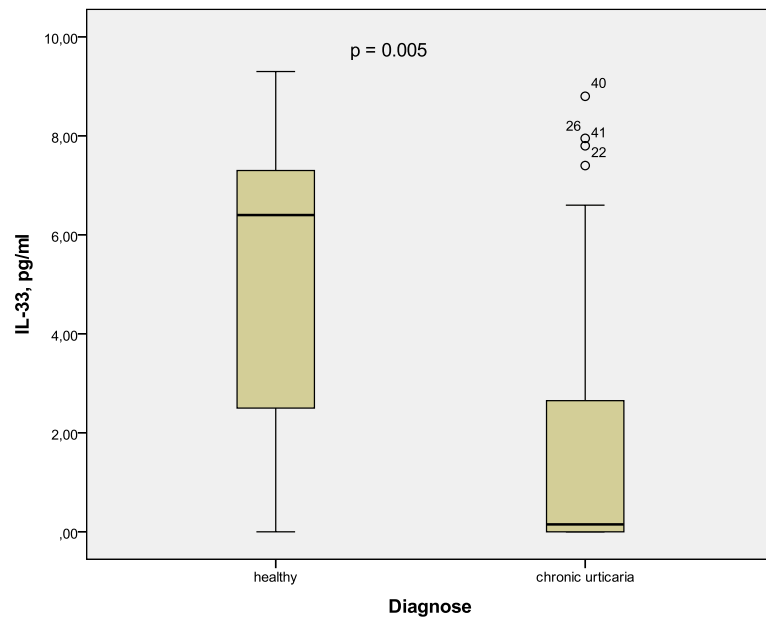
Фигура 14. Съпоставка стойностите на IL-6 при пациенти с ХСУ и здрави.



Фигура 15. Съпоставка стойностите на IL-10 при пациенти с ХУ и здрави.



Фигура 16. Съпоставка стойностите на IL-33 при пациенти с ХУ и здрави.



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

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

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

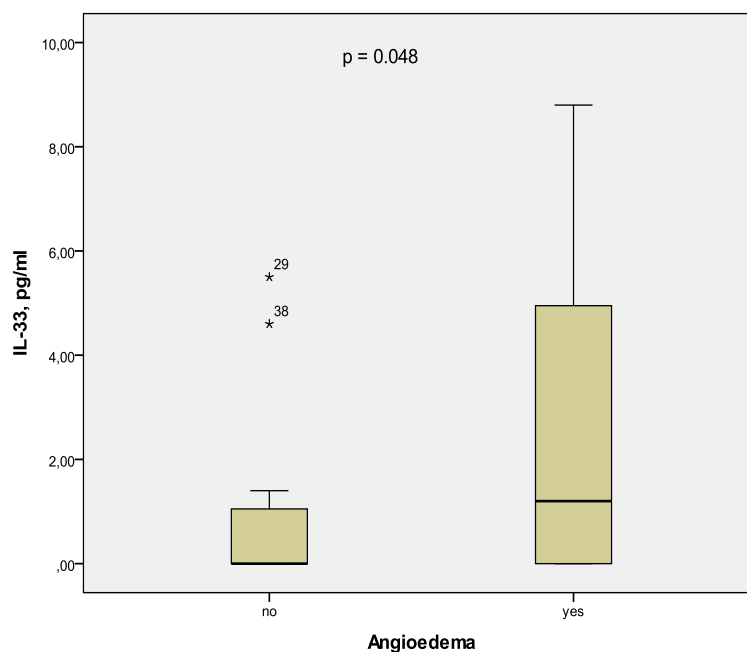
Параметър	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml	IL-33, pg/ml	MCP1/CCL2, pg/ml
Лека/средно тежка ХУ	1.27 ± 1.14	6.19 ± 0.78	1.67 ± 0.56	96.68 ± 7.61
Тежка/много тежка ХУ	2.60 ± 1.01	5.62 ± 0.56	2.14 ± 0.63	84.68 ± 8.41
P-value	0.473	0.925	0.451	0.483

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

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

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

Фигура 17. Стойности на IL-33 при пациенти с ХУ според наличието на ангиоедем.



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

всички цитокини и наличие на автоимунен тиреоидит са представени в Таблица 10.

Таблица 12. Стойности на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ според наличието на автоимунен тиреоидит.

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

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

Таблица 13. Стойности на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ според наличието ASST.

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

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

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

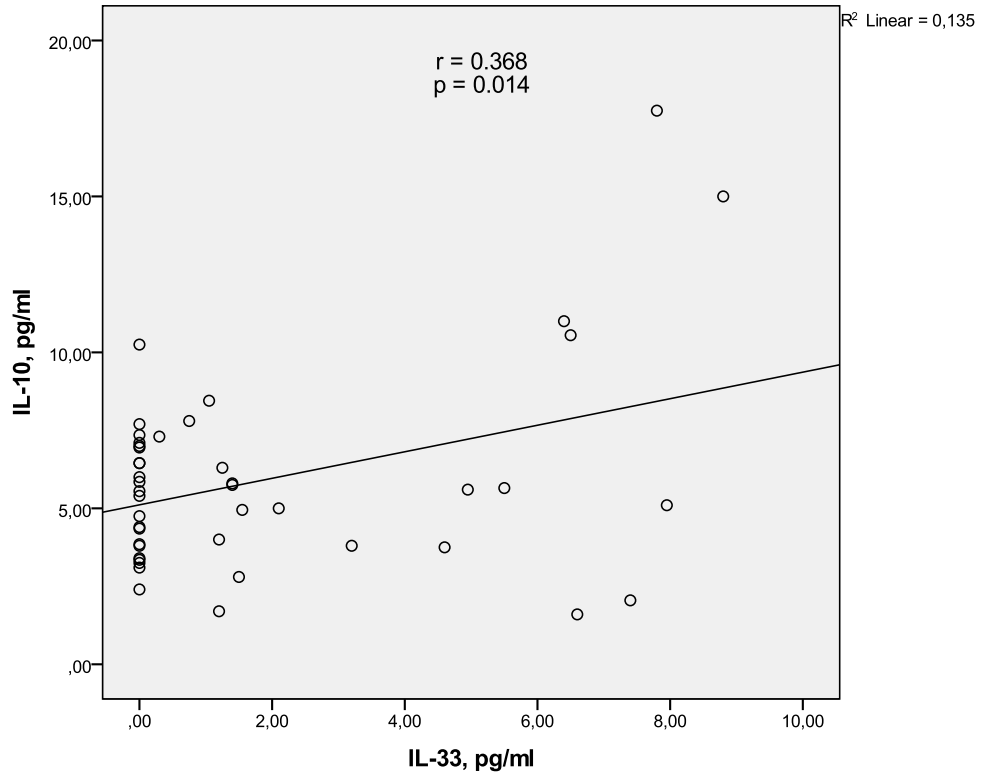
Таблица 14. Корелации между лабораторни и имунологични показатели.

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



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

Фигура 18. Корелация между IL -10 - IL-33.



## **ГЛАВА 3**

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

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

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

#### **Пациентска група**

#### **Период 1971-2012**

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

Информацията в Регистъра за НАЕ е периодично обновявана през годините, като обобщените данни сочат, че за периода 1972-2013: единствената потвърдена диагноза на брадикинин-медиран ангиоедем е този, дължащ се на дефицит на C1-INH (количествен или качествен). Обобщена е информация за всички семейства с поставена диагноза на рядка форма на ангиоедем, тяхната

фамилна история, фамилно дърво и проведени изследвания за диагностика на ангиоедема. Данните за пациентите с доказано заболяване са представени в Таблица 15:

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

#### *Демографска характеристика*

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

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

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

Таблица 16.

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

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

*Смъртни случаи*

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

Сред загиналите проследихме каква част от пациентите са загинали в резултат на НАЕ и данните са обобщени в Таблица 17:

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

Фигура 19.



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

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

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

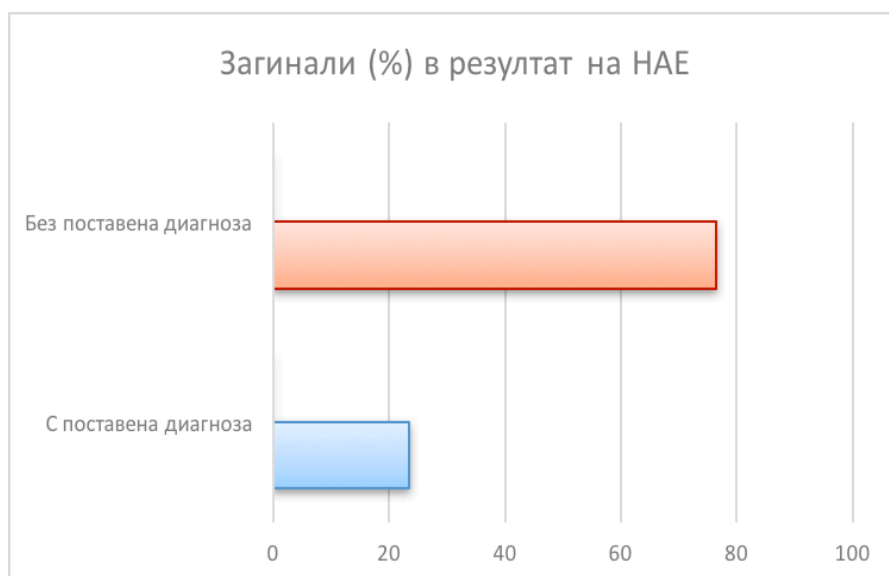
Данните сочат, че едва при 23.5% от случаите (8 пациенти) смърт е настъпила при налична поставена диагноза и известен НАЕ в резултат на С1 инхибиторен дефицит.

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

Таблица 18.

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

Фигура 20.



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

Таблица 19.

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

Фигура 21.



Загубените от проследяване фамилии са 21 броя: 11 на С1-INH-НАЕ тип 1 (18 пациенти), 6 фамилии с С1-INH-НАЕ тип 2 (8 пациенти) и една фамилия, при която не може да се заключи дали е тип 1 или 2 (4 пациенти).

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

Таблица 20.

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



Разпределението на загубените от проследяване пациенти по вид на НАЕ е показано в Таблица 21:

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

### Период 2013-2018

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

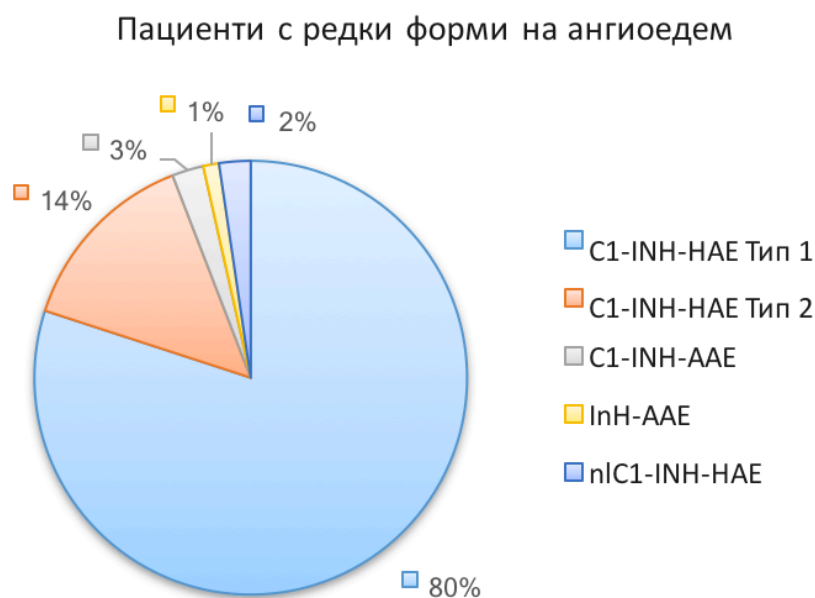
Данните обобщени за пациентите са представени в следващите таблици.

Таблица 22.

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

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

Фигура 22.



### Демографска характеристика

Демографските характеристики на пациентите с C1-INH-HAE и придобит ангиоедем ААЕ са представени в следната таблица:

Таблица 23.

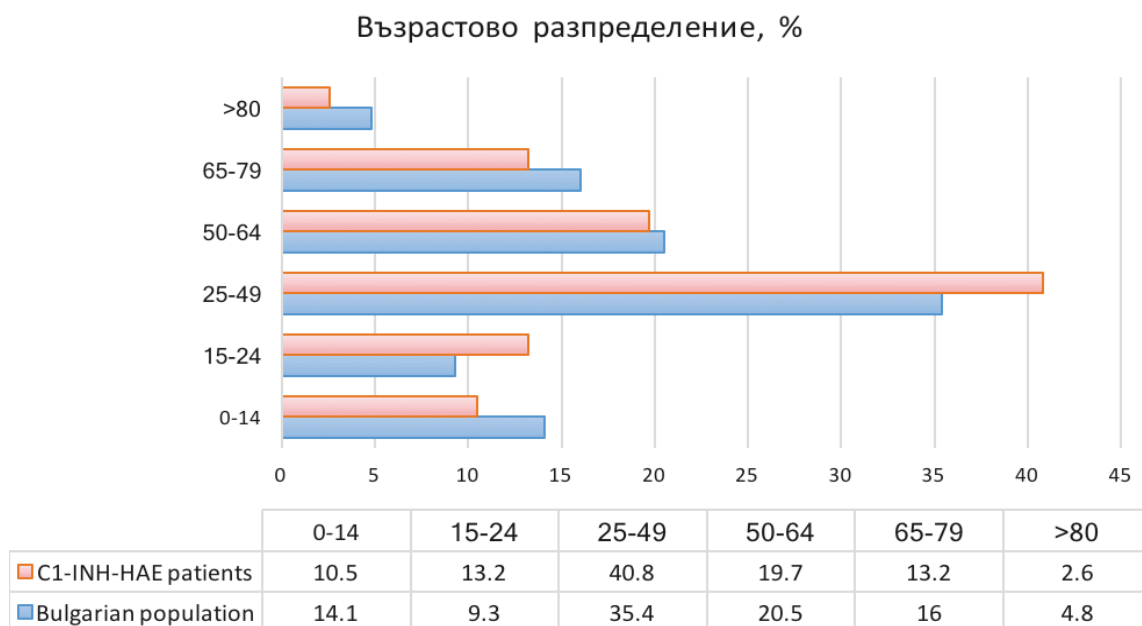
Период 2013-2018			
Възраст (към 2018 г)		Средна	Обхват
	C1-INH-HAE	43	(8-84)
	AAE	55	(48-62)
		Брой	Процент %
<b>Пол C1-INH-HAE</b>	Жени	43	53.7%
	Мъже	37	46.3%
<b>Пол ААЕ</b>	Жени	3	60%
	Мъже	2	40%

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

Процентното разпределение спрямо пол при С1-ИНН-НАЕ е 54:46% (ж:м), което е очаквано предвид автозомно доминантния тип на унаследяване на болестта.

Изчислихме процентното възрастово разпределение при С1-ИНН-НАЕ и го сравнихме с това на българската популация.

Фигура 23. Възрастово разпределение на българската популация и С1-ИНН-НАЕ.



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

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

НАЕ: 27.2 години (обхват, 2-79). Изчисленото време за поставяне на диагнозата е 16.8 години (0-74 г).

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

Таблица 24. Фамилна анамнеза, възраст на проява на симптомите и поставяне на диагнозата.

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

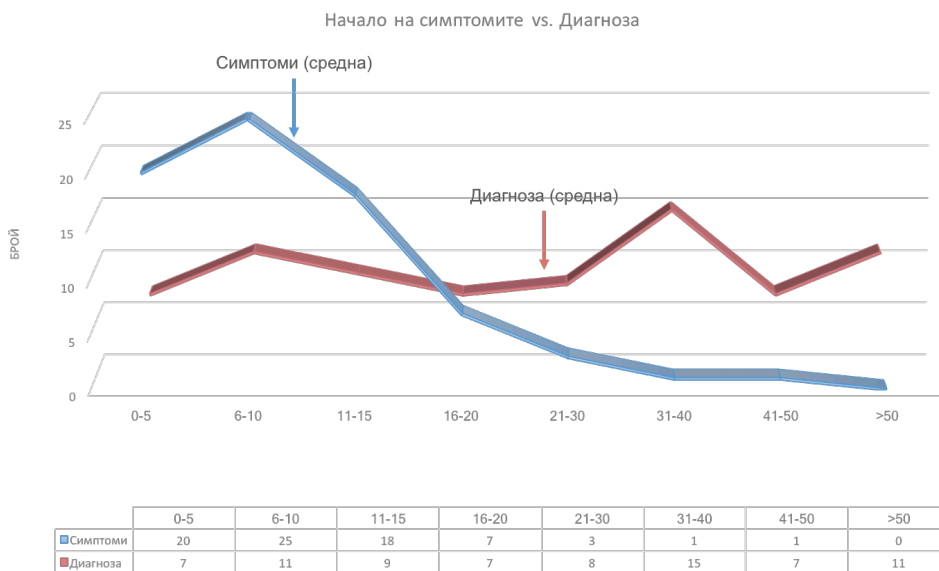
Направено бе съпоставяне на двата показателя: възраст на проява на НАЕ и възраст при диагностициране на НАЕ.

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

Таблица 25.

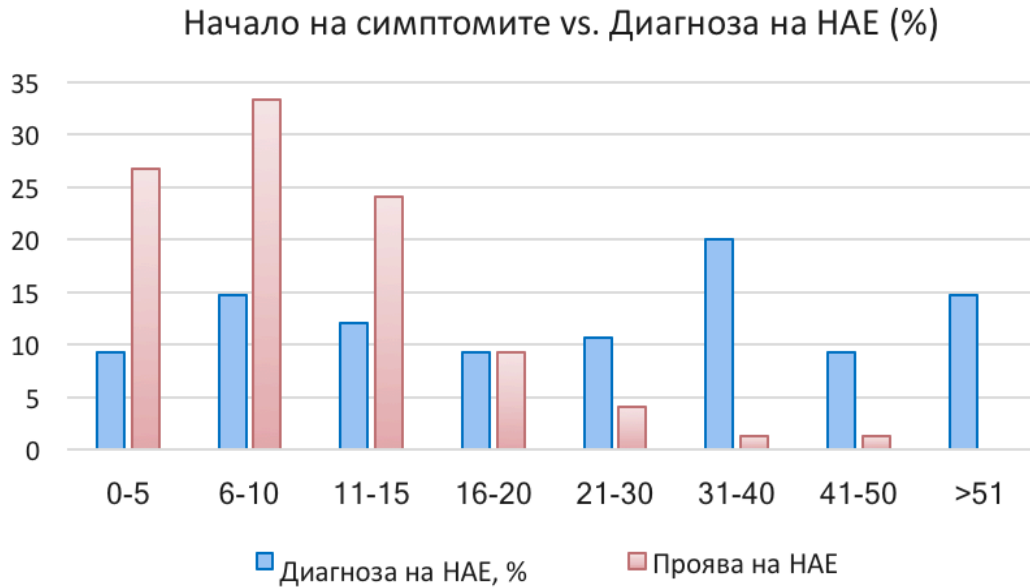
n=75	0-5	6-10	11-15	16-20	21-30	31-40	41-50	>51
<b>Проява на НАЕ</b>	20 (26.7%)	25 (33.3%)	18 (24.0%)	7 (9.3%)	3 (4.0%)	1 (1.3%)	1 (1.3%)	0 (0.0%)
<b>Диагноза на НАЕ</b>	7 (9.3%)	11 (14.7%)	9 (12.0%)	7 (9.3%)	8 (10.7%)	15 (20.0%)	7 (9.3%)	11 (14.7%)

Фигура 24.



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

Фигура 25.



### Смъртни случаи

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

- 2 в резултат на сърдечно-съдово заболяване (усложнения в резултат на мозъчен инсулт и остър миокарден инфаркт),
- 1 в резултат на дисеминирано злокачествено заболяване (метастатичен рак на млечната жлеза) и
- 1 в резултат на усложнения на неврологично заболяване (болест на Паркинсон).

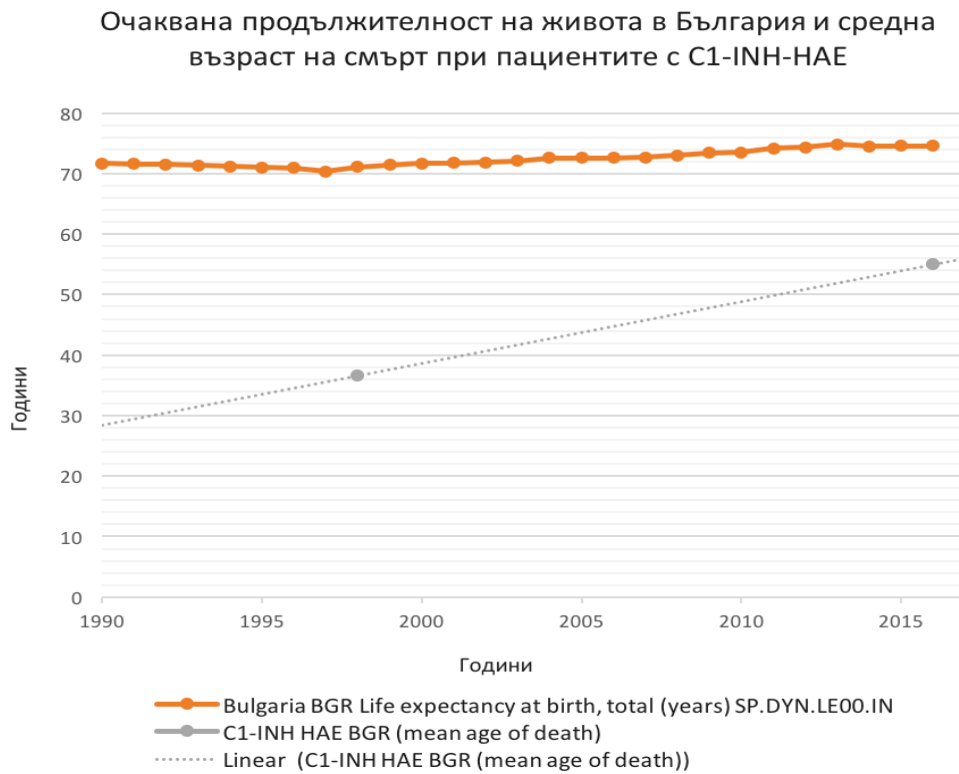
Не бе регистриран нито един случай на смърт в резултат на фатален ларингеален оток.

Таблица 26.

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

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

Фигура 26.



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

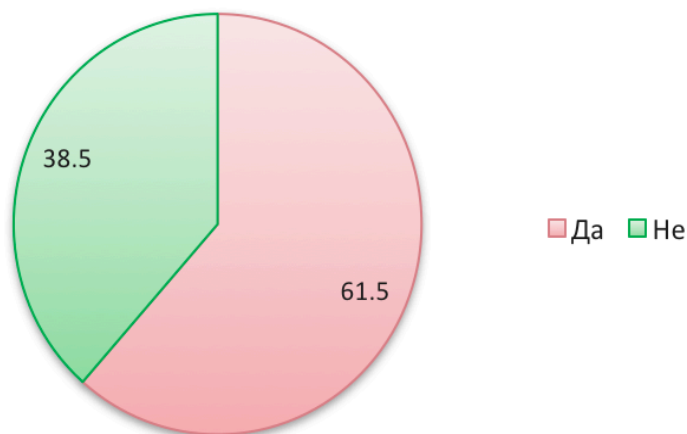
Таблица 27.

Период 2013-2018	C1-INH-НАЕ	Брой	Процент %
Смърт от НАЕ във фамилията	Да	16	61.5%
	Не	10	38.5%



Фигура 27.

Смърт от НАЕ в семейството, %



#### *Клинични прояви на НАЕ*

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

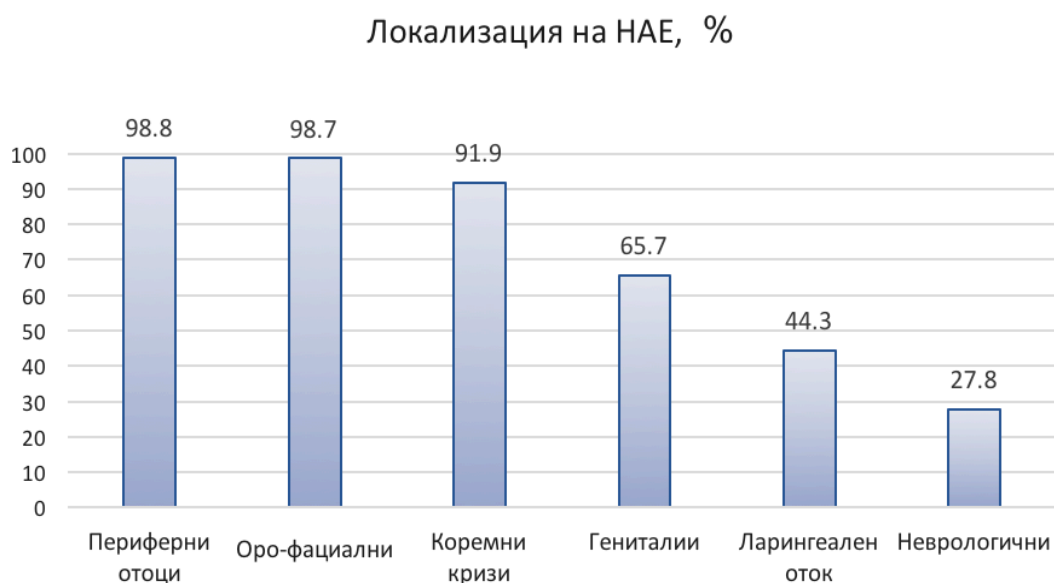
Известен процент от пациентите свързват неврологична симптоматика (главоболие, дезориентация) като прояви на НАЕ – 27.8%.

