МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО БЕЛОДРОБНИ БОЛЕСТИ
МБАЛББ „Света София“ ЕАД

Д-Р ДЕНИЦА ГОШЕВА ДИМИТРОВА

ФЕНОТИПИЗИРАНЕ НА БРОНХИАЛНАТА АСТМА

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

по професионално направление 7.1 Медицина,

Научна специалност: Белодробни болести, Шифър 03.01.17

Научен ръководител:

Доц. д-р Ваня Милошева Юрукова, д.м.

Научно жури:

Проф. Д-р Димитър Темелков Костадинов, д.м.

Доц. д-р Ваня Милошева Юрукова, д.м.

Доц. Д-р Димо Митев Димов д.м.

Проф. Д-р Благой Иванов Маринов д.м.

Доц. Д-р Явор Йорданов Иванов д.м.

СОФИЯ

2020 г.

Списък на използваните съкращения:

БА	Бронхиална астма
ТА	Тежка астма
СТА	Средно тежка астма
ЛБА	Лека бронхиална астма
ИКС	Инхалаторен кортикостероид
СКС	Системен кортикостероид
ОКС	Орален кортикостероид
КДБА	Краткодействащ бета 2 агонист
ДДБА	Дългодействащ бета 2 агонист
ИТМ	Индекс телесна маса
ФЕО1	Форсиран експираторен обем за 1 секунда
ФВК	Форсиран витален капацитет
БДТ	Бронходилататорен тест
ДКК	Диференциална кръвна картина
КАП	Кожно-алергични проби
ГЕРБ	Гастро-езофагеална рефлуксна болест
ЛТРА	Левкотриенов рецепторен антагонист
FeNO	Fractional Exhaled Nitric Oxide (Фракция на издишан азотен окис)
IgE	Immunoglobulin E (Имуноглобулин Е)
CRP	C-reactive protein (С-реактивен протеин)
IL	Interleukin (Интерлевкин)
GINA	Global Initiative for Asthma (Глобалната инициатива за астма)
ERS	European Respiratory Society (Европейското Респираторно Дружество)
ATS	American Thoracic Society (Американското Торакално Дружество)
ACT	Asthma Control Test (Астма контрол тест)
ACQ	Asthma Control Questionnaire (Въпросник за контрол на астмата)
ppb	Parts per Billion (частици на билион)
BTPS	Body Temperature, Pressure, Saturated (Телесна температура, налягане, влажност)
GLI	Global Lung Initiative (Глобална инициатива за белодробна функция)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ензимно-свързан имуносорбентен анализ)
TGFβ	Transforming growth factor beta (Трансформиращ фактор на растеж бета)
Th2	T helper 2 (Т хелпери 2)
ILC	Innate lymphoid cells (Вродени лимфоидни клетки)
ECP	Eosinophil Cationic Protein (Еозинофилен катионен протеин)
TNF	Tumor necrosis factor (Тумор некротизиращ фактор)
IFN	Interferon (Интерферон)
NOS	Nitric oxide synthase (Азотоксидна синтаза)
LLN	Lower limit of normal (Долна граница на нормата)
FVC	Forced vital capacity (Форсиран витален капацитет)
FEV1	Forced expiratory volume in one second (Форсиран експираторен обем за една секунда)
AERD	Aspirin-exacerbated respiratory disease (Аспирин-изострено респираторно заболяване)
b-Eos	Blood eosinophilic count (Абсолютен брой на кръвните еозинофили)
b-Neu	Blood neutrophilic count (Абсолютен брой на кръвните неутрофили)
SARP	Severe Asthma Research Program (Изследователска програма за тежка астма)
U-BIOPRED	Unbiased BIOmarkers in PREDiction of respiratory disease outcomes (Безпристрастни биомаркери при прогнозиране на резултатите при респираторните заболявания)
RCT	Randomized controlled trial (Рандомизирано контролирано проучване)

СЪДЪРЖАНИЕ:

I. Въведение 5
II. Литературен обзор 6
2.1. Честота, разпространение и смъртност. 6
2.2. Контрол на бронхиалната астма 7
2.3. Екзацербации 11
2.4. Тютюнопушене и коморбидности 13
2.5. Тежест 16
2.6. Фенотипизиране и клъстерен анализ на БА 20
2.7. Маркери на възпаление в издишан въздух 41
2.7.1 Фракция на азотен окис в издишания въздух (FeNO) 41
2.8. Системни маркери при БА 49
2.9. Изводи от литературния обзор 57
III. Цел и задачи 60
IV. Материал и методи 61
4.1 Изследвана популация 61
4.2 Методи 63
4.2.1 Анкетна карта и въпросници 63
4.2.2 Изследване на фракцията на азотен окис в издишан въздух (FeNO) 64
4.2.3 Спирометрия 65
4.2.4 Кожно-алергични проби (КАП) 65
4.2.5 Кръвни изследвания и серумни маркери 65
4.2.6 Определяне на общи IgE 66
4.2.7 Определяне на специфични IgE към Staphilococcus aureus ентеротоксин B 67
4.2.8 Определяне на серумен IL-5 67
4.2.9 Определяне на серумен IL-6 68
4.2.10 Определяне на серумен IL-13 70
4.2.11 Определяне на серумен IL-17A 71
4.2.12 Определяне на серумен IL-8 72
4.2.13 Определяне на серумен периостин 73
4.2.14 Определяне на серумни нива на CRP 75
4.2.15 Статистически методи 75
V. Резултати 77
5.1 Резултати към задача 1: Определяне и оценка на пола, възрастта, началото и продължителността на БА, коморбидностите и тютюнопушенето при възрастни пациенти със средно-тежка и тежка бронхиална астма и анализ на техните асоциации с контрола, тежестта, възпалителните и имунологични маркери. 78
5.1.1 Разпределение по пол 78
5.1.2 Разпределение по възраст 79
5.1.3 Начало на БА 81
5.1.4 Коморбидности 86
5.1.5 Тютюнопушене и БА 92
5.2 Резултати към задача 2: Определяне на контрол, честота на екзацербации, функционални характеристики и тежест на БА и анализ на факторите свързани с тях 95
5.2.1 Контрол на БА 95
5.2.2 Екзацербации 100
5.2.3 Функционални показатели 101
5.2.4 Тежест 104

5.3 Резултати към задача 3: Определяне и анализиране на атопичен статус, общи IgE, кръвни еозинофили, FeNO и CRP 107
5.3.1 Атопичен статус 107
5.3.2 Нива на общ имуноглобулин Е (IgE) в периферна кръв и специфични IgE към Staphilococcus aureus ентеротоксин В (SEB-IgE) 116
5.3.3 Абсолютен еозинофилен брой в периферна кръв (b-Eos) 117
5.3.4 Фракция на издишан азотен окис (FeNO) 121
5.3.5 С-реактивен протеин (CRP) 125
5.4 Резултати към задача 4: Изследване и анализиране на серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A и периостин при пациенти с БА и ЗК 127
5.4.1 Серумни нива на интерлевкин 5 (IL-5) 127
5.4.2 Серумни нива на интерлевкин 6 (IL-6) 128
5.4.3 Серумни нива на интерлевкин 8 (IL-8) 131
5.4.4 Серумни нива на интерлевкин 13 (IL-13) 132
5.4.5 Серумни нива на интерлевкин 17A (IL-17A) 134
5.4.6 Серумни нива на периостин 135
5.5 Резултати към задача 5: Групиране на пациентите с БА според утвърдени биомаркери и анализ на техния възпалителен и имунологичен профил 137
5.6 Резултати към задача 6: Провеждане на непреднамерен клъстерен анализ с дефиниране на клъстерни групи с цел идентифициране на отделни фенотипи 144
5.7 Резултати към задача 7: Определяне на терапевтичното поведение чрез алгоритъм, приложим в рутинната клинична практика 157
VI. Обсъждане 163
6.1 Обсъждане на резултатите към задача 1 163
6.2 Обсъждане на резултатите към задача 2 169
6.3 Обсъждане на резултатите към задача 3 176
6.4 Обсъждане на резултатите към задача 4 182
6.5 Обсъждане на резултатите към задача 5 186
6.6 Обсъждане на резултатите към задача 6 195
6.7 Обсъждане на резултатите към задача 7 201
VII. Заключение 203
VIII. Изводи 205
IX. Приноси 206
X. Книгопис 208
XI. Публикации и участия в научни форуми по темата на дисертацията 227
XII. Приложения 230

I. Въведение

Бронхиалната астма (БА) е хетерогенно заболяване, характеризиращо се с хронично възпаление на дихателните пътища и респираторни симптоми, като задух, кашлица, свирене и стягане в гърдите, вариращи по изява и интензитет във времето, свързани с вариабилност в ограничението на експираторния въздушен поток (139).

Честотата на БА варира от 1-16% в популацията на различните страни (139) и засяга хора от всяка възраст, раса и пол. Клиничната изява може да варира от едва забележими симптоми до тежко, живото-застрашаващо състояние. Насоките за диагностика и лечение на пациентите с БА са все по-индивидуализирани и съобразени с тежестта на заболяването и с фенотипните характеристики на всеки пациент.

Основни цели при лечението на БА са постигането на оптимален контрол, превенция на риска от екзацербации и развитие на фиксирана бронхиална обструкция и възпрепятстване настъпването на нежелани лекарствени събития, свързани най-вече с употребата на системни кортикостероиди (СКС). Около 45 – 54 % от пациентите с БА остават с недобър контрол на заболяването, като причините за това са комплексни.

От 5 до 10% от всички пациенти са с тежка бронхиална астма (ТА)(82) с прогресивно влошаване на симптомите и чести тежки екзацербации, които водят до бърза загуба на белодробна функция, въпреки провежданата комплексна терапия и представляват особено предизвикателство, поради необходимостта от обширна диагностична оценка, липса на достатъчно доказателства по отношение на персонализираната терапия, както и висока консумация на ресурси в областта на здравеопазването (319). При тези пациенти концепцията за фенотипизиране на БА има нарастващо значение през последните години (70). Клъстерни проучвания подкрепят идеята, че клинико-възпалителните модели на БА са променливи, но чрез тях могат да бъдат идентифицирани фенотипи, които остават стабилни във времето и подлежат на персонализиран подход за лечение (455).

II. Литературен обзор

2.1. Честота, разпространение и смъртност.

БА засяга около 339 милиона хора по света (138). Въпреки множеството доклади за разпространение на заболяването, липсата на точна и универсална дефиниция затруднява сравнението на честотата на БА в различни части на света. Въз основа на стандартизирани методи, глобалното разпространение на БА се оценя от 1 до 16% от населението в различните страни (114, 139). Милева и сътр. докладват честота на БА в България, както следва: < 20 години – 9.1%, 20-44 години – 4.7%, > 44 години – 12.9%, с обща честота за популацията 9% базирайки се на данните от мултицентрово епидемиологично проучване (n=6 492) (271).

По данни на доклада за глобална тежест на заболяванията от 1990 до 2015 г. разпространението на БА се е увеличило с 12.6% (9.0-16.4) до около 358.2 милиона индивида (данните варират от 323.1 милиона до 393.5 милиона) (403). През 2015 г. 0.40 милиона души (95% UI 0.36 - 0.44 милиона) са загинали от БА, което е понижение с 26.7% (-7.2-43.7) в сравнение с 1990 г. Най-голямо намаление на разпространение и смъртност се отчита в страните с висок социално-демографски индекс (SDI) (Табл.1) (403).

	Смъртни случаи (хиляди)	Процентна промяна на смъртността при всички възрастови групи 1990-2015	Процентна промяна на смъртността при възрастова стандартизация 1990-2015	Честота, брой случаи (хиляди)	Процентна промяна на честотата при всички възрастови групи 1990-2015	Процентна промяна на честотата при възрастова стандартизация 1990-2015
Астма						
Глобално	397 (363 to 439)	-26·7 (-43·7 to 7·2)	-58·8 (-69·0 to -39·0)	358 198 (323 134 to 393 466)	12·6 (9·0 to 16·4)	-17·7 (-19·9 to -15·1)
Висок SDI	22 (20 to 24)	-53·2 (-56·8 to -48·9)	-71·8 (-73·7 to -69·5)	63 883 (59 724 to 68 309)	-13·8 (-17·0 to -10·2)	-26·0 (-28·4 to -23·0)
Висок-среден SDI	54 (50 to 61)	-3·2 (-12·9 to 9·0)	-49·4 (-54·9 to -43·0)	76 935 (69 650 to 84 654)	8·4 (4·1 to 13·0)	-15·2 (-18·0 to -12·1)
Среден SDI	120 (110 to 132)	-12·2 (-28·7 to 16·0)	-38·4 (-49·5 to -19·4)	91 375 (82 505 to 100 370)	8·3 (4·2 to 12·6)	-14·5 (-16·3 to -12·3)
Нисък-среден SDI	159 (136 to 186)	-40·5 (-61·4 to 19·0)	-69·6 (-81·3 to -32·9)	90 605 (79 887 to 101 371)	28·9 (24·6 to 33·4)	-18·4 (-20·7 to -15·9)
Нисък SDI	41 (34 to 51)	22·1 (2·1 to 55·4)	-54·3 (-63·9 to -38·3)	35 011 (30 065 to 40 255)	94·8 (86·2 to 106·1)	-7·3 (-11·2 to -3·0)

Данните в скоби са 95% интервали на несигурност. SDI се изчислява за всяко местоположение (всички 188 държави, седем територии и 519 поднационални местоположения, оценени от GBD 2015). SDI от 0 представлява най-ниското ниво на доход на глава от населението, образователно равнище и най-висока фертилност, наблюдаван от 1980 г. до 2015 г., а SDI от 1 представлява най-високият доход на глава от населението, образователното равнище и най-ниската фертилност с ефект върху здравето през същия период. Граничните стойности на SDI скалата за квинтилите са избрани въз основа на техните стойности за 2015 по местоположение. SDI:социално-демографски индекс.

Табл.1 Данни за честотата и смъртността на БА през 2015 г. и тяхната динамика при сравнение с данните от 1990 г. в световен мащаб и при сравнение според социално-демографски индекс (403).

От 2006 г. динамиката в глобалната смъртност от БА се задържа сравнително постоянна (110). През 2014 г. кралският колеж в Лондон провежда проучване (NRAD, n=195) за характеристиката на пациентите, при които е настъпила смърт вследствие на БА (239). Данните сочат, че 47% от починалите имат история за предходна

хоспитализация по повод екзацербация на БА, 10% са починали 28 дни след изписване от болницата, а 45% са починали преди да успеят да потърсят медицинска помощ. Разпределението на починалите пациенти според тежестта на БА е както следва: 39% - тежка астма (ТА), 58% - лека (ЛБА) и средно тежка астма (СТА), но е много вероятно пациентите определени, като такива с ЛБА или СТА, да са с неконтролирана болест на фона на провежданото лечение. Тревожни са данните, че 39% от починалите пациенти са използвали над 12 флакона краткодействащ бета-2 агонист (КДБА) през последната година, при 4 % има данни за употреба на над 50 флакона КДБА, а 57% от починалите не са били под постоянно медицинско наблюдение през последните 12 месеца (239).

2.2. Контрол на бронхиалната астма

При голяма част от пациентите не може да се постигне контрол на БА. Това води до повишен риск от тежки екзацербации, прогресивна загуба на белодробна функция, лошо качество на живот и неработоспособност (162). Освен това разходите в здравната система са пряко свързани с нивото на контрол. Разходите необходими за неконтролирани пациенти са повече от два пъти по-високи от разходите за контролираните пациенти (14 212 щатски долара срещу 6 452, P <0.0001) (409). Тези резултати са потвърдени в скорошен доклад на Chapman и сътр. при 10 500 пациента с БА от амбулаторната практика в Канада (75).

Проучването AIRE е първото многоцентрово проучване, което оценява нивото на контрол на БА в Европа (341). При над 2 800 пациента от седем Европейски страни (Франция, Германия, Италия, Нидерландия, Испания, Швеция и Великобритания) са проведени телефонни интервюта чрез структуриран въпросник. Резултатите показват, че 46% от пациентите са с дневни симптоми и 30% имат нарушения на съня поне веднъж седмично. В последната година на проучването 25% са имали непланирани посещения при лекар, 10% са имали едно или повече посещения на спешен център, а 7% са били хоспитализирани. Само 5.3% от изследваното население отговаря на всички критерии за контрол заложени в препоръките на Глобалната Инициатива за Астма (GINA).

Резултатите от голямо проучване проведено в 11 Европейски страни (REALISE 2014, n=8 000) показват, че 45% от пациентите остават с неконтролирана БА, 34.8% - с частично контролирана БА, а 44% са приемали орални кортикостероиди (ОКС) по повод остра екзацербация през последната една година. Повече от 80% от болните, въпреки ежедневните симптоми смятат своето заболяване за контролирано (333).

Според Demoly и сътр. 54% от пациентите са с лош контрол на заболяването (96). Контролът на БА е анализиран в редица проучвания, като неконтролираната бронхиална БА се среща с честота вариращa от 35-82% според изследваната популация и използваните методи за оценка (Табл.2).

Проучване	Държави	Участници	Възраст	Неконтролирана БА, %	Персистиращи симптоми	Употреба на медикамент при нужда
Braido и сътр. (2016)(54)	12	8 111	≥ 18	38.5% ACQ	-	-
Price и сътр. (REALISE 2014)(333)	11	8 000	18-50	45%	79.7% (≥1 ден през последните 7 дни)	68.9% (≥1 ден през последните 7 дни)
Fletcher и сътр. (2013)(122)	1	1 083	≥ 18	-	65%	41% (≥1 на ден)
Demoly и сътр. (2012)(96)	5	3 848	≥ 18	54%	-	Около 75% > 2 пъти седмично
Partridge и сътр. (2011)(302)	5	1 022	≥ 18	38% ACQ >1.5	-	58% (>1-2 повечето дни)
EUCAN AIM (2010)(286)	6	2 420	12-17 и ≥ 18	12-35% оценка на пациента	13-29% (през един или повече дни / 4 седмици)	31-56% (>1 употреба седмично, последната 1г.)
Bellamy и сътр. (2005)(42)	7	802	≥ 16	82%	74% (през последните 8 седмици)	62% (>1 употреба през последните 8 седмици)
Haughney и сътр. (2004)(166)	1	517	14-65	-	66% (>2 пъти седмично)	32% ежедневно
Rabe и сътр. (2004)(340)	7	2 803	Деца и възрастни	-	56% (през последните 4 седмици)	-

Табл.2 Контрол на БА – мета-анализ.

Резултати от Европейското проучване за национално здраве (97), проведено с цел оценка нивото на контрол на БА, 10 години след публикуване препоръките на GINA в пет Европейски страни (Франция, Германия, Италия, Испания, Испания и Великобритания) показват, че около 80% от болните с БА се лекуват и въпреки това 50% остават недобре контролирани. Неконтролираните пациенти са по-възрастни, имат по-ниско образование и са по-често със затлъстяване, депресия и тютюнопушене. Проучването PRISMA (19) е проектирано да оцени нивото на контрол на БА в реалния живот. Общо 2 853 възрастни пациентите са включени от 56 центъра на Италия, като

64.4% от пациентите са имали контролирана БА, 15.8% частично контролира, а 19.8% неконтролирана. Броят на пациентите, нуждаещи се от хоспитализация или непланирани посещения е по-нисък при контролираните (1.8% и 1.6% респективно), отколкото при частично контролираните (5.1% и 11.5%) и неконтролирани пациенти (6.4% и 18.6%). Основните причини за липсата на контрол са съпътстващи заболявания 36.2%, продължително излагане на алергени и тригери 34% и недостатъчно придържане към лечението при 27%.

Причините за недобрия контрол на заболяването могат да бъдат обобщени в две категории: клинични (тежест, коморбидности, експозиция на алергени, неадекватна терапия и др.) и поведенчески (лошо придържане, неправилна техника, пасивно и активно тютюнопушене и др.)(54).

Отчитат се несъответствия в честотата на неконтролирана БА и характеристиките на изследваните популации в рандомизирани-контролирани (RCT) и обсервационни проучвания. Това се дължи най-вече на ограничителните критерии в методологията на проучванията, което води до изследвани на високо селектирана популация пациенти с БА. Често в RCT участват по-малко то 5% от пациентите лекувани в рутинната практика, като се прилага по-строг контрол върху единичните субекти участващи в проучването (171). Обратно, проучванията "в реалния живот" включват по-големи и по-разнообразни групи пациенти с/без съпътстващи заболявания и вредни навици, различни нива на придържане към лечението и с различни подходи при лечението в зависимост от фактори, като лекуващ лекар, наличието на здравни ресурси или обучението на пациента (357).

През 1999 г. Я. Иванов (3) провежда за пръв път в България фармакоикономичен анализ, като доказва, че системното наблюдение, лечение и обучение водят до намаление на общата цена за заболяването 1.5 пъти.

Въпросници за оценка на контрола на БА

Основните стратегии за оценка контрола на БА включват клинична оценка на симптомите, измерване на белодробната функция и риска от настъпване на нежелани събития, като екзацербации, фиксирана бронхиална обструкция и нежелани лекарствени реакции (352). През годините се утвърдиха четири въпроса приети от GINA (139) за оценка контрола на БА – наличие на дневни симптоми повече от два

пъти седмично, нощни събуждания поради астма, употреба на медикамент при нужда повече от два пъти седмично, ограничена активност поради БА.

През 1999 Juniper и сътр. разработват и валидират въпросник със 7 въпроса за оценка контрола на БА (ACQ7) (199). ACQ има много силни характеристики за оценка контрола на БА, както в крос-секционни така и в клинични проучвания (199). Точката на пресичане между „добре контролирана“ и „ неконтролирана“ БА е резултат за ACQ близо до 1.00. Оптималната точка за добър контрол е 0.75 (отрицателна прогнозна стойност = 0.85), а за неконтролирана БА е 1.50 (положителна прогнозна стойност = 0.88) (198). Стойностите между тези два резултата се явяват така наречената „сива зона“ (198). Съкратени версии (ACQ5; ACQ6) са с подобни на ACQ7 възможности за оценка на контрола (198, 200) и могат да бъдат подходящи за употреба в първичната медицинска помощ (111). Sastre и сътр. определят ACQ като прецизен инструмент в реалния живот и анализират различна гранична стойност за трите версии на въпросника. Оптималната гранична точка, за разграничаване на пациентите с добре контролирана БА от неконтролирана, е резултат от 1.14 - по-нисък от предложения от Juniper (368).

Ретроспективен анализ на O'Byrne и сътр. (293) сравнява контрола на БА оценен чрез ACQ-5, насоките на GINA или критериите за оптимален контрол на астмата (GOAL) при 8 188 пациента с БА. Оценката на контрола чрез GINA и GOAL са сходни по отношение на ACQ оценките. Този анализ показа, че за всички версии на ACQ точката на пресичане между добре контролирани и не добре контролирани е близо до 1.00. По-точно, ако пациентът има оценка ACQ от 0.75 или по-малко, има 85% вероятност БА да е добре контролирана и ако пациентът има ACQ от 1.50 или по-голяма, има 88% вероятност БА да не е добре контролирана (198).

През 2004 год. Nathan и сътр. представят разработването на астма контрол теста (ACT), съдържащ 5 въпроса, селектирани след провеждане на регресионен анализ (287). Резултатите показват, че ACT е клинично валиден и полезен метод при оценката контрола на БА в различни популации. Schatz и сътр. оценят надеждността и валидността на ACT и способността му да отчита промените в контрола на БА с течение на времето (373). Способността на ACT да отразява контрола корелира с оценката на специалиста, с резултата от ACQ и ФЕО1. Резултатът за ACT $\leq$ 19 осигурява оптимален баланс от сензитивност (71%) и специфичност (71%) за откриване на неконтролирана БА (373). В крос-секционно проучване се оцени възможността на

ACT да предскаже GINA дефинирания контрол на астмата, с особен акцент върху бинарното разделение между GINA определените групи за “частично контролирана” и “неконтролирана” БА срещу “контролирана”. Почти 3 000 пациента, посещаващи лекари и специалисти от първична медицинска помощ във Франция, Германия, Италия, Испания, Великобритания и САЩ участват в проучването (424). ACT < 19 правилно прогнозира GINA "частично контролирана" или "неконтролирана" БА в 94%, а ACT > 20 предсказва GINA-дефинирана контролирана БА в 51%. Miedinger и сътр. (270) (n=1 093) от друга страна докладват, че ACT ≤17 най-добре идентифицира неконтролирана БА съгласно насоките на GINA.

Korn и сътр. установяват, че ACT (гранична стойност 19) и ACQ7 (гранична стойност 1.50) в реалната практика имат способност да прогнозират GINA-неконтролирана БА в 80.7% (чувствителност 94%, специфичност 70%) и 71.3% (чувствителност 88%, специфичност 57%), съответно (221). Korn и сътр. предлагат резултат за ACQ5 ≥ 1.90 и ACT ≤ 16, като гранични за неконтролирана БА в реалния живот при пациенти с СТА и ТА (221).

Въпреки, че и ACT и ACQ имат добра диагностична ефективност при оценката на контролирана и недобре контролирана БА, тяхната приложимост се различава както в клиничните изследвания, така и в клиничната практика (191).

Jia и сътр.(191) провеждат мета-анализ на 21 проучвания с 11 141 участници, оценени с ACT и 12 483 оценени с ACQ. Те докладват добра диагностична точност на ACT за оценка на контролирана и недобре контролирана БА, а ACQ (ACQ-7 и ACQ-6) има по-добра диагностична точност за оценка на недобре контролирана БА. Въпреки това ACT се представя незадоволително при дефинирането на неконтролирана АБ с AUC 0.69, докато граничната стойност при определяне на неконтролирана БА за ACQ е неопределена. Допълнителни потенциални фактори, като тежест на БА, възраст, измерване на белодробната функция, дизайн на проучването, начин на попълване на въпросниците могат да повлияят диагностичната точност на тестовете.

2.3. Екзацербации

Всички препоръки за лечение на БА са насочени към своевременно идентифициране и предотвратяване настъпването на екзацербации, които са критичен фактор за оценка степента на контрол на заболяването. Може да се твърди, че екзацербациите са най-значимият фактор, който трябва да бъде повлиян, тъй като те

водят до висок риск от настъпване на нежелани събития и предизвикват повишени разходи в системата на здравеопазване (352). Екзацербациите се срещат по-често при пациентите с ТА и увеличават риска от настъпване на смърт. Дори при пациенти, за които се смята, че имат ЛБА, честотата на тежките екзацербации е много по-висока от очакваното (352).

За тежка екзацербация е прието да се говори при събитие свързано с изява на симптоми, които водят до употреба на СКС (таблетки, суспензии или инжекции) или увеличаване на стабилната поддържаща доза за най-малко 3 последователни дни. СКС курсове отдалечени помежду си от една или повече седмици, трябва да се третират, като отделни тежки екзацербации. Хоспитализация или посещение на спешен център поради симптоми на БА, наложило приложение на КС също се приема, като епизод на тежка екзацербация (352). През 2000 год. в САЩ екзацербациите на БА са довели до 2.9 билиона долара разходи(106).

Suruki и сътр. анализират честотата на екзацербациите в голяма кохорта пациенти от САЩ и Англия (n=222 817 и n=211 807). Те установяват, че 12.5 и 8.4% от тези популации изпитват една или повече от 1 екзацербация за периода на проследяване, като честотата на екзацербациите нараства с тежестта на заболяването (410). Schatz и сътр. анализират честотата и рисковите фактори за настъпване на екзацербация в голяма кохорта от 2 543 възрастни пациенти с персистираща БА на фона на интензивна поддържаща терапия с висока доза инхалаторни кортикостероиди (ИКС) и дългодействащ бета-2 агонист (ДДБА). Те установяват, че въпреки терапията има незначително повлияване в честотата на екзацербациите (28% на 25%) (371). Я. Иванов и сътр. представиха данни за честотата на екзацербациите на БА в България. Те проследяват 540 пациента и установяват, че при 56% от тях е настъпила поне 1 екзацербация през последната година, а 24.6% са били с две и повече екзацербации (183). Те установяват, че важни фактори допринасящи за екзацербациите са високата употребата на КДБА, тютюнопушенето и коморбидностите (183).

Рискови фактори, докладвани в литературата за настъпване на чести екзацербации са неконтролираната БА (163), висока употреба на КДБА (183, 304), неадекватен прием на ИКС (268), нисък ФЕО1 (282, 299), висока реверзибилност (329), персистираща експозиция на вредности (183, 299), съпътстващи коморбидности (183, 420). През последните години се установиха, като рискови фактори и повишението на FeNO при възрастни пациенти с алергична БА (472), както и еозинофилията в спутум и периферна

кръв (146, 213, 471). Пациентите, които са имали една или повече от една екзацербация през последната година остават също с повишен риск за възникване на нова екзацербация (273).

2.4. Тютюнопушене и коморбидности

Тютюнопушене

Честотата на тютюнопушенето при БА е подобна на тази в общата популация, около 20-25% (73, 445). Експозицията на цигарен дим е доказал се рисков фактор за развитие на БА (25, 123, 323, 429), като може да бъде и причина за развитието на БА при възрастни с алергични реакции (325). При алергични индивиди постоянното излагане на цигарен дим и алерген в комбинация може да има комплексни ефекти върху адаптивните и вродени имунни отговори, водещи до специфични астматични възпалителни ендотипове. Проучванията върху хора и животни показват, че полиароматните въглеводороди, имат способността да предизвикват алергични имунни отговори и повишават Th2 медиирания възпален отговор (101, 326). Постоянното излагане на цигарен дим не само засилва алергичното възпаление, но предизвиква и Th1-медиирани възпалителни реакции (49). Смесеният Th1/Th2 възпалителен отговор е ключово събитие в процеса на развитие на по-тежък фенотип на БА. Животински модели, сенсибилизирани към дом прах, демонстрират повишено еозинофилно натрупване в дихателните пътища при експозиция на цигарен дим (48).

Наблюдават се различия в локалния и системен възпалителен отговор при тютюнопушачи, като могат да се дефинират различни подгрупи в зависимост от доминиращия клетъчен тип (219, 387). Пушачите с БА са изложени на риск от развитие на по-тежки симптоми, по-висока честота на екзацербации и по-лошо качество на живот при БА (112, 426). Тютюнопушенето и неговата продължителност са силно свързани в дозо-зависим начин с тежестта на БА(327). Най-силната връзка с тежестта на заболяването се наблюдава при пациенти с тютюнопушене > 20 пакетогодини. Контролът на БА също е силно зависим от честотата на експозиция на тютюнев дим (327). Скоростта на намаляване на белодробната функция се ускорява при пушачи с БА в сравнение с непушачите (425), въпреки че има и няколко противоречиви в тази насока изследвания (157, 404) При тези пациенти чувствителността към ефектите на КС е редуцирана (76, 234).

Алергичен ринит

Епидемиологични и патофизиологични данни доказват, че алергичния ринит и БА често се срещат, като съпътстващи заболявания при възрастни и при деца. Двете заболявания могат да бъдат считани за различни прояви на едно и също възпалително състояние. Приблизително 20-60% от пациентите с ринит имат БА, докато > 80% от пациентите с алергична БА имат съпътстващи симптоми на ринит (369). Въз основа на класификация на работната група, изучаваща алергичния ринит и неговото въздействие върху БА (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma - ARIA), около една трета от всички пациенти с алергичен ринит имат персистиращи симптоми. Ролята на хроничния ринит трябва да се вземе под внимание при лечението и профилактиката на БА. Тази концепция е ясно демонстрирана от ARIA (50).

Както тежестта, така и продължителността на симптомите от горни дихателни пътища (ГДП) са важни фактори за контрола на БА (436). Рискът от неконтролирана БА е по-висок (2.61, $p < 0.001$) при пациенти с умерени/тежки симптоми, в сравнение с тези с леки симптоми, както и при персистиращи симптоми в сравнение с интермитентна изява [(OR: 1.97), $p<0.001$)].

В моделите на логистична регресия, сред пациентите, страдащи от ТА, умереният/тежък ринит е силен предиктор за загуба на контрола и екзацербации (331).

Аспирин-изострено респираторно заболяване (AERD) е клиничен синдром, свързан с проява на СТА и ТА с чести екзацербации и изява около 3-та и 4-та декада, назална полипоза, хроничен, еозинофилен, хипертрофичен синуит и лекарствена чувствителност към инхибитори на циклооксигеназа-1 (COX-1), а именно аспирин и други нестероидни, противовъзпалителни средства (НСПВС) (116). Клиничният синдром е описан за пръв път през 1922 от Widal и сътр.(458), а по-късно през 1968 Samter и Beers популяризират синдрома като „триада на Samter“(366). През последните години се използва термина: аспирин-изострено респираторно заболяване (AERD). AERD засяга 0.3-0.9% от общата популация (237). Отчитат се вариации в честотата на AERD между 5.5 и 12.4% при БА, докато при ТА честотата почти се удвоява до 14.9% (346). При пациентите с носна полипоза и хроничен риносинуит честотата е средно 9.69 и 8.70% (346). Поради известната патогенеза, свързана с действието на COX1 инхибиторите и повишена продукция на цистеинил левкотриени и експресия на левкотриен С4-синтетаза, AERD се приема за не-атопично състояние. Въпреки това при 34-66% от пациентите с AERD могат да бъдат установени позитивни КАП или

специфични IgE антитела (116), като се предполага, че AERD може да се развие независимо от атопичния статус на пациентите. Известно е, че заболяването прогресира и персистира въпреки липсата на употреба на провокиращите медикаменти. Установява се висока еозинофилия в назалните полипи, спутум и кръв при тези пациенти (236), което предполага включване на допълнителни патогенетични пътища, свързани с повишен вроден имунен отговор и освобождаване на IL-33 и тимичен стромален лимфопоетин (TSLP) (участващи в каскадата на тип 2 имунния отговор) от епителните клетки на дихателните пътища (62, 247). В подкрепа на тези данни са и резултати от повлияване на клиничната симптоматика след приложение на таргетни терапии насочени срещу IgE и IL-5 (207, 236).

Затлъстяване

Честотата на БА е почти двойно по-висока при пациентите със затлъстяване (359). Освен това по-висок процент пациенти с ТА са със затлъстяване (49.4 - 69.3%) (266, 370). Затлъстяването е рисков фактор за развитие на БА. Проспективно, кохортно, 11-годишно проучване (n=23 191) установи, че метаболитният синдром е показал коефициент за развиване на БА 1.57 (95% CI, 1.31-187) (58). Автори на проучване проведено в Швеция докладват, че ИТМ между 25.0-29.9 независимо увеличава риска от развитие на БА приблизително 2 пъти, докато ИТМ ≥ 30 повишава риска за развитие на БА с 2.7 пъти (95% CI, 1.5-4.7) (359). Сред 2 559 пациента с тежка степен на затлъстяване (ИТМ > 60), честотата на БА е 32.7% (230). Пациентите с БА и затлъстяване имат по-ниски ФЕО1 и ФВК, свързани с рестриктивния тип нарушение на белодробната функция. Тези от тях с висок FeNO в допълнение имат по-силно изразена съпътстваща бронхиална обструкция. (204). Повишеният риск от БА сред пациентите със затлъстяване не зависи от атопичния статус (359). Тези данни показват, че затлъстяването може да има уникални механизми, които не само могат да влошат заболяването, но могат и да го причинят.

Гастро-езофагеална рефлуксна болест (ГЕРБ)

За клинична изява на ГЕРБ съобщават 80% от пациентите с БА, докато доказана с pH-метрия ГЕРБ се среща при 38% (259). ГЕРБ може да допринесе за влошаване на контрола и е потенциален рисков фактор за чести екзацербации. Честотата на ГЕРБ е по-висока при пациентите с „трудно контролирана" БА, отколкото при пациенти с добре контролирана БА (459). Liang и сътр. (241) използват мултивариационен логистичен регресионен анализ за установяване на независимата асоциация на ГЕРБ с

недобре контролирана БА (коефициент на вероятност, 3.12; 95% доверителен интервал, 1.53–4.88). В противоречие с тези данни е проучване, включващо 402 пациенти с БА, при което е установено, че ГЕРБ не е свързан с контрола на БА при пациенти със затлъстяване, но обструктивната сънна апнея, която се наблюдава по-често при тези пациенти се асоциира с по-лош контрол (104)

2.5. Тежест

Тежестта на БА се определя според интензивността на лечението, необходимо за постигане на добър контрол над симптомите и екзацербациите (352). Тежестта на БА може да се изменя във времето, като е много важно да се разграничи ТА от неконтролирана БА. Много пациенти с неконтролирана БА могат да бъдат трудно лекувани в резултат на избор на неподходяща терапия, проблеми с придържането към лечението или нелекувани и резистентни на лечание коморбидности.

Първа стъпка при идентифицирането на пациенти с ТА е потвърждение на диагнозата и определяне на реалното, терапевтично ниво, осигуряващо контрол на заболяването. Преди да се предприемат допълнителни, терапевтични стратегии, съпътстващите заболявания трябва да бъдат лекувани, персистиращите тригери - премахнати, а придържането на пациентите към лечението, следва да бъде оптимизирано. Заболявания с подобна на БА клинична симптоматика следва да се диагностицират след снемане на подробна анамнеза и провеждане на допълнителни изследвания (82).

През 2010 год. от Световната Здравна Организация (СЗО) въвежда класификация на БА в три групи, всяка от които носи различно послание и предизвикателство за общественото здраве (52). ТА е определена, като неконтролирана БА, която може да доведе до риск от чести, тежки екзацербации, нежелани реакции от лечението и развитие на фиксирана бронхиална обструкция (Табл.3)(52).

Група по СЗО	Име	Пояснение
I	Не лекувана	Неконтролирана, още не лекувана
II	Трудна за лечение БА	Неконтролирана поради неадекватно придържане към терапията, персистиращи тригери и коморбидности
III	Резистентна на терапия	Неконтролирана въпреки максималната терапия или контрола може да се задържи само с максимална терапия

Табл.3 Класификация на ТА според препоръките на СЗО (52)

Според GINA (140) ЛБА е тази, която е добре контролирана на стъпка 1 или стъпка 2 от лечението, т.е. при необходимост прилагане на спасителен медикамент или в комбинация с ниска доза контролиращи медикаменти – ниски дози ИКС, левкотриенови рецепторни антагонисти (ЛТРА) и др. СТА е добре контролирана на стъпка 3 от лечението, т.е. с ниска доза ИКС/ДДБА. ТА е тази, която изисква лечение от стъпки 4 или 5, т.е. високи дози ИКС/ДДБА, за да се предотврати превръщането ù в неконтролирана или БА, която остава неконтролирана, въпреки това лечение.

В последната редакция на GINA 2019 (140) настъпи корекция в стъпките на лечение. Според GINA 2019, стъпка 4 отговаря на терапия със средно висока доза ИКС и ДДБА или друг контролиращ медикамент, или монотерапия с висока доза ИКС, за разлика от GINA 2018 (139), където в стъпка 4 пациентите провеждаха лечение със средно висока или висока доза ИКС и ДДБА или друг съпътстващ медикамент, а монотерапията с висока доза ИКС отговаряше на стъпка 3 в лечението. В GINA 2019 пациентите на висока доза ИКС и ДДБА са селектирани в стъпка 5.

В ревизираната версия на GINA 2019 (140) е въведена нова част, в която се обсъжда поведението при трудна за лечение БА и ТА. Там са въведени са следните дефиниции:

- Неконтролирана БА включва лош контрол на симптомите и/или чести екзацербации (≥2/год.), изискващи ОКС или тежка екзацербация (≥1/год), налагаща хоспитализация.

- Трудна за лечение БА е тази, която остава неконтролирана, въпреки лечение от стъпка 4 или 5 (т.е. средна или висока доза ИКС с втори контролиращ медикамент или поддържане с ОКС) или изисква това лечение, за да остане контролирана.

- ТА е подгрупа на трудната за лечение БА, което означава, че е неконтролирана или става неконтролирана при опит за деескалиране на високата доза КС, въпреки доброто придържане и максимално оптимизираната терапия за съпътстващите фактори.

В литературата се използва допълнителна терминология при изследване на пациенти с ТА (39), като:

Стероид-зависима ТА: ТА, която изисква ежедневни СКС за контрол на симптоми и предотвратяване на екзацербациите. Въпреки постигането на краткосрочен контрол, тези пациенти са във висок риск от развитие на нежелани лекарствени реакции в дългосрочен план.

Стероид-резистентна ТА: Неконтролирана ТА, въпреки високите дози СКС, ежедневен контрол не се постига и рискът от екзацербации персистира.

Американското Торакално Дружество (ATS) публикува първата изчерпателна дефиниция за ТА, която бе приета и от Европейското Респираторно Дружество (ERS) и през април 2014 г. работна група на ERS и ATS изготви документ с инструкции за дефиниране, диагностика, поведение и лечение на ТА (82).

ТА според дефиницията на ATS/ERS 2014, изисква лечение с висока доза ИКС и допълнителен контролиращ медикамент (ДДБА, Montelukast, Theophylline), и/или използването на ОКС над 6 месеца през последната една година (стъпка 4, 5 според GINA 2014), за да се предотврати загубата на контрол или остава неконтролирана, въпреки това лечение (82).

Критерии за неконтролирана БА според препоръките на ERS/ATS 2014 са:

- ACT< 20 или ACQ > 1.5, или лош контрол на симптомите според утвърдени ръководства (GINA)

- Поне 2 тежки екзацербации, налагащи провеждане на курс със СКС за повече от 3 последователни дни през последните 12 месеца

- Поне 1 екзацербация, налагаща хоспитализация или механична вентилация през последните 12 месеца

- ФЕО1 < 80% (ФЕО1/ФВК под нормалните стойности)

Липсват достатъчно епидемиологични данни, но се смята, че ТА засяга приблизително от 5-10% от пациентите с БА (82). Тежката, рефрактерна БА се наблюдава в значително по-нисък процент.

Холандско проучване проведено през 2015 г. е първото, в което се цели да се определи честотата на трудната за лечение БА и тежка рефректерна БА в добре документирана база данни (170). Авторите установяват, че 24% от пациентите с БА провеждат лечение от стъпка 4 и 5 по GINA, 17% са с трудна за лечение БА (стъпка 4 и 5, лош контрол), а 3.7% са с тежка рефрактерна БА (стъпка 4 и 5, лош контрол, добро придържане и инхалаторна техника).

Пациентите с ТА са изложени на риск от чести тежки екзацербации, които водят до загуба на белодробна функция, въпреки провежданата комплексна терапия. Тези пациенти имат влошено качество на живот, употребяват повече медикаменти и

консумират над половината от директните и индиректни разходи за БА в системата на здравеопазване. При тях риска от необходимост от спешна медицинска помощ е 15 пъти по-висок при сравнение с ЛБА, а риска от хоспитализация е 20 пъти по-висок.

Неясните, подлежащи, патофизиологични механизми провокираха изследователите за създаване на международни мрежи от специализирани центрове за изучаване на ТА. Атопията отдавна е призната, като рисков фактор, който има най-голямо влияние за появата на персистираща БА, най-вече при БА с ранно начало, особено сенсибилизацията към аероалергени в дома. За разлика от това тя може да се яви, като по-малко важен фактор при пациенти с БА с късно начало, при които фактори като професионални вредности, аспиринова чувствителност, вируси и други вредности биха имали по-силно влияние (422).

Специализирани центрове в девет Европейски страни създадоха през 2003 г. Европейска мрежа за разбиране механизмите на тежката астма (ENFUMOSA) (422). В крос-секционно обсервационно проучване на 163 пациенти с ТА се установи доминиране на женския пол при ТА и доказателства за персистиращо освобождаване на медиатори при намалена асоциация с атопия. Друго интересно откритие в проучването е доминиращата неутрофилия в кръвта и спутума при пациентите с ТА.

През 2011 г. беше създаден международен Европейски изследователски проект U-BIOPRED за събиране на проби и анализ на информация при пациенти с ТА с цел фенотипизиране (40). В кохортата на пациентите с ТА се наблюдаваха по-често коморбидности, като тревожност, депресия, назална полипоза (25%), ГЕРБ (46%) и влошена белодробна функция. В тази група се наблюдава честота на екзацербациите средно 2.5 пъти/година (386).

Американската научна програма за тежка астма (SARP) също открива повишена честота на абнормна белодробна функция, асоциация със симптоми от горни дихателни пътища, персистиращи симптоми и висока утилизация на здравни ресурси при пациентите с ТА (277). Данни от британския национален регистър за тежка астма сочат, че при 93% от пациентите се срещат съпътстващи заболявания, свързани с приемане на СКС (диабет тип II, остеопороза и язвена болест) (414).

Непосрещнатите нужди на пациентите с ТА доведе до разработване на различни подходи за групиране на пациентите в отделни фенотипи според клинични, физиологични, възпалителни, имунологични, молекулярни и генетични характеристики

с цел разработване на индивидуализиран подход при лечението с разработените таргетни биологични терапии.

Тежестта на БА зависи от механизмите поддържащи активността на възпалението при конкретния фенотип.

2.6. Фенотипизиране и клъстерен анализ на БА

Фенотипът отразява видими структурни и функционални характеристики на един организъм, детерминирани от неговия генотип и модулирани от околната среда (453). Фенотипът може да бъде описан чрез употребата на физиологични и патологични биомаркери (352).

Още през 1940 год. Rackemann (342) разграничава два отделни вида БА на така наречените „extrinsic“ или алергична астма и „intrinsic“ или неалергична астма. Той забелязал, че пациентите с неалергична БА обикновено са имали късно начало и по-тежък клиничен ход на заболяването от пациенти с алергична БА. Освен това, жените са по-често засегнати и често симптомите са се проявявали след респираторна инфекция.

Терминологията „extrinsic“ и „intrinsic“ астма е заменена с „алергична“ и „неалергична“ БА в официална декларация на Европейската академия по алергия и клинична имунология през 2001 год. (194). Въпреки, че някой проучвания не намират убедителни различия между алергичната и неалергичната БА по отношение на подлежащия тип възпаление (179), клиничните фенотипове на алергична и неалергична БА са с ясни различия (358). През 1999 год. Wenzel и сътр. описват два отделни субтипа ТА – с и без еозинофилия (456). През 2004 год., Miranda и сътр. (274) предлагат диференциация на БА въз основа на възрастта (с ранно и с късно начало) и наличието на еозинофилия в дихателните пътища. Еозинофилната астма при възрастни е идентифицирана, като отделна подгрупа в голяма кохорта от пациенти с БА в Обединеното кралство през 2008 год. (151).

Wenzel през 2006 година прави класификация на потенциални фенотипни категории БА (453).

<u>Клинични или физиологични фенотипи</u>: определени според тежестта, честотата на екзацербации, дефинирани според хроничната рестрикция, резистентни на терапия, дефинирани според възрастта на начална изява

Фенотипи свързани с тригери: аспирин или НСПВС, Алергени от околната среда, професионални алергени или дразнители, хормонални промени при жените, усилие

Инфламаторни фенотипи: еозинофилен, неутрофилен, „пауси“ гранулоцитен

Simpson и сътр. (396) през 2006 год. идентифицират различни възпалителни фенотипи, базирани на цитологичния профил на спутума, които са в основата на проста класификационна схема: еозинофилна, неутрофилна, смесена (т.е. открити са както неутрофили, така и еозинофили) и „пауси“ гранулоцитна (малко или липсващи гранулоцити) БА.

Anderson и сътр. през 2008 год. (24) предлагат въвеждането на термина ендотип. Ендотипът е субтип на заболяването, дефиниран функционално и патофизиологично чрез молекулярни механизми или чрез отговор към терапията (Фиг.1).



Фиг. 1 Схема за селекция на отделните ендо- и фенотипи на БА (249).

Wenzel дефинира 3 основни стратегии за фенотипна идентификация на подлежащи ендотипи:

1. Употреба на статистически клъстерни подходи
2. Прилагане на „омник“ подхода: изучавайки гените, протеините и метаболитите
3. Оценка на ефекта от таргетна имунна терапия, която би имала ефективност при конкретна биологична характеристика

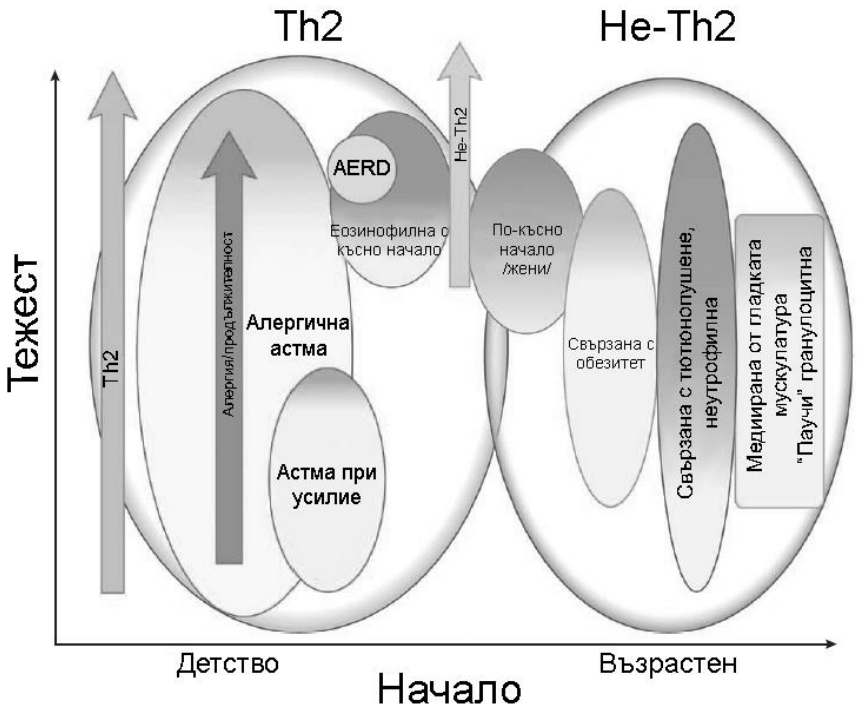
През 2009 г. Woodruff и сътр. (462), базирайки се на специфична генна експресия идентифицират две големи групи БА: Th-2 висока и Th-2 ниска БА.

Развива се идеята за формиране на два ендотипа – Th-2 и не-Th2 БА и 6 фенотипа (454) (Фиг.2):

- Th2 БА: алергична с ранно начало астма, еозинофилна с късно начало, провокирана от усилие БА;

- Не-Th2: свързана със затлъстяване, неутрофилна астма, и астма при пушачи;

По-късно тези две групи биват наречени тип 2 (Т2) висока и тип 2 (Т2) ниска БА или Т2 БА и не-Т2 БА, поради идентифициране на нова клетъчна популация от вродените лимфоидни клетки (innate lymphoid cells - ILC2), които подобно на Th-2 лимфоцитите участват за поддържане на Т2 възпалението (69).



Фиг.2 Теоретично групиране на Th-2 и Не-Th2 дефинираните фенотипи. Превод от (454)

През 2011 год. Lotvall и сътр.(249) от Европейската академия за алергия и клинична имунология приемат консенсуса PRACTICALL и дефинират 6 ендотипа на БА на базата на седем параметъра, представящи различни измерения на БА - клинични характеристики, биомаркери, физиология на белите дробове, генетика, хистопатология, епидемиология и отговор на лечението.

- Причинена от хиперсензитивност към аспирин
- Астма асоциирана с алергична бронхопулмонална микоза
- Алергична БА
- Деца в предучилищна възраст с хриптене и позитивни предиктивни показатели за астма
- Тежка с късно начало, еозинофилна БА
- Астма при ски бегачи

Въпреки това, добре дефинирани патофизиологични механизми и индивидуални биомаркери, разграничаващи предложените ендотипи, не са открити и няма общо съгласие, че тези подтипове БА представляват истински ендотипи (454).

През последните години подходите за фенотипизиране на БА се развиха от субективно експертно мнение към ориентирани към данните методологии, като машинното обучение (336, 337). Статистическите методи за машинно обучение улесняват ефективното проучване на данни за идентифициране и анализ на болестните модели. Тези методи са в състояние да се възползват от широкия спектър от данни, генерирани от кохорти пациенти, за да ги групират и класифицират и да се изработят прогнозни модели. Това е в контраст с традиционните методи, основани на човешко наблюдение и тестване на хипотези, използващи предварително знание. Фенотипизирането на пациентите според една доминираща характеристика може да доведе до грешна представа за ендотипната принадлежност.

Клъстерният анализ е статистически метод, който идентифицира сравнително хомогенни групи от пациенти на базата на избран комплекс от характеристики. Така се дефинират групи от хора въз основа на клинични, физиологични и биологични разлики (или прилики) в отделни клъстери (С) (табл. 4). Индивидите в един клъстер са със силни връзки помежду си и слаби връзки с тези от другите клъстери.

През последното десетилетие бяха включени голям брой пациенти с БА и здрави контроли в три международни програми, за да се изследва и разбере по-добре сложната хетерогенност на БА. Програмите за ендотипизиране на бронхиалната астма с цел персонализирани терапии (ADEPT), изследване на ТА (SARP) и определяне на безпристрастни биомаркери за прогнозиране на респираторните заболявания (U-BIOPRED) използват допълващи се, но различни подходи в опитите за фенотипизиране на заболяването.

Кохорта	Година	Средна възраст	N	Клъстерен метод	Брой клъстери
Haldar и сътр. (151)	2008	49.2 43.4 52.4	184 187 68	PCA и последващо двустъпно клъстериране k-mean анализ	3 4 3
Weatherall и сътр. (451)	2009	25-75	175	Двустъпно клъстериране	5/4
Moore и сътр. SARP (280)	2010	12-80	726	Ward`s йерархичен анализ, Post hoc	5
Baines и сътр. (33)	2011	19-75	72	Йерархичен анализ: Complete linkage	3
Patrawalla и сътр. (305)	2012	18-75	471	Ward`s йерархичен анализ	5
Sutherland и сътр. (411)	2012	37.6	250	Ward`s йерархичен анализ, Post hoc	4
Kim и сътр. (212)	2013	>18	724 1843	Двустъпков анализ: Ward`s йерархичен анализ k-mean анализ	4 4
Kaneko и сътр. (201)	2013	16-84	880	Ward`s йерархичен анализ	6
Lavoie-Charland и сътр. (233)	2013	35.7	377	FA и последващ двустъпков анализ Ward`s йерархичен k-mean анализ	4
Sakagami и сътр. (365)	2013	59.8	86	Ward`s йерархичен анализ	3
Amelink и сътр.(22)	2013	възрастни	200	FA и Ward`s йерархичен анализ k-mean	3
Schatz и сътр. TENOR (370)	2014	>12	3612	Ward`s йерархичен анализ	5
Wu и сътр. SARP (464)	2014	възрастни	378	InfoGain, Markov алгоритъм, k-mean анализ; Ward`s йерархичен анализ	6
Newby и сътр. (290)	2014	възрастни	349	PCA Двустранен клъстерен анализ	5
Loureiro и сътр. (250)	2015	45.6	57	Ward`s йерархичен анализ	5
Loza и сътр. (252) ADEPT/U-BIOPRED	2016	възрастни	156 82/397	PAM	4
Wang и сътр. (447)	2017	възрастни	284	Ward`s йерархичен анализ k-mean анализ	5
Ilmarinen и сътр. (181)	2017	възрастни	171	k-mean анализ	5
Lefaudeux и сътр. (238)	2017	възрастни	266	PAM	4
Schofield и сътр. (378)	2019	възрастни	246	Анализ на топологични данни от спутумен протеом	10
Wu и сътр. SARP	2019	възрастни	346	k-mean анализ	4
Brinkman и сътр. U-BIOPRED (56)	2019	възрастни	78	Ward`s и k-mean анализ на данни на издишани метаболити	3

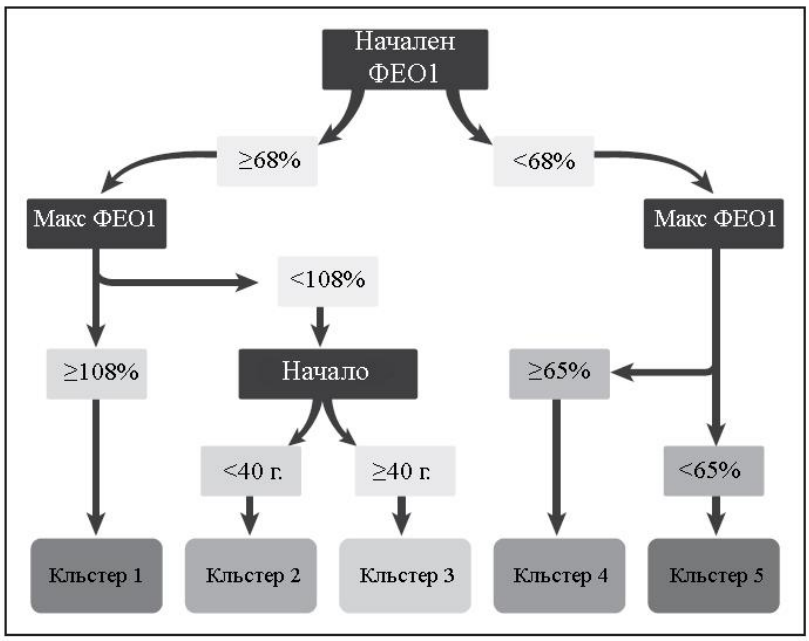
Табл. 4 Клъстерни проучвания при възрастни пациенти с БА. Съкращения: FA – factor analysis (факторен анализ); PCA- principal component analysis (анализ на основни компоненти); PAM- partitioning around medoids (разделяне около медоиди)

През 2008 г. Haldar и сътр. (151) използват клъстерен анализ, за да определят различни фенотипи в популация от 371 пациента с ЛБА до рефрактерна ТА. Те описват три клъстера (С1 – ранно начало, атопична астма, С2 – нееозинофилна астма при затлъстяване, С3 – доброкачествена астма) в първичната медицинска помощ и 4 клъстера (С1 – ранно начало, атопична астма, С2 – нееозинофилна астма при затлъстяване, С3 – ранна астма с много симптоми, С4 – астма с доминиращо възпаление) в специализираната медицинска помощ (фиг.3).



Фиг.3 Клинико-възпалителни фенотипи на БА (151).

Moore и сътр. (280) идентифицират 5 клъстера в програмата за ТА (Severe Asthma Research Program – SARP) (n=726) чрез йерархичен анализ. Анализирани са пациенти с персистираща БА на възраст на или над 12 години. Селектираните 34 вариабилни, обхващат демографски данни, информация за заболяването, клинични и физиологични измервания. Определят С1 с ранно начало, атопична БА и нормална белодробна функция при минимална употреба на контролиращи медикаменти и здравни услуги, С2 – също атопична БА с ранно начало, но с утилизация на повече здравни грижи, С3 – неатопична БА с късно начало, предимно при възрастни жени със затлъстяване с чести екзацербации и среден спад на ФЕО1 и С4, 5 на тежка бронхиална обструкция, но с различна възраст на изява на БА, различен атопичен статус и употреба на орални КС. В този анализ на SARP не е използвана спутумната цитология при идентификация на клъстерите, в контраст с проучването на Haldar и сътр. И в двете проучвания е наблюдавана група на жени със затлъстяване и късно начало на БА по-малко атопични, както и група от тежки атопични астматици с късно начало с лоша белодробна функция. В допълнение Moore и сътр. използват дървовиден анализ основан на три клинични променливи (пред- и пост-бронходилататорен ФЕО1% и възраст на начална изява) за дефиниране на нови 5 клъстера (Фиг. 4). Откриват от 51-87% припокриване между двата метода за клъстериране. Около 20% от случаите са класифицирани във вариабилни клъстери в зависимост от метода.



Фиг.4 Дървовиден клъстерен анализ. Модифицирано то (280)

През 2013 г. Moore и сътр. (278) провеждат допълнителен анализ на клъстерите от SARP, включвайки селекция според спутумен анализ и откриват значима инфламаторна хетерогенност припокриваща клиничната такава. Те използват гранични стойности за спутумни еозинофили ≥ 2% и неутрофили ≥ 40%, за да идентифицират 4 групи на: пауцигранулоцитна, еозинофилна, неутрофилна и смесена БА и установяват, че всеки от четирите инфламаторни фенотипа има почти еднаква изява при всеки един от 5-те клинични клъстера без ясна доминация. Пациентите със смесен еозинофилно/неутрофилен фенотип са с висока честота на фиксирана обструкция и високи симптоми в съответствие на данни докладвани от Hastie и сътр. (165). Клъстерният анализ на SARP идентифицира тежък клъстер, при който белодробна функция е силно намалена, в БАЛ се установява персистиране на еозинофили в комбинация с висок брой неутрофили и издишан азотен окис (464). Тези данни предполагат, че комбинираното еозинофилно/неутрофилно възпаление може да бъде биомаркер на най-тежката форма на заболяването, свързана с резистентност към КС (349).

Няколко години по-късно учените от SARP (464) използват различен подход с включване на 112 променливи и идентифицират шест клъстера на базата на симптоми, атопия, медикаменти, белодробна функция, употреба на КС, маркери за възпаление и демографски показатели. Идентифицирани са 5 клъстера, от които 3 се припокриват с

предишните резултати, а 2 са нови (тежка еозинофилна астма с назални полипи, тежка атопична).

Подобно, през 2014 г. Newby и сътр. (290) намират 5 клъстера при анализ на 349 пациента от британския регистър за ТА (British Thoracic Society Severe Refractory Asthma Registry): С1 - атопични с ранно начало, С2 със затлъстяване и късно начало, С3 с най- тежка форма на БА, С4 - еозинофилна с късно начало и С5 с фиксирана бронхиална обструкция. В проучванията на Haldar, Moore и Newby, тютюнопушачи - настоящи и такива с над 10 пакетогодини в миналото са изключени от участие.

Schatz и сътр. (370) използва клъстерен анализ при 3 612 пациента с тежка и трудна за лечение БА (TENOR), като включват и пушачи. Той идентифицира 5 клъстера. Най-често срещания според него е С1, включващ жени с късно начало на астмата, без аспиринова сензитивност и с ниски IgE антитела. Другите клъстери се различават по изразена атопия (С2), мъжки пол (С3), раса (С4) и аспиринова чувствителност (С5). Подобен на този анализ е проведен и в Португалия при 57 пациента с БА (250).

В U-BIOPRED кохорта на 266 пациента със СТА и ТА при непушачи, бивши и настоящи тютюнопушачи, Lefaudeus и сътр. (238) идентифицират 4 отделни клъстера чрез „омник“ подхода: С1 - Добре контролирана СТА и ТА, нормална функция, ниска спутумна еозинофилия, висока пропорция на атопични пациенти и много малка употреба на ОКС; С2 - ТА, късно начало, пушачи, лош контрол, тежка обструкция, най-висока спутумна и кръвна еозинофилия, ниска пропорция на атопични пациенти; С3 - Подобен на С2, ТА без тютюнопушене с хронична обструкция на въздушния поток, по-висока пропорция атопични пациенти; С4 - затлъстели жени, чести екзацербации, лошо качество на живот, позитивен атопичен статус, лошо качество на живот въпреки нормална функция. FeNO и IgE не се различават в отделните клъстери.

Loza и сътр. (251) също идентифицират 4 отделни клъстера в кохортата от пациенти на ADEPT, като използват следните вариабилни: преФЕО1, преФВК, ФЕО1/ФВК, бронхиална реверзибилност, бронхиална хиперреактивност, ACQ7, въпросник за качество на живот, FeNO, кръвни еозинофили. Характеристиките на клъстерите са следните : С1 - Добре контролирана ЛБА със запазена белодробна функция и нисък, доминиращ Т2 инфламаторен фенотип; С2 – частично контролирана, лека обструкция, но тежка хиперреактивност, еозинофилен, Т2 възпалителен фенотип;

С3 – частично контролирана с лека обструкция, редуциран витален капацитет, слабо изразена бронхиална реверзибилност, Т2 нисък фенотип с неутрофилно възпаление (подобна на ХОББ); С4 – лош контрол, изразена бронхиална обструкция и бронходилататорен отговор и смесен възпалителен фенотип. Те провеждат допълнително клъстерно изследване със същите вариабилни (без оценка на бронхиалната хиперреактивност) и статистически методи при група пациенти от U-BIOPRED и откриват значимо припокриване на установените 4 клъстера между двете кохорти.

Както Haldar и сътр., така и Siroux и сътр.(398) са определили и група с ЛБА при проведените клъстерни проучвания. Групирането, което произтича от тези изследвания потвърждава дългогодишното наблюдение на клиницистите, че БА с ранно начало се асоциира с алергия, докато пациентите с БА с късно начало са с по-изразено намаление на белодробната функция и по-рядко са алергични.

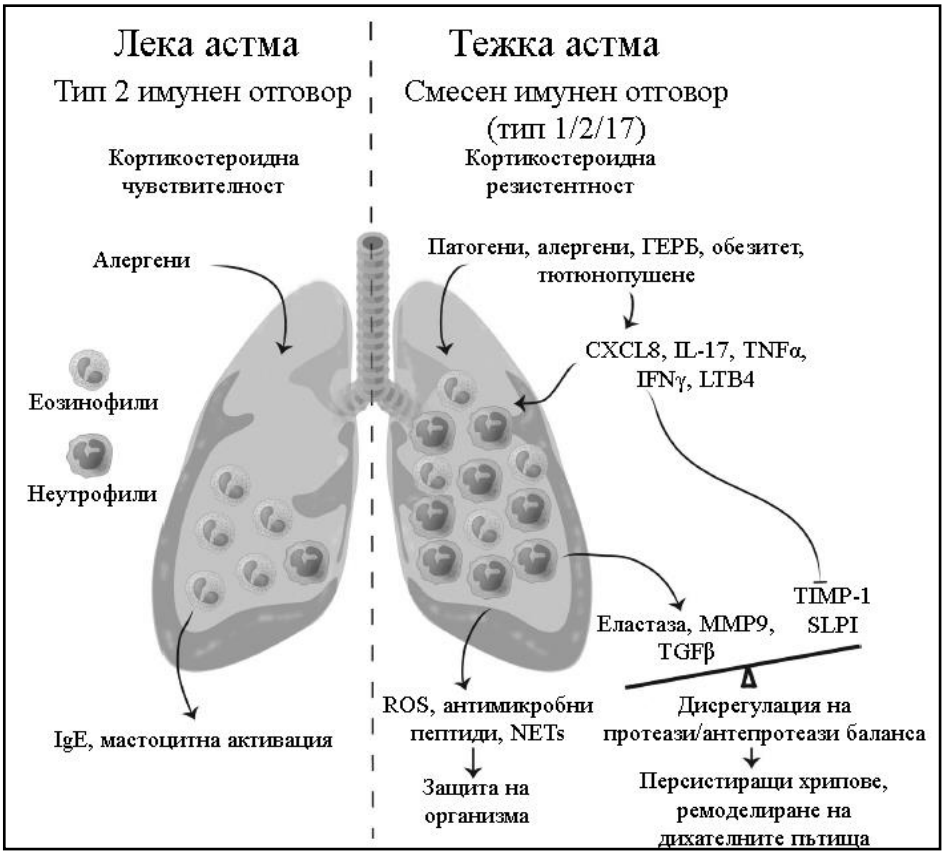
Оказва се, че приблизително 50% от пациентите, независимо дали са диагностицирани с ЛБА или ТА, имат възпалителен отговор от Т2 в техните дихателни пътища (119, 275, 462, 464). При ЛБА възпалителният Т2 отговор обикновено е свързан с ранно начало, атопично/алергично заболяване, докато при ТА, връзката с атопията/алергията е по-малко ясна (277, 386, 422). Въпреки това при по-тежка форма, проучванията на различни терапии, насочени към възпаление Т2, започват да свързват фенотипа на БА с късно начало с цитокинови пътища, традиционно свързани с атопия/алергия (IL- 4 и IL-13) и еозинофилия (IL-5).

Последните проучвания показват наличието на сложен възпалителен процес при ТА, въпреки лечението с високи дози ИКС или СКС.

В кохортата на U-BIOPRED бе предприет подход за изучаване на молекулярните различия на ТА, използвайки анализ на данни от транскриптомиката на спутум, като до момента са идентифицирани три отделни молекулярни фенотипа (238). Първият фенотип се характеризира с имунни рецептори IL33R, CCR3 и TSLPR с обогатени генни сигнатури за IL-13/Th2 и ILC2, свързани с висока еозинофилия. Пациенти от първи фенотип са имали ТА с КС зависимост, чести обостряния и тежка обструкция на въздушния поток. Вторият клъстер се характеризира с интерферони, TNFα и инфламазомно-свързани гени с най-висока неутрофилия и нива на серумен С-реактивен протеин (CRP). Третият фенотип се характеризира с гени на метаболитни пътища,

убиквитиниране и митохондриална функция, „паучи“ възпаление и слаба обструкция на въздушния поток. Този безпристрастен подход на клъстериране установи един Т2-висок и два Т2-нискомолекулни фенотипа.

Възпалителните клетки играят критична роля в патогенезата на БА чрез секреция на цитокини и проинфламаторни молекули. Развива се идеята, че имунен отговор Т2 и асоциираните с него цитокини доминират при ЛБА и СТА, докато при резистентна на лечение ТА, преобладава смесен Т2/Т1 фенотип с компонент на Th17 ангажиране (фиг. 5).



Фиг.5 Активация на имунната система при ТА. Контрастни особености на ЛБА и смесената неутрофилно/еозинофилна ТА (349).

Тип 2 и не-тип 2 имунен отговор при ТА

Класическият път на Т2 имунната реакция е свързан с възникване на персистиращо еозинофилно възпаление, предизвикано от алергени, които влизат в контакт с епителната бариера. Като първа линия на защита, дендритните клетки улавят антигените и предизвикат каскаден отговор след свързване с Т-хелперните клетки в регионалните лимфни възли. В случай на Th2 отговор, CD4 + лимфоцити се превръщат в Th2-клетки и започват производството на каноничните Т2 цитокини - IL-4, IL-5 и IL-13 (173).

Наскоро са разпознати клас клетки, които са липсващата връзка между "алергичния" Th2 отговор и устойчивото, еозинофилно възпаление при пациенти без алергии. Вродените лимфоидни клетки (innate lymphoid cells – ILCs, наричани преди нулоцити) подклас 2 (ILC2s) продуцират големи количества IL-5 и IL-13 (400, 467), което ги прави атрактивен кандидат, регулиращ еозинофилното възпаление (167, 405). Разрушаването на епителната бариера от външни тригери, предизвиква повишена продукцията на епителни алармини - IL-25, IL-33 и на тимичен стромален лимфопоетин (TSLP). Тези цитокини причиняват активация на ILC2 в тъканите, като по този начин се инициира производството на Т2 цитокини [154,155,156]. Продукцията на простагландин D2 и левкотриен E4 от активирани еозинофили и мастоцити може да повиши реактивността на ILC2 клетките, което води до възникването на порочен цикъл (59, 431). Еозинофилията в дихателните пътища при ТА корелира с повишена експресия на CCL хемокини. CCL11 (еотаксин-1) е мощен хемоатрактант за еозинофили, особено при пациенти с ТА (99). Експресията на еотаксин-1 е подчертано подобрена след комбинирано стимулиране с TGF-β1 и IL-4/IL-13, което предполага за наличието на механизми, чрез които еозинофилното възпаление при ТА може да стане самоподдържащ се процес (457).

IL-5 е ключов цитокин за еозинофилния растеж, диференциация, придвижване, активация и оцеляване (145, 390). Хетеродимерния рецептор за IL-5 се смята, че е най-важният цитокинен рецептор, експресиран от еозинофилите (437). Алфа-субединицата (IL-5Rα) е специфична за свързване с IL-5, което води до активиране на сигнална трансдукция в клетката (265). Th-2 клетките, мастоцитите, ILC2, CD34+ прогениторните клетки и самите еозинофили са клетъчният източник на IL-5 (292). Алергенни стимули водят до повишена експресия на IL-5Rα върху плурипотентните CD34+ клетките в костния мозък и се асоциира с еозинофилия в кръвта и спутума.

Еозинофилната диференциация обикновено протича в костния мозък. Въпреки това, прекурсори на еозинофилите са изолирани от периферната кръв на атопични индивиди със значително по-високи концентрации в сравнение с неатопичните контроли. Значително повишен брой CD34+/IL-5Rα+ еозинофилни прекурсори се откриват в бронхиални биопсии на астматици в сравнение с неастматични контроли (както атопични, така и неатопични) (356). Еозинофилните прогенитори, изолирани от кръвта на пациенти с тежка еозинофилна астма, имат изразен клоногенен отговор към IL-5 in vitro, в сравнение с еозинофилни прекурсори на леки астматици, което предполага, че in situ еозинофилопоезата може да има клинично значима роля при тежка еозинофилна БА (382).

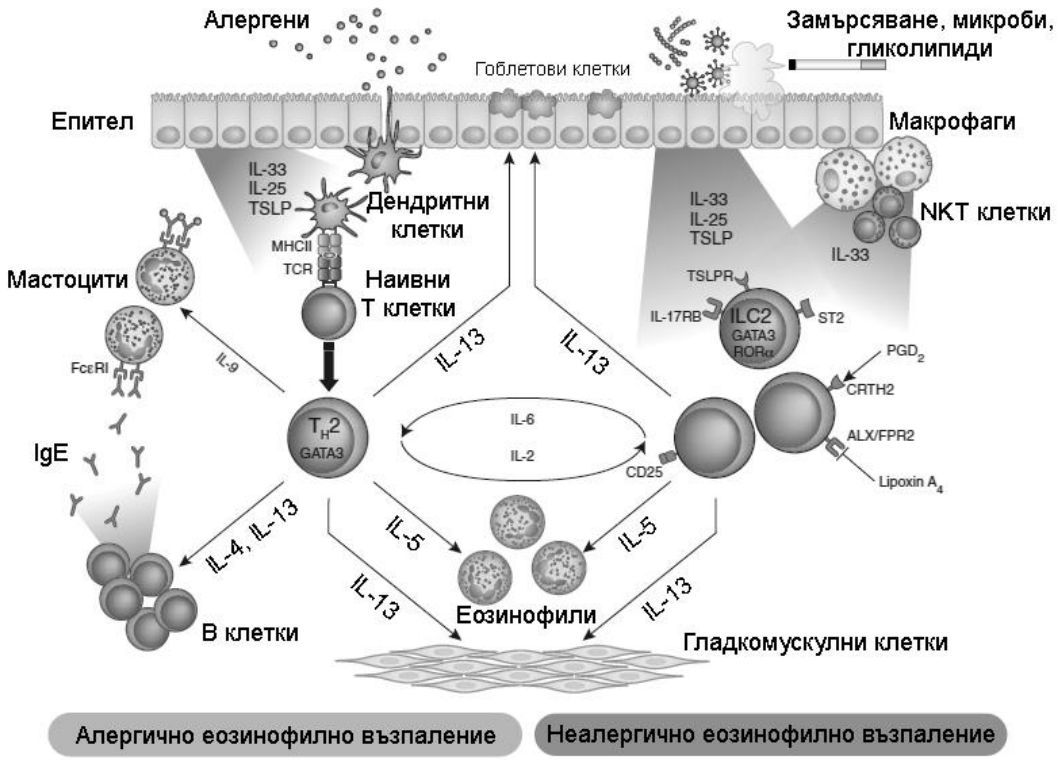
И.Цочева (7) в своя дисертационен труд при деца с БА установява значимо повишение на серумен IL-5 при БА в сравнение със ЗК.

Еозинофилите бързо преминават към апоптоза при липсата на IL-5 (81). Agache и сътр. установяват силна асоциация на серумните нива на IL-5 и IL-13 с еозинофилният фенотип БА (гранична стойност за дефиниране според абсолютния еозинофилен брой в периферна кръв ≥ 350 cells/microL) (14).

IL-13 има различни ефекторни функции. Действието му е свързано със секрецията на друг Т2 интерлевкин – IL-4 (32). Двата медиатора съвместно участват при индуцирането на IgE продукция от плазмоцитите (173). Те осъществяват своите ефекти след активация на хетеродимерен комплекс състоящ се от алфа единица на IL-13 рецептора (IL-13Rα1) и алфа единица на IL-4 рецептора (IL-4Rα) (295). Афинитетът за свързване на IL-13 към рецептора се повишава в присъствието на IL-4 (232). IL-13 стимулира епителните клетки в дихателните пътища за продукция на iNOS и мукусна секреция (78). Той играе важна роля в ремоделирането на дихателните пътища чрез стимулирана хиперплазия на гоблетовите клетки, трансформация на бронхиалните фибробласти в миофибробласти, усилване на контрактилитета и усилена депозиция на екстрацелуларен колаген (30, 86, 260). Пациентите с БА демонстрират повишение в нивата на IL-4 и IL-13 в спутума, серум, лигавицата на дихателните пътища и БАЛ (14, 44, 254, 335, 363, 438, 446). Наблюдава се връзка между нивата на IL-13 в спутума и/или серумната му концентрация, с тежестта на БА (363). Бързата промяна на нивата му в серума, обаче го прави несигурен маркер (260).

Т2 ТА може да се раздели на поне два главни фенотипа. Първият фенотип е свързан с ранно начало на заболяването, често асоциирано с атопични/алергични

състояния и по-високи нива на IgE, но по-рядко с тежка еозинофилия. Вторият фенотип - с късно начало на БА (обикновено след 20 годишна възраст) е по-слабо асоцииран с атопия, но с впечатляващо локално и системно еозинофилно възпаление (150, 274). Въпреки, че и двата фенотипа са свързани с белодробна еозинофилия, механизмите, по които тя възниква може да се различават (Фиг.6) (59).



Фиг.6 Два различи патогенетични механизми за развитие на еозинофилно възпаление. Модифицирано от (59).

Алергичната БА е най-добре разпознаваемият фенотип, който обичайно е с ранно начало – още в детска възраст, предимно при мъже с фамилна обремененост. Асоциира се с алергични заболявания, като дерматит, ринит, хранителна или лекарствена алергия. Изследването на спутум при тези пациенти също често разкрива еозинофилно възпаление, което по-добре отговаря на ИКС (139).

Фенотипите на атопична и неатопична БА се формират според данните за присъствие или липса на положителен кожен тест (КАП) или специфични имуноглобулин Е (sIgE) антитела срещу инхалаторни алергени. Въпреки това, самото присъствие на атопия не може да се използва за разделяне на пациенти с БА на алергичен и неалергичен фенотип (284). Необходима е оценка на клиничната значимост на проявената алергична реакция. При потвърден атопичен статус се предполага IgE

медииран механизъм за развитие на БА, но не-IgE медиирани пътища поддържащи възпалението също могат да участват във възпалението (284).

Проучвания с бронхиални биопсии при атопична и неатопична БА, доказват инфилтрация на бронхиалната стена с еозинофили, клетки с висок афинитет на IgE рецептор и повишена експресия на Т2-тип цитокини при БА в сравнение с резултатите при контролните групи. Предполага се, че при неатопична астма може да има локално производство на IgE, насочено срещу неизвестни антигени, вероятно с вирусен произход или дори автоантигени (263).

Белези за персистиращо Т2 възпаление се наблюдават при около 50% от пациентите с ТА, базирайки се на тъканната и периферна еозинофилия и нивото на азотен окис в издишания въздух (FeNO) (431). Приблизително при половината пациенти без еозинофилно възпаление след редуциране на КС терапия Т2 възпалителните биомаркери се позитивират, което предполага, че това е много често срещан фенотип (231).

Персистиращата еозинофилия се свързват с по-тежко заболяване, лош контрол и прогноза (375). В резултат на еозинофилното възпаление в дихателните пътища се развива блокиране на въздух, хиперинфлация, влошаване на симптомите и чести екзацербации. БА с късно начало и високи кръвни еозинофили (≥ 300 cells/microL) оформя добре разпознаваем фенотип на ТА с чести екзацербации и лоша прогноза (334). При тези пациенти има трайно ограничаване на въздушния поток и дистално възпаление с хиперинфлация, както и хроничен риносинуит и назална полипоза (147). Откриват се по-високи нива на общи IgE без повишена честота на сенсибилизация към обикновени инхалаторни алергени (147). Еозинофилният фенотип се среща с честота 50-60% от общата популация на възрастни пациенти с БА (18).

През 2017 г. консенсусна група дефинира тежката еозинофилна БА според наличието на група от големи и малки критерии (63):

Големите критерии включват: диагностицирана ТА според критериите на ERS/ATS, високо еозинофилно възпаление (спутумна или кръвна еозинофилия при ≥ 2 изследвания), чести екзацербации (≥2 годишно), зависимост (интермитентна или персистираща) от ОКС за поддържане на контрол.

Малките критерии включват: късно начало, ангажиране на горни дихателни пътища (хроничен риносинуит, назална полипоза), фиксирана бронхиална обструкция,

блокиран въздух/мукусни отливки, ролята на други биомаркери (FeNO, периостин и дипептидил пептидаза-4).

При пациенти с липсващи данни за Т2 възпаление, молекулярният фенотип остава слабо дефиниран.

Не Т2 ТА също е хетерогенна група, представена предимно с неутрофилно или паучигранулоцитно клетъчно възпаление (33, 279, 431). В групата на БА с не-Т2 фенотип честотата на коморбидности и експозиция на цигарен дим е по-висока (151, 267). Неутрофилната, нееозинофилна БА остава недобре дефиниран фенотип. Честотата й варира около 20-30% при възрастните пациенти с персистираща БА (144, 396). Спутумната неутрофилия се асоциира с ТА, КС нечувствителност и хронична бронхиална обструкция (188, 279, 308) и понякога се наблюдава при екзацербация с асоциирано повишение на IL-8 (118). Множество медиатори, включително хемокини, цитокини и липиди, могат да регулират и да поддържат неутрофилното натрупване в дихателните пътища (217), а пушенето и съпътстващите заболявания, като ГЕРБ и затлъстяване са показали положителни връзки с броя на неутрофилите в спутума (349). Индуцирани от патогенни микроорганизми механизми могат също да са отговорни за персистиращото неутрофилно възпаление в дихателните пътища (423). В подкрепа на това се явяват данните за благоприятния ефект на макролидите при еозинофилна и нееозинофилна ТА (60, 136), кореспондиращи с по-ранни данни от миши модели на тежка стероидна рефрактерна алергична астма, при което кларитромицинът потиска възпалението и хиперреактивността на дихателните пътища чрез различни механизми (намаляване на еозинофилията при Th2 и потискане на IL-17 и TNF) в зависимост от използваните модели (115).

Пациентите с ТА, локална неутрофилия и нисък брой еозинофили, демонстрират особен възпалителен профил в спутума с високи нива на TLR2, TLR4, CXCL1, CXCL10, CCL2, IL-6, IL-8 и неутрофилна матриксна металопротеиназа 9 (MMP-9) (93, 257). Повишени концентрации на неутрофилно активни медиатори, като IL-8, еластаза, MMP-9, IL-17A, LTB4, GM-CSF и TNF-a, са били открити в плазмата и БАЛ на пациенти с ТА (57). Установено е, че транскриптите за IL17A са повишени в храчките на пациенти с БА и са свързани с CXCL8 (IL-8) транскрипти и неутрофилния брой в спутума, както и с тежест на БА (64). Неутрофилната астма се свързва със системно възпаление и повишени нива на серумни CRP, IL-6, IL-8 и IL-17A (246, 405, 460).

Интерлевкин 8 (IL-8 или хемокин (C-X-C) лиганд 8, CXCL8) е хемокин продуциран от макрофагите и други структурни клетки, като епителните, гладкомускулните клетки и др. Той е силен атрактант за кумулация на неутрофили в белите дробове (225). Наблюдават се повеишени нива на CXCL8 (IL-8) в спутума при БА (134, 225). Въпреки че различни видове клетки, включително епителни клетки на дихателните пътища, Т клетки и макрофаги, могат да секретират IL-8, самите неутрофили са показали, че произвеждат този хемокин, което предполага самоподдържащо се неутрофилно възпаление в дихателните пътища (134). Интересно е, че неутрофилите при пациенти с БА, но не и при неастматични субекти са показали, че експресират високоафинитетния IgE рецептор (FcsRI), чието активиране води до освобождаване на IL-8 от неутрофилите (143). IL-8 също се индуцира от IL-17 (229). Значимостта на тази индукция се подчертава чрез кръстосани реакции между човешки неутрофили и Th17 клетки, като всеки от тях благоприятства набирането на другия клетъчен тип чрез освобождаване на хемокини, включително IL-8 (312). По този начин е възможно неутрофили, Thl и Th17 клетки да създадат комуникационна мрежа в дихателните пътища при ТА и резистентност на КС ефекти.

Glenda и сътр. установяват, че при пациенти с резистентна на лечение ТА са значително повишени неутрофилите и IL-8 в спутума (137). Jiang и сътр. съобщават, че повишените серумните нива на IL-8 са свързани с развитието и прогресията на БА след анализ на серумни проби от 85 пациента в екзацербация, 85 извън екзацербация и 150 здрави контроли (193).

Hosoki и сътр. провеждат анализ на БАЛ течност при 36 субекта: 11 здрави контроли, 15 с контролирана БА и 10 с неконтролирана БА. Те установяват, че единствените възпалителни маркери, които разграничават контролирана от неконтролирана БА, са процентът на неутрофилите в спутума и нивата на IL-8, които са обратно пропорционално свързани с ФЕО1. Различията между БА с нормални неутрофили и тази с високи неутрофили е по-високото ниво на IL-8 в БАЛ течността и по-нисък ФЕО1 в последната група (176).

Agache и сътр. установяват повишение на серумните нива на IL-8 в клъстер на пациенти с ТА и смесен тип възпаление, вместо в групата с тежка нееозинофилна БА (14). Цигарениият дим може директно да провокира освобождаване на IL-8 от гладкомускулните клетки в дихателните пътища (297).

Th17 клетките са допълнителна отделна популация CD4 + лимфоцити, които секретират IL-17A, IL-17E, IL-17F, и IL-22, медииращи неутрофилната миграция чрез IL-8 механизъм (361).

Въпреки че Th17 клетките представляват основен източник на IL-17, ново идентифицираната популация от вродени лимфоидни клетки (ILCs) също е в състояние да произвежда IL-17 (288, 469). Тип 17 асоциираните цитокини повишават контрактилността и пролиферацията на гладката мускулатура на дихателните пътища и се свързват по-често с КС-резистентна, неутрофилна астма (74, 224, 432). В кохортното проучване на асоциацията за клинични изследвания на БА, пациентите с неалергична БА показват много отчетливо пролинфламаторен имунитет насочен към IL-17, стимулирайки неутрофилното възпаление и потискане функцията на Treg клетките (344). Th17 цитокините (IL-17, IL-22 и IL-26) предизвикват значително разрушаване на епителната бариера, за разлика от въздействието на интерферони, Thl или Th2 цитокини, които влияят на функцията на мукозната бариера (347). Shaw и сътр. изчисляват в проучване на 1100 пациента с БА, че 10-кратно увеличение на неутрофилите в спутума се свързва с намаление на 92 мл. в пост-бронходилататорния ФЕО1 (57). IL-17 повишава ин витро експресията на глюкокортикоиден рецептор бета (GR – β) от епителните клетки. GR-β, изоформа на рецептора е свързана с развитие на КС резистентност (432). КС от друга страна водят до удължаване живота на неутрофилите в дихателните пътища чрез превенция на неутрофилната апоптоза (144, 205, 362).

Съвременни проучвания при мишки и хора показват повишени Th1/IFN-γ и Th17/IL-17 отговори при БА, особено при ТА, резистентна на КС, която често се свързва с неутрофилна инфилтрация на дихателните пътища (348, 350). Нивото на IL-17 в серума се спряга за независим, рисков фактор за развитие на ТА (13).

Th17-медииранота възпаление може да съществува заедно с Th2 фенотип, усилвайки Т2 отговора. Пациенти с възпалителен модел, с високи IL-5, IL-17A, IL-25 в дихателните пътища, често са с неконтролирана БА (384).

Th2 клетките могат да се диференцират в двойно-позитивни Th2/Th17 клетки (89). Тези клетки са идентифицирани в БАЛ на пациенти с БА и се свързват с глюкокортикоидната резистентност in vitro, обструкцията на дихателните пътища и хиперреактивността им (182).

Връзката между Th17 и тип 2 имунната реакция е много сложна. Интересни данни от животински модели предполагат, че IL-17, продуциран от Т-клетки и от Th17 клетки в отговор на увредения епител, усилва производството на IL-4 и IL-13 от ILC2 и Th2, което действа като отрицателна обратна връзка, която потиска отделянето на IL-17 (285). Съответно, IL-4 и IL-13 могат да амплифицират Th17 отговора чрез регулиране на експресията на CD209a върху дендритни клетки (330). Когато отговорът от Т2 не успява напълно да потисне реакцията на IL-17, или се задейства положителна обратна връзка, може да настъпи прекомерно увреждане на тъканите. Познанието за обратните връзки на IL-17-IL-4/13, ще осигури безценна информация за разбирането на ТА при смесен Th17/Th2 ендотип.

В. Цветкова-Вичева и сътр. анализират нивата на IL-17-продуциращите клетки при пациенти с алергичен ринит и установяват асоциация на нивата им с полисенсибилизацията, но не намират връзка с бронхиалната хиперсензитивност (434).

Някой автори намират, че присъствието на IL-6, наивни Т клетки се диференцират в специализираната популация - IL-17 продуциращи Th17 клетки. Може да се обсъжда положителна обратна връзка между тези два цитокини (355). В белите дробове IL-6 се продуцира от епителните клетки, интерстициалните фибробласти, макрофагите и други възпалителни клетки. Продукцията се индуцира в отговор на различни стимули, които причиняват клетъчно увреждане (алергени, респираторни вируси, усилия, частици от околната среда). IL-6 може да се окаже ключов модулатор на имунния отговор, както и регулатор на функциите на неимунните клетки (355).

Интерлевкин (IL) - 6 е плеотропен цитокин, който действа като провъзпалителен медиатор и индуктор на острата фаза на възпалението (354), като такъв е в асоциация с нивата на CRP (174, 355). IL-6 се свързва с разтворим или мембранен рецептор (sIL-6R или mIL-6R), след което се свързва с трансмембранния белтък gp130 и се задействат различни вътреклетъчни процеси (354). Той играе важна роля в прогресията на редица заболявания и увреждането на тъканите при автоимунни процеси, като мултиплена склероза, ревматоиден артрит и системен лупус. През последните години се установи, че IL-6 е основен модулатор на CD4 Т лимфоцитите (102). Повишен IL-6 се открива в БАЛ при персистираща БА (441). Нивата му в БАЛ корелират с тези в плазмата (289). Предполага се, че нивата му съответстват на активирано състояние на епитела на дихателните пътища и е установена корелация между нивата на IL-6 в спутума с ФЕО1, ФЕО1/ФВК, и затлъстяването (289).

Ilmarinen и сътр. (180) проследяват в рамките на 12 год. група от 170 пациента с БА с късно начало, при които наблюдават високи нива на системно възпаление измерено чрез CRP и/или IL-6. IL-6 корелира с CRP и по-слабо с дихателната функция. IL-6 и брой еозинофили са предиктори за употребата на по-висока доза ИКС.

IL-6 може да бъде маркер за активността на заболяването и загуба на белодробна функция (332).

Morjaria и сътр, изследват нивата на IL-6 и IL-8 в храчка при 18 пациенти с ТА и установяват повишаването им при по-ниско ФЕО1(281).

Alwakil и сътр. намират повишени серумни нивата на IL-6 и IL-8 при 20 пациента с БА, като нивата корелират негативно с белодробната функция (20).

Ghaffari и сътр. сравняват нивата на IL-6 и IL-8 в серум при 21 пациента с ТА с 30 пациента с ЛБА и не намират разлика, като заключават че тези цитокини не отразяват тежестта на заболяването (131). Chu и сътр. (80) установяват високи нива на IL-6 в спутума на пациенти със смесено еозинофилно/неутрофилно възпаление и асоциация с по-ниско ФЕО1. Те установяват повишаване на IL-6 в белия дроб на мишки след мукозна експозиция на алерген (домашен прах), а при блокиране на IL-6 пътя, алерген-индуцираното възпаление е прекъснато. Peters и сътр. провеждат анализ на плазмените нива на IL-6 при 249 пациента с не-тежка астма и 387 – с ТА. Определят гранична стойност на IL-6 (3.1 pg/ml) чрез 95-тия персентил от резултатите за IL-6 при здрави контроли. Пациентите с висок IL-6 демонстрират по-висок ИТМ, по-висока честота на коморбидности, по-чести екзацербации и намалена белодробна функция (317). Turan и сътр. (435) идентифицират група пациенти с ТА от проучването U-BIOPRED с високи нива на IL-6 в спутума и експресия на mRNA за IL6R, които се представят с неутрофилно възпаление, ниска белодробна функция и висок CRP.

Цигарениият дим, съчетан с астматично възпаление, може да предизвика важни промени в астматичния ендотип с преобладаване на активирани макрофаги и неутрофили в дихателните пътища и белодробния паренхим, както при ранно хронично обструктивно белодробно заболяване. Когато се активират от цигарен дим, макрофагите могат да произведат безброй провъзпалителни молекули, реактивни кислородни радикали (ROS), тъканни протеази и хемокини, участващи в мобилизацията и продължителната преживяемост на неутрофилите в белодробната тъкан (IL-8) (328). Д.Димов и сътр. (2, 415) провеждат редица генетични проучвания на

пациенти с ХОББ и БА в България и установяват, че генетичният полимерфизъм на матриксните металопротеинази може да има различно въздействие при развитието на бронхообструктивни заболявания.

Тютюнопушенето при БА може да доведе до повишени нива на тимусен стромален лимфопоетин (TSLP), което допълнително да стимулира мастоцитите и ILC2 да освобождават медиатори, независимо от Th2 клетките. Продължителното излагане на цигарен дим при БА води до допълнителни, синергични възпалителни и ремоделиращи реакции в дихателни пътища и по този начин се обяснява, докладваното ускорено намаляване на белодробната функция и повишената тежест на обструкцията на въздушния поток (328).

Siew и сътр. (392) провеждат интересно проучване на ендобронхиални биопсии при 10 непушачи с БА и 8 пушачи с БА. Експресията на IL-17A, IL-6, IL-8 и броя на неутрофилите е значително повишена в бронхиалната лигавица на астматичните пушачи в сравнение с непушачите. Експресията на IL-17A корелира с тази на IL-8 и неутрофилния брой. При пушачите с БА, еозинофилният брой също корелира с експресията на IL-8 и IL-17A. Излагането на епителните клетки, както на цигарен дим, така и на IL-17A, повишава експресията на IL-6 и IL-8 в зависимост от концентрацията по синергичен начин. Ко-стимулирането с цигарен дим, IL-17A и аероалергени допълнително повишава производството на IL-6 и IL-8 синергично.

Затлъстяването е друга фенотипна характеристика, често свързвана с не-Т2 БА. Клъстерни анализи са идентифицирали фенотипни подгрупи на пациенти с БА според оценката на ИТМ. Haldar и сътр. (151) съобщават, че затлъстяването е свързано с повишена експресия на симптоми, намалено еозинофилно възпаление на дихателните пътища, женски пол, късно начало и намален отговор към ИКС. Отделен клъстерен анализ на пациенти, участващи в програмата за изследване на тежката астма NIH показва, че повишеният ИТМ е свързан със специфични клинични характеристики при ТА, с идентифициране на група от пациенти, при които повишения ИТМ е свързан с женски пол, късно начало, по-висока нужда от здравни грижи и приложение на СКС (280). Тези две проучвания потвърждават, че фенотипът на БА е относително хомогенен при пациенти със затлъстяване, с висока експресия на симптоми, ниска атопия и еозинофилия в дихателните пътища, и относителна нечувствителност към КС, феномен, който е докладван от други клинични проучвания (124, 315, 412).

Sutherland и сътр.(411) провеждат клъстерен анализ и идентифицират 4 клъстера, като 2 от тях са със затлъстяване. Те установяват, че и при пациентите със висок ИТМ и БА има хетерогенност в експресията на симптомите и възпалителните биомаркери. Последните изследвания показват, че затлъстяването при БА може да бъде проявено най-малко в два различни фенотипа (38). Фенотип на конвенционална алергична БА модулирана от затлъстяването с по-чести екзацербации, системно възпаление и поддържане на тип 2 маркери на. И друг фенотип възникнал единствено поради наличието на затлъстяване при неатопични пациенти с късно начало. Предполага се, че последният е следствие от хроничната компресия на белите дробове, причинена от задебелената гръдна стена. При първата подгрупа на затлъстяване и ранна атопична Т2-висока БА, затлъстяването поддържа и усложнява алергичното възпаление. При този фенотип са наблюдава повишена честота на обструкция на дихателните пътища, по-голяма бронхиална хиперреактивност, по-високи нива на общи IgE и по-голяма вероятност от алергична сенсибилизация и реакция. В контраст, втората подгрупа на късна, неатопична Т2 БА със затлъстяване, се намира на фона на по-ниска атопия, по-ниска бронхиална свръхчувствителност и бронхиална обструкция и по-редки екзацербации в сравнение с предходната група (141).

През последните години нарастват данните от клинични проучвания при прилагане на инхибитори на медиаторите на възпалението, най-вече чрез използването на моноклонални антитела срещу Т2 имунен отговор – анти IgE, IL-5, IL-4, IL-13.

Засилва се интереса към ролята на структурните/епителните клетки в секрецията на медиатори като IL-25, IL-33, тимусният стромален лимфопоетин (TSLP) IFN-γ, както и към въздействието на IL-17 при ТА (159).

От особена важност е правилната селекция на пациентите при използване на новите терапевтични стратегии, тъй като отговорът към терапията зависи от подлежащия водещ патогенетичен път. С оглед на това, в практиката се прилага употребата на биомаркери.

Работна група на американската агенция по храните и лекарствата (FDA) и националните институти по здравеопазване (NIH) разработиха протокол BEST (биомаркери, крайни точки и други средства) (45), който определя биомаркера като „характеристика, която се измерва като индикатор за нормални биологични процеси,

патогенни процеси или отговори на експозиция или интервенция, включително терапевтични интервенции ”.

Те дефинират 5 субкатегории на използваните биомаркери при ТА: диагностични биомаркери (фенотипизиращи), мониториращи биомаркери, биомаркери за оценка на отговор, предиктивни биомаркери и прогностични биомаркери.

Основните Т2 неинвазивни биомаркери използвани до момента в областта на фенотипизирането на БА са общи IgE, абсолютен еозинофилен брой в периферна кръв, фракция на издишан азотен окис (FeNO), серумен периостин. Липсва добре утвърден биомаркер за идентифициране на не-Т2 БА.

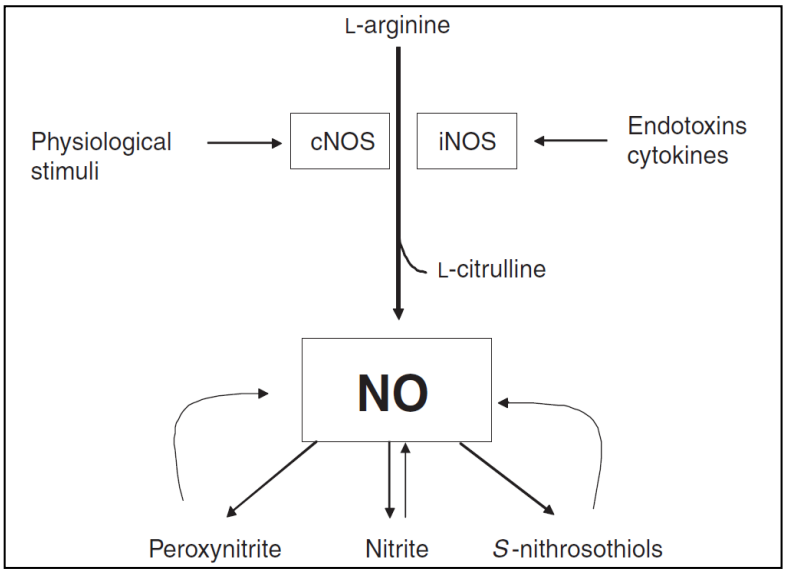
През 2019 г. GINA (140) въведе отделна част за поведение при ТА, в която терапията на ТА се коментира в контекста на установени фенотипни характеристики на базата на изследваните до момента биомаркери. Тип 2 възпалението при ТА в GINA 2019 е дефинирано според следните критерии: кръвни еозинофили ≥ 150 cells/microL и/или FeNO ≥ 20 ppb, и/или спутумна еозинофилия ≥ 2%, и/или алергична БА, и/или нужда от СКС за поддържане (повторно трикратно измерване на кръвните еозинофили и FeNO при най-ниската възможна доза СКС). Не-Т2 БА се определя на базата на липсващи доказателства за персистиращо тип 2 възпаление.

2.7. Маркери на възпаление в издишан въздух

2.7.1 Фракция на азотен окис в издишания въздух (FeNO)

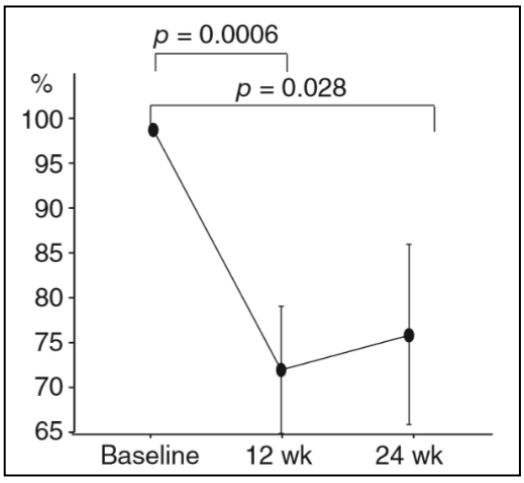
Нуждата от мониториране на възпалението в дихателните пътища доведе до развитие на методи за неинвазивната му оценка чрез изследване на индуцирана храчка и кондензат от издишан въздух, измерване температурата на издишания въздух, измерване фракцията на азотен окис в издишан въздух (FeNO).

Азотния окис се образува под действието на ензима азотно-окисна синтаза (NOS) от аминокиселината L-аргинин (Фиг.7)



Фиг. 7 Синтез на азотен окис (NO) от L-аргинин. cNOS – конститутивна азотноокисна синтаза; iNOS – индуктивна азотноокисна синтаза (324)

Ензимът съществува като конститутивна, индуктивна и невронална изоформа (cNOS, iNOS, nNOS). Експресията на iNOS се индуцира от възпалителни медиатори (IFN-γ, IL-4, IL-13, IL-1β, TNF-α) и ендотоксини (36), и се открива в епителните клетки на дихателните пътища, еозинофилите, алвеоларните макрофаги, ендотелните клетки, фибробластите и други възпалителни клетки (148). Нивото на издишания NO зависи предимно от експресията на iNOS, която се повлиява значително от КС (245) (Фиг.8).



Фиг. 8 Промяна в нивата на FeNO след започване на лечение с ИКС (n=37) (260).

Ин витро е доказано синергично нарастване на експресията и активацията на iNOS след комбинирана стимулация с тип-1 и тип-2 цитокини (IFN-γ и IL-13) (431). Персистиращо повишение на FeNO, въпреки системната употреба на КС предполага наличие на резистентност, може би по-често проявена при смесени имунни механизми на възпаление (149, 431).

Последните препоръки на ATS/ERS за измервания на издишвания NO описват няколко аспекта на стандартизацията на метода и се използват в световен мащаб. Документът от 2005 г. все още е валиден и най-вече все още приложим (23). След формулирането на тези препоръки сферата за изследване на FeNO все повече се разраства и се разработват и използват все по-нови устройства. Основните методи за измерване на FeNO са хемилуминесцентен, електрохимичен и лазерна спектроскопия. Хемилуминесцентният метод остава стандарт при изследването на FeNO. Всички по-късно въведени техники се сравняват с него (92). Редица портативни апарати базирани на електрохимичния метод бяха въведени през последните години с цел улеснение в рутинната клинична практика. Разликата в стойностите на FeNO при сравнение на измерванията с новите анализатори и хемилуминесцентната методика е в границите на ± 4-10 ppb, което се счита за клинично приемлива вариация (27, 175). Резултатът от измерването се представя в частици на милиард (parts per billion - ppb).

Редица фактори повлияват нивата на FeNO. От изключително значение е правилната техника на изпълнение за осигуряване на максимално вдишване, оптимален въздушен поток и време на издишване. Тъй като нивата на NO в горни дихателни пътища са по-високи от тези в белите дробове е необходимо достигане на орално налягане, което да изключи назалната контаминация. Външните условия трябва да бъдат стабилни, а нивото на NO в околната среда известно (23). FeNO се повлиява в различна степен от ръст, възраст, диета, инфекции, тютюнопушене и коморбидности. Димов и сътр. (103)установяват, че хипоксията също води до повишение на нивата на FeNO. Нарастват данните за значимостта на този показател при заболявания, като ХОББ, муковисцидоза, обструктивна сънна апнея, цилиарна дискинезия, хепато-пулмонален синдром, съдови заболявания на бял дроб (175).

Известно е, че FeNO е повишен при атопична БА, повишава се по време на екзацербация, корелира с еозинофилите в индуциран спутум и в кръвта, с бронхиалната хиперреактивност и е повишен в късната фаза след алергична провокация (34).

Jones и сътр. (196) проведоха 11-седмично проучване с 78 възрастни (с преобладаваща атопична БА), за да оценят прогнозната и диагностичната стойност на FeNO при оценка загубата на контрол при БА след отнемане на КС. Издишаният FeNO е свързан с положителна прогностична стойност между 80 и 90% за предсказване и диагностