

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Evidenčna št.: 1613

Program P3-0360, Celostna obravnava alergijskih bolezni in astme v Sloveniji: od epidemiologije do genetike

Vodja programa: prof. dr. Mitja Košnik, dr. med., spec.

### **Stabilno financiranje znanstvenoraziskovalne dejavnosti,**

### **Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik**

Komisija za spremljanje in vrednotenje in nadzor raziskovalnih programov (KRP), vodja raziskovalnega programa P3-0360 in direktor Klinike Golnik v skladu s 1., 2. in 3. točko drugega odstavka 28. člena ZZrID sprejemamo dokument, ki opredeljuje:

- strateške in dolgoročne cilje prejemnika stabilnega financiranja, ukrepe za njihovo dosego, ciljne in izhodiščne vrednosti ter kazalnike, s katerimi se spremlja doseganje ciljnih vrednosti;
- načrt izvajanja znanstvenoraziskovalne dejavnosti, ki vključuje predvsem razvoj dejavnosti v okviru institucionalnega stebra financiranja in programskega stebra financiranja ter
- razvojne cilje prejemnika stabilnega financiranja, ukrepe za njihovo doseganje, ciljne in izhodiščne vrednosti ter kazalnike, s katerimi se spremlja doseganje ciljnih vrednosti.

### **INSTITUCIONALNI STEBER FINANCIRANJA (ISF-O)**

## **INFRASTUKTURNA DEJAVNOST**

### **1. Uvod**

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik je vodilni zavod na področju pulmologije, astme, pljučnega raka, tuberkuloze in druge respiratorne mikrobiologije ter alergologije v Sloveniji, tako na nivoju raziskovanja in poučevanja, kot na nivoju zdravljenja bolnikov. Na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik je trenutno aktivnih več kot 50 raziskovalcev, ki delujejo v okviru raziskovalnega programa financiranega s strani ARRS. Na kliniki poteka več tudi več projektov financiranih s strani ARRS (J3-3072, J3-2532) in tudi več mednarodnih projektov.

Raziskovalna dejavnost se infrastrukturno deli na:

- a) predklinično, ki se izvaja v štirih laboratorijih: Laboratoriju za citologijo in patologijo, Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko, Laboratoriju za mikobakterije in Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo.
- b) klinično dejavnost, to so diagnostika, zdravljenje ter podporne zdravstvene dejavnosti (kot so klinična farmacija, psihološka podpora in paliativa), ki se izvajajo v kliničnih in drugih enotah zdravstvene dejavnosti.
- c) epidemiološko dejavnost, se izvaja na Registru tuberkuloze Republike Slovenije, na Kliničnem registru bolnikov z rakom pljuč in registru bolnikov s hudo heterogeno astmo – Centralni Register SHARP –.

Taka infrastruktura raziskovalne dejavnosti Klinike Golnik omogoča učinkovit translacijski prenos znanja in novih metod iz predkliničnih raziskav v klinično dejavnost. Ta infrastruktura zagotavlja izjemno dobro podporo vsem raziskovalnim dejavnostim, ki se izvajajo na kliniki. Njen nadaljnji razvoj bo ključen za mednarodno konkurenčno raziskovalno dejavnost Univerzitetne klinike Golnik.

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik se kot vodilna ustanova na infrastrukturnem področju pri svojem raziskovalnem delu povezuje z Medicinsko fakulteto Univerze v Ljubljani in v Mariboru, klinikami in inštituti Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in Maribor, Onkološkim inštitutom, Inštitutom Jožefa Stefana, Kemijskim inštitutom, Biotehniško fakulteto Univerze v Ljubljani, Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani, Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Klinika se aktivno vključuje tudi v mednarodne projekte ter pri svojem raziskovalnem delu sodeluje s priznanimi mednarodnimi institucijami, med drugimi z National Institute of Allergy and Infectious Disease, NIAD (ZDA), Imperial College London (Velika Britanija), Medizinischen Universität Wien in Universitätsklinikum AKH Wien (Avstrija).

## **2. Strateški in dolgoročni cilji infrastrukturne dejavnosti**

### **Integracija raziskovalne dejavnosti**

Za nudenje boljše podpore infrastrukturne dejavnosti bomo integrirali in povezali infrastrukturo Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik v tri enovite sklope.

#### **2.1 Genetski sklop**

##### **2.1.1. Sekvenciranje naslednje generacije in tarčna genska terapija**

Uporaba genetskih metod za diagnostiko in terapijo je v porastu, predvsem na račun razvoja sekvenciranja naslednje generacije (NGS) in tarčne genske terapije. Namen tega sklopa bo zagotoviti raziskovalcem Klinike Golnik vso potrebno opremo ter strokovno znanje za izvajanje NGS vključno z bioinformatsko analizo kompleksnih rezultatov sekvenciranja. V ta namen bomo vzpostavili skupno opremo za izvajanje sekvenciranja, ki se bo uporabljala na vseh ključnih raziskovalnih področjih klinike (pulmologija, astma, pljučni rak, mikrobiologija in alergologija) s strani vseh štirih laboratoriјev. Vzporedno bomo vzpostavili bioinformatsko pot, ki bo temeljila na strežniški analizi, ki bo kot celota opravljana na enem mestu, ne več dislocirano na delovnih postajah; ob izkazani potrebi za dodatno procesorsko moč oziroma dodaten prostor za shranjevanj podatkov, bodo strojne nadgradnje ravno tako opravljene na enem (strežniškem) mestu. Ta koncept bo omogočal najnaprednejše bioinformatske analize, kot npr. neoantagenska analiza, kjer se iz pridobljenih genomskeh podatkov napove biološko funkcijski vpliv sprememb.

### 2.1.2. Celična kultivacija

Drugi namen tega sklopa je vzpostaviti infrastrukturo za raziskave na nivoju celičnih kultur saj tarčne genske terapije temeljijo na spremjanju izbranih genov in je za inicialni razvoj ter testiranje novih genskih terapij potrebno delo s celicami, vključno z 2D in 3D celičnimi kulturami. V tem sklopu bosta pomembna tudi nadaljnji razvoj pretočne citometrije in vzpostavitev različnih sistemov za avtomatizirano celično selekcijo in izolacijo.

### 2.2 Translacijski sklop

Translacijski sklop bo temeljil na infrastrukturi, ki bo omogočila, da se znanje, ki se pridobi v predkliničnem delu celostno in učinkovito prenese v klinični del. Zelo pogosto se predklinične raziskave začnejo tudi na pobudo s strani kliničnega dela, predvsem povezanega s težjimi primeri in/ali kompleksno patologijo. Pri tem bo ključno, da se vzpostavi čim tesnejša povezava med raziskovalci na nivoju predkliničnega in kliničnega dela s pomočjo kontinuiranega izobraževanja ter specializiranega osebja, ki skrbi za integracijo na različnih nivojih, tako strokovnih, tehničnih, organizacijskih, etičnih in poslovnih (intelektualna lastnina). Za optimalen prenos tega znanja je potrebno visoko usposobljeno osebje ter učinkovito komunikacijsko vozlišče, ki s pravilnimi usmeritvami informacij povezuje vse deležnike predkliničnega in kliničnega raziskovalnega procesa. Učinkovit translacijski sklop je temelj hitrega in dinamičnega odzivanja na procese, ki jih sodobno visoko konkurenčno mednarodno raziskovalno okolje nujno zahteva. Translacijski nivo je še posebej razvit v določenih mednarodnih institucijah, zato bomo integrirali določene koncepte, ki se uporabljajo za to integracijo, predvsem koncept projektne pisarne, ki integrira delo obeh dveh ključnih sklopov, torej predkliničnega in kliničnega. V ta namen bomo organizirali centralno hranjenje in obravnavo študijskih podatkov, pri čemer bomo upoštevali vse zakonske podlage, vključno s priporočili GDPR in centralnim upravljanjem z etičnimi vlogami ter dovoljenji.

### 2.3 Epidemiološki sklop

Ključno infrastrukturo za učinkovito izvajanje epidemioloških raziskav so raziskovalni in klinični registri. V okviru raziskovalne dejavnosti Klinike Golnik želimo integrirati infrastrukturo, opremo in znanje štirih registrov: Register tuberkuloze Republike Slovenije, Klinični register bolnikov z rakom pljuč v Sloveniji, Register bolnikov s hudo heterogeno astmo – Centralni Register SHARP in nov register, ki je v procesu ustanavljanja, to bo Klinični register bolnikov z anafilaksijo v Sloveniji. Ta infrastruktura bo izjemno pomembna za boljšo integracijo med kliničnimi in predkliničnimi sklopi raziskav.

## 3. Načrt izvajanja infrastrukturne dejavnosti

Načrt izvajanja infrastrukturne dejavnosti se bo prilagajal razpoložljivim sredstvom povezanih s stabilnim financiranjem. Trenutno se na Kliniki Golnik izvajajo program in dva ARRS projekta, pri katerima so naši raziskovalci vodilni. Načrt se bo izvajal po sledeči shemi:

	Infrastruktura	Mejni in rezultati
<b>2.1 Genetski sklop</b>		
2.1.1. Sekvenciranje naslednje generacije in tarčna genska terapija	Aparati za sekvenciranje naslednje generacije in strežniki z visoko procesorsko močjo	- Integracija sekvenciranja - Integracija bioinformacijske poti

2.1.2. Celična kultivacija	Oprema za celično kultivacijo vključno s primernimi prostori in oprema za analizo celic ter njihovo selekcijo in izolacijo	- integracija celične aktivacije - integracija opreme - integracija različnih postopkov in protokolov
<b>2.2 Translacijski sklop</b>	Centralna projektna pisarna	- integracija predklinične in klinične raziskovalne dejavnosti - vzpostavitev ustreznih informacijskih poti za integracijo in obdelavo podatkov - spremeljanje kazalnikov za spremeljanje doseganja ciljnih vrednosti
<b>2.3 Epidemiološki sklop</b>	Centralna infrastruktura za epidemiološke raziskave	- integracija registrov in obdelave podatkov

#### **4. Razvojni cilji infrastrukturne dejavnosti**

Razvojni cilji infrastrukturne dejavnosti se bodo osredotočili na:

- a) Integracijo trenutnih raziskovalnih zmogljivosti v enovite sklope
- b) zagotavljanje strokovnega osebja, ki bo skrbelo za raziskovalno opremo
- c) zagotavljanje pomoči uporabnikom pri uporabi te opreme ter izvedbe raziskave
- d) skrb za strateški razvoj in vlaganja v nove tehnologije, kar bo zagotovilo mednarodno konkurenčnost v prihodnje.

### **UPRAVLJALSKA IN PODPORA DEJAVNOST**

#### **1. Strateški in dolgoročni cilji upravljalске in podporne dejavnosti**

Upravljalска in podpora dejavnost je zelo pomembna za uspešen in učinkovit translacijski proces. Posebno pozornost bomo namenili razvoju projektne pisarne, ki opravlja pomembna dela na področju vodenja projektov in dejavnosti, ki so sestavni del stabilnega financiranja ter na področjih vezanih na pogodbena razmerja (tudi pogodbe o prenosu materiala) ter medicinsko etiko. Projektna pisarna je tudi ključno vozlišče podatkov vezanih na programsko skupino ter habilitiranje raziskovalcev. Cilj je tako kadrovski, kot tudi strokovni razvoj projektne pisarne.

Poleg projekte pisarne bo poudarek tudi na razvoju drugih podpornih služb kot so finančno-računovodska, kadrovska, pravna služba. Razvijali bomo tudi kadre za področje projekte koordinacije in druga potrebna strokovna dela.

#### **2. Načrt izvajanja upravljalске in podporne dejavnosti**

Razvoj upravljalске in podporne dejavnosti bo potekal preko strokovnih izobraževanj in obiskov referenčnih izobraževalnih centrov tako doma, kot v tujini.

#### **3. Razvojni cilji upravljalске in podporne dejavnosti**

Razvojni cilji so razvoj dinamične, prilagodljive ter visoko strokovne podpore translacijskemu procesu. Strokovna podpora ne bo skrbela le za translacijske procese znotraj klinike, ampak bo pomemben člen ciljanega odpiranja klinike v širši raziskovalni prostor, tako slovenski, kot mednarodni.

## **PROGRAMSKI STEBER FINANCIRANJA (PSF-O)**

### **RAZISKOVALNI PROGRAMI, P3-0360 (5 vsebinskih sklopov (WP))**

Programski steber financiranja Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik izvaja s programom P3-0360 »Celostna obravnava alergijskih bolezni in astme v Sloveniji: od epidemiologije do genetike«. Spodaj so opisani specifični strateški in dolgoročni cilji, načrt izvajanja in razvojni cilji programa.

#### **WP 1: TEŽKA ASTMA**

##### **WP 1.1 PREOBLIKOVANJE DIHALNIH POTI PRI TEŽKI ASTMI**

###### **STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI**

Strukturne spremembe dihalnih poti so temelj patogeneze težke astme. Pred kratkim so se pojavili novi interventni terapevtski pristopi, kot je bronhialna termoplastika, vendar natančen mehanizem delovanja te terapije ni poznan. Preučili bomo, kako ta terapija vpliva na strukturne spremembe dihalnih poti in imunološko dogajanje v pljučih ter kakšni so njeni dolgotrajni učinki.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

###### **NAČRT IZVAJANJA**

Bolnikom, ki bodo zdravljeni z bronhialno termoplastiko, bomo natančno preučili strukturni in imunološki odziv na to terapijo. Skušali bomo ugotoviti, katere imunološke oziroma strukturne poti so povezane s pozitivnim odzivom na to terapijo in kakšni so vzroki, da so nekateri bolniki ne odzovejo na to terapijo.

Bolnikom, ki bodo zdravljeni z bronhialno termoplastiko, bomo v pljučnih bioptatih in v drugih vzorcih preučili spremembe mRNA in mikro RNA. Zajeli bomo analizo celotnega transkriptoma, kar bo omogočilo natančno ugotavljanje sprememb genske ekspresije, povezanih s to terapijo.

###### **RAZVOJNI CILJI**

Ključni razvojni cilji bodo vezani na preučevana spremembe mRNA in mikro RNA. To kompleksno analizo bo omogočila integracija infrastrukture genetskega sklopa in integracija genetske dejavnosti.

##### **WP 1.2 ENDOTIPI TEŽKE ASTME**

###### **STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI**

Zadnje raziskave kažejo, da imajo različni bolniki s težko astmo različno imunološko ozadje oziroma astmatske endotipe. Zelo pomembno je poznavanje tega ozadja, saj le-ta vpliva na izbiro terapevtskega pristopa. Poleg tega je boljše razumevanje tega imunološkega ozadja pomembno za razvoj novih diagnostičnih in terapevtskih pristopov.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Natančno bomo preučili vlogo efektorskih celic pri različnih bolnikih s težko astmo. Pri tem se bomo osredotočili na mastocite in bazofilce.

Preučili bomo vlogo določenih limfocitnih subpopulacij pri bolnikih s težko astmo in pridruženo nosno polipozo. Osredotočili se bomo na CD3+CD4-CD8- dvojno negativne tkivne T celice in imunoregulatorne T limfocite.

#### RAZVOJNI CILJI

Naš ključni razvojni cilj bo temeljil na analizi imunskeih celic, ki vplivajo na endotipe težke astme. Te razvoje cilje bo omogočala integracija infrastrukture za celično aktivacijo in integracija analitskega dela.

### **WP 2: IgE SENZIBILIZACIJA IN ANAFILAKSIJA**

#### **WP 2.1 VLOGA BAZOFILCEV PRI ANAFILAKSIJI**

##### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

V tem večjem WP bomo ugotavljali, kakšna je vloga bazofilcev pri anafilaksiji. Trenutno še velja prepričanje, da so za anafilaksijo ključni mastociti. Vendar naše preliminarne raziskave kažejo na izjemno pomembno in specifično vlogo bazofilcev. V ta WP bomo vključili dva različna klinična modela. Prvi model bo urgentni, kjer bomo spremljali bolnike, ki bodo v študijo vstopili preko urgentne ambulante v akutni fazi anafilaksije. V drugem modelu pa bomo spremljali spremembe med kontrolirano provokacijo za alergene, ki se bo izvajala v kliničnem okolju. Preučevali bomo tako bolnike, kjer je anafilaksija povzročena s pikom kožekrilcev, kot tudi bolnike, kjer bo reakcijo sprožil alergen hrane ali pa zdravila. Ta del programa se bo izvajal skupaj z mednarodnimi partnerji.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Preučili bomo, kakšna je povezava med številom bazofilcev v krvi in pojavom ter težo sistemske alergijske reakcije. To bomo preučili na obeh eksperimentalnih modelih, tako na urgentnem modelu kot tudi na modelu kontrolirane provokacije za alergene.

Zanimalo nas bo, kakšna je povezava med gensko ekspresijo visoko afinititnega IgE receptorja (FcεRI), karboksil peptitaze A3 (CPA3) in L-histadin dekarboksilaze (HDC) in pojavom ter težo sistemske alergijske reakcije.

Preučili bomo, kakšna je povezava med bazofilnimi kemotaktičnimi faktorji CCL2, CCL5 in CCL11 in pojavom ter težo sistemske alergijske reakcije.

Natančno bomo preučili, kakšna je možna diagnostična vloga merjenja CCL2 kemokina za potrditev klinične diagnoze anafilaksije. Te rezultate bomo primerjali z drugimi diagnostičnimi pristopi, vključno z merjenjem serumske triptaze. Dodatno bomo pri določenih bolnikih CCL2 meritve primerjali tudi s štetjem bazofilcev v krvi in genskim izražanjem visoko afinitetnega IgE receptorja.

V in vitro pogojih bomo preučili, ali serum bolnikov z anafilaksijo inducira migracijo izoliranih bazofilcev. V tem kompleksnem eksperimentalnem modelu se bo preučevala predvsem vloga kemokina CCL2, za katerega smo prepričani, da je ena ključnih molekul med anafilaksijo. Dodatno se bo preučilo ali z blokiranjem CCL2 oziroma CCR2 receptorja na bazilicah preprečimo to migracijo. V tem eksperimentalnem modelu bomo preučil tudi ali aktivacija bazofilcev z alergenom in vitro pogojih vpliva na nivo eksperimentalne migracije.

Patogeno vlogo migracije bazofilcev bomo preverili na humaniziranih mišjih modelih anafilaksije. Osnovni cilj teh eksperimentov bo opredeliti, ali migracija rezultira v aktivaciji in degranulaciji bazofilcev v tarčnih organih.

#### RAZVOJNI CILJI

Prvi razvojni cilj tega sklopa je vzpostavitev novih diagnostičnih metod, ki bodo temeljile na bazilnih biomarkerjih in ki bodo omogočale napoved teže anafilaktične reakcije, oziroma spremljanje odgovora na zdravljenje.

Drugi razvojni cilj tega sklopa je razvoj novih terapevtskih pristopov, ki bodo specifično delovali na nivoju bazofilcev.

## **WP 2.2 CELIČNA SENZITIVNOST IN SPECIFIČNA IMUNOTERAPIJA**

#### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

Mehanizem kratkotrajne zaščite in vzpostavitev dolgotrajne tolerance pri zdravljenju s specifično imunoterapijo s strupi kožekrilcev (VIT) je verjetno povezan s spremembami celične senzitivnosti bazofilcev in mastocitov.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Razjasnili bomo vlogo inhibitornih faktorjev v povezavi s spremembami celične senzitivnosti ob vzpostaviti kratkotrajne zaščite VIT s strupi kožekrilcev. Osredotočili se bomo predvsem na serumske faktorje, saj bi želeli vzpostaviti prognostični model, kjer bi uspešnost imunoterapije lahko napovedali z uporabo relativno preprostega laboratorijskega testa.

V obsežni študiji želimo klinično ovrednotiti naše preliminarne ugotovitve, da je za vzpostavitev tolerance pri VIT s strupi kožekrilcev ključen padec senzitivnosti bazofilcev. Vzpostavili smo dolgotrajno multicentrično študijo dveh centrov (Avstrija in Slovenija), kjer spremljamo senzitivnost pred in eno leto po zaključku VIT.

#### RAZVOJNI CILJI

Ključni razvojni cilj tega sklopa je izboljšati učinkovitost imunoterapije.

## **WP 2.3 CELIČNA SENZITIVNOST IN TEŽA REAKCIJE**

### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

Trenutno ni nobenega laboratorijskega testa oziroma metode, ki bi lahko napovedala klinično težo sistemsko alergijsko reakcijo. Na modelu alergij za arašide in modelu stranskih sistemskih zapletov med uvajanjem imunoterapije s strupi kožekrilcev smo pred kratkim pokazali na možno vlogo povišane senzitivnosti bazofilcev. Sedaj želimo to potrditi še na kliničnem modelu reakcije po piku kožekrilca na terenu.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

### NAČRT IZVAJANJA

Primerjali bomo težo reakcije po piku kožekrilcev s senzitivnostjo bazofilcev in drugimi imunološkimi parametri v pediatrični populaciji.

Primerjali bomo tudi težo reakcije po piku kožekrilcev s senzitivnostjo bazofilcev in drugimi imunološkimi parametri v odrasli populaciji.

### RAZVOJNI CILJI

Ključni razvojni cilj je vzpostaviti novo celično metodologijo, ki bo omogočala napovedovanje teže alergijske reakcije.

## **WP 3: REKOMBINANTNI ALERGENI**

### **WP 3.1 TESTIRANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI REKOMBINANTNIH ALERGENOV**

#### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

V okviru raziskovalnega programa Klinike Golnik že vrsto let testiramo biološko aktivnost rekombinantnih alergenov za različne tuje in slovenske raziskovalne institucije. Testiramo ga preko celotne krivulje celičnega odziva bazofilcev. Ti podatki so ključni za izdelavo ustreznih rekombinantnih diagnostičnih in imunoterapevtskih pripravkov.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Preko celotne krivulje celičnega odziva bazofilcev bomo pri jasno definiranih bolnikih ugotavljeni alergogeno aktivnost določenih rekombinantnih alergenov. Te determinante so pridobljene v različnih ekspresijskih sistemih (prokariontski ali evkariontski) in imajo različnost IgE reaktivnost ter različno biološko aktivnost (nekatere niso alergogene). Načrtovano je testiranje novih rekombinantnih alergenov zastrup Polistesa in čebele ter za različne oreščke, predvsem arašide, in za različne inhalacijske alergene (predvsem pršica in epitelij mačke).

#### RAZVOJNI CILJI

Ključni cilj je razvoj novih rekombinantnih alergenov za njihovo možno terapevtsko uporabo.

## **WP 3.2 DIAGNOSTIČNA VREDNOST REKOMBINANTIH ALERGENOV, POMEMBNIH ZA ANAFILAKSIJO:**

### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

Pri slovenskih bolnikih bomo preučili diagnostično vrednost trenutno dostopnih rekombinantnih alergenov, povezanih z anafilaksijo. Osredotočili se bomo na tri področja opisana v načrtu izvajanja.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

### NAČRT IZVAJANJA

Prvo področje so rekombinantni alergeni, povezani s strupom čebele.

Drugo področje so rekombinantni alergeni hrane, kjer se bomo osredotočili na vlogo hrambenih proteinov in LTP-ja.

Tretje zelo pomembno področje pa bo področje idiopatske anafilaksije. To so anafilaktične reakcije, kjer sprožilec ni poznan. Pri teh bolnikih bomo testirali različne »alergo čipe«. To so proteinske mikromreže, na katerih lahko istočasno določamo specifične IgE za več kot sto različnih rekombinantnih alergenov.

### RAZVOJNI CILJI

Ključni cilj je razvoj novih rekombinantnih alergenov za njihovo diagnostično uporabo.

## **WP 4: BIOLOŠKE TERAPIJE**

V zadnjih letih nove biološke terapije pomembno spreminja zdravljenje alergijskih in pljučnih bolezni. Kljub relativno visoki učinkovitosti se določeni bolniki nanje ne odzovejo. V tem WP se bomo osredotočili na imunološke in molekularne mehanizme, povezane z odzivom na biološko terapijo.

### **WP 4.1 ANTI IgE-TERAPIJA**

#### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

Pred kratkim se je anti-IgE terapija s področja zdravljenja težke astme razširila tudi na področje zdravljenja kronične urticarije. Predvideva se, da se bo anti-IgE terapija širila tudi na druga področja, povezana predvsem s sistemskimi zapleti med imunoterapijo.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Ker kronična urticarija ni alergijska bolezen, mehanizem delovanja omalizumaba pri zdravljenju te bolezni ni jasen, zato bomo preučili celične spremembe na nivoju bazofilcev in mastocitev pri bolnikih s kronično urticarijo med zdravljenjem z anti-IgE terapijo. Pri teh bolnikih bomo merili spremembe receptorja Fc $\epsilon$ RI in IgE protiteles na površini bazofilcev ter mastocitov. Ugotavljali bomo tudi, če med samo terapijo pride do sprememb v migraciji bazofilcev iz periferne krvi v kožo. V tem eksperimentalnem modelu bomo vzorčili pred začetkom terapije, dva do tri tedne in 8 do 12 tednov po začetku terapije. Na tkivnih vzorcih bomo med terapijo izvedli tudi analizo celotnega transkriptoma.

To bo omogočilo preučiti ključne gene ter glavne molekularne poti, ki so udeležene pri odzivu na anti-IgE terapijo.

Natančno bomo preučili uporabnost omalizumaba pri obvladovanju stranskih sistemskih učinkov imunoterapije s strupi kožekrilcev. V tem delu se bomo osredotočili na najteže bolnike, ki jim zaradi sistemskih zapletov imunoterapije ne moremo uvesti. Vzpostavili bomo nov način premedikacije z anti-IgE terapijo in ob tem spremljali tudi različne imunološke parametre, vključno s senzitivnostjo bazofilcev.

#### RAZVOJNI CILJI

Ključni razvojni cilj je preučiti ali se anti-IgE terapije lahko uporablja tudi pri drugih boleznih, kjer so pomembna IgE protitelesa.

### **WP 4.2 ANTI IL-5 TERAPIJA**

#### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

IL-5 citokin je ključen za homeostazo in migracijo eozinofilcev. Eozinofilci so pomembne efektorske celice alergijskega vnetja. Še posebej so pomembni pri težki astmi eozinofilnega endotipa. To je poleg eozinofilnega ezofagitisa tudi ključno področje uporabe anti IL-5 terapije.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

V tem delu bomo ugotavljalci, zakaj se določeni astmatski bolniki ne odzovejo na anti IL-5 terapijo. Zato bomo spremljali različne humorale in celične imunološke parametre v perifernih in pljučnih vzorcih (induciran sputum) pri astmatskih bolnikih, zdravljenih z anti IL-5 terapijo.

#### RAZVOJNI CILJI

Ključni razvojni cilj je izboljšati selekcijo bolnikov, ki se bodo dobro odzvali na anti IL-5 terapijo.

### **WP 4.3 ANTI TSLP TERAPIJA**

#### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

TSLP je protein, ki ga izločajo nekatere epitelne celice in močno vpliva na Th2 imunski odgovor. Prav tako regulira razvoj različnih imunokompetentnih celic in predstavlja možno novo tarčno molekulo za zdravljenje astme.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Skupaj s tujimi partnerji bomo preučili bomo vlogo TSLP pri astmi in KOPB. Osredotočili se bomo na merjenje TSLP v serumskih vzorcih in poskušali ugotovili, ali je povezan s težo bolezni oziroma z endotipi različnih obstrukcijskih pljučnih bolezni.

#### RAZVOJNI CILJI

Anti TSLP terapija trenutno še ni v rutinski klinični uporabi, zato bo ključni razvojni cilj tega delovnega sklopa opredeliti patogenetsko vlogo TSLP proteina pri obstruktivnih pljučnih boleznih, kot sta astma in KOPB.

## **WP 5: GENETIKA ALERGIJSKIH BOLEZNI**

### **WP 5.1 GENETSKO OZADJE ANAFILAKSIJE**

#### **STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI**

Anafilaksija je sistemski, življenje ogrožajoča alergijska reakcija z akutnim potekom. Incidenca anafilaksije je v porastu in verjetnost, da bo posameznik doživel vsaj eno anafilaktično reakcijo v življenju, je bila ocenjena na 2 %. Nekateri ljudje po stiku z alergenom, ki je drugim povzročil nastanek anafilaktične reakcije, doživijo le omejeno, lokalno reakcijo, spet tretji pa na isti alergen niti ne odreagirajo. Zaradi zgoraj naštetih dejstev je identifikacija bolnikov, ki bodo po stiku z alergenom doživeli anafilaktično reakcijo, ter razjasnitve mehanizmov nastanka te potencialno smrtne bolezni, ključnega pomena za boljše razumevanje in obvladovanje bolezni.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### **WP 5.1.1 PODVOJITVE GENA ZA TRIPTAZO TPSAB1**

#### **STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI**

Triptaza je pomemben mediator anafilaksije, ki ga izločajo mastociti. Zapisi za triptazo se nahajajo v genih TPSAB1, TPSB, TPSD1 in TPSG1, ki so locirani na kromosому 16. Zvišana triptaza v serumu se uporablja za potrditev diagnoze anafilaksije, nivo basalne triptaze pa je povezan s tveganjem za težjo obliko anafilaktične reakcije. Ker na nivo basalne triptaze vplivajo predvsem podvojitve gena za triptazo TPSAB1, bomo pri skupini 600 bolnikov z različno stopnjo reakcije/anafilaksije po pikih kožekrilcev in skupini 200 zdravih kontrol določili število kopij gena TPSAB1. V primeru, da se bodo podvojitve gena TPSAB1 izkazale kot dejavnik tveganja za anafilaksijo, bomo le-te določili tudi pri bolnikih z anafilaksijo po hrani in zdravilih.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### **NAČRT IZVAJANJA**

Ovrednotili bomo povezavo podvojitev gena TPSAB1 s preobčutljivostno reakcijo/anafilaksijo.

Ocenili bomo primernost določitve podvojitev TPSAB1 za napovedovanje tveganja za nastanek anafilaksije.

#### **RAZVOJNI CILJI**

Ključni razvojni cilj je ugotoviti ali imajo določeni bolniki dedno osnovo za težji potek anafilaksije.

#### **WP 5.1.2 DOLOČITEV SOMATSKIH MUTACIJ POVEZANIH Z MASTOCITOZO**

#### **STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI**

Mastocitoza je neoplastična bolezen, za katero je značilno kopičenje mastocitov v različnih organih in tkivih, kar ima za posledico sproščanje biološko aktivnih snovi, kot so histamin in triptaza. V patogenezo mastocitoze je vključen receptor KIT. Mutacije v genu C-KIT privedejo do kontinuirane aktivnosti tega receptorja in posledično nekontrolirane rasti mastocitov, zato so le-te najpogosteje vzrok za nastanek mastocitoze. Določitev mutacij, predvsem D816V, v genu C-KIT, je eden izmed diagnostičnih meril za mastocitozo. Z naprednimi in visoko senzitivnimi metodami, kot je digitalni PCR, pa je določitev prej omenjenih mutacij mogoča tudi v krvi bolnikov. Bolniki z mastocitozo imajo pogosteje hude sistemske preobčutljivostne reakcije, zato bomo v DNA izolirani iz periferne krvi pri skupini 600 bolnikov z različno stopnjo reakcije/anafilaksije po pikih kožekrilcev določili prisotnost mutacij v genu C-KIT. Na izbranem deležu bolnikov bomo mutacijo določili tudi v kostnem mozgu ter s tem primerjali senzitivnost metode. V primeru, da se bo določitev somatskih mutacij v genu C-KIT iz krvi izkazala kot dovolj senzitivna metoda ter dejavnik tveganja za anafilaksijo, bomo le-te določili tudi pri bolnikih z anafilaksijo po hrani in zdravilih.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Določili bomo pogostost somatskih mutacij v genu C-KIT pri bolnikih z preobčutljivostno reakcijo/anafilaksijo.

Ovrednotili bomo senzitivnost metode določanja mutacij C-KIT v krvi.

Ocenili bomo primernost določitve mutacij v genu C-KIT za napovedovanje tveganja za nastanek anafilaksije.

#### RAZVOJNI CILJI

Ključni razvojni cilj je vzpostaviti neinvazivni presejalni test za mastocitozo in za mastocitna obolenja povezana s težjim potekom anafilaksije. Ta presejalni test se bo izvajal na vzorcu periferne krvi in bo omogočal določanje najpomembnejše mutacije (C-KIT), povezane z mastocitnimi obolenji.

## **WP 5.2 ANALIZA CELOTNEGA TRANSKRIPTOMA PRI ANAFILAKSIJI**

#### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

Kljub temu, da je anafilaksija sistemski, življenje ogrožajoča reakcija z akutnim potekom, ki vključuje aktivacijo mastocitov in bazofilcev, natančen mehanizem poteka še ni povsem znan. Za boljše razumevanje mehanizmov, ki vodijo k potencialno smrtnim dogodkom, bomo s pomočjo sekvenciranja nove generacije izvedli analizo celotnega transkriptoma (sekvenciranje RNA) na vzorcih periferne krvi pri bolnikih med anafilaksijo (sprejetih v urgentno ambulanto ter med provokacijo z arašidi). Analizo transkriptoma bomo izvedli tudi na krvi mišk z različno stopnjo anafilaksije ter pri senzibiliziranih miškah brez anafilaksije.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Določili bomo ključne gene/transkripte, ki so različno izraženi med anafilaksijo.

Ovrednotili bomo glavne molekularne poti, ki vodijo v anafilaksijo.

Določili bomo glavne imunske celice udeležene pri anafilaksiji.

Ugotovili bomo skupne gene/poti/celice pri humani in mišji anafilaksiji in katere poti so različne.

Čim boljše želimo razumeti mehanizme anafilaksije.

#### RAZVOJNI CILJI

Ključni razvojni cilj je kompleksna analiza celotnega transkriptoma. Za izpolnitev tega težkega cilja bo ključna učinkovita in uspešna infrastrukturna integracija genetskega sklopa.

### **WP 5.3 UGOTAVLJANJE KORELACIJE MED GENOTIPOM IN FENOTIPOM**

#### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

V tem WP bomo ugotavljalci genetsko ozadje, ki vpliva na različne fenotipe bolezni na primerih hereditarnega angioedema in astme.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### **WP 5.3.1 HEREDITARNI ANGIOEDEM, DOLOČITEV GENETSKEGA OZADJA, KI VPLIVA NA NASTANEK IN TEŽO BOLEZNI**

#### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

Hereditarni angioedem (HAE) je redka, vendar življenje ogrožajoča bolezen. Kljub temu, da so že znani geni, ki so odgovorni za nastanek HAE, kot so SERPING1, F12, PLG in ANGPT1, obstaja še velika skupina bolnikov, pri katerih pa genetski vzrok bolezni še ni pojasnjen. Poleg tega tudi ni znano genetsko ozadje, ki je odgovorno za veliko heterogenost teže bolezni. Genetske variante, ki bi lahko bile pojasnile heterogenost teže bolezni pri HAE, so lahko odgovorne tudi za nastanek ostalih podtipov od bradikinina odvisnih angioedemov. V ta namen bomo najprej bolnike s HAE iz Jugovzhodne Evrope (poleg Slovenije tudi Hrvaške, Bosne in Hercegovine, Srbije, Makedonije in Črne Gore) genotipizirali za prisotnost mutacij v, za HAE znanih genih, s sekvenciranjem po Sangerju. Nato bomo bolnike, pri katerih ne bomo odkrili genetskega vzroka, analizirali še z metodo sekvenciranja nove generacije (NGS). Poleg tega bomo z metodo NGS preučevali tudi povezavo med genotipom in fenotipom, najprej pri bolnikih s HAE, nato pa tudi pri bolnikih z ne-dednimi oblikami angioedema.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

#### NAČRT IZVAJANJA

Ugotovili bomo genetski vzrok za HAE.

Določili bomo nove, še neopisane mutacije/gene odgovorne za HAE.

Ovrednotili bomo povezavo med genotipom in fenotipom pri HAE in angioedemom.

Čim boljše želimo razumeti mehanizme angioedema.

#### RAZVOJNI CILJI

Ključni cilj je izboljšanje terapije bolnikov s hereditarnim angioedemom (HAE).

## **WP 5.3.2 DOLOČITEV GENETSKE HETEROGENOSTI ASTME**

### STRATEŠKI IN DOLGOROČNI CILJI

Astma sodi med najpogostejše kronične bolezni. V patogenezo astme, je poleg dejavnikov okolja vpletena tudi genetika, vendar pa kljub številnim raziskavam še vedno ne poznamo genov, ki bi z visoko gotovostjo napovedovali njen razvoj. Nadalje naj bi bil genetski ustroj posameznika povezan tudi z različnim odzivom na zdravljenje. To naj bi držalo ne le za tradicionalna protiastmatična zdravila (bronchodilatatorji, kortikosteroidi), ampak tudi za nova biološka zdravila, kot sta anti-IgE in anti-IL5. Ta WP bo usmerjen v iskanje farmakogenetskih označevalcev, s pomočjo katerih bi tak odziv na zdravljenje lahko napovedali. Zato bomo pri klinično dobro definiranih bolnikih z različnim odzivom na zdravljenje s protiastmatičnimi zdravili, z metodami alelne diskriminacije in NGS določili variante, ki bi lahko bile povezane s tem odzivom.

Poglavitni kazalniki bodo publikacije, patentne prijave in translacija tega znanja.

### NAČRT IZVAJANJA

Ovrednotili bomo povezavo genetskih variant s heterogenostjo astme.

Ovrednotili bomo povezavo genetskih variant z odzivi na različne režime zdravljenja.

Ocenili bomo primernost uporabe teh genetskih variant za napovedovanje odziva na zdravljenje.

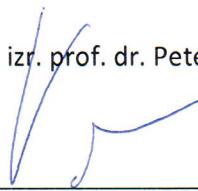
### RAZVOJNI CILJI

Genetska heterogenost vpliva na izbiro ustrezne tarčne biološke terapije, zato pričakujemo, da bomo v prihodnosti dobili orodja, ki nam bodo preko genetskega testiranja omogočala izbiro biološke terapije, ki bo za bolnika najučinkovitejša.

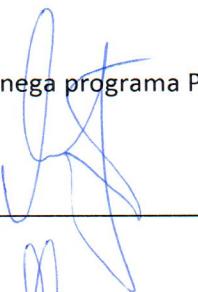
## **MLADI RAZISKOVALCI**

Na Kliniki Golnik načrtujemo sočasno zaposlitev od treh do štirih mladih raziskovalcev.

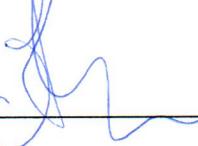
Predsednik KRP: izr. prof. dr. Peter Korošec, univ. dipl. biol., spec.



Vodja raziskovalnega programa P3-0360: prof. dr. Mitja Košnik, dr. med., spec.



Direktor: doc. dr. Aleš Rozman, dr. med., spec., v. d. direktorja



12 -09- 2022