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

Таблица 28.

Период 2013-2018	C1-INH-НАЕ	Случаи (n/80)	Процент %
<b>Локализация на атаките при C1-INH-НАЕ</b>	Периферни отоци	79 / 80	98.8%
	Оро-фациални	78 / 79	98.7%
	Коремни кризи	68 / 74	91.9%
	Гениталии	48 / 73	65.7%
	Ларингеален оток	35 / 79	44.3%
<b>Симптоми, асоциирани като прояви на НАЕ</b>	Неврологична симптоматика (главоболие, дезориентация)	20 / 72	27.8%

Фигура 28.



### Инвазивни процедури

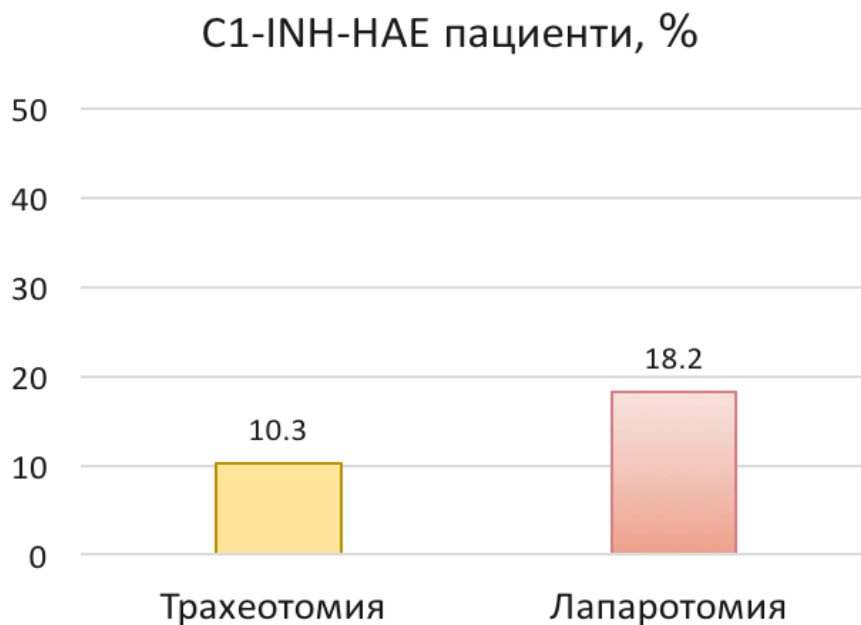
Сред проследените пациенти, известен брой съобщава за свързани с ангиоедема инвазивни медицински манипулации в миналото: 10.3% са били

подложени на трахеотомия, 18.2% са били подложени на лапаротомия в хода на коремна криза.

Таблица 29.

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

Фигура 29. Пациенти (%), подложени на инвазивни медицински манипулации поради НАЕ.



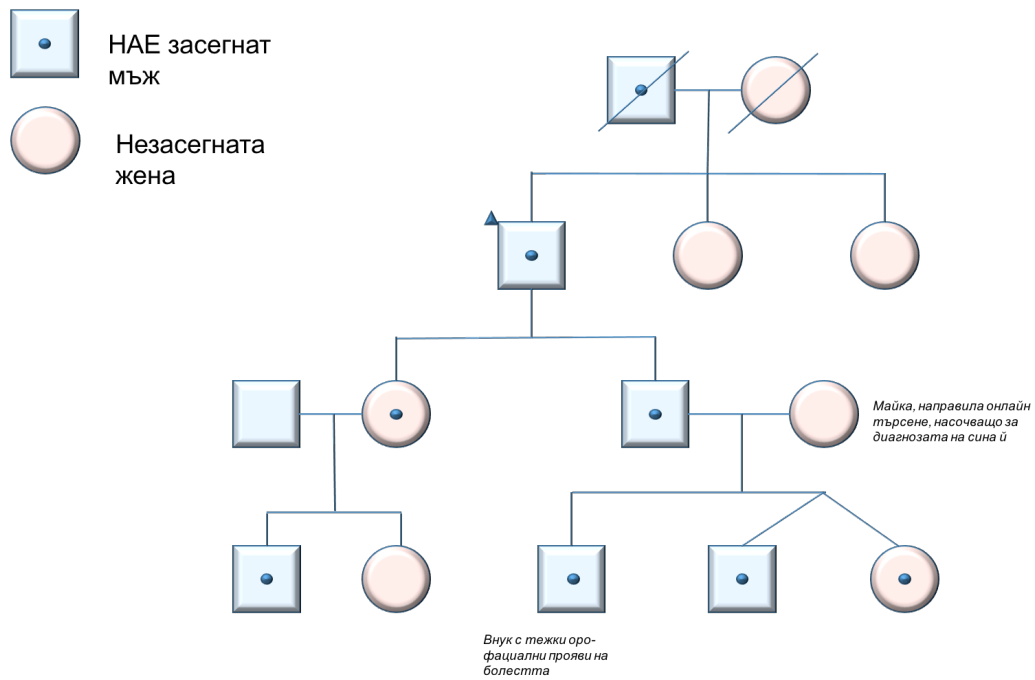
Един от пациентите съобщава за 3 оперативни интервенции в миналото, 5 спешни ендоскопски изследвания, както и многократни хоспитализации по повод на коремни болки.

Фигура 30.



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

Фигура 31.



### Клинична тежест на НАЕ

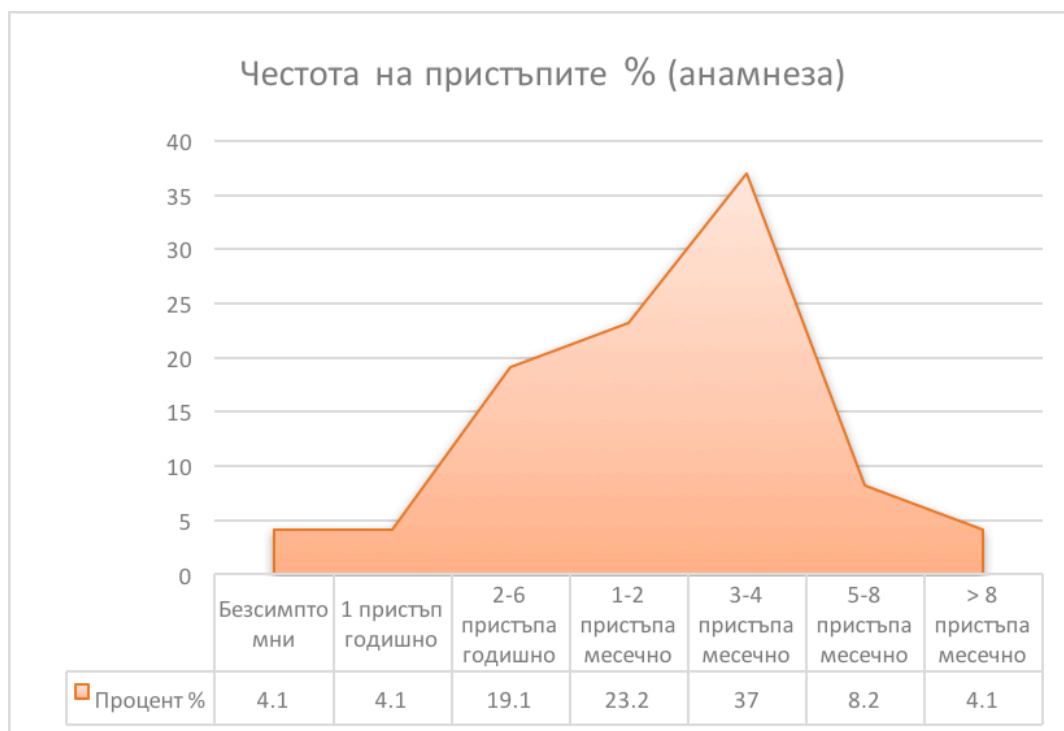
Клинична тежест на симптомите при отделните пациенти бе оценена спрямо честота на симптомите от НАЕ.

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

Таблица 30.

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

Фигура 32.

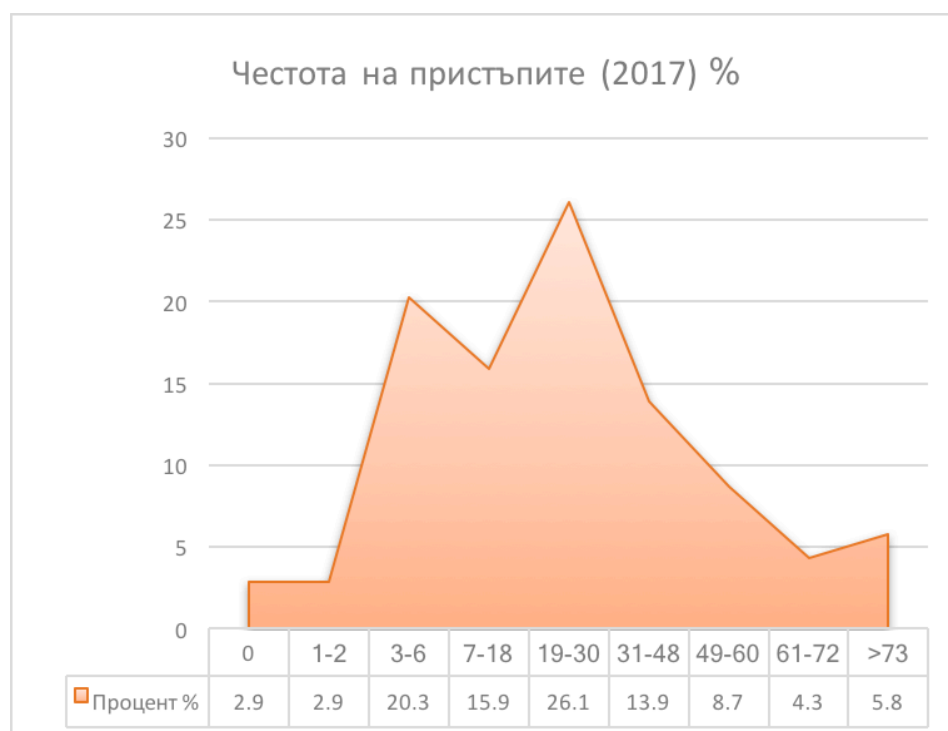


Данните за настъпили НАЕ пристъпи през 2017 са представени в следните таблици и графика.

Таблица 31.

Период 2013-2018	Пристъпи на С1-ИНН-НАЕ	Случаи (n/69)	Процент %
<b>Честота на пристъпите (2017)</b>	0	2	2.9%
	1-2	2	2.9%
	3-6	14	20.3%
	7-18	11	15.9%
	19-30	18	26.1%
	31-48	9	13.9%
	49-60	6	8.7%
	61-72	3	4.3%
	>73	4	5.8%

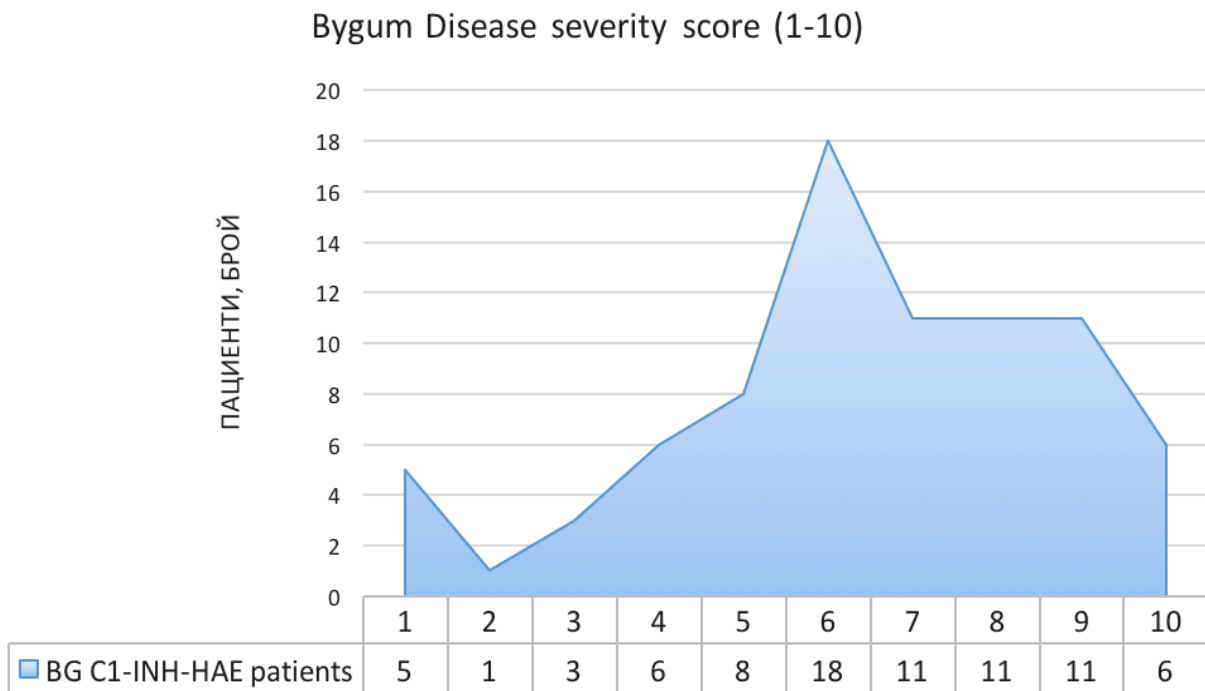
Фигура 33.



*Bygum score*

Честотата на симптомите от НАЕ (анамнестично или за даден период) са величини, с потенциално променлив характер, зависещ от множество комплексни фактори. За да преодолеем този проблем, разпределихме пациентите в 10 категории според клиничната тежест на болестта, спрямо изчисления скор за оценка на клиничната тежест на НАЕ (Bygum score: обективен метод за оценка клиничната тежест на C1-INH-НАЕ) (143).

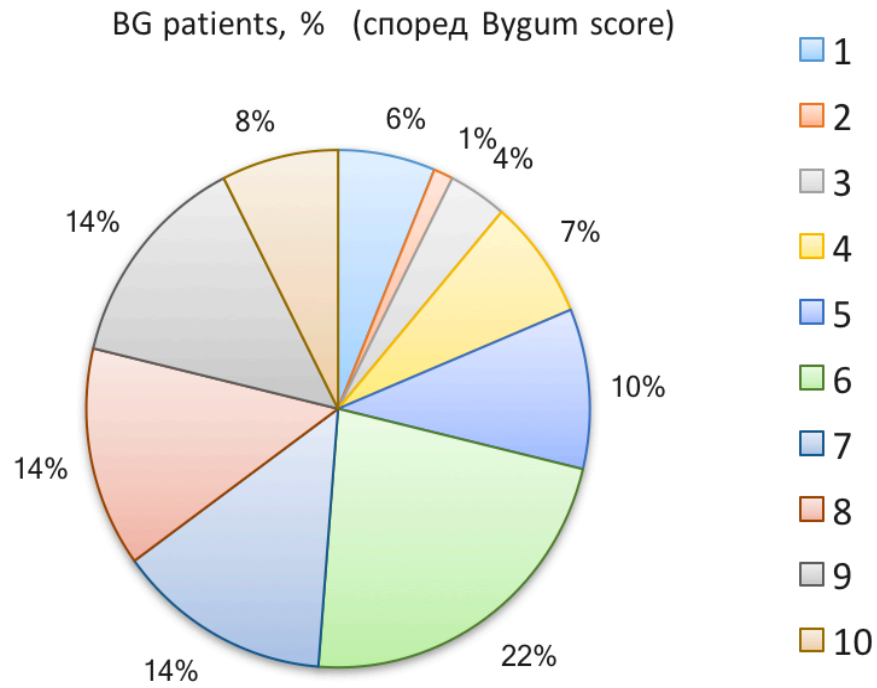
Фигура 34.



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



Фигура 35.



*Терапевтично поведение при пациентите с НАЕ*

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

Таблица 32.

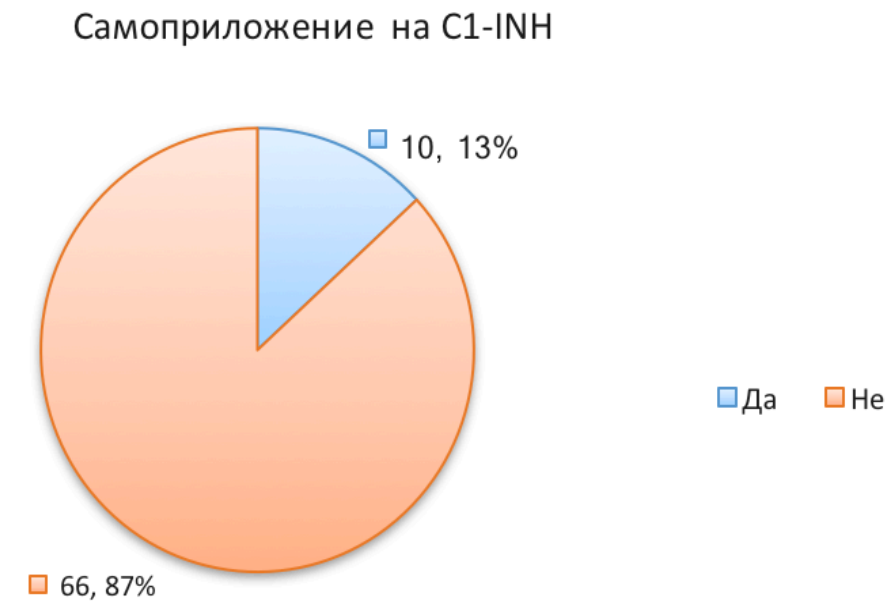
Период 2013-2018		С1-ИНН-НАЕ	Случаи (n/76)	Процент %
Специфична терапия за С1-ИНН-НАЕ	При нужда	С1-ИНН концентрат	70	92.1%
		➤ pdC1-ИНН	11	14.5%
		➤ rhC1-ИНН	59	77.6%
		Icatibant	2	2.6%
	Профилактика	Андрогени	7	9.2%
		Транексамова киселина	1	1.3%
		С1-ИНН концентрат	6	7.9%

Мнозинството от пациентите (92.1%) се лекуват с С1 инхибиторен концентрат при нужда (рекомбинантен или добит от човешка плазма). От тях едва 13.2% са способни да извършват самоприложение на медикамента, докато 86.8% търсят помощ от здравен работник или медицинско заведение за венозна апликация при нужда.

Таблица 33.

Период 2013-2018	С1-ИНН-НАЕ	Брой (n/76)	Процент %
Самоприложение на С1-ИНН	Да	10	13.2%
	Не	66	86.8%

Фигура 36.



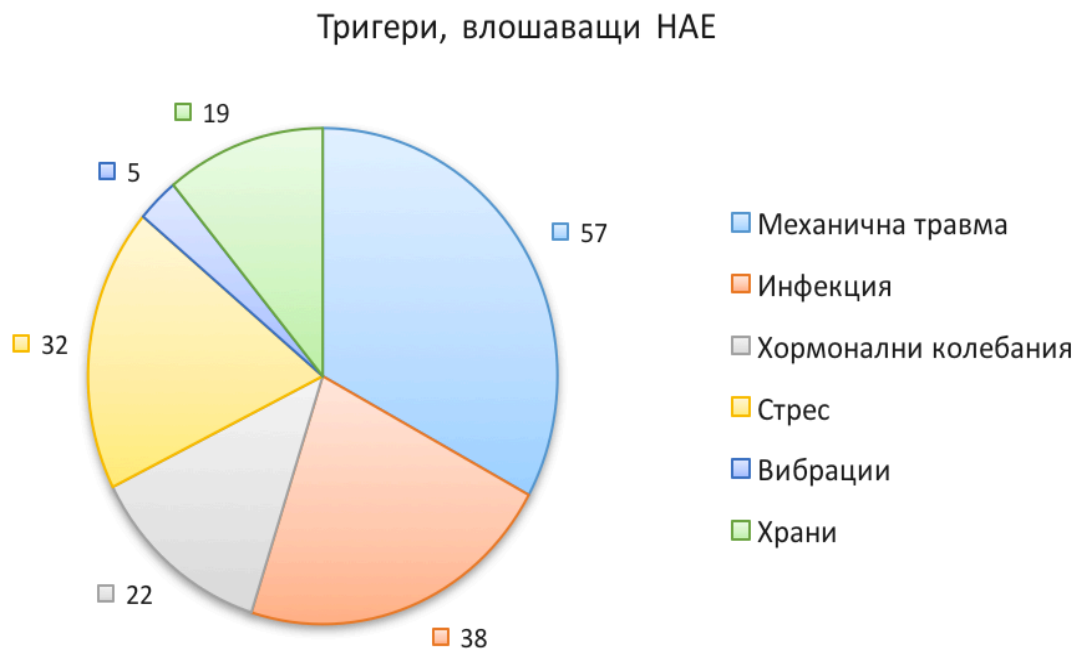
### Тригери на НАЕ

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

Таблица 34.

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

Фигура 37.



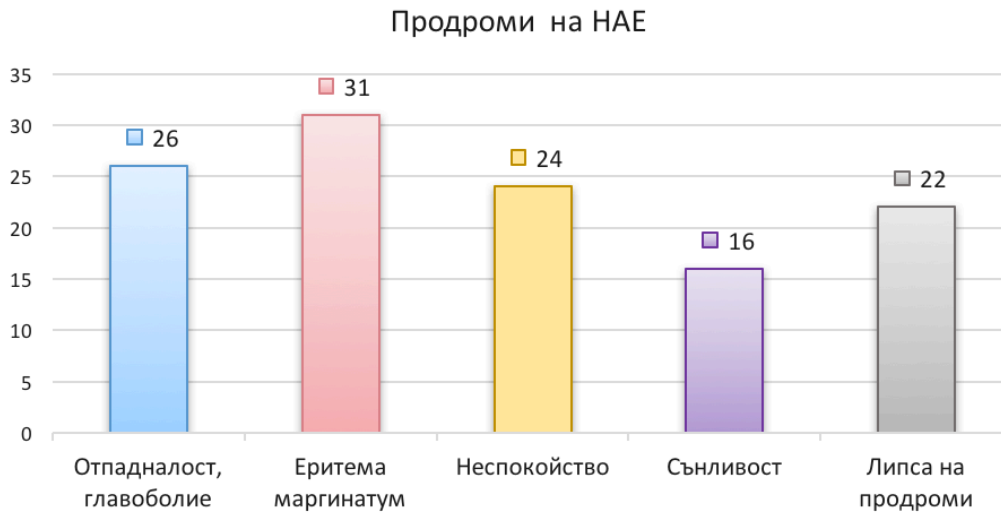
*Продроми на НАЕ*

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

Таблица 35.

<b>Период 2013-2018</b>	<b>C1-INH-НАЕ</b>	<b>Брой (n/76)</b>	<b>Процент %</b>
<b>Продроми на АЕ</b>	Отпадналост, главоболие	26	34.2%
	Еритема маргинатум	31	40.8%
	Неспокойство	24	31.6%
	Сънливост	16	21.1%
	Липса на продроми	22	28.9%

Фигура 38.



### Съпътстващи заболявания

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

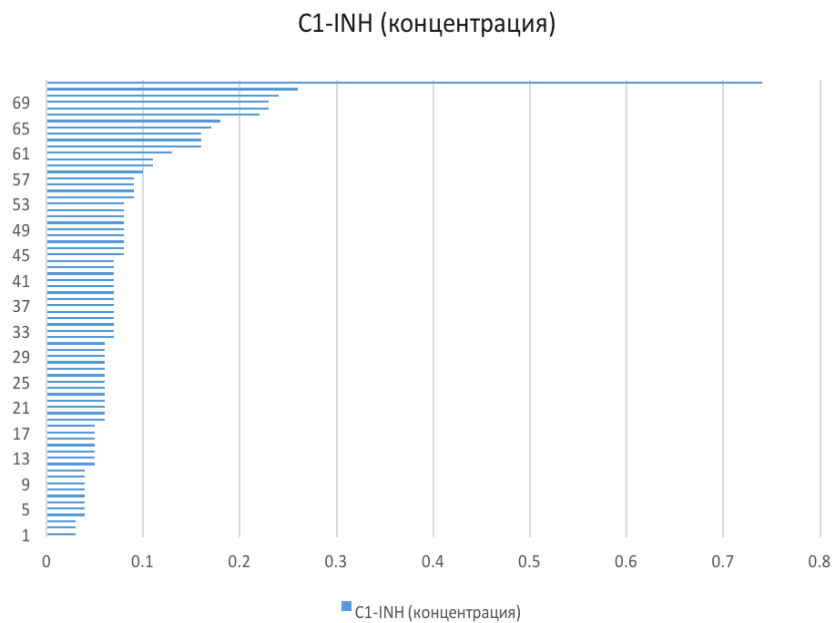
Таблица 36.

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

*Лабораторни изследвания*

Данните от лабораторните изследвания, потвърждаващи болестта са представени в следващите фигури. Концентрацията на C1-INH се открива много под допустимите референтни граници при мнозинството пациенти. Малък брой пациенти имат плазмена концентрация на протеина, попадаща в нормата или над нея, което кореспондира с C1-INH-НАЕ тип 2, където се синтезира количествено нормален (или по-голямо количество), но дисфункционален плазмен протеин.

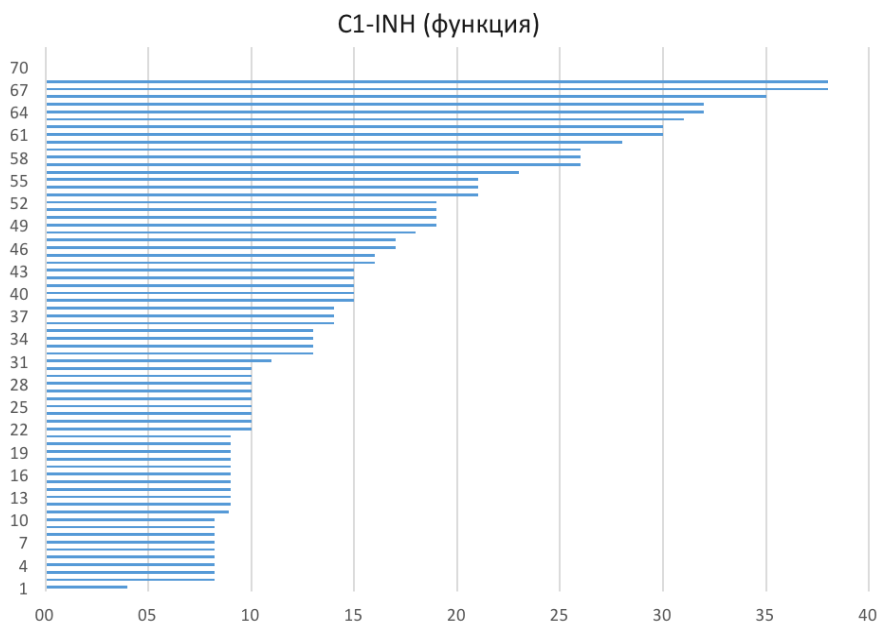
Фигура 39.



C1-INH (концентрация): референтни граници 0,17-0,44 g/l

От функционалното изследване на протеина се вижда, че всички пациенти имат ниски функционални нива на C1 инхибитора, далеч под нормалните 70% активност, бележеща долната граница на нормата.

Фигура 40.

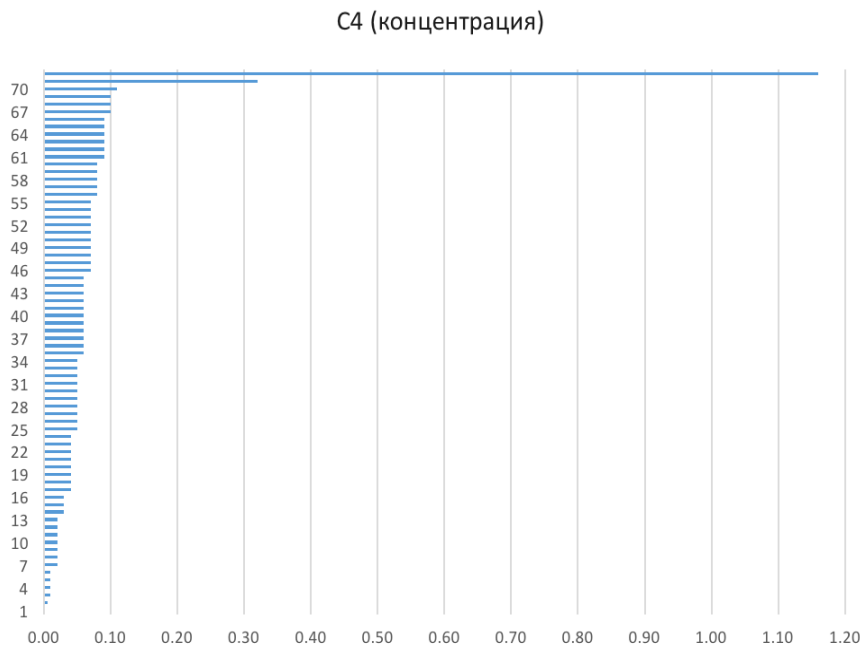


C1-INH (функция): референтни граници 70 – 130 %

От изследванията на C4 се вижда добрата диагностична стойност на изследването, което е показателно за функционалния дефицит на C1 инхибитора при пациентите с C1-INH-НАЕ. Макар и малък процент (около 5-6%), някои пациенти демонстрират плазмена концентрация на C4 около нормата, което потвърждава необходимостта от количествено и функционално изследване на C1 инхибитора при съмнение за C1-INH-НАЕ.



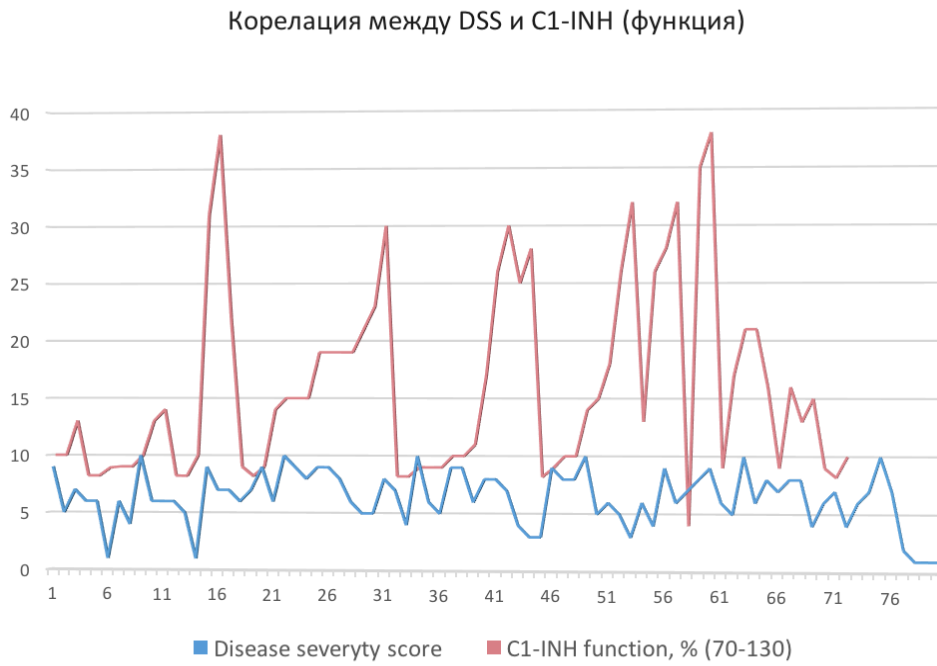
Фигура 41.



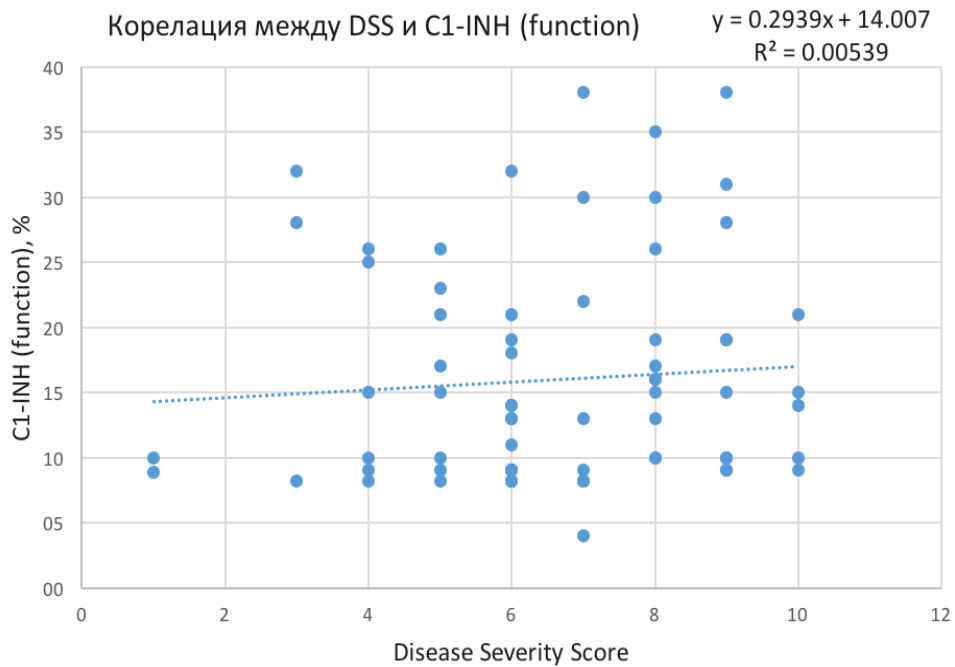
С4 (концентрация): референтни граници 0,1-0,4 g/l

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

Фигура 42.



Фигура 43.

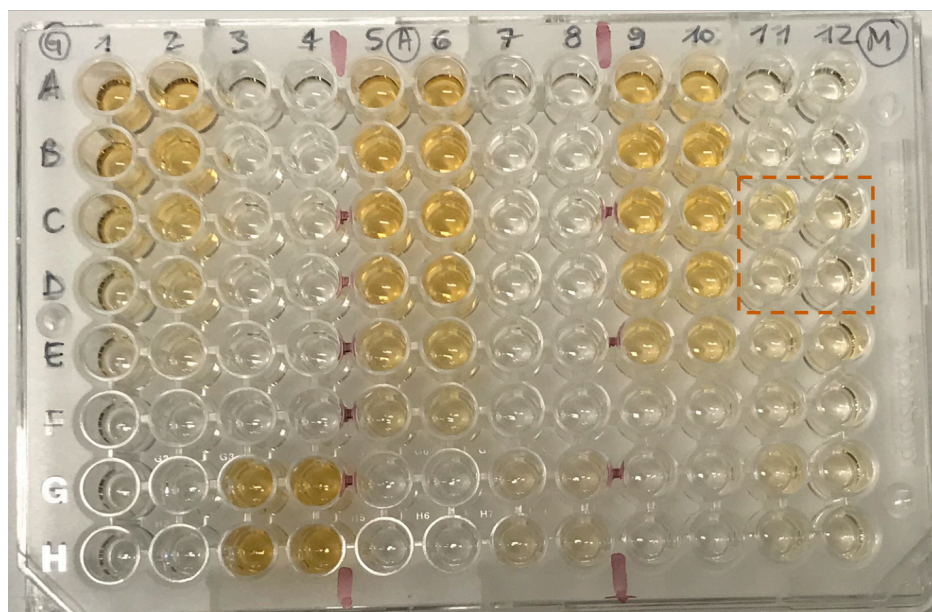


В групата на придобит С1 инхибиторен дефицит (С1-INH-AAE) проведохме изследвания за специфични неутрализиращи антитела срещу С1 инхибитора (ELISA).

Антитела от клас IgM се откриха слабо положителни при един от двата случая на тази диагноза в нашата група. Наличието на тези антитела потвърждава патофизиологичния механизъм, по който възниква дефицитът на С1 инхибитора в разглеждания случай. И двата случая на С1-INH-AAE в нашата група е при пациенти със съпътстващо лимфопролиферативно заболяване (лимфом).

Фигура 44.

ELISA anti-C1-INH антитела

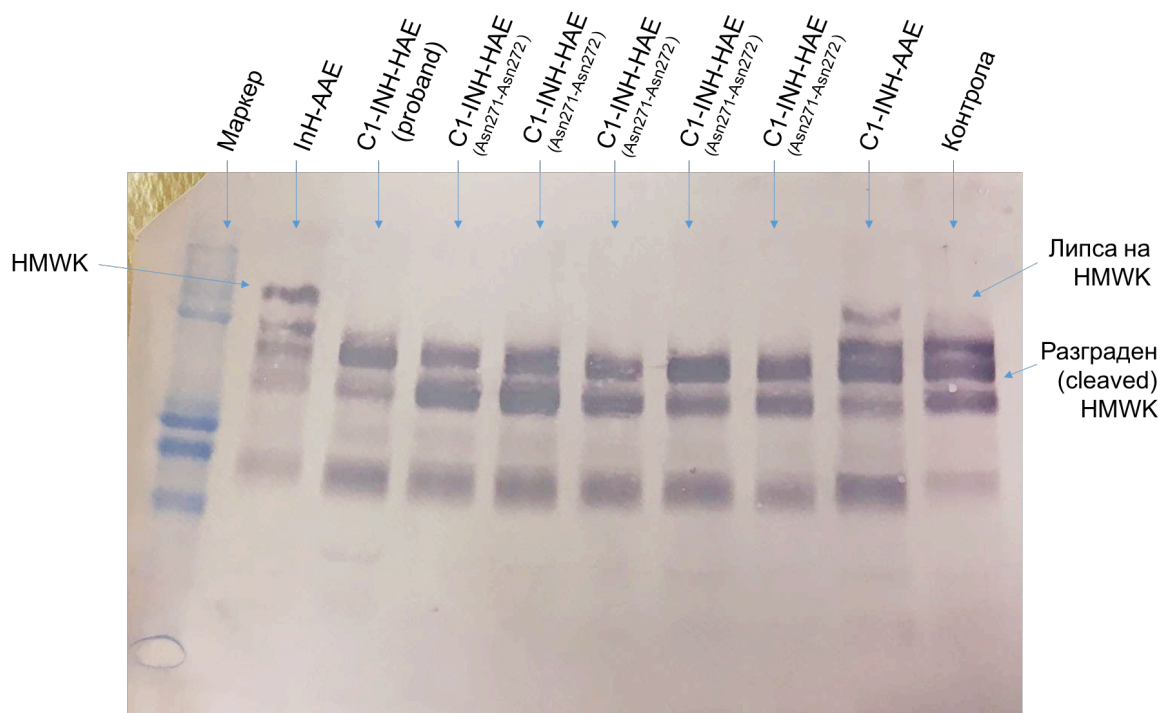


Изследването на С1q при двата случая на придобит ангиоедем показва наличие на протеина в референтни граници.

Проведе се изследване за разпадането на високо-молекулния кининоген (HMWK) при пациента с InH-AAE (идиопатичен не-хистаминергичен придобит ангиоедем), при една от пациентките с придобит С1 инхибиторен дефицит, при

един пациент с de novo C1-INH-AE, както и при 5 от пациентите с една от новите мутации (тази за HAE тип 2, описана подробно Глава 5).

Фигура 45.



Резултатът показва, че липсват данни за разпадане на кининогена при пациентът с InH-AE, което не потвърждава брадикининовия механизъм на състоянието. При пациентката с C1-INH-AE, HMWK също се открива, макар с данни за умерено разпадане (ремисия на ангиоедема и лимфома в момента на получаване на пробата). При пациентите от семейството с C1-INH-AE тип 2 (нова мутация **Asn271-Asn272**) се вижда напълно разпадане на кининогена, което е белег за нестабилността на молекулата при отсъствието на функциониращ основния контролиращ ензим - C1 инхибитор.

## ГЛАВА 4

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

### Честота на НАЕ

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

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

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

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

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

Фигура 46. Административни райони в България.



## Честотата на диагнозата, според административните райони на Р. България и карта на С1-INH-НАЕ

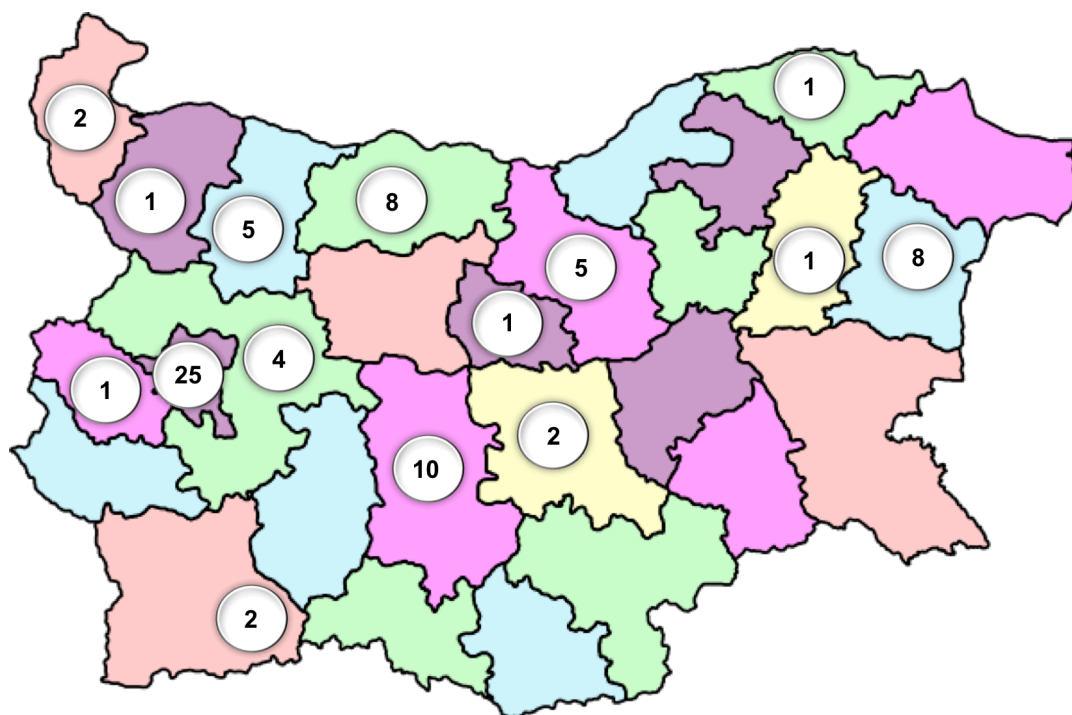
Прави впечатление, наличието на 13 области на страната, в които няма нито един диагностициран случай на НАЕ. Най-големите от тях са Бургас, Пазарджик, Хасково и Русе с общо население около 1 000 000 души. В други области, макар да има диагностицирани няколко случая на НАЕ, изчислената честота на болестта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

Фигура 47. Честота на диагнозата, според административните райони на Р. България

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

Изготвихме и карта на диагностицираните случаи с С1-INH-НАЕ.

Фигура 48.



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

През последните години се наблюдава и обратното явление: някои пациенти да се завръщат в страната, разбирайки, че вече и тук са налични съвременни медикаменти за лечение на НАЕ. Такъв е случаят на двама членове на едно от големите семейства с С1-INH-НАЕ, които са прекарвали около 10 години в Испания и през последните 2 години живеят отново в България.



## ГЛАВА 5

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

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

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

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

още се очаква, като първоначалните изследвания, предлагат извършване на цялостен NGS, тъй като таргетното изследване на очакваните причинни гени не показва наличие на мутация.

Проведени бяха и изследвания на пациенти с C1-INH-AAE, nC1-INH-HAE и InH-AAE, като генетичното изследване доказва липса на патогенна мутация в гените SERPING1 и F12.

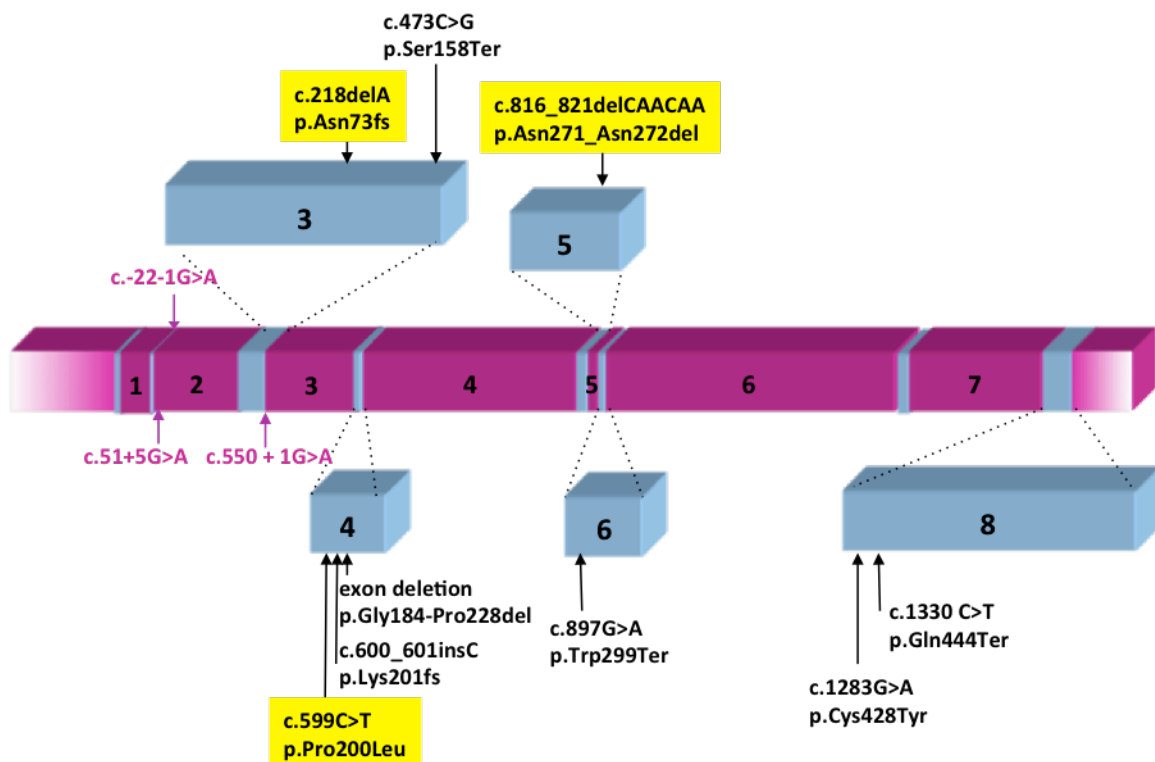
Данните от проведените генетични изследвания на българските пациенти са представени в следващата таблица.

Таблица 37. Генетични характеристики на пациентите с редки форми на ангиоедем.

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

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

Фигура 49.



Легенда:

екзони = светлосиньо

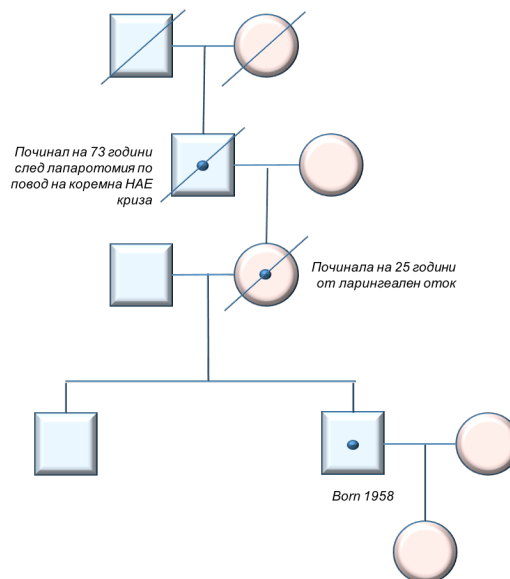
интрони = пурпурно

новите мутации са маркирани в жълто

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

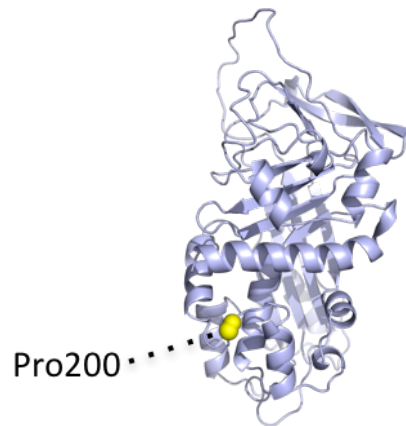
Едната новооткрита мутация, засяга рамката на четене на гена (frameshift: **p.Asn73fs**):

Фигура 50. Фамилно дърво (frameshift: **p.Asn73fs**)

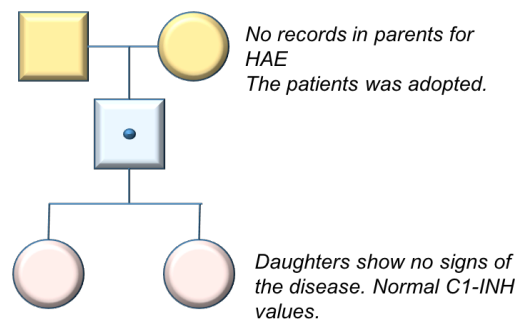


Втората новооткрита мутация е заместване на една аминокиселина **Pro200Leu** в екзон 4.

Фигура 51. Задна част на протеина (при **Pro200Leu**)

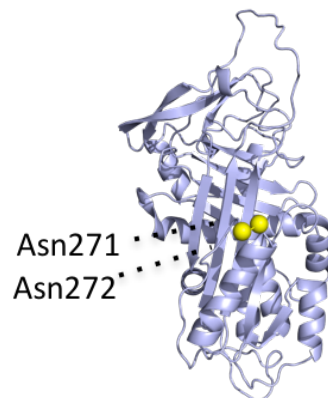


Фигура 52. Фамилно дърво (**Pro200Leu**)

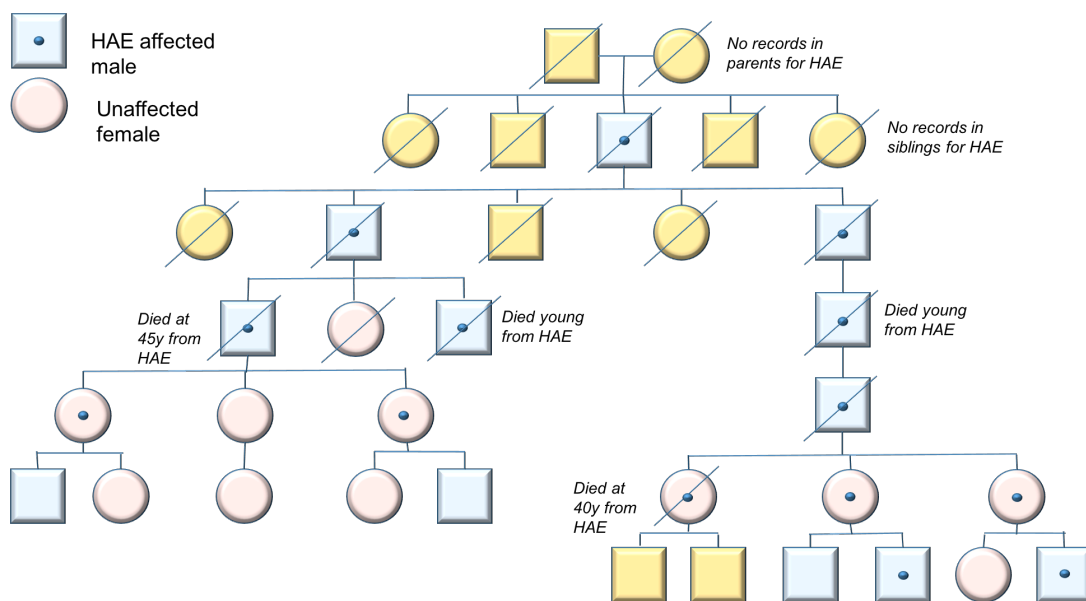


Третата новооткрита мутация е делецията на нуклеотидите, кодиращи **Asn271-Asn272** в екзон 5.

Фигура 53. Предна част на протеина (при **Asn271-Asn272**)



Фигура 54. Фамилно дърво (**Asn271-Asn272**)



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

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

## **ГЛАВА 6**

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

Диагностичното и терапевтичното поведение при пациенти с ангиоедем често е затруднено в клиничната практика поради редица фактори. Състоянието е разпространено в клиничната медицинска практика и води до чести посещения при лекар. Въпреки това, патофизиологичните разновидности на различните фенотипове ангиоедем не са добре известни в практиката, което е и предпоставка за трудности в разграничаването на отделните форми ангиоедем. Диагностичната оценка и подходящата диференциална диагноза са от решаващо значение при заболяване с такъв хетерогенен клиничен профил. Правилната клинична оценка изисква подробна и внимателна медицинска анамнеза. Клиничните признаци, насочващи към диагнозата са изброени в следващата таблица. Сред тях са скоростта на поява на симптомите, времето до тяхното спонтанно отминаване, възрастта на поява, преобладаващата



локализация, факторите влошаващи оплакванията, наличието на фамилна анамнеза и присъствието на лекарствата, влошаващи симптомите.

Таблица 38.

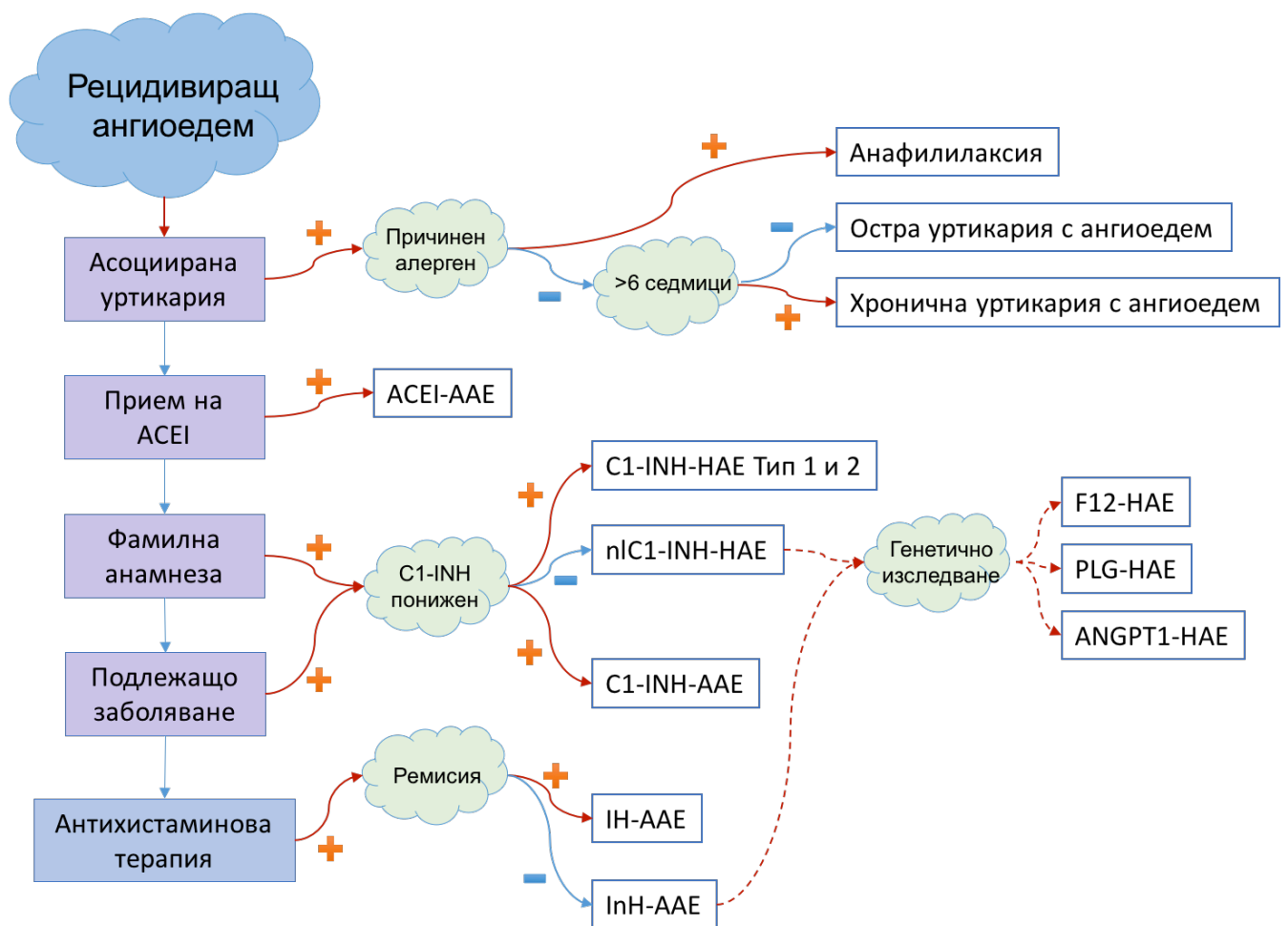
Характеристики АЕ	Хистаминергичен	Брадикинин-медиран	
		Придобит	Наследствен
Скорост на началото	Минути	Часове	Часове
Асоциация с уртикария	Често	Не	Не #
Време до спонтанно преминаване	Минути до часове	Дни	Дни
Възраст на появата	Всяка	След 4-та декада; След 6-та декада за ACEI-ААЕ	1-2 декада от живота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

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

\*нелицензирана терапия

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

Фигура 55. Алгоритъм за диагностика и поведение при пациенти с ангиоедем.



## 7. Обсъждане

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

### **ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 1**

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

Настоящата класификация на ангиоедема без уртикария е разработена от Cicardi и Международната работна група за Наследствен ангиоедем (HAWK) (27), като в нея се разграничават две основни групи ангиоедем: наследствен (HAE) и придобит (AAE). Осъвременяването в частта отнасяща се към HAE с нормален C1-INH (**nC1-INH-HAE**), се налага поради бурното откритие на нови патогенни мутации през изминалата 2017-2018 година (21-23).

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

пациенти, предполага основна роля на мастоцитите при тази подгрупа от пациентите с InH-AAE (42-45).

Друга класификация, фокусирана върху патофизиологичните механизми на АЕ, е предложена от Giavina-Bianchi et al. (46). Тази класификация се основава на идентификацията от 2 основни групи, при които ангиоедемът се медира от мастоцитна и/или базофилна дегранулация, или съответно от продуцирането на брадикинин.

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

Поради това, при предложената от нас патофизиологична класификация, се застъпва нова хипотеза за съществуване на припокриване (overlap) между медиаторите при недобре характеризираните форми на идиопатичен ангиоедем. Такъв подход при аналитичното разглеждане на различните фенотипове на ангиоедема, би помогнал на клиничната практика, тъй като обръща внимание на честите и отгатваеми механизми при хистаминергичния ангиоедем, отделя ясно групите на брадикини-медиирания ангиоедем, но оставя и място за нередките състояния в клиничната практика, при които строго разграничаване на патофизиологичния механизъм не е възможно или има припокриващи се белези на двете по-добре-дефинирани групи. Именно при тази форма на “припокриване” (overlap), биха били оправдани методи на интервенцията от изследователски характер: анти-IgE терапия (omalizumab) (42-

45, 144), анти-каликреинова терапия (lanadelumab, BCX7353) (113, 126), анти-фактор 12 (anti-F12 моноклонално антитяло) и други (145).

## **ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 2**

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

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

CYE ( $r = 0.476$ ,  $p = 0.007$ ), IL-10 – IL-33 ( $r = 0.368$ ,  $p = 0.014$ ) и брой на моноцитите – IL-10 ( $r = 0.420$ ,  $p = 0.006$ ), CCL2/MCP-1 и IL-6 ( $r = 0.426$ ,  $p = 0.001$ ), както и за CCL2/MCP-1 и IL-33 ( $r = -0.281$ ,  $p = 0.040$ ). От нашите изследвания показателите IL-6, IL-10, IL-33, hsCRP и CYE са обещаващи маркери за активността на болестта при пациенти с ХСУ.

Наблюдавахме набелязана тенденция в зависимост от статуса на 25-ОН-витамин Д при пациентите с тежка ХУ, което може да бъде обяснено с предполагаемата имуномодулаторна функция на витамин Д. Подобни изследвания, проведени от други изследователски екипи предлагат клинична полза от 4-6 седмичен курс с витамин Д, което би могло да помогне за подобрене на терапевтичния отговор при пациенти с трудна за лечение ХСУ (146, 147). Необходимо е изследване на витамин Д статуса при по-голяма пациентска група, с оглед оценка на значимостта му в диагностично-терапевтичното поведение при пациенти с ХСУ.

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

Измерването на стойностите на IL-6, IL-10, IL-33, CCL2/MCP-1 при пациенти с ХУ и при здрави контроли, показва разлики между двете групи. Оказва се, че цитокините IL-6 и IL-10 са значимо повишени при пациентите с ХУ, белег за минимално персистиращо възпаление при пациентите с ХУ. Подобни данни са

описвани и от други изследователи, потвърждавайки наличието на системно възпаление, съпътстващо болестта. Данните за IL-6 имат потвърдителен характер, както е установено и от други изследователски екипи (148, 149). За разлика от тях, IL-33 се откри сигнификантно намален при пациентите с ХУ в сравнение със здрави индивиди. Обсъждането на този феномен не може да бъде еднозначно поради различните хипотези за неговото значение при състояния с персистиращо системно възпаление. Установените значимо различни нива на IL-10 и IL-33 не са съобщавани в реферираната медицинска периодика до момента и имат оригинален характер в изследването на тези цитокини при пациенти с ХУ. От сравнението на нивата на цитокините според тежестта на болестта не бяха открити сигнификантни разлики за IL-6, IL-10, IL-33 между пациенти с лека и тежка ХУ. Този факт предполага, че наличието на имунен дисбаланс е част от феномените, характеризиращи болестта, но не непременно дозо-зависим фактор, способен да предскаже клиничната тежест на ХУ.

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

От корелационния анализ на различните променливи бяха открити слаби корелации между с коефициент под  $r=0.5$ , които са значими ( $p<0.05$ ). Някои от тях са напълно логични и предвидими, например hsCRP – СУЕ ( $r = 0.417$ ,  $p = 0.005$ ). Такъв е и случаят с корелация между D-dimer – СУЕ ( $r = 0.476$ ,  $p = 0.007$ ), както е наблюдавано и от други изследователски екипи (150, 151). Нашите

изследвания са в подкрепа на хипотезата за системния характер на хроничната уртикария (152).

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

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

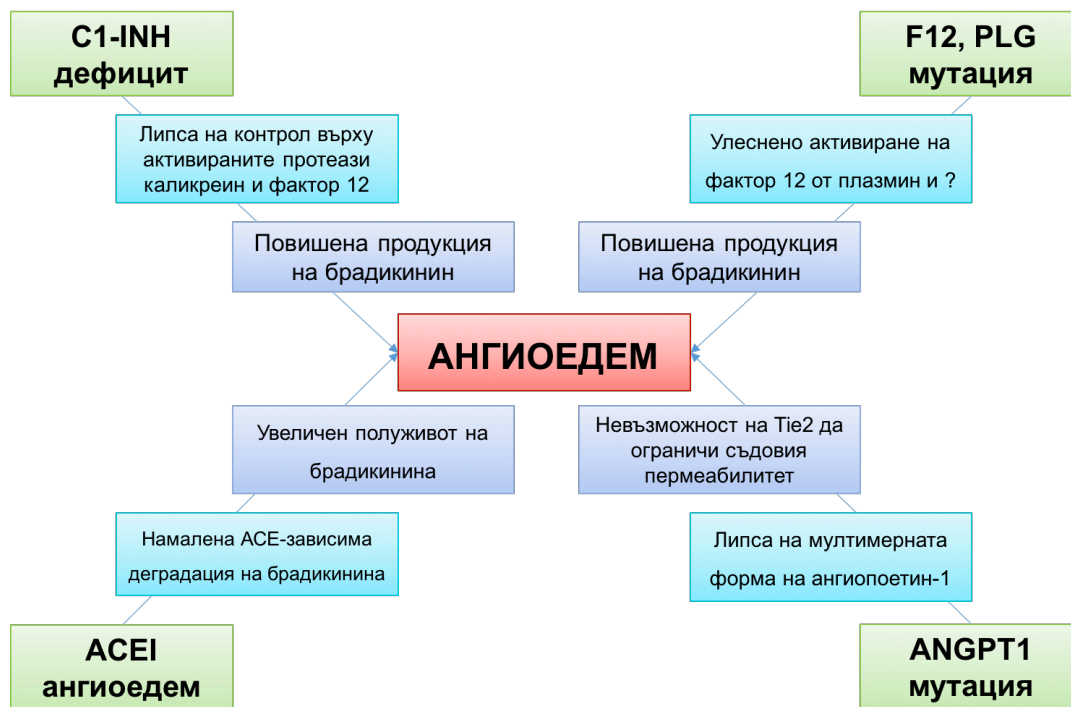


### **ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 3**

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

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

Фигура 56. Адаптирана по Cicardi и Zuraw 2018, JACI In Practice (73).



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

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

## Период 1971-2012

Ретроспективното изследване за периода 1972-2012 обхваща годините от поставянето на първата диагноза НАЕ в България от проф. д-р Божко Божков и анализират информация, съхранявана в Регистъра за НАЕ, който е създаден

към Клиниката по алергология на УМБАЛ “Александровска” за целите на по-добро проследяване и грижа за пациентите с редки форми на ангиоедем. Годината на поставяне на първата диагноза НАЕ е сред първите в Европа и говори за високо ниво на познанието на Учителите в областта на Алергологията в България. Известно е, че проф. Божков се е свързал лично с Prof. Sir. Peter Lachmann за провеждане на първите изследвания на комплемента при българските пациенти (153-155). Prof. Sir Peter Lachmann е един от признатите светили в изучаването на болести, свързани с участието на комплемента (156, 157).

Информацията в Регистъра за НАЕ е периодично обновявана през годините благодарение на доц. д-р Мария Стаевска. Нейно дело са и първоначалните изследвания в областта на НАЕ, както и първите генетични изследвания на български пациенти с C1-INH-НАЕ, проведени в Института Луи Пастьор в Париж, Франция (158). Данните от тези изследвания са съобщавани пред българската алергологична общност, също и като част от обучителната програма на специалистите алерголози, което ги превръща в основните медицински специалисти в България, които се занимават с диагнозата, лечението и проследяването на пациентите с НАЕ и другите редки форми на брадикинин-медиран ангиоедем (159-161).

Обобщените данни от Регистъра на НАЕ сочат, че за периода 1972-2013: единствената потвърдена диагноза на брадикинин-медиран ангиоедем в България е този, дължащ се на дефицит на C1-INH (количествен и/или качествен). Обобщена бе информация за всички диагностицирани семейства с поставена диагноза на рядка форма на ангиоедем, тяхната фамилна история, фамилно дърво и проведени изследвания за диагностика на ангиоедема.

### *Демографска характеристика*

Общият брой на проследените болни е 202, от които 91 жени и 111 мъже, като разпределението между С1-INH-НАЕ тип 1 и 2 е 171 (85%) към 26 (13%), респективно. Тези данни са в унисон с очакваните за автозомно-доминентно генетично заболяване (162-164).

Броят на фамилияте с диагноза С1-INH-НАЕ са 41, от които 28 са С1-INH-НАЕ тип 1 (68%), 12 С1-INH-НАЕ тип 2 (29%). Не е коректно изчисление на честотата на НАЕ на популационно ниво спрямо нашите данни, тъй като в тях са включени живи и починали пациенти от различни поколения. Исторически, срезовите данни на проф. Божков, извършени в края на 90-те години на изминалия век, съобщават честота на НАЕ в България около **1 : 68,000** (120 проследяващи се пациенти с НАЕ, население 8,190,000 млн. души към 2000 г.) (153)(Божков Б, М. Стаевска. Проучване на наследствения ангиоедем (НАЕ) в България от Катедрата по алергология при Медицински факултет – София. Годишник на БАКИ 2008:1:51-55).

Сред пациентите в нашата група, 86% от случаите (174 болни) имат данни за положителна фамилна анамнеза за ангиоедем в предходни поколения, докато при 10% фамилна анамнеза липсва (20 болни). Тези данни кореспондират с обичайно съобщените такива относно честотата на de-novo мутации в SERPING1 гена (142, 165-167). Тази честота е обичайно около 25% на нови мутации, като разминаването в получените при нас данни е вероятно поради многочислеността на една от големите фамилии с НАЕ (Фамилия 11: исторически данни за над 112 засегнати членове, в най-малко 6 поколения; към момента продължават да се проследяват 26 от тези пациенти).

Средната възраст на поява на оплакванията от ангиоедем е 14.64 години (обхват, 1-54 години), което кореспондира и на международните данни за болестта (115, 168).

Средното забавяне от проява на симптомите до поставяне на правилна диагноза е 10.21 години (обхват, 0-44 години), което е приблизително, както цитираните в развитите страни (Италия, Испания, Германия)(169, 170).

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

Други 27% от пациентите (56 пациенти: 28 жени и 28 мъже) са загинали пациенти с НАЕ на средната възраст от 36.6 години. От тях, загиналите в резултат на смърт от асфиксия са 60.7% (34 пациенти: 18 жени и 16 мъже) на средната възраст при фаталния ларингеален оток от 33.3 години. Загиналите в резултат на друга причина (различна от НАЕ: сърдечно-съдов инцидент, злокачествено заболяване, травма, инфекция и др.) са едва 17.9% (10 пациенти: 6 жени) със средна възраст при смъртта 66.7 години. Загиналите в резултат на неясна причина (липсва информация дали причината за смърт е НАЕ или друго заболяване) са 21.4% (12 пациенти, 4 жени), със средна възраст при смъртта

21.3 години. Вероятно е в тази група също известен процент от случаите да са загинали в резултат на фатален оток на ларинкса, както и други неизвестни причини (детска смъртност, битови инциденти, инфекции и др.).

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

Сравнихме какво е разпределението между пациентите с или без поставена диагноза НАЕ към момента на смъртта в резултат на НАЕ (фатален оток на ларинкса), като данните сочат, че едва при 23.5% от случаите (8 пациенти) смърт е настъпила при вече поставена диагноза НАЕ в резултат на С1 инхибиторен дефицит. Мнозинството от смъртните случаи (76.5%, 26 болни) са получили фатален ларингеален оток преди диагностициране на НАЕ в семейството. Представените данни за смъртността от НАЕ при отсъствие на диагноза и отсъствие на специфична терапия за НАЕ, кореспондират със съобщенията от Bork et al., който коментира тези проблеми в някои от основополагащите публикации за НАЕ (171-174). Съобщената от него смъртност от НАЕ е при около 33% от загиналите случаи, което показва значително по-високата честота на фатални ларингеални атаки в българската група пациенти с НАЕ. Вероятна причина може да се обсъди по-ниският процент на диагностицираните случаи в нашата страна, както и особености на здравната мрежа и система в България и Германия. Друга гледна точка представят многобройните случаи, при които в миналото пациентите дори не търсят лекарска помощ при остра атака на НАЕ, именно поради вътрешното си убеждение, че специфична терапия за техния случай няма, а стандартно прилаганите кортикостероиди, антихистамини и/или

адреналин: няма да помогнат. Такъв е и случаят на последният известен загинал пациент с НАЕ през 1998 година: пациент на възраст от 30 години.

Историята за смъртен случай от НАЕ в семейството е налична при 56% от фамилиите (23 семейства). Едва при 17% от фамилиите исторически не е наблюдаван случай на смърт от ларингеален оток (7 фамилии). При останалите 27% тази информация не е категорична, тъй като представителите от тези фамилии са загубени от проследяване. Актуални са и данните, съобщени от Agostoni и Cicardi, които съобщават, че при липса на специфична терапия може да се очаква смърт на до 50% от членовете на фамилия с НАЕ (115).

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

## **Период 2013-2018**

Проспективно проследяване на пациентите с редки форми на ангиоедем бе проведено за периода 2013-2018 година, като пациентите бяха групирани според техните демографски, клинични характеристики, както и терапевтично поведение. Диагностицираните пациенти с редки форми на ангиоедем са 85, като мнозинството от тях са C1-INH-НАЕ тип 1 и 2 (80 и 14%, респективно, които са 85 и 15% от НАЕ). Диагностицирани са два случая на ангиоедем, дължащ се

на придобит C1 инхибиторен дефицит (C1-INH-AAE). Диагнозата при един от пациентите е придобит нехистаминергичен ангиоедем (InH-AAE). При едно семейство (майка и дъщеря) бе поставена диагноза на наследствен ангиоедем с нормален C1 инхибитор (nC1-INH-HAE). Броят на диагностицираните фамилии с C1-INH-HAE е 26, от които 22 са тип 1 и 4 тип 2. Получените данни съответстват на данните от световната литература за разпределение между C1-INH-HAE тип 1 и 2 в съотношение 85:15 (175, 176).

### *Демографска характеристика*

Средната възраст на пациентите с C1-INH-HAE е 43 години (обхват, 8-84 г), докато при AAE тя е 55 години (48-62 г). Този резултат е очакван, предвид обичайно по-късното начало на болестта при придобития C1-INH дефицит (17, 73, 176-180).

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

Изчисленото процентно възрастово разпределение при C1-INH-HAE и при българската популация (данни на Национален статистически институт, [www.nsi.bg](http://www.nsi.bg)) демонстрира по-ниското застъпване сред възрастовите групи 0-14 г и >65 г при пациентите с C1-INH-HAE. Полученият резултат е предпоставка за дискусия относно по-ниската преживяемост при пациентите с C1-INH-HAE, както и незадоволителната диагностика на HAE в детската възраст и/или нежелание за продължение на рода при пациентите с C1-INH-HAE, водещо до по-ниска раждаемост в семействата на пациенти с HAE. Данни относно по-ниско възрастово застъпване в ранна и напреднала възраст сред пациенти с C1-INH-



НАЕ са съобщени и от Zanichelli et al. (162). Той обяснява явлението с това, че в миналото в Италия пациентите с C1-INH-НАЕ са имали по-малко шансове, в сравнение с общото население, да достигнат до по-напреднали десетилетия от живота. Вероятно е причината в България да е същата, като при нас пациентите намаляват своята възрастова застъпеност спрямо българската популация, още в годините след 65, докато в Италия това се случва след 70 годишна възраст. Очакваме, че диагностичните методи и терапевтичните възможности, които са на разположение днес, ще премахнат асфиксията като обща причина за смъртта сред пациентите с C1-INH-НАЕ и това в бъдеще да доведе до равно представяне на пациентите спрямо общото население в напредналите десетилетия на живота, освен ако други фактори не оказват влияние върху очакваната продължителност на живота при НАЕ.

Проследихме данните за наличие или отсъствие на фамилна анамнеза за ангиоедем в семейството. Положителна такава се наблюдава в 80% от случаите. Тези данни се доближават до очакваните 25% спонтанни de-novo мутации на SERPING1 гена, които са описани в международната медицинска литература (14, 142, 165, 166).

Средната възраст на поява на симптомите на НАЕ бе изчислена на 10.4 години (обхват, 1-50), докато средната възраст на поставяне на диагнозата НАЕ - 27.2 години (обхват, 2-79). Съответно, забавянето до поставяне на диагнозата е 16.8 години (0-74 г). Тези данни са близки до съобщените за други европейски страни и потвърждават общата липса на добро разпознаване на състоянието, което бива диагностицирано след множество безрезултатни медицински прегледи и неефективно лечение (169, 170, 181-183). Съпоставянето на двата показателя: възраст на проява на НАЕ и възраст при диагностициране на НАЕ, представя

разминаването между двата показателя и ниското разпределение на диагнозата в ранните години на живота. Данните сочат, че 93.3% от пациентите получават първите си симптоми до 20 годишна/възраст, докато едва 45.3% получават диагноза преди навършване на тази възраст. Ранното начало на оплакванията от НАЕ са и един от критериите, разпознати като показателни за по-тежкия ход на болестта, както е описано и от други автори (71, 184-189).

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

### *Смъртни случаи*

За периода 2013-2018 бяха регистрирани 4 смъртни случая на пациенти с С1-ИНН-НАЕ: 2 в резултат на сърдечно-съдово заболяване (усложнения в резултат на мозъчен инсулт и остър миокарден инфаркт), 1 в резултат на дисеминирано злокачествено заболяване (метастатичен рак на млечната жлеза) и 1 в резултат на усложнения на неврологично заболяване (болест на Паркинсон). Причините за смърт в проследения период съответстват на водещите причини за смъртност в българската популация (Национален статистически институт, [www.nsi.bg](http://www.nsi.bg)). Не бе регистриран нито един случай на смърт в резултат на фатален ларингеален оток, което потвърждава напредъка в мениджмънта и ефективността на съвременното специфично лечение на НАЕ, което е на разположение на българските пациенти след 2013 година. Подобна положителна промяна спрямо

естественния ход на болестта е съобщен и от други изследователи в резултат на достъпа на пациентите до модерна терапия (104, 169, 190).

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

Изчислените данни за наличие или отсъствие на смърт от НАЕ във фамилията са съответно 61.5% към 38.5%, което бележи подобрене спрямо установените 17% без смъртен случай от НАЕ, които установихме в ретроспективната група. Въпреки това, процентът семейства с НАЕ, при които има фамилна история за смърт от НАЕ в предходни поколения, продължава да оказва сериозна психосоциална тежест върху семействата на пациентите (191, 192). Този проблем е сред основните, асоциирани с тежестта на болестта върху качеството на живот, заедно с други показатели като страх да предадат болестта на поколението си, страх от внезапно задушаване, страх от болезнените коремни кризи, притеснение във връзка с външния вид и др. (101, 186, 190, 193, 194)

### *Клинични прояви на НАЕ*

Анализирахме клиничните прояви на НАЕ спрямо локализациите на ангиоедема: 98.8% представят периферни подкожни отоци, 98.7% – оро-фациални отоци, 91.9% - болезнени коремни кризи, 65.7% генитални отоци, 44.3% - ларингеални отоци. Представяне на проявите на ангиоедема се съобщава от различни изследователски групи с различна честота и застъпеност. Например, почти всички автори съобщават за висок процент на прояви на периферни подкожни отоци (115, 189, 195). Обичайната разпространеност на коремните кризи при НАЕ е обект на разнородни съобщения: от около 40 до над 90% от засегнатите

пациенти (196-199). В нашата пациентска група този процент е от високите, което се асоциира и с по-висока оценка тежестта на болестта, както е съобщено от Yugum et al. (143). Известен процент от пациентите в нашата група свързват неспецифична неврологична симптоматика (главоболие, дезориентация) като прояви на НАЕ – 27.8%. Подобни съобщения се цитират и от други автори, като е възможно симптомите да са резултат от действието на брадикинин (200, 201).

### *Инвазивни процедури*

Сред проследените за периода пациенти, известен брой съобщават за свързани с ангиоедема инвазивни медицински манипулации в миналото: 10.3% са били подложени на трахеотомия, а 18.2% са били подложени на лапаротомия в хода на остра коремна криза. Спешната трахеотомия в случая е терапевтична животоспасяваща манипулация, като това е била една от малкото ефективни спешни интервенции в миналото в случай на ларингеален оток (83, 202-205). Известен процент от пациентите са били подложени и на интубация в случай на оток, ангажиращ дихателните пътища, когато е преценено, че е възможно ефективното поставяне на въздуховод (206, 207).

Противно на това, инвазивната оперативна или ендоскопска намеса в случай на коремна криза, безспорно се разглежда като ятрогенна намеса (208-212) . В нашата пациентска група тази честота е изключително висока: 18.2% от пациентите съобщават за инвазивна оперативна намеса. В един от случаите това води до 3 оперативни интервенции в миналото, 5 спешни ендоскопски изследвания (неколкократно провеждане на спешна колоноскопия и гастроскопия), както и многократни хоспитализации по повод на коремни болки. Поставената “диагноза” е “рецидивиращ илеус” без разпознаване на

характерните прояви за болестта като предшестваща еритема маргинатум (описана като уртикариален обрив) и наличието на подобни оплаквания в 4 поколения на засегнатото семейство. При същия пациент поставянето на диагнозата се случва с 62-годишно забавяне, което е едно от най-големите описвани в световната литература (213, 214). Диагнозата е предложена от незасегнатата майка на неговия внук, преди потвърждение в специализирания център за ангиоедем. Изложените факти предлагат обсъждането на ангиоедема да бъде включено във всички медицински учебници и пособия за обучение на студенти по медицина, както и обучение на специализиращите лекари в сферата на хирургията, гастроентерологията, анестезиологията, урологията и нефрологията. Още повече, че преходен, “рецидивиращ асцит” е често наблюдаван симптом в хода на коремна НАЕ криза, което допълнително обърква поставянето на диагнозата от лекар, незапознат с естеството на заболяването (212). Ангиоедемът трябва да бъде включен във всички диференциално-диагностични алгоритми за уточняване на рецидивираща коремна болка.

### *Клинична тежест на НАЕ*

Клинична тежест на симптомите при отделните пациенти бе оценена спрямо честота на симптомите от НАЕ, като направихме изчисления за обичайната честота, според анамнезата на пациента, както и според данните за настъпили НАЕ атаки през изминалата 2017 година. Прави впечатление, процентното застъпване на пациентите с висока честота на острите атаки от НАЕ като това е видимо, както от анамнестичните данни за обичайна честота на пристъпите от НАЕ, така и от броят на атаките през изминалата 2017 година. Не е изключено

сред двете величини да има известно разминавания, тъй като обичайната честота на пристъпите е вариабилен показател, зависещ от множество фактори. Ако сравним данните с друго проспективно проучване в италианска популция от С1-INH-НАЕ, се установява, че сред италианските пациенти честота на пристъпите от НАЕ >6 пристъпа за годината се наблюдава при около 46% от случаите, докато сред българските пациенти този процент е около 72% (198). Причината за това вероятно е големият брой на пациенти, провеждащи дългосрочна профилактика с атенюирани андрогени сред италианските пациенти: около 50% от изследваните 103 пациенти. В българската група едва 9% от пациентите провеждат дългосрочна профилактика с андрогени, като и сред тях профилактиката не е постоянна поради фактори, свързани с притеснение от дългосрочните ефекти от андрогеновата терапия, както и с трудности да се снабдяват с лекарството, което не е достъпно в България.

### *Bygum score*

Тъй като честотата на симптомите от НАЕ (анамнестично или за даден период) са величини с потенциално променлив характер, зависещ от множество комплексни фактори, разпределихме пациентите в 10 категории според клиничната тежест на болестта, спрямо разработения скор за оценка на клиничната тежест на НАЕ предложен от Bygum и сътрудници (Bygum score: обективен числен метод за оценка клиничната тежест на С1-INH-НАЕ) (143). От получените резултати прави впечатление, че мнозинството от пациентите с НАЕ в българската популция имат стойност на този показател  $\geq 5$ , което съответства на по-тежък клиничен ход на болестта. Тези данни потвърждават наблюденията ни, че диагностицираните пациенти с НАЕ в българската популция спадат към

група с по-тежко протичане на НАЕ: ранно начало на оплакванията, множество локализации на ангиоедема, история за дългосрочна профилактика на НАЕ. Интересно е да се коментира и защо българските пациенти имат сравнително по-тежък ход на НАЕ: вероятно е това да е релативно разпределение на тежестта на болестта, предвид хиподиагностиката на болестта в България. Възможно е случаите с по-редки прояви на болестта да са именно тези, които не са диагностицирани до момента, което би било очаквано предвид слабото познаване на заболяването и незадоволителната информираност сред различните медицински специалисти.

#### *Терапевтично поведение при пациентите с НАЕ*

Изследвахме терапевтичните подходи при пациентите с НАЕ, като данните показват, че към сегашна дата мнозинството от пациентите (92.1%) се лекуват с С1 инхибиторен концентрат при нужда (рекомбинантен или добит от човешка плазма). От тях едва 13.2% са способни да извършват самоприложение на медикамента, докато 86.8% търсят помощ от здравен работник или медицинско заведение за венозна апликация при нужда. Този процент на обучените за поставяне на венозна инжекция е сравнително нисък в сравнение с пациенти от други страни (123, 215-220). Например, Zanichelli съобщава за значително подобряване на качеството на живот на пациентите след провеждане на обучение за самоприложение на интравенозен С1 инхибитор (221). Подобно обучение би било от полза и за българските пациенти с цел подобрене на самостоятелността и възможността за бързо и ефективно справяне с острите прояви на ангиоедем, независимо от конкретната отдалеченост от здравно заведение. Мнозинството от българските пациенти търсят медицинско лице

(личен лекар, фелдшер, медицинска сестра) за приложение на медикамента при нужда, което понякога става причина за забавяне поставянето на лекарството, което може да се асоциира и с намаляване на ефективността на терапията (135, 215, 222-229).

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

### *Тригери на НАЕ*

Направихме обобщение на разпознатите причини за провокиране на пристъпите от ангиоедем, които са докладвани като най-чести от пациентите: механична травма (75%), съпътстваща инфекция (50%), хормонални колебания (29%), психо-емоционален стрес (42%), вибрации (7%) или някои храни /канела, ядки, алкохол и др./ (25%). Описаните данни са добре познати от международната литература (62, 230-233), като българските пациенти съобщават и за “нов” стимул, който не е описван от други автори по конкретния начин: “вибрации при продължително пътуване с кола”. Този тригер може да бъде дискутиран към стимулите, асоциирани с механична травма, но поради специфичността на описанието, дадена от пациентите, решихме да го отграничим като отделен провокиращ фактор. Интересно е, че пациентите, с подобни оплаквания



асоциират този провокиращ фактор за специфична причина на оток на гениталиите.

Останалите провокиращи фактори са добре известни от световната литература и потвърждават валидността на общите препоръки при лечение на пациенти с НАЕ: да се избягват по възможност дейности, причиняващи физическа травма, а в случаите, когато такава е наложителна (например, инвазивни медицински манипулации като хирургични и стоматологични интервенции), да се провежда краткосрочна профилактика за НАЕ (234-251). Състояния, при които пациентите са изложени на повишен риск от пристъпи от НАЕ са и съпътстващите инфекции, като подобен период може да бъде разгледан за показан за временна дългосрочна профилактика (252-255). Хормоналните колебания са друга част от асоциираните състояния, водещи до повишена честота на пристъпите от НАЕ (256-262). Такъв феномен на влошаване на хода на болестта се наблюдава и при въвеждане на естроген-съдържащи перорални контрацептивни средства, което е и причина за манифестиране на болестта в някои от случаите (257, 263-267). Психо-емоционалният стрес и определени храни също са докладвани като влошаващи оплакванията от НАЕ, като оценката е затруднена от редица субективни фактори, валидни според конкретния случай (268-270).

### *Продроми на НАЕ*

Подобно на други данни от медицинската литература, голям процент от пациентите с НАЕ съобщават за продромни симптоми (предшестващи симптоми), асоциирани с начало на прояви на ангиоедем. В нашата група са описани редица от обичайно разпознатите предшестващи ангиоедема симптоми като отпадналост, главоболие (34%), специфичен кожен обрив – еритема

маргинатум (41%), неспокойство (32%) или сънливост (21%). Около една трета от пациентите съобщават, че не могат да предвидят проявите на ангиоедем според предшестващи симптоми. Тези данни са подобни на докладваните в групи пациенти от различни страни (230, 232, 233, 270-275), като “сънливостта” до колкото ни е известно не е сред съобщаваните до момента.

Начилието на еритема маргинатум е една от най-характерните черти на започваща НАЕ атака (272, 276-278). Някои автори дори смятат появата ѝ за начало на пристъпа на НАЕ и съветват прилагане на лечението още в този много ранен етап преди настъпване на страдание, причинено от оток или коремни болки (279). Подобен съвет се приема за вероятно полезен в клиничната практика, но спекулативен, тъй като липсват данни, показващи какъв процент от случаите, при които се наблюдава еритема маргинатум, са последвани от остра атака на ангиоедем (272, 275, 280, 281).

### *Съпътстващи заболявания*

В разглежданата група С1-INH-НАЕ пациенти, анализирахме разпознатите съпътстващи заболявания, като такива се откриха в 34 от наличните за анализ 58 пациенти. Най-честите са: хипертония - 25 случая (40%), захарен диабет - 4 случая (6.6%), злокачествени заболявания - 2 случая (3.3%), 2 случая на автоимунно заболяване (3.3%), 3 случая на неврологично заболяване (5%) и 4 случая на друго съпътстващо генетично заболяване (6.6%). Липса на разпознати съпътстващи заболявания се наблюдава при 25 (31.3%) от пациентите. Трудно е да се коментира наличието на придружаващи ангиоедема заболявания, като за момента те могат да се разглеждат, като независещи от ангиоедема. Честотата на тези болести в българската популация също е голяма, което прави

задачата да се предвидят зависимостите между присъствието на генетичен C1 инхибиторен дефицит като предразполагащо за даден ви заболяване – не лесна задача. Липсват и подобни данни в световната литература, вероятно поради трудността да се окрупнят данни от достатъчен брой пациенти, предвид рядката честота на болестта. Единственото, което открихме като дискусия е за връзката с дългосрочната профилактика с андрогени върху дългосрочния здравен риск на спазващите такава терапия пациенти (131, 133, 282-290). Известно е, че съществен брой от българските пациенти са приемали в миналото продължителни курсове с атенюирани андрогени поради липсата на алтернативни медикаменти. Връзката на тази терапия в миналото с наблюдаваните сега сърдечно-съдови, гастроентерологични, ендокринологични и неврологични болести не може да бъде обективно оценена. Според нас актуален е и въпросът към какви състояния предразполага генетичната предопределеност към хиперпермеабилитет. Wu et al. например, коментират наличието на подлежаща автономна дисрегулация при пациенти с C1-INH-NAE (268). Съществуват и наблюдения за инверсия в причините за смъртност сред италиански пациенти с C1-INH-NAE с превес на злокачествените заболявания, спрямо общата популация [лична комуникация, непубликувани данни на Chiara Pomaranzi, Francesca Perego, Antonio Gidaro et Marco Cicardi]. Атрактивна е спекулацията, че състоянието на хиперпермеабилитет, предразполага и към нео- процеси, предвид фактът, че съдовият пермеабилитет е от основно значение за нарастването на новообразуванията, като неразривна част от ангиогенезата (291-296). Steffania Loffredo et al. съобщават за увеличени про-ангиогенни фактори при пациенти с C1-INH-NAE, като това е обект на интересни настоящи изследвания (64). Насочени към подобна тема са и изследванията на

Bossi et al., която анализира наличието на взаимно-свързаност между кининовите системи и съдовия пермеабилитет (7).

### *Лабораторни изследвания*

Данните от лабораторните изследвания, проведени при българските пациенти с C1-INH-НАЕ сочат, че концентрацията на C1-INH се открива много под допустимите референтни граници при мнозинството пациенти. Въпреки това, малък брой пациенти имат плазмена концентрация на протеина, попадаща в нормата или над нея, което кореспондира с C1-INH-НАЕ тип 2, където се синтезира количествено нормален (или по-голямо количество), но дисфункционален плазмен протеин. Тези наблюдения потвърждават твърденията на други международни автори, коментиращи важността на изследването концентрацията на C1 инхибитора в плазма, без абсолютизиране на резултата, тъй като съществуват около 15% от случаите на C1-INH-НАЕ тип 2, при който количеството на плазмения протеин е нормално или дори повишено (27, 222, 297-299).

От функционалното изследване на протеина се вижда, че всички пациенти имат ниски функционални нива на C1 инхибитора, далеч под нормалните 70% активност, бележеща долната граница на нормата. Стойността на функционалната активност на протеина обикновено е около 10-20% при нашите пациенти, в няколко случая – до 38% от нормата. Тези изследвания потвърждават напълно диагнозата C1-INH-НАЕ сред разглежданите пациенти. Редно да е се има предвид, че препоръчително е изследванията на C1 инхибитора да се анализират в комплект (концентрация и функция) и да не се абсолютизира значението единствено на изследването концентрацията или

функцията на протеина. Този коментар е необходим поради съображението, че функционалното изследване на C1 инхибитора е трудоемка и много чувствителна методика, предразполагаща към известен брой фалшиво понижени резултати, именно поради капризността на метода. Резултатите са чувствителни, както на спецификите на самата методика, така и на условията на съхранение на материала от плазма преди изследването (299-310).

От изследванията на C4 се вижда добрата диагностична стойност на изследването, което е показателно за функционалния дефицит на C1 инхибитора при пациентите с C1-INH-NAE. Изследването на C4, също така, е най-достъпно и приложимо от гледна точка на своите икономически параметри: ниска цена, достъпност на метода, който може да се изработи практически във всяка лаборатория, устойчивост на протеина и ниска зависимост на резултата при обичайни условия за съхранение на плазмения материал. Макар и малък процент (около 5-6%), някои пациенти демонстрират плазмена концентрация на C4 около нормата, което би довело до “фалшиво” отрицателен резултат и потвърждава необходимостта от количествено и функционално изследване на C1 инхибитора при съмнение за C1-INH-NAE.

Като допълнение, изследвахме корелацията на функционалната активност на C1 инхибитора (най-чувствителен показател за нарушение на ефективността на протеина) и показателя за оценка на тежестта на болестта (Vugum score), като резултатът отхвърля наличието на зависимост между двете. Подобна корелация се наблюдава при унгарски пациенти (311), но не и при други популации (143). Нашите данни отхвърлят зависимостта на лабораторния показател за C1-INH (функция) с клиничния ход на болестта и потвърждават единствено диагностичното му значение.

В групата на придобит С1 инхибиторен дефицит (С1-INH-AAE) проведохме изследвания за специфични неутрализиращи антитела срещу С1 инхибитора (ELISA), като антитела от клас IgM се откриха слабо положителни при един от двата случая на тази диагноза в нашата група. Наличието на тези антитела потвърждава патофизиологичния механизъм, по който възниква дефицитът на С1 инхибитора в разглеждания случай (299, 312-315). И двата случая на С1-INH-AAE в нашата група се явяват при пациенти със съпътстващо лимфопролиферативно заболяване. Изследванията за целите на нашия проект бяха извършени лично с участието на докторанта при практиката ѝ по програма за обучение на докторанти в Лабораторията за изследване на Комплекента, ръководена от Prof. Marco Cicardi, Университет на Милано, Болница Луиджи Сакко, Милано, Италия. Методиката е дизайнерски адаптирана по AIsenz et al., с използването на собствени реактиви за положителна контрола (IgA, IgG и IgM) (140, 315-320). Уместно е да се коментира нуждата от въвеждане на това изследване в практиката в България, което към момента не е достъпно като рутинно изследване на пациенти при съмнение за придобит С1 инхибиторен дефицит.

Изследванията на С1q при двата случая на придобит ангиоедем показаха наличие на протеина в референтни граници. Този резултат не отхвърля диагнозата, тъй като С1q може да бъде в референтни граници при около 30% от изследваните пациенти с С1-INH-AAE (15, 178, 299). Още повече, кръвният материал при единия пациент бе получен в етап на ремисия на ангиоедема и съпътстващото лимфопролиферативно заболяване. Като допълнение при същия пациент, разпадането на високомолекулния кининоген показва

стабилност на молекулата, което предполага ниска степен на брадикининовото влияние към конкретния момент.

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

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

## **ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 4**

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

Според международните данни за C1-INH-НАЕ, честотата на заболяването варира средно между 1 случай на 10 000, до 1 случай на 64 000 души (162, 177). Обобщавайки данните, представени в Глава 3, изчислихме честотата на C1-INH-НАЕ в България: **1 : 93,105**. Тези данни сочат по-ниска честота на C1-INH-НАЕ в сравнение с исторически съобщената за българската популация от проф. Божков и доц. Стаевска: 1:68,000 [Божков Б., М.Балева, Кр. Николов, М. Стаевска, М. Угърчински, И. Стоилов, В. Ганев, И. Кременски, А.Алексиев, Т. Лисичков. Наследствен ангиоедем – резултати от досегашните проучвания и перспективи. Сборник пленарни доклади, III Национален конгрес по алергология, 152 – 157; Божков Б, М. Стаевска. Проучване на наследствения ангиоедем (НАЕ) в България от Катедрата по алергология при Медицински факултет – София. Годишник на БАКИ 2008:1:51-55]. Намалението на честотата на НАЕ се наблюдава поради загубата от проследяване на съществен брой от проследяваните към 1990-2000 година пациенти. Съдбата на тези пациенти продължава да бъде неясна, като положителната гледна точка е, че спонтанно през известен период от време представители на тези фамилии търсят медицински съвет относно заболяването си в Клиниката по алергология и постепенно липсващите страни на историята на НАЕ в България започват да се



запълват. Не е изключено част от тези пациенти да не са преживели, за да потърсят консултация със специалист и за съжаление такава е и очакваната прогноза при отсъствие на специфично лечение в случай на остър пристъп на ларингеален оток (164, 171, 286, 321, 322).

От данните е видно, че получената средна честота за страната е прекалено ниска и вероятно диагностиката на болестта в България не е задоволителна, По наши прогнози откритите случаи на С1-ИНН-НАЕ са около половината от очакваните за населението на страната.

Разпознавайки проблема, решихме да изготвим карта на пациентите с С1-ИНН-НАЕ, които се следят на територията на страната и да изчислим честотата на диагнозата в различните административни райони на Р. България.

Анализът показва наличието на 13 области на страната, в които няма нито един диагностициран случай на НАЕ. Най-големите от тях са Бургас, Пазарджик, Хасково и Русе с общо население около 1 000 000 души. Останалите 9 области (Добрич, Кърджали, Кюстендил, Ловеч, Разград, Сливен, Смолян, Търговище и Ямбол) имат население около 1.5 млн. души. Това прави липса на диагнозата в част от България с общо население около 2.5 млн. души, където се очаква да живеят между 40 и 250 пациенти с С1-ИНН-НАЕ, изчислено според международните данни за разпространение на болестта. В други области, макар да има няколко диагностицирани случая на НАЕ, изчислената честота на болестта е много под очакваната (например Стара Загора, Шумен, Благоевград, Враца, Перник).

Причините за подозираната хиподиагностика на болестта са много, част, от които свързани с особености на здравната мрежа в описаните области, трудности в достъпа до консултация с обучен за състоянието лекар (най-често

алерголог), социална стигма за търсене на помощ по повод на неясно генетично заболяване и много други.

Трудно е да се предвиди точната честота на НАЕ в българската популация, предвид историята за имиграция на известен брой от българските пациенти през годините, когато в страната не са съществували никакви терапевтични възможности за лечение на проявите на НАЕ. Известни са случаи на такива пациенти, които в момента се лекуват в други европейски страни (Италия, Австрия, Германия, Испания, Португалия), където семействата има са потърсили по-приемливи условия за живот и лечение на болестта. Подобен вид *имиграция по медицински причини* е описвана от няколко автори, разглеждащи проблеми, асоциирани с редки болести и неравнопоставен достъп на пациенти от различни страни до модерни методи за диагностика и лечение (323, 324).

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

## ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 5

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

Съвременните генетични изследвания разкриват, че ангиоедемът представлява разнородна фамилия от състояния, свързани с кининовия метаболизъм, като реалността е свързана с много по-голяма генетична сложност и разнообразие от първоначално предвижданите. През изминалите години бяха публикувани убедителни данни, показващи, че клиничната хетерогенност на наследствения ангиоедем, дължащ се на дефицит на С1 инхибитора (класифициран като С1-INH-HAE), се асоциира с мутации на *SERPING1* гена, или на мутации в кодиращи гени за ензими, участващи в метаболизма или функцията на брадикинина (14, 62, 72, 325-328). Мутации, установени във Фактор 12 (F12), се считат за отговорни за около 25% от случаите на наследствен ангиоедем с нормален С1-INH (nC1-INH-HAE) (74, 329-336). Наскоро описаните мутации в гените за плазминоген (PLG) и ангиопоетин-1 (ANGPT1) са сред последните, разпознати да водят до състояния, предразполагащи към прояви на пароксизмален хиперпермеабилитет (23, 337).

Повече от 125 години след разпознаването на наследствената природа на HAE от Osler (9), хетерогенността на клиничните прояви, генетиката на това заболяване и връзките между генотип и фенотип, все още представляват предизвикателство, което ще бъде разкрито в бъдещето (71, 188). Очаква се широкомащабни, задълбочени генетични изследвания да отговорят на причинните въпроси, свързани с възникването на болестта, но и да изяснят по-

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

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

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

В хода на проекта бяха извършени генетични изследвания на представители на 19 от 26-те фамилии с C1-INH-HAE в българската популация, като това представлява **генотипизиране на 73% от всички диагностицирани фамилии с HAE в България**. При 13 от фамилиите бе открита патогенна мутация в *SERPING1* гена, **като 3 от тези мутации се откриха за първи път като причинни за C1-INH-HAE**. Разпознатите мутации бяха описани и съобщени в публичната Human Genome Database. При 3 от семействата мутация не бе открита. При останалите 3 фамилии резултатът все още се очаква, като първоначалните изследвания, предлагат извършване на цялостен NGS, тъй като таргетното изследване на очакваните причинни гени не показва наличие на мутация. Липсата на открита мутация в *SERPING1* според международните данни за липса на откритие на мутация при C1-INH-HAE е около 5 до 10% от случаите (189, 326, 338-340). При нас този процент е около 15 ( 3 от изследваните 19 семейства с C1-INH-HAE), което може да е инцидентно установена висока честота, вероятно поради хиподиагностицираните случаи в България.

Проведени бяха и изследвания на пациенти с C1-INH-AAE, nIC1-INH-HAE и InH-AAE, като генетичното изследване доказва липса на патогенна мутация в гените *SERPING1* и *F12*. Генетичен скрининг на неясните случаи е предложен от водещите автори, с цел опит за диагностично уточняване на пациентите с неясен брадикин-медиран ангиоедем (14, 325).

### Открити мутации

Генетичният скрининг чрез новата потребителска таргетна NGS платформа разкри: 3 nonsense мутации (в екзон 3, екзон 6 и екзон 8), 4 дефекта на мястото

на снаждане (splicing дефекти: в интрон 2, интрон 3, utr-5), 2 изменения на четене на рамката (frameshift мутации: екзон 3 и екзон 4), 1 INDEL мутация без промяна на рамката (екзон 5), 2 missense мутации (екзон 8) и 1 голяма делеция на екзон 4.

Новооткритата мутация, засягаща рамката на четене на гена (frameshift: **p.Asn73fs**) е показателна за тежък клиничен ход на НАЕ, причинявайки 2 смъртни случая в 3 поколения C1-INH-НАЕ пациенти. При това семейство се наблюдава плазмено ниво на C1 инхибитора, което е приблизително 50% от долната референтна граница, тъй като протеинът се синтезира само от единствения здрав ген на пациентите.

Втората новооткрита мутация е заместване на една аминокиселина **Pro200Leu** в екзон 4. Polyphen анализ предполага, че подобно заместване е доброкачествено и леко променя конформационната стабилност на протеина чрез FoldX. Мутации в този регион се предвижда да бъдат полимерогенни за други серпини (341).

Третата новооткрита мутация е делецията на нуклеотидите, кодиращи **Asn271-Asn272** в екзон 5. Тази мутация е съседна на делецията в *C1-INH Ta* (p.Lys273del), свързана с НАЕ Тип 2 (342). Интересно е, че до момента *C1-INH Ta* бе единственият вариант на C1-INH-НАЕ Тип 2, където мутацията се намира извън региона, отговарящ за реактивния център на серпина (екзон 8). Предполага се, че мутация в тази част на молекулата, създава предпоставка за допълнително място за гликозилиране на протеина, което от своя страна пречи на нормалната му конформация и ензимна активност. Вероятно е и да

предразполага към образуване на олиго- и/или полимери от C1 инхибитор, което не позволява неговата нормална функция. От изследванията при нашите пациенти е видимо, че техните количествени нива на C1-INH са близки до долната граница, като обаче функционалната активност на протеина е ниска (15-30% от нормата). Предполаганите механизми, според които мутацията **Asn271-Asn272** засяга действието на ензима към момента са плод на хипотетични разсъждения и спекулация от наша страна. Предстоят молекулни механистични анализи след пурификация на мутантния протеин от плазма, във връзка, с което екипът ни си сътрудничи с Лабораторията по изучаване на Комплекента, Университет на Милано, Италия.

При групата на хистаминергичен ангиоедем с хронична уртикария (пациентска група по Глава 2), беше съхранен ДНК материал от 20 пациенти с много тежък клиничен ход на болестта (резистентни на терапия случаи). Тази първа за България биобанка с ДНК материал от пациенти с хистаминергичен ангиоедем и хронична уртикария, ще послужи за провеждане на бъдещи генетични изследвания за разпознаване на вероятни гени, патогенни за състоянието.

## **ОБСЪЖДАНЕ ГЛАВА 6**

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

Ангиоедемът е честа причина за посещение при лекар. Диагностичното и терапевтичното поведение при пациентите с ангиоедем, обаче, често е затруднено в клиничната медицинска практика поради редица фактори. Не добре известни са патофизиологичните разновидности на различните фенотипове ангиоедем, което е предпоставка за трудности в клиничното разграничаване на отделните форми. Диагностичната оценка и подходящата диференциална диагноза са от решаващо значение при заболяване с такъв хетерогенен клиничен профил (326, 343-345). Правилната клинична оценка изисква подробна и внимателна медицинска анамнеза (прием на определени медикаменти, фамилна история за ангиоедем и др.), както и някои минимални лабораторни изследвания, които разгледахме подробно в предните глави (176, 299, 325, 344).

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

Симптомите варират в зависимост от местоположението на ангиоедема:

- Кожният оток може да причини обезобразяване и да влияе на ежедневните дейности,



- Ларингеалният оток може да бъде живото-застрашаващ,
- Коремните атаки могат да бъдат съпроводени с непоносима болка и да доведат до повръщане, диария и ятрогенни намеси (171, 190, 213, 346).

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

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

## 8. Изводи и препоръки

### **Изводи**

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

8. Предложен бе оригинален алгоритъм за диагностика и поведение при пациенти с рецидивиращ ангиоедем.

### **Препоръки**

1. Необходимо е предприемане на активни действия за подобряване познаването и диагностиката на редките брадикинин-медиирани форми на ангиоедем.
2. Идентифицирани бяха административните области на Р. България, където се предполага, че има значимо намалена честота на диагнозата на редките форми на ангиоедем.
3. Предлага се ангиоедемът да бъде включен във всички диференциално-диагностични алгоритми за уточняване на рецидивираща коремна болка.
4. Предлага се въвеждане на представения алгоритъм за диагностика и поведение при рецидивиращ ангиоедем при широка група от медицински специалисти: алерголози, дерматолози, анестезиолози, хирурзи, УНГ-специалисти, гастроентеролози.

## 9. Справка за приносите на дисертационния труд

### **Оригинални приноси**

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

## ***Потвърдителни приноси***

1. Забавянето на диагнозата при редките форми на ангиоедем остава сред водещите фактори, асоциирани с усложнения и/или ятрогенни намеси.
2. Смъртните случаи в резултат на НАЕ са по-чести сред групата пациенти без установена диагноза към момента на фатален ларингеален оток.
3. Възрастовото разпределение при пациентите с редки форми на ангиоедем бе наблюдавано различно спрямо общата популация.
4. Нашите данни отхвърлят зависимостта на имунологичния показател за функционална активност на C1-INH с клиничния ход на НАЕ (според обективния Vugum score) и потвърждават единствено диагностичното значение на лабораторното изследване.

## 10. Публикации и научни съобщения

### Публикации

I. Публикации в международни списания с ISI импакт фактор:

1. **Anna Valerieva**, Marco Cicardi, James Baraniuk, Maria Staevska. The physician and hereditary angioedema friend or foe: 62-year diagnostic delay and iatrogenic procedures. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* (2018) 14:75

DOI: 10.1186/s13223-018-0275-4

**IF: 2.26 (November 2018)**

II. Публикации в международни списания без ISI импакт фактор

III. Публикации в национални списания

2. **Валериева А**, Чикарди М, Димитров В, Стаевска М. Ангиоедем: наследствени и придобити форми. История и класификация. *Алергии, Хиперсензитивност, Астма* 2018;14 (1): 23-30
3. **Валериева А**, Чикарди М, Димитров В, Стаевска М. Патофизиология и клинични фенотипове на ангиоедема. *Алергии, Хиперсензитивност, Астма* 2018;14 (1): 31-44
4. Петкова Е, М. Стаевска, **А. Валериева**, В. Димитров. Връзка на стреса като невроендокринен фактор с клиничния ход на болестта при пациенти с хронична уртикария. *Алергии, Хиперсензитивност, Астма* 2016;13;(2) 34-41

5. Петкова Е., М. Стаевска, **А. Валериева**, В. Димитров Терапевтично поведение при хронична уртикария: Препоръки на EAACI, AAAAI и BSACI. Алергии, Хиперсензитивност, Астма 2016:13;(2) 53-64

IV. Участия в монографии, учебници, сборници, ръководства

*Научни съобщения*

Международни форуми

V. Участия в международни научни форуми

1. **Valerieva A**, Vasileva M, Velikova Ts, Petkova E, Dimitrov V, Staevska M, Hereditary Angioedema in Bulgaria: Clinical and Therapeutic Characteristics, 10<sup>th</sup> C1inh Workshop, May 2017, Budapest, Hungary.
2. **Valerieva A**. Hereditary angioedema and breast cancer: tamoxifen exacerbating angioedema attacks (case discussion). HAE Exchange program for experts (HAE ExPERT) Meeting, 2018, Berlin, Germany
3. **Valerieva A**, Staevska M, Zamanakou M, Loules G, Caccchia S, Cicardi M, Germenis A. Hereditary Angioedema: Novel Targeted Next Generation Sequencing revealed Novel Mutations of the SERPING1 gene in the Bulgarian Population. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany

4. **Valerieva A**, Krusheva B, Staevska M. Long-Term Prophylaxis with Recombinant Human C1 Inhibitor in Patients with Hereditary Angioedema: Extended Experience with Intramuscular Administration. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
5. **Valerieva A**, Staevska M. Intramuscular Administration of Recombinant Human C1-Inhibitor could be an Alternative for the Treatment of Acute Attacks in Patients with Hereditary Angioedema: A 3 Year Experience. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
6. **Valerieva A**, Staevska M. Short-Term Prophylaxis with Recombinant Human C1 Inhibitor in 9 Patients with Hereditary Angioedema: a case series. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
7. **Valerieva A**, Staevska M, Cicardi M. The physician and hereditary angioedema friend or foe: 62-year diagnostic delay and eight iatrogenic procedures. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany
8. Hakl R, **Valerieva A**, Farkas H, Jesenak M, Hrubiskova K, Zanichelli A, Staevska M, Bellizzi L, Relan A, Cicardi M. Efficacy and Safety of Recombinant Human C1 Esterase Inhibitor Treatment for Hereditary Angioedema Attacks: Interim Analysis of a European Registry. European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2018, Munich, Germany (oral presentation: Valerieva A)
9. **Valerieva A**. Short-term prophylaxis in hereditary angioedema. 2018, Zagreb, Croatia (plenary)
10. **Valerieva A**. Designing clinical trials in Primary angioedema with normal C1 inhibitor. 2018, Gazzada, Italy (plenary)



## Национални форуми

### VI. Участия в национални научни форуми

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

## 11. Приложения

1. Публикации
2. Копия на научни съобщения
3. Оценка проект Млад изследовател
4. Решения на КЕНИМУС и писмо Етична комисия “Александровска”
5. Заповед научни ръководители
6. Заповед отчисление с прави на защита

## 12. Библиография

1. Kaplan AP, Greaves MW. Angioedema. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(3):373-88; quiz 89-92.
2. Hacard F, Nosbaum A, Bensaid B, Nicolas JF, Augey F, Goujon C, et al. [Histaminergic angioedema and chronic urticaria]. *Presse Med*. 2015;44(1):37-42.
3. Busse PJ, Buckland MS. Non-histaminergic angioedema: focus on bradykinin-mediated angioedema. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(4):385-94.
4. Cugno M, Nussberger J, Cicardi M, Agostoni A. Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(3):311-7.
5. Nussberger J, Cugno M, Cicardi M. Bradykinin-mediated angioedema. *N Engl J Med*. 2002;347(8):621-2.
6. Javaud N, Floccard B, Gontier F, Lapostolle F, Boccon-Gibod I, Martin L, et al. Bradykinin-mediated angioedema: factors associated with admission to an intensive care unit, a multicenter study. *Eur J Emerg Med*. 2016;23(3):219-23.
7. Bossi F, Peerschke EI, Ghebrehiwet B, Tedesco F. Cross-talk between the complement and the kinin system in vascular permeability. *Immunol Lett*. 2011;140(1-2):7-13.
8. Quincke H. Uber akutes umschriebenes hautodem. *Monatshe Prakt Dermatol*. 1882;1:129-31.
9. Osler W. Hereditary angio-neurotic oedema. *AmJMed Sci*. 1888;95:362-7.
10. Donaldson VH, Rosen FS. Action of Complement in Hereditary Angioneurotic Edema: the Role of C'1-Esterase. *J Clin Invest*. 1964;43:2204-13.
11. Rosen FS, Pensky J, Donaldson V, Charache P. Hereditary Angioneurotic Edema: Two Genetic Variants. *Science*. 1965;148:957-8.
12. Curd JG, Yelvington M, Ziccardi RJ, Mathison DA, Griffin JH. Purification and characterization of two functionally distinct forms of C1 inhibitor from a patient with angioedema. *Clin Exp Immunol*. 1981;45(2):261-70.
13. Verpy E, Couture-Tosi E, Eldering E, Lopez-Trascasa M, Spath P, Meo T, et al. Crucial residues in the carboxy-terminal end of C1 inhibitor revealed by pathogenic mutants impaired in secretion or function. *J Clin Invest*. 1995;95(1):350-9.
14. Germenis AE, Speletas M. Genetics of Hereditary Angioedema Revisited. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016.
15. Cicardi M, Zanichelli A. Acquired angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010;6(1):14.
16. Cicardi M, Agostoni A, Davis AE. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency. *Ann Intern Med*. 2000;133(10):837-8; author reply 9.
17. Zanichelli A, Azin GM, Wu MA, Suffritti C, Maggioni L, Caccia S, et al. Diagnosis, Course, and Management of Angioedema in Patients With Acquired C1-Inhibitor Deficiency. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2017;5(5):1307-13.

18. Jackson J, Sim RB, Whelan A, Feighery C. An IgG autoantibody which inactivates C1-inhibitor. *Nature*. 1986;323(6090):722-4.
19. Bork K, Barnstedt SE, Koch P, Traupe H. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet*. 2000;356(9225):213-7.
20. Binkley KE, Davis A, 3rd. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(3):546-50.
21. Bork K, Wulff K, Hardt J, Witzke G, Staubach P. Hereditary angioedema caused by missense mutations in the factor XII gene: clinical features, trigger factors, and therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):129-34.
22. Bork K, Wulff K, Steinmuller-Magin L, Braenne I, Staubach-Renz P, Witzke G, et al. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy*. 2017.
23. Bafunno V, Firinu D, D'Apolito M, Cordisco G, Loffredo S, Leccese A, et al. Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(3):1009-17.
24. Zauli D, Contestabile S, Grassi A, Bortolotti R, Ballardini G, Bianchi FB. ACE-inhibitors and angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(3):538-9; author reply 9.
25. Roberts JR, Lee JJ, Marthers DA. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor angioedema: the silent epidemic. *Am J Cardiol*. 2012;109(5):774-5.
26. Cicardi M, Bergamaschini L, Zingale LC, Gioffre D, Agostoni A. Idiopathic nonhistaminergic angioedema. *Am J Med*. 1999;106(6):650-4.
27. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*. 2014;69(5):602-16.
28. Caccia S, Suffritti C, Cicardi M. Pathophysiology of Hereditary Angioedema. *Pediatric allergy, immunology, and pulmonology*. 2014;27(4):159-63.
29. Magerl M, Germenis AE, Maas C, Maurer M. Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor: Update on Evaluation and Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2017;37(3):571-84.
30. Scott SI, Andersen MF, Aagaard L, Buchwald CV, Rasmussen ER. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor induced angioedema - an overlooked and potentially lethal adverse drug reaction? *Curr Diabetes Rev*. 2017.
31. Hermanrud T, Bygum A, Rasmussen ER. Recurrent angioedema associated with pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase IV. *BMJ case reports*. 2017;2017.
32. Hahn J, Trainotti S, Hoffmann TK, Greve J. Drug-Induced Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme and Dipeptidyl Peptidase 4 Results in Nearly Therapy Resistant Bradykinin Induced Angioedema: A Case Report. *Am J Case Rep*. 2017;18:576-9.
33. Saisho Y, Itoh H. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and angioedema: a class effect? *Diabet Med*. 2013;30(4):e149-50.

34. Hudey SN, Westermann-Clark E, Lockey RF. Cardiovascular and Diabetic Medications That Cause Bradykinin-Mediated Angioedema. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2017;5(3):610-5.
35. Li B, Zhao Y, Yin B, Helian M, Wang X, Chen F, et al. Safety of the neprilysin/renin-angiotensin system inhibitor LCZ696. *Oncotarget*. 2017;8(47):83323-33.
36. Owens RE, Oliphant CS. Angioedema Spotlight: A Closer Examination of Sacubitril/Valsartan Safety Results. *J Am Board Fam Med*. 2017;30(4):556-7.
37. von Lueder TG, Atar D, Krum H. Current role of neprilysin inhibitors in hypertension and heart failure. *Pharmacol Ther*. 2014;144(1):41-9.
38. Knecht SE, Dunn SP, Macaulay TE. Angioedema Related to Angiotensin Inhibitors. *J Pharm Pract*. 2014.
39. Castelli R, Zanichelli A, Cicardi M, Cugno M. Acquired C1-inhibitor deficiency and lymphoproliferative disorders: a tight relationship. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;87(3):323-32.
40. Cugno M, Castelli R, Cicardi M. Angioedema due to acquired C1-inhibitor deficiency: a bridging condition between autoimmunity and lymphoproliferation. *Autoimmun Rev*. 2008;8(2):156-9.
41. Wu MA, Castelli R. The Janus faces of acquired angioedema: C1-inhibitor deficiency, lymphoproliferation and autoimmunity. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2016;54(2):207-14.
42. Faisant C, Du Thanh A, Mansard C, Deroux A, Boccon-Gibod I, Bouillet L. Idiopathic Non-histaminergic Angioedema: Successful Treatment with Omalizumab in Five Patients. *J Clin Immunol*. 2017;37(1):80-4.
43. Ozturk AB, Kocaturk E. Omalizumab in recurring larynx angioedema: a case report. *Asia Pacific allergy*. 2014;4(2):129-30.
44. von Websky A, Reich K, Steinkraus V, Breuer K. Complete remission of severe chronic recurrent angioedema of unknown cause with omalizumab. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013;11(7):677-8.
45. Sands MF, Blume JW, Schwartz SA. Successful treatment of 3 patients with recurrent idiopathic angioedema with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):979-81.
46. Giavina-Bianchi P, Aun MV, Motta AA, Kalil J, Castells M. Classification of angioedema by endotypes. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(6):1142-3.
47. Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Bjorkqvist J, Tradler T, et al. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity*. 2011;34(2):258-68.
48. Sala-Cunill A, Bjorkqvist J, Senter R, Guilarte M, Cardona V, Labrador M, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):1031-43 e6.
49. Ashina K, Tsubosaka Y, Nakamura T, Omori K, Kobayashi K, Hori M, et al. Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In Vivo. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132367.

50. Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nature communications*. 2012;3:1208.
51. Guo M, Breslin JW, Wu MH, Gottardi CJ, Yuan SY. VE-cadherin and beta-catenin binding dynamics during histamine-induced endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294(4):C977-84.
52. Shasby DM, Ries DR, Shasby SS, Winter MC. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(6):L1330-8.
53. Ashina K, Tsubosaka Y, Kobayashi K, Omori K, Murata T. VEGF-induced blood flow increase causes vascular hyper-permeability in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464(2):590-5.
54. Bravi L, Dejana E, Lampugnani MG. VE-cadherin at a glance. *Cell and tissue research*. 2014;355(3):515-22.
55. Davis MDP, van der Hilst JCH. Mimickers of Urticaria: Urticarial Vasculitis and Autoinflammatory Diseases. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2018;6(4):1162-70.
56. Hartmann K, Henz BM, Kruger-Krasagakes S, Kohl J, Burger R, Guhl S, et al. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood*. 1997;89(8):2863-70.
57. Grunewald SM, Hahn C, Wohlleben G, Teufel M, Major T, Moll H, et al. Infection with influenza A virus leads to flu antigen-induced cutaneous anaphylaxis in mice. *J Invest Dermatol*. 2002;118(4):645-51.
58. Valeriewa A, Caccia S, Cicardi M. Recombinant human C1 esterase inhibitor (Conestat alfa) for prophylaxis to prevent attacks in adult and adolescent patients with hereditary angioedema. *Expert Rev Clin Immunol*. 2018;14(9):707-18.
59. Maas C, Renne T. Regulatory mechanisms of the plasma contact system. *Thromb Res*. 2012;129 Suppl 2:S73-6.
60. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*. 1997;90(10):3819-43.
61. Schmaier AH. Contact activation: a revision. *Thrombosis & Haemostasis*. 1997;78(1):101-7.
62. Zuraw BL, Christiansen SC. HAE Pathophysiology and Underlying Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;51(2):216-29.
63. Joseph K, Tholanikunnel BG, Bygum A, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. Factor XII-independent activation of the bradykinin-forming cascade: Implications for the pathogenesis of hereditary angioedema types I and II. *J Allergy Clin Immunol*. 2013.
64. Loffredo S, Bova M, Suffritti C, Borriello F, Zanichelli A, Petraroli A, et al. Elevated plasma levels of vascular permeability factors in C1 inhibitor-deficient hereditary angioedema. *Allergy*. 2016.

65. Demirturk M, Gelincik A, Cinar S, Kilercik M, Onay-Ucar E, Colakoglu B, et al. Increased eNOS levels in hereditary angioedema. *Int Immunopharmacol*. 2014;20(1):264-8.
66. Kajdacs E, Jani PK, Csuka D, Varga LA, Prohaszka Z, Farkas H, et al. Endothelial cell activation during edematous attacks of hereditary angioedema types I and II. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1686-91.
67. Joseph K, Tholanikunnel BG, Kaplan AP. Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(2):896-900.
68. Joseph K, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. Activation of the kinin-forming cascade on the surface of endothelial cells. *Biol Chem*. 2001;382(1):71-5.
69. Joseph K, Tholanikunnel BG, Kaplan AP. Cytokine and estrogen stimulation of endothelial cells augments activation of the prekallikrein-high molecular weight kininogen complex: Implications for hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):170-6.
70. Bas M, Greve J, Strassen U, Khosravani F, Hoffmann TK, Kojda G. Angioedema induced by cardiovascular drugs: new players join old friends. *Allergy*. 2015;70(10):1196-200.
71. Grivceva-Panovska V, Kosnik M, Korosec P, Andrejevic S, Karadza-Lapic L, Rijavec M. Hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency in Macedonia: clinical characteristics, novel SERPING1 mutations and genetic factors modifying the clinical phenotype. *Ann Med*. 2018;50(3):269-76.
72. Speletas M, Szilagyi A, Psarros F, Moldovan D, Magerl M, Kompoti M, et al. Hereditary angioedema: molecular and clinical differences among European populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):570-3.
73. Cicardi M, Zuraw BL. Angioedema Due to Bradykinin Dysregulation. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2018;6(4):1132-41.
74. Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(4):1286-9.
75. Cichon S, Martin L, Hennies HC, Muller F, Van Driessche K, Karpushova A, et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet*. 2006;79(6):1098-104.
76. de Maat S, Björkqvist J, Suffritti C, Wiesenekker CP, Nagtegaal W, Koekman A, et al. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;138(5):1414-23.e9.
77. Toh S, Reichman ME, Houstoun M, Ross Southworth M, Ding X, Hernandez AF, et al. Comparative risk for angioedema associated with the use of drugs that target the renin-angiotensin-aldosterone system. *Arch Intern Med*. 2012;172(20):1582-9.
78. Mansi M, Zanichelli A, Coerezza A, Suffritti C, Wu MA, Vacchini R, et al. Presentation, diagnosis and treatment of angioedema without wheals: a retrospective analysis of a cohort of 1058 patients. *J Intern Med*. 2015;277(5):585-93.

79. Faisant C, Boccon-Gibod I, Mansard C, Dumestre Perard C, Pralong P, Chatain C, et al. Idiopathic histaminergic angioedema without wheals: A case series of 31 patients. *Clin Exp Immunol.* 2016.
80. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, Abdul Latiff AH, Baker D, Ballmer-Weber B, et al. The EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. *Allergy.* 2018;73(7):1393-414.
81. Zuberbier T, Bernstein JA. A Comparison of the United States and International Perspective on Chronic Urticaria Guidelines. *The journal of allergy and clinical immunology In practice.* 2018;6(4):1144-51.
82. Bova M, De Feo G, Parente R, De Pasquale T, Gravante C, Pucci S, et al. Hereditary and Acquired Angioedema: Heterogeneity of Pathogenesis and Clinical Phenotypes. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018.
83. LoVerde D, Files DC, Krishnaswamy G. Angioedema. *Crit Care Med.* 2017;45(4):725-35.
84. Depetri F, Tedeschi A, Cugno M. Angioedema and emergency medicine: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Eur J Intern Med.* 2018.
85. Cugno M, Tedeschi A, Nussberger J. Bradykinin in idiopathic non-histaminergic angioedema. *Clin Exp Allergy.* 2017;47(1):139-40.
86. Moellman JJ, Bernstein JA, Lindsell C, Banerji A, Busse PJ, Camargo CA, Jr., et al. A consensus parameter for the evaluation and management of angioedema in the emergency department. *Acad Emerg Med.* 2014;21(4):469-84.
87. Sabroe RA, Black AK. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and angioedema. *Br J Dermatol.* 1997;136(2):153-8.
88. Banerji A, Blumenthal KG, Lai KH, Zhou L. Epidemiology of ACE Inhibitor Angioedema Utilizing a Large Electronic Health Record. *The journal of allergy and clinical immunology In practice.* 2017.
89. Bas M. The Angiotensin-Converting-Enzyme-Induced Angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2017;37(1):183-200.
90. Brown T, Gonzalez J, Monteleone C. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema: A review of the literature. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2017;19(12):1377-82.
91. Zuraw BL. Clinical practice. Hereditary angioedema. *N Engl J Med.* 2008;359(10):1027-36.
92. Andersen MF, Longhurst HJ, Rasmussen ER, Bygum A. How Not to Be Misled by Disorders Mimicking Angioedema: A Review of Pseudoangioedema. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;169(3):163-70.
93. Starr JC, Brasher GW. Erythema marginatum preceding hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 1974;53(6):352-5.
94. Odermatt E, Berger H, Sano Y. Size and shape of human C1-inhibitor. *FEBS Lett.* 1981;131(2):283-5.



95. Strecker G, Ollier-Hartmann MP, van Halbeek H, Vliegenthart JF, Montreuil J, Hartmann L. [Primary structure of the glycan chains of normal C1 esterase inhibitor (C1-INH) after NMR analysis at 400 MHz]. *C R Acad Sci III*. 1985;301(11):571-6.
96. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*. 2001;276(36):33293-6.
97. Davis AE, 3rd. C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:595-628.
98. Davis AE, 3rd, Cai S, Liu D. C1 inhibitor: biologic activities that are independent of protease inhibition. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):313-23.
99. Davis AE, 3rd. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, III: mechanisms of hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;100(1 Suppl 2):S7-12.
100. Davis AE, 3rd. New treatments addressing the pathophysiology of hereditary angioedema. *Clin Mol Allergy*. 2008;6:2.
101. Aygoren-Pursun E, Bygum A, Beusterien K, Hautamaki E, Sisic Z, Wait S, et al. Socioeconomic burden of hereditary angioedema: results from the hereditary angioedema burden of illness study in Europe. *Orphanet journal of rare diseases*. 2014;9:99.
102. Federici C, Perego F, Borsoi L, Crosta V, Zanichelli A, Gidaro A, et al. Costs and effects of on-demand treatment of hereditary angioedema in Italy: a prospective cohort study of 167 patients. *BMJ Open*. 2018;8(7):e022291.
103. Lumry WR. Hereditary Angioedema: The Economics of Treatment of an Orphan Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:22.
104. Bork K, Bernstein JA, Machnig T, Craig TJ. Efficacy of Different Medical Therapies for the Treatment of Acute Laryngeal Attacks of Hereditary Angioedema due to C1-esterase Inhibitor Deficiency. *J Emerg Med*. 2016;50(4):567-80 e1.
105. Craig TJ, Levy RJ, Wasserman RL, Bewtra AK, Hurewitz D, Obtulowicz K, et al. Efficacy of human C1 esterase inhibitor concentrate compared with placebo in acute hereditary angioedema attacks. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(4):801-8.
106. Zuraw BL, Busse PJ, White M, Jacobs J, Lumry W, Baker J, et al. Nanofiltered C1 inhibitor concentrate for treatment of hereditary angioedema. *N Engl J Med*. 2010;363(6):513-22.
107. Bork K, Frank J, Grundt B, Schlattmann P, Nussberger J, Kreuz W. Treatment of acute edema attacks in hereditary angioedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (Icatibant). *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1497-503.
108. Cicardi M, Banerji A, Bracho F, Malbrán A, Rosenkranz B, Riedl M, et al. Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(6):532-41.

109. Zuraw B, Cicardi M, Levy RJ, Nuijens JH, Relan A, Visscher S, et al. Recombinant human C1-inhibitor for the treatment of acute angioedema attacks in patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(4):821-7.e14.
110. Cicardi M, Levy RJ, McNeil DL, Li HH, Sheffer AL, Campion M, et al. Ecallantide for the treatment of acute attacks in hereditary angioedema. *N Engl J Med.* 2010;363(6):523-31.
111. Prematta M, Gibbs JG, Pratt EL, Stoughton TR, Craig TJ. Fresh frozen plasma for the treatment of hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007;98(4):383-8.
112. Lunn M, Santos C, Craig T. Cinryze as the first approved C1 inhibitor in the USA for the treatment of hereditary angioedema: approval, efficacy and safety. *J Blood Med.* 2010;1:163-70.
113. Aygoren-Pursun E, Bygum A, Grivcheva-Panovska V, Magerl M, Graff J, Steiner UC, et al. Oral Plasma Kallikrein Inhibitor for Prophylaxis in Hereditary Angioedema. *N Engl J Med.* 2018;379(4):352-62.
114. Craig T, Busse P, Gower RG, Johnston DT, Kashkin JM, Li HH, et al. Long-term prophylaxis therapy in patients with hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018.
115. Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore).* 1992;71(4):206-15.
116. Lumry WR, Castaldo AJ, Vernon MK, Blaustein MB, Wilson DA, Horn PT. The humanistic burden of hereditary angioedema: Impact on health-related quality of life, productivity, and depression. *Allergy Asthma Proc.* 2010;31(5):407-14.
117. Bowen T. Hereditary angioedema: beyond international consensus - circa December 2010 - The Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology Dr. David McCourtie Lecture. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2011;7(1):1.
118. Spaulding WB. Methyltestosterone therapy for hereditary episodic edema (hereditary angioneurotic edema). *Ann Intern Med.* 1960;53:739-45.
119. Cicardi M, Mannucci PM, Castelli R, Rumi MG, Agostoni A. Reduction in transmission of hepatitis C after the introduction of a heat-treatment step in the production of C1-inhibitor concentrate. *Transfusion.* 1995;35(3):209-12.
120. Horowitz B, Busch M. Estimating the pathogen safety of manufactured human plasma products: application to fibrin sealants and to thrombin. *Transfusion.* 2008;48(8):1739-53.
121. Terpstra FG, Kleijn M, Koenderman AH, Over J, van Engelenburg FA, Schuitemaker H, et al. Viral safety of C1-inhibitor NF. *Biologicals.* 2007;35(3):173-81.
122. Bork K, Hardt J. Hereditary angioedema: increased number of attacks after frequent treatments with C1 inhibitor concentrate. *Am J Med.* 2009;122(8):780-3.
123. Bygum A, Andersen KE, Mikkelsen CS. Self-administration of intravenous C1-inhibitor therapy for hereditary angioedema and associated quality of life benefits. *Eur J Dermatol.* 2009;19(2):147-51.
124. Bork K, Hardt J. Hereditary angioedema: long-term treatment with one or more injections of C1 inhibitor concentrate per week. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;154(1):81-8.

125. Longhurst HJ. Kallikrein Inhibition for Hereditary Angioedema. *N Engl J Med.* 2017;376(8):788-9.
126. Banerji A, Busse P, Shennak M, Lumry W, Davis-Lorton M, Wedner HJ, et al. Inhibiting Plasma Kallikrein for Hereditary Angioedema Prophylaxis. *N Engl J Med.* 2017;376(8):717-28.
127. Qiu T, Chiuchiolo MJ, Whaley AS, Russo AR, Sondhi D, Kaminsky SM, et al. Gene Therapy for C1 Esterase Inhibitor Deficiency in a Murine Model of Hereditary Angioedema. *Allergy.* 2018.
128. Agostoni A, Cicardi M, Martignoni GC, Bergamaschini L, Marasini B. Danazol and stanazolol in long-term prophylactic treatment of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 1980;65(1):75-9.
129. Cicardi M, Bergamaschini L, Cugno M, Hack E, Agostoni G, Agostoni A. Long-term treatment of hereditary angioedema with attenuated androgens: a survey of a 13-year experience. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;87(4):768-73.
130. Cicardi M, Bergamaschini L, Tucci A, Agostoni A, Tornaghi G, Coggi G, et al. Morphologic evaluation of the liver in hereditary angioedema patients on long-term treatment with androgen derivatives. *J Allergy Clin Immunol.* 1983;72(3):294-8.
131. Cicardi M, Castelli R, Zingale LC, Agostoni A. Side effects of long-term prophylaxis with attenuated androgens in hereditary angioedema: comparison of treated and untreated patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(2):194-6.
132. Agostoni A, Marasini B, Cicardi M, Martignoni G, Uziel L, Pietrogrande M. Hepatic function and fibrinolysis in patients with hereditary angioedema undergoing long-term treatment with tranexamic acid. *Allergy.* 1978;33(4):216-21.
133. Zanichelli A, Wu MA, Andreoli A, Mansi M, Cicardi M. The safety of treatments for angioedema with hereditary C1 inhibitor deficiency. *Expert Opin Drug Saf.* 2015:1-12.
134. Craig T, Shapiro R, Vegh A, Baker JW, Bernstein JA, Busse P, et al. Efficacy and safety of an intravenous C1-inhibitor concentrate for long-term prophylaxis in hereditary angioedema. *Allergy Rhinol (Providence).* 2017;8(1):13-9.
135. Cancian M. Diagnostic and therapeutic management of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency: the Italian experience. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2015;15(4):383-91.
136. Riedl MA, Bygum A, Lumry W, Magerl M, Bernstein JA, Busse P, et al. Safety and Usage of C1-Inhibitor in Hereditary Angioedema: Berinert Registry Data. *The journal of allergy and clinical immunology In practice.* 2016;4(5):963-71.
137. Longhurst H, Cicardi M, Craig T, Bork K, Grattan C, Baker J, et al. Prevention of Hereditary Angioedema Attacks with a Subcutaneous C1 Inhibitor. *N Engl J Med.* 2017;376(12):1131-40.
138. Berrettini M, Lammle B, White T, Heeb MJ, Schwarz HP, Zuraw B, et al. Detection of in vitro and in vivo cleavage of high molecular weight kininogen in human plasma by immunoblotting with monoclonal antibodies. *Blood.* 1986;68(2):455-62.

139. Cugno M, Cicardi M, Agostoni A. Activation of the contact system and fibrinolysis in autoimmune acquired angioedema: a rationale for prophylactic use of tranexamic acid. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;93(5):870-6.
140. Alsenz J, Bork K, Loos M. Autoantibody-mediated acquired deficiency of C1 inhibitor. *N Engl J Med.* 1987;316(22):1360-6.
141. Cicardi M, Beretta A, Colombo M, Gioffre D, Cugno M, Agostoni A. Relevance of lymphoproliferative disorders and of anti-C1 inhibitor autoantibodies in acquired angioedema. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(3):475-80.
142. Pappalardo E, Cicardi M, Duponchel C, Carugati A, Choquet S, Agostoni A, et al. Frequent de novo mutations and exon deletions in the C1inhibitor gene of patients with angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(6):1147-54.
143. Bygum A, Fagerberg CR, Ponard D, Monnier N, Lunardi J, Drouet C. Mutational spectrum and phenotypes in Danish families with hereditary angioedema because of C1 inhibitor deficiency. *Allergy.* 2011;66(1):76-84.
144. Staubach P, Metz M, Chapman-Rothe N, Sieder C, Brautigam M, Canvin J, et al. Effect of omalizumab on angioedema in H<sup>1</sup>-antihistamine resistant chronic spontaneous urticaria patients: results from X-ACT, a randomised controlled trial. *Allergy.* 2016.
145. Voelker R. New Hereditary Angioedema Therapy. *JAMA.* 2017;318(5):416.
146. Tuchinda P, Kulthanan K, Chularojanamontri L, Arunkajohnsak S, Sriussadaporn S. Relationship between vitamin D and chronic spontaneous urticaria: a systematic review. *Clin Transl Allergy.* 2018;8:51.
147. Grzanka A, Machura E, Mazur B, Misiolek M, Jochem J, Kasperski J, et al. Relationship between vitamin D status and the inflammatory state in patients with chronic spontaneous urticaria. *J Inflamm (Lond).* 2014;11(1):2.
148. Kasperska-Zajac A, Grzanka A, Damasiewicz-Bodzek A. IL-6 Transsignaling in Patients with Chronic Spontaneous Urticaria. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145751.
149. Machura E, Szczepanska M, Mazur B, Barc-Czarnecka M, Kasperska-Zajac A. Interleukin 1-beta, interleukin-1 receptor antagonist, and interleukin 18 in children with acute spontaneous urticaria. *Biomed Res Int.* 2013;2013:605262.
150. Kasperska-Zajac A, Jasinska T. Analysis of plasma D-dimer concentration in patients with delayed pressure urticaria. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(2):232-4.
151. Kasperska-Zajac A, Brzoza Z. Increased D-dimer concentration in plasma of patients with severe acute urticaria. *Br J Dermatol.* 2009;161(6):1409-10.
152. Darlenski R, Kazandjieva J, Zuberbier T, Tsankov N. Chronic urticaria as a systemic disease. *Clin Dermatol.* 2014;32(3):420-3.
153. Bozhkov B, Nikolov K, Baleva M. [Familial studies of patients with hereditary angioedema]. *Vutr Boles.* 1988;27(4):62-5.
154. Божков Б., М.Балева, Кр. Николов, М. Стаевска, М. Угърчински, И. Стоилов, В. Ганев, И. Кременски, А.Алексиев, Т. Лисичков. Наследствен ангиоедем – резултати от досегашните проучвания и перспективи. Сборник пленарни доклади, III Национален конгрес по алергология, 152 – 157.

155. Божков Б., М. Стаевска. C1 – инхибиторен дефицит – Наследствен ангиоедем (НАЕ). В: Б. Божков и М. Огнянов (ред.) “Клинична имунология”, Знание ЕООД, Стара Загора, 1997, 65-67
156. Lachmann PJ, Rosen FS. The catabolism of C1(-)-inhibitor and the pathogenesis of hereditary angio-edema. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl.* 1984;284:35-9.
157. Lachmann PJ. Inherited complement deficiencies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1984;306(1129):419-30.
158. Стаевска М., А. Савов, В. Ганев, И. Кременски, М. Балева и Б. Божков. Полиморфизъм на C1-инхибиторния ген у здрави и болни с наследствен ангиоедем у нас – предварителни резултати от генетичните проучвания. *Съвр. мед.* 1997, №6, 17-21
159. Божков Б., М. Стаевска. Наследствен ангиоедем., В: Б. Божков (ред.) “Алергология - принципи и практика” МИ “Арсо”, София, 1999,174-178
160. М. Стаевска. Наследствен ангиоедем. В. В. Димитров (ред) “Клинична алергология за общопрактикуващи лекари”, МИ “Арсо”, София 2002, 153-157
161. Божков Б, М. Стаевска. Проучване на наследствения ангиоедем (НАЕ) в България от Катедрата по алергология при Медицински факултет – София. *Годишник на БАКИ* 2008;1:51-55
162. Zanichelli A, Arcoleo F, Barca MP, Borrelli P, Bova M, Cancian M, et al. A nationwide survey of hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency in Italy. *Orphanet journal of rare diseases.* 2015;10:11.
163. Zingale, Bork, Farkas, Bygum, Bouillet, Caballero, et al. The European Register of Hereditary Angioedema: Experience and Preliminary Results. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2007;119(1):S276.
164. Cicardi M, Bergamaschini L, Marasini B, Boccassini G, Tucci A, Agostoni A. Hereditary angioedema: an appraisal of 104 cases. *Am J Med Sci.* 1982;284(1):2-9.
165. Lopez-Lera A, Garrido S, Roche O, Lopez-Trascasa M. SERPING1 mutations in 59 families with hereditary angioedema. *Mol Immunol.* 2011;49(1-2):18-27.
166. Tosi M. Molecular genetics of C1 inhibitor. *Immunobiology.* 1998;199(2):358-65.
167. Tosi M, Carugati A, hernandez C, Boucontet L, Pappalardo E, Agostoni A, et al. De novo C1 inhibitor mutations in hereditary angioedema. *Molecular Immunology.* 1998;35(6-7):406- .
168. Weis M. Clinical review of hereditary angioedema: diagnosis and management. *Postgrad Med.* 2009;121(6):113-20.
169. Longhurst H, Bygum A. The Humanistic, Societal, and Pharmaco-economic Burden of Angioedema. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;51(2):230-9.
170. Zanichelli A, Magerl M, Longhurst H, Fabien V, Maurer M. Hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency: delay in diagnosis in Europe. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2013;9(1):29.
171. Bork K, Hardt J, Witzke G. Fatal laryngeal attacks and mortality in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(3):692-7.

172. Bork K, Hardt J, Schicketanz KH, Ressel N. Clinical studies of sudden upper airway obstruction in patients with hereditary angioedema due to C1 esterase inhibitor deficiency. *Arch Intern Med.* 2003;163(10):1229-35.
173. Bork K, Barnstedt SE. Laryngeal edema and death from asphyxiation after tooth extraction in four patients with hereditary angioedema. *J Am Dent Assoc.* 2003;134(8):1088-94.
174. Bork K, Siedlecki K, Bosch S, Schopf RE, Kreuz W. Asphyxiation by laryngeal edema in patients with hereditary angioedema. *Mayo Clin Proc.* 2000;75(4):349-54.
175. Nzeako UC, Frigas E, Tremaine WJ. Hereditary angioedema: a broad review for clinicians. *Arch Intern Med.* 2001;161(20):2417-29.
176. Zeerleder S, Levi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor-dependent angioedema: from pathophysiology to treatment. *Ann Med.* 2016;48(4):256-67.
177. Aygoren-Pursun E, Magerl M, Maetzel A, Maurer M. Epidemiology of Bradykinin-mediated angioedema: a systematic investigation of epidemiological studies. *Orphanet journal of rare diseases.* 2018;13(1):73.
178. Otani IM, Banerji A. Acquired C1 Inhibitor Deficiency. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2017;37(3):497-511.
179. Longhurst HJ, Zanichelli A, Caballero T, Bouillet L, Aberer W, Maurer M, et al. Comparing acquired angioedema with hereditary angioedema (types I/II): findings from the Icatibant Outcome Survey. *Clin Exp Immunol.* 2017;188(1):148-53.
180. Bekos C, Perkmann T, Krauth M, Raderer M, Lechner K, Jaeger U. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency in lymphomas: prevalence, symptoms, and response to treatment. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(9):2033-6.
181. Caballero T, Aberer W, Longhurst HJ, Maurer M, Zanichelli A, Perrin A, et al. The Icatibant Outcome Survey: experience of hereditary angioedema management from six European countries. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017.
182. Gakhil MS, Marcotte GV. Hereditary angioedema: imaging manifestations and clinical management. *Emerg Radiol.* 2014.
183. Psarros F, Koutsostathis N, Farmaki E, Speletas MG, Germenis AE. Hereditary angioedema in Greece: the first results of the greek hereditary angioedema registry. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;164(4):326-32.
184. Aabom A, Andersen KE, Fagerberg C, Fisker N, Jakobsen MA, Bygum A. Clinical characteristics and real-life diagnostic approaches in all Danish children with hereditary angioedema. *Orphanet journal of rare diseases.* 2017;12(1):55.
185. Gianni P, Loules G, Zamanakou M, Kompoti M, Csuka D, Psarros F, et al. Genetic Determinants of C1 Inhibitor Deficiency Angioedema Age of Onset. *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;174(3-4):200-4.
186. Bygum A, Busse P, Caballero T, Maurer M. Disease Severity, Activity, Impact, and Control and How to Assess Them in Patients with Hereditary Angioedema. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:212.

187. Christiansen SC, Davis DK, Castaldo AJ, Zuraw BL. Pediatric Hereditary Angioedema: Onset, Diagnostic Delay, and Disease Severity. *Clin Pediatr (Phila)*. 2016;55(10):935-42.
188. Andrejevic S, Korosec P, Silar M, Kosnik M, Mijanovic R, Bonaci-Nikolic B, et al. Hereditary Angioedema Due to C1 Inhibitor Deficiency in Serbia: Two Novel Mutations and Evidence of Genotype-Phenotype Association. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142174.
189. Ohsawa I, Honda D, Nagamachi S, Hisada A, Shimamoto M, Inoshita H, et al. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of hereditary angioedema: survey data from 94 physicians in Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015;114(6):492-8.
190. Caballero T, Aygoren-Pursun E, Bygum A, Beusterien K, Hautamaki E, Sisic Z, et al. The humanistic burden of hereditary angioedema: results from the Burden of Illness Study in Europe. *Allergy Asthma Proc*. 2014;35(1):47-53.
191. Fouche AS, Saunders EF, Craig T. Depression and anxiety in patients with hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;112(4):371-5.
192. Toscani M, Riedl M. Meeting the challenges and burdens associated with hereditary angioedema. *Manag Care*. 2011;20(9):44-51.
193. Bygum A, Aygoren-Pursun E, Beusterien K, Hautamaki E, Sisic Z, Wait S, et al. Burden of Illness in Hereditary Angioedema: A Conceptual Model. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(6):706-10.
194. Banerji A, Busse P, Christiansen SC, Li H, Lumry W, Davis-Lorton M, et al. Current state of hereditary angioedema management: a patient survey. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36(3):213-7.
195. Goring HD, Bork K, Spath PJ, Bauer R, Ziemer A, Hintner H, et al. [Hereditary angioedema in the German-speaking region]. *Hautarzt*. 1998;49(2):114-22.
196. Xu YY, Jiang Y, Zhi YX, Yin J, Wang LL, Wen LP, et al. Clinical features of hereditary angioedema in Chinese patients: new findings and differences from other populations. *Eur J Dermatol*. 2013;23(4):500-4.
197. Nzeako UC, Longhurst HJ. Many faces of angioedema: focus on the diagnosis and management of abdominal manifestations of hereditary angioedema. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012;24(4):353-61.
198. Zanichelli A, Vacchini R, Badini M, Penna V, Cicardi M. Standard care impact on angioedema because of hereditary C1 inhibitor deficiency: a 21-month prospective study in a cohort of 103 patients. *Allergy*. 2011;66(2):192-6.
199. Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt J. Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am J Med*. 2006;119(3):267-74.
200. Chung JY, Kim M. Migraine-like headache in a patient with complement 1 inhibitor deficient hereditary angioedema. *J Korean Med Sci*. 2012;27(1):104-6.
201. Luong KV, Nguyen LT. Headache and complement C1-esterase inhibitor deficiency in Vietnamese immigrants living in southern California. *Allergy Asthma Proc*. 1999;20(2):127-33.
202. Roche O, Blanch A, Caballero T, Sastre N, Callejo D, Lopez-Trascasa M. Hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency: patient registry and approach to the prevalence in Spain. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;94(4):498-503.

203. Henao MP, Kraschnewski JL, Kelbel T, Craig TJ. Diagnosis and screening of patients with hereditary angioedema in primary care. *Therapeutics and clinical risk management*. 2016;12:701-11.
204. Cicardi M, Bellis P, Bertazzoni G, Cancian M, Chiesa M, Cremonesi P, et al. Guidance for diagnosis and treatment of acute angioedema in the emergency department: consensus statement by a panel of Italian experts. *Intern Emerg Med*. 2014;9(1):85-92.
205. Xu YY, Zhi YX, Liu RL, Craig T, Zhang HY. Upper airway edema in 43 patients with hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;112(6):539-44 e1.
206. Bentsianov BL, Parhisca A, Azer M, Har-El G. The role of fiberoptic nasopharyngoscopy in the management of the acute airway in angioneurotic edema. *Laryngoscope*. 2000;110(12):2016-9.
207. Spargo PM, Smith GB. Hereditary angioneurotic oedema, tracheal intubation and airway obstruction. *Can J Anaesth*. 1987;34(5):540-1.
208. Gugila I, Ruxanda A, Vasile L, Iordache V. [Osler's hereditary angioneurotic edema as rare but possible cause of false surgical acute abdomen]. *Chirurgia (Bucur)*. 2003;98(5):437-41.
209. Janardhanan D, Nair S, Subramanian TS. Recurrent abdominal pain due to hereditary angioedema. *Indian J Pediatr*. 2007;74(1):83-4.
210. Bork K, Bindewald H, Bockers M, Eckardt V. [Ascites and suspected acute abdomen in hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1997;122(44):1347-50.
211. Obtulowicz P, Urbanik A, Obtulowicz K. [Recurrent abdominal pain and ascites in patients suffering from congenital angioedema due to C1 inhibitor deficiency. Retrospective analysis]. *Przegl Lek*. 2013;70(5):299-302.
212. Gabos G, Dobru D, Mihaly E, Bara N, Dumitrache C, Popa R, et al. Recurrent ascites: a need to evaluate for hereditary angio-oedema. *Lancet*. 2017;390(10107):2119-20.
213. Valeriewa A. CM, Baraniuk J., Staevska M. The physician and hereditary angioedema friend or foe: 62-year diagnostic delay and iatrogenic procedures. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;in press.
214. Peterson MP, Bygum A. Hereditary angioedema: 44 years of diagnostic delay. *Dermatology online journal*. 2016;22(4).
215. Wang A, Fouche A, Craig TJ. Patients perception of self-administrated medication in the treatment of hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015;115(2):120-5.
216. Aabom A, Andersen KE, Perez-Fernandez E, Caballero T, Bygum A. Health-related quality of life in Danish patients with hereditary angioedema. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(2):225-6.
217. Tuong LA, Olivieri K, Craig TJ. Barriers to self-administered therapy for hereditary angioedema. *Allergy Asthma Proc*. 2014;35(3):250-4.
218. Rizk C, Karsh J, Santucci S, Yang W. Self-administration of intravenous C1 esterase inhibitor in hereditary angioedema. *CMAJ*. 2013;185(9):791-2.



219. Tourangeau LM, Castaldo AJ, Davis DK, Koziol J, Christiansen SC, Zuraw BL. Safety and efficacy of physician-supervised self-managed C1 inhibitor replacement therapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;157(4):417-24.
220. Levi M, Choi G, Picavet C, Hack C. Self-administration of C1-inhibitor concentrate in patients with hereditary or acquired angioedema caused by C1-inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(4):904-8.
221. Zanichelli A, Azin GM, Cristina F, Vacchini R, Caballero T. Safety, effectiveness, and impact on quality of life of self-administration with plasma-derived nanofiltered C1 inhibitor (Berinert(R)) in patients with hereditary angioedema: the SABHA study. *Orphanet journal of rare diseases.* 2018;13(1):51.
222. Maurer M, Magerl M, Ansotegui I, Aygoren-Pursun E, Betschel S, Bork K, et al. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema-The 2017 revision and update. *Allergy.* 2018;73(8):1575-96.
223. Nasr IH, Manson AL, Al Wahshi HA, Longhurst HJ. Optimizing hereditary angioedema management through tailored treatment approaches. *Expert Rev Clin Immunol.* 2016;12(1):19-31.
224. Zanichelli A, Mansi M, Azin GM, Wu MA, Periti G, Casazza G, et al. Efficacy of on-demand treatment in reducing morbidity in patients with hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Allergy.* 2015;70(12):1553-8.
225. Bork K. Current drugs in early development for hereditary angioedema: potential for effective treatment. *Expert opinion on investigational drugs.* 2014;23(7):887-91.
226. Maurer M, Aberer W, Bouillet L, Caballero T, Fabien V, Kanny G, et al. Hereditary angioedema attacks resolve faster and are shorter after early icatibant treatment. *PLoS One.* 2013;8(2):e53773.
227. Riedl M, Gower RG, Chrvala CA. Current medical management of hereditary angioedema: results from a large survey of US physicians. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011;106(4):316-22 e4.
228. Papadopoulou-Alataki E. Upper airway considerations in hereditary angioedema. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10(1):20-5.
229. Longhurst HJ, Farkas H, Craig T, Aygoren-Pursun E, Bethune C, Bjorkander J, et al. HAE international home therapy consensus document. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2010;6(1):22.
230. Caballero T, Maurer M, Longhurst HJ, Aberer W, Bouillet L, Fabien V, et al. Triggers and prodromal symptoms of angioedema attacks in patients with hereditary angioedema. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology.* 2016;26(6):383-6.
231. Bernstein JA. Managing hereditary angioedema patients undergoing otolaryngeal procedures. *Am J Rhinol Allergy.* 2013;27(6):522-7.
232. Reshef A, Kidon M, Leibovich I. The Story of Angioedema: from Quincke to Bradykinin. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;51(2):121-39.

233. Prematta MJ, Bewtra AK, Levy RJ, Wasserman RL, Jacobson KW, Machnig T, et al. Per-attack reporting of prodromal symptoms concurrent with C1-inhibitor treatment of hereditary angioedema attacks. *Advances in therapy*. 2012;29(10):913-22.
234. Henry Li H, Riedl M, Kashkin J. Update on the Use of C1-Esterase Inhibitor Replacement Therapy in the Acute and Prophylactic Treatment of Hereditary Angioedema. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018.
235. Rosa A, Miranda M, Franco R, Guarino MG, Barlattani A, Jr., Bollero P. Experimental protocol of dental procedures In patients with hereditary angioedema: the role of anxiety and the use of nitrogen oxide. *Oral Implantol (Rome)*. 2016;9(2):49-53.
236. Williams AH, Craig TJ. Perioperative management for patients with hereditary angioedema. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2015;6(1):50-5.
237. Nanda M, Singh U, Wilmot J, Bernstein JA. A cross-sectional questionnaire assessing patient and physician use of short-term prophylaxis for hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014.
238. Gavigan G, Yang WH, Santucci S, Harrison R, Karsh J. The prophylactic use of C1 inhibitor in hereditary angioedema patients undergoing invasive surgical procedures: a retrospective study. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014;10(1):17.
239. Bhardwaj N, Craig TJ. Treatment of hereditary angioedema: a review. *Transfusion*. 2014.
240. Betschel S, Badiou J, Binkley K, Hebert J, Kanani A, Keith P, et al. Canadian hereditary angioedema guideline. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014;10(1):50.
241. Angeletti C, Angeletti PM, Mastrobuono F, Pilotti L, Ciccozzi A, Guetti C. Bradykinin B2 receptor antagonist off label use in short-term prophylaxis in hereditary angioedema. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(4):653-9.
242. Nanda MK, Singh U, Wilmot J, Bernstein JA. A cross-sectional questionnaire assessing patient and physician use of short-term prophylaxis for hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113(2):198-203.
243. Jurado-Palomo J, Munoz-Caro JM, Lopez-Serrano MC, Prior N, Cabanas R, Pedrosa M, et al. Management of dental-oral procedures in patients with hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(1):1-6.
244. Aygoren-Pursun E, Martinez Saguer I, Kreuz W, Klingebiel T, Schwabe D. Risk of angioedema following invasive or surgical procedures in HAE type I and II--the natural history. *Allergy*. 2013;68(8):1034-9.
245. Farkas H, Zotter Z, Csuka D, Szabo E, Nebenfuhrer Z, Temesszentandras G, et al. Short-term prophylaxis in hereditary angioedema due to deficiency of the C1-inhibitor--a long-term survey. *Allergy*. 2012;67(12):1586-93.
246. Frank MM. Hereditary angioedema: short-term prophylaxis for surgery. *Allergy Asthma Proc*. 2012;33(4):303-4.
247. Bork K, Hardt J, Staubach-Renz P, Witzke G. Risk of laryngeal edema and facial swellings after tooth extraction in patients with hereditary angioedema with and without

prophylaxis with C1 inhibitor concentrate: a retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(1):58-64.

248. Bernstein JA, Coleman S, Bonnin AJ. Successful C1 inhibitor short-term prophylaxis during redo mitral valve replacement in a patient with hereditary angioedema. *J Cardiothorac Surg.* 2010;5:86.

249. Farkas H, Gyeney L, Gidofalvy E, Fust G, Varga L. The efficacy of short-term danazol prophylaxis in hereditary angioedema patients undergoing maxillofacial and dental procedures. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999;57(4):404-8.

250. Mohr M, Pollok-Kopp B, Gotze O, Burchardi H. [The use of a C1-inhibitor concentrate for short-term preoperative prophylaxis in two patients with hereditary angioedema]. *Anaesthesist.* 1996;45(7):626-30.

251. Farkas H, Kohalmi KV, Veszeli N, Zotter Z, Varga L. Successful prophylaxis with recombinant human C1 inhibitor in a patient with hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015;114(1):64-5.

252. Farkas H, Fust G, Fekete B, Karadi I, Varga L. Eradication of *Helicobacter pylori* and improvement of hereditary angioneurotic oedema. *Lancet.* 2001;358(9294):1695-6.

253. Visy B, Fust G, Bygum A, Bork K, Longhurst H, Bucher C, et al. *Helicobacter pylori* infection as a triggering factor of attacks in patients with hereditary angioedema. *Helicobacter.* 2007;12(3):251-7.

254. Rais M, Unzeitig J, Grant JA. Refractory exacerbations of hereditary angioedema with associated *Helicobacter pylori* infection. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(4):713-4.

255. Farkas H, Gyeney L, Majthenyi P, Fust G, Varga L. Angioedema due to acquired C1-esterase inhibitor deficiency in a patient with *Helicobacter pylori* infection. *Z Gastroenterol.* 1999;37(6):513-8.

256. Iahn-Aun M, Aun MV, Motta AA, Kalil J, Giavina-Bianchi P, Hayashida SA, et al. The Complex Interaction Between Polycystic Ovary Syndrome and Hereditary Angioedema: Case Reports and Review of the Literature. *Obstet Gynecol Surv.* 2017;72(7):417-24.

257. Mowat AE, Kimble R. Hereditary Angioedema with an Estrogen Trigger in a 12-Year-Old. *Journal of pediatric and adolescent gynecology.* 2014.

258. Bouillet L, Longhurst H, Boccon-Gibod I, Bork K, Bucher C, Bygum A, et al. Disease expression in women with hereditary angioedema. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199(5):484.e1-4.

259. Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, et al. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(3 Suppl):S51-131.

260. Kashyap AS, Kashyap S. Hereditary angioedema and hormones. *Arch Intern Med.* 2002;162(18):2142; author reply

261. Bockers M, Bork K. [Contraception and pregnancy in hereditary angioedema]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1987;112(13):507-9.

262. Frank MM. Effect of sex hormones on the complement-related clinical disorder of hereditary angioedema. *Arthritis Rheum.* 1979;22(11):1295-9.
263. Caballero T, Canabal J, Rivero-Paparoni D, Cabanas R. Management of hereditary angioedema in pregnant women: a review. *Int J Womens Health.* 2014;6:839-48.
264. Bergmann MM, Caubet JC, Defendi F, Farkas H, Drouet C, Eigenmann PA. Estrogen-independent hereditary angioedema with normal C1 inhibitor function in a 10-year-old boy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;111(1):67-9.
265. Bouillet L, Gompel A. Hereditary angioedema in women: specific challenges. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2013;33(4):505-11.
266. Caballero T, Farkas H, Bouillet L, Bowen T, Gompel A, Fagerberg C, et al. International consensus and practical guidelines on the gynecologic and obstetric management of female patients with hereditary angioedema caused by C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(2):308-20.
267. Ebo DG, Verweij MM, De Knop KJ, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, et al. Hereditary angioedema in childhood: an approach to management. *Paediatr Drugs.* 2010;12(4):257-68.
268. Wu MA, Casella F, Perego F, Suffritti C, Afifi Afifi N, Tobaldini E, et al. Hereditary angioedema: Assessing the hypothesis for underlying autonomic dysfunction. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187110.
269. Caballero T, Maurer M, Longhurst HJ, Aberer W, Bouillet L, Fabien V, et al. Triggers and Prodromal Symptoms of Angioedema Attacks in Patients With Hereditary Angioedema. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2016;26(6):383-6.
270. Zotter Z, Csuka D, Szabo E, Czaller I, Nebenfuhrer Z, Temesszentandrasi G, et al. The influence of trigger factors on hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet journal of rare diseases.* 2014;9(1):44.
271. Martin L, Renne T, Drouet C. Urticaria as a Presenting Prodromal Manifestation of Attacks of Hereditary Angioedema. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(4):574-5.
272. Rasmussen ER, de Freitas PV, Bygum A. Urticaria and Prodromal Symptoms Including Erythema Marginatum in Danish Patients with Hereditary Angioedema. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(3):373-6.
273. Tachdjian R, Banerji A, Guyer A, Morpew T. Current characteristics associated with hereditary angioedema attacks and treatment: the home infusion based patient experience. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(2):151-9.
274. Warin RP. The role of trauma in the spreading weals of hereditary angio-oedema. *Br J Dermatol.* 1983;108(2):189-94.
275. Magerl M, Doumoulakis G, Kalkounou I, Weller K, Church MK, Kreuz W, et al. Characterization of prodromal symptoms in a large population of patients with hereditary angio-oedema. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39(3):298-303.
276. Bygum A. Hereditary angio-oedema in Denmark: a nationwide survey. *Br J Dermatol.* 2009;161(5):1153-8.

277. Starr JC, Brasher GW, Rao A, Posey D. Erythema marginatum and hereditary angioedema. *South Med J*. 2004;97(10):948-50.
278. Farkas H, Harmat G, Fay A, Fekete B, Karadi I, Visy B, et al. Erythema marginatum preceding an acute oedematous attack of hereditary angioneurotic oedema. *Acta Derm Venereol*. 2001;81(5):376-7.
279. Bygum A, Broesby-Olsen S. Rapid resolution of erythema marginatum after icatibant in acquired angioedema. *Acta Derm Venereol*. 2011;91(2):185-6.
280. Kohalmi KV, Veszeli N, Cervenak L, Varga L, Farkas H. A novel prophylaxis with C1-inhibitor concentrate in hereditary angioedema during erythema marginatum. *Immunol Lett*. 2017;189:90-3.
281. Martinez-Saguer I, Farkas H. Erythema Marginatum as an Early Symptom of Hereditary Angioedema: Case Report of 2 Newborns. *Pediatrics*. 2016;137(2):e20152411.
282. Tse KY, Zuraw BL, Chen Q, Christiansen SC. Anabolic androgen use in the management of hereditary angioedema: Not so cheap after all. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118(4):456-60 e1.
283. Hsieh CY, Chen CH. Rhabdomyolysis and pancreatitis associated with coadministration of danazol 600 mg/d and lovastatin 40 mg/d. *Clin Ther*. 2008;30(7):1330-5.
284. Kohalmi KV, Veszeli N, Luczay A, Varga L, Farkas H. [Effect of danazol treatment on growth in pediatric patients with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency]. *Orv Hetil*. 2017;158(32):1269-76.
285. Longhurst H, Zinser E. Prophylactic Therapy for Hereditary Angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2017;37(3):557-70.
286. Bork K. A Decade of Change: Recent Developments in Pharmacotherapy of Hereditary Angioedema (HAE). *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016.
287. Greve J, Strassen U, Gorczyza M, Dominas N, Frahm UM, Muhlberg H, et al. Prophylaxis in hereditary angioedema (HAE) with C1 inhibitor deficiency. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2016;14(3):266-75.
288. Zuraw BL, Davis DK, Castaldo AJ, Christiansen SC. Tolerability and Effectiveness of 17-alpha-Alkylated Androgen Therapy for Hereditary Angioedema: A Re-examination. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2016;4(5):948-55 e15.
289. Dagen C, Craig TJ. Treatment of Hereditary Angioedema: items that need to be addressed in practice parameter. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010;6(1):11.
290. Frank MM, Jiang H. New therapies for hereditary angioedema: disease outlook changes dramatically. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(1):272-80.
291. Gordon EJ, Fukuhara D, Westrom S, Padhan N, Sjostrom EO, van Meeteren L, et al. The endothelial adaptor molecule TSAd is required for VEGF-induced angiogenic sprouting through junctional c-Src activation. *Sci Signal*. 2016;9(437):ra72.
292. Tacconi C, Correale C, Gandelli A, Spinelli A, Dejana E, D'Alessio S, et al. Vascular endothelial growth factor C disrupts the endothelial lymphatic barrier to promote colorectal cancer invasion. *Gastroenterology*. 2015;148(7):1438-51 e8.

293. Anisimov A, Tvorogov D, Alitalo A, Leppanen VM, An Y, Han EC, et al. Vascular endothelial growth factor-angiopoietin chimera with improved properties for therapeutic angiogenesis. *Circulation*. 2013;127(4):424-34.
294. Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh Migr*. 2012;6(6):535-615.
295. Dejana E, Giampietro C. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(3):218-23.
296. Raju B, Ibrahim SO. Pathophysiology of oral cancer in experimental animal models: a review with focus on the role of sympathetic nerves. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(1):1-9.
297. Zuraw BL, Christiansen SC. Pathogenesis and laboratory diagnosis of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Proc*. 2009;30(5):487-92.
298. Krishna M, Goswami R, Frew A, Smith J, Williams A. Laboratory diagnostics for hereditary angioedema: An economic, evidence-based standpoint. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(4):878-9.
299. Farkas H, Veszeli N, Kajdacs E, Cervenak L, Varga L. "Nuts and Bolts" of Laboratory Evaluation of Angioedema. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016.
300. Cicardi M, Suffritti C, Perego F, Caccia S. Novelities in the Diagnosis and Treatment of Angioedema. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(4):212-21; quiz two pages after page 21.
301. Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ, Zuraw B, et al. 2010 International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010;6(1):24.
302. Wagenaar-Bos IG, Drouet C, Aygoren-Pursun E, Bork K, Bucher C, Bygum A, et al. Functional C1-inhibitor diagnostics in hereditary angioedema: assay evaluation and recommendations. *J Immunol Methods*. 2008;338(1-2):14-20.
303. Gompels MM, Lock RJ. C1 inhibitor deficiency: diagnosis. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30(4):460-2.
304. Cicardi M, Bergamaschini L, Cugno M, Beretta A, Zingale LC, Colombo M, et al. Pathogenetic and clinical aspects of C1 inhibitor deficiency. *Immunobiology*. 1998;199(2):366-76.
305. Chng HH, Boey ML. Hereditary angioedema: diagnosis and management. *Singapore Med J*. 1990;31(2):177-9.
306. Sim TC, Grant JA. Hereditary angioedema: its diagnostic and management perspectives. *Am J Med*. 1990;88(6):656-64.
307. Nilsson TK. Aspects of C1-inhibitor biochemistry and pathophysiology. *Clin Rheumatol*. 1987;6(3):332-9.
308. Morris GE, Slavin BM, Browse NL. Hereditary angioneurotic oedema: a neglected diagnosis. *J Clin Pathol*. 1987;40(5):516-7.
309. Schapira M, Silver LD, Scott CF, Colman RW. New and rapid functional assay for C1 inhibitor in human plasma. *Blood*. 1982;59(4):719-24.

310. Molina C, Brun J, Coulet M, Betail G, Wahl D, Hartmann L. Diagnostic and therapeutic problems associated with hereditary deficiency of the C1 esterase inhibitor. *Clin Allergy*. 1977;7(2):127-35.
311. Csuka D, Fust G, Farkas H, Varga L. Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. *Clin Immunol*. 2011;139(1):85-93.
312. Aabom A, Bygum A, Koch C. Complement factor C4 activation in patients with hereditary angioedema. *Clin Biochem*. 2017.
313. Castelli R, Wu MA, Arquati M, Zanichelli A, Suffritti C, Rossi D, et al. High prevalence of splenic marginal zone lymphoma among patients with acquired C1 inhibitor deficiency. *Br J Haematol*. 2016;172(6):902-8.
314. Ates O, Sunar V, Babacan T, Akin S, Kertmen N, Altundag K. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency in a marginal zone lymphoma patient treated with rituximab. *J BUON*. 2015;20(1):349.
315. Zanichelli A, Suffritti C, Cicardi M, Perricone R. C1 Inhibitor Autoantibodies. *Autoantibodies: Third Edition* 2013. p. 699-705.
316. Alsenz J, Loos M. The acquired C1-INH deficiencies with autoantibodies (AAE type II). *Behring Inst Mitt*. 1989(84):165-72.
317. Alsenz J, Lambris JD, Bork K, Loos M. Acquired C1 inhibitor (C1-INH) deficiency type II. Replacement therapy with C1-INH and analysis of patients' C1-INH and anti-C1-INH autoantibodies. *J Clin Invest*. 1989;83(6):1794-9.
318. Alsenz J, Loos M. A rapid and simple ELISA for the determination of duplicate monoclonal antibodies during epitope analysis of antigens and its application to the study of C1(-)-INH. *J Immunol Methods*. 1988;109(1):75-84.
319. Cicardi M, Zingale LC. C1 Inhibitor autoantibodies. *Autoantibodies* 2007. p. 695-701.
320. Cicardi M, Zingale LC, Pappalardo E, Folcioni A, Agostoni A. Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(4):274-81.
321. Cicardi M, Zanichelli A. Angioedema due to C1 inhibitor deficiency in 2010. *Intern Emerg Med*. 2010;5(6):481-6.
322. Cicardi M, Zingale L. How do we treat patients with hereditary angioedema. *Transfus Apher Sci*. 2003;29(3):221-7.
323. Winyard G. Medical immigration: the elephant in the room. *BMJ*. 2007;335(7620):593-5.
324. Pohjola P, Hedley V, Bushby K, Kaariainen H. Challenges raised by cross-border testing of rare diseases in the European union. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(11):1547-52.
325. Loules G, Zamanakou M, Parsopoulou F, Vatsiou S, Psarros F, Csuka D, et al. Targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Gene*. 2018;667:76-82.
326. Craig TJ, Bernstein JA, Farkas H, Bouillet L, Boccon-Gibod I. Diagnosis and treatment of bradykinin-mediated angioedema: outcomes from an angioedema expert consensus meeting. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;165(2):119-27.

327. Johnston DT. Diagnosis and management of hereditary angioedema. *J Am Osteopath Assoc.* 2011;111(1):28-36.
328. Gosswein T, Kocot A, Emmert G, Kreuz W, Martinez-Saguer I, Aygoren-Pursun E, et al. Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema. *Cytogenetic and genome research.* 2008;121(3-4):181-8.
329. Moreno AS, Valle SO, Levy S, Franca AT, Serpa FS, Arcuri HA, et al. Coagulation Factor XII Gene Mutation in Brazilian Families with Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;166(2):114-20.
330. Firinu D, Bafunno V, Vecchione G, Barca MP, Manconi PE, Santacroce R, et al. Characterization of patients with angioedema without wheals: the importance of F12 gene screening. *Clin Immunol.* 2015;157(2):239-48.
331. Bjorkqvist J, de Maat S, Lewandrowski U, Di Gennaro A, Oschatz C, Schonig K, et al. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *J Clin Invest.* 2015;125(8):3132-46.
332. Kiss N, Barabas E, Varnai K, Halasz A, Varga LA, Prohaszka Z, et al. Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. *Clin Immunol.* 2013;149(1):142-5.
333. Bork K, Wulff K, Meinke P, Wagner N, Hardt J, Witzke G. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clin Immunol.* 2011;141(1):31-5.
334. Vitrat-Hincky V, Gompel A, Dumestre-Perard C, Boccon-Gibod I, Drouet C, Cesbron JY, et al. Type III hereditary angio-oedema: clinical and biological features in a French cohort. *Allergy.* 2010;65(10):1331-6.
335. Picone O, Donnadiou AC, Brivet FG, Boyer-Neumann C, Fremeaux-Bacchi V, Frydman R. Obstetrical Complications and Outcome in Two Families with Hereditary Angioedema due to Mutation in the F12 Gene. *Obstet Gynecol Int.* 2010;2010:957507.
336. Duan QL, Binkley K, Rouleau GA. Genetic analysis of Factor XII and bradykinin catabolic enzymes in a family with estrogen-dependent inherited angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(4):906-10.
337. Bork K, Wulff K, Steinmuller-Magin L, Braenne I, Staubach-Renz P, Witzke G, et al. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy.* 2018;73(2):442-50.
338. Steiner UC, Keller M, Schmid P, Cichon S, Wuillemin WA. Mutational spectrum of the SERPING1 gene in Swiss patients with hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol.* 2017.
339. Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med.* 2015;17(6):444-51.
340. Canonica GW, Rossi O. Diagnosis and treatment of hereditary angioedema. *Panminerva Med.* 2012;54(3):241-53.
341. Miranda E, Ferrarotti I, Berardelli R, Laffranchi M, Cerea M, Gangemi F, et al. The pathological Trento variant of alpha-1-antitrypsin (E75V) shows nonclassical behaviour during polymerization. *The FEBS journal.* 2017;284(13):2110-26.



342. Zahedi R, Aulak KS, Eldering E, Davis AE, 3rd. Characterization of C1 inhibitor-Ta. A dysfunctional C1INH with deletion of lysine 251. *J Biol Chem.* 1996;271(39):24307-12.
343. Bernstein JA, Cremonesi P, Hoffmann TK, Hollingsworth J. Angioedema in the emergency department: a practical guide to differential diagnosis and management. *Int J Emerg Med.* 2017;10(1):15.
344. Dreyfus DH. Differential Diagnosis of Chronic Urticaria and Angioedema Based on Molecular Biology, Pharmacology, and Proteomics. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2017;37(1):201-15.
345. James C, Bernstein JA. Current and future therapies for the treatment of histamine-induced angioedema. *Expert Opin Pharmacother.* 2017;18(3):253-62.
346. Bork K, Staubach P, Eckardt AJ, Hardt J. Symptoms, course, and complications of abdominal attacks in hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(3):619-27.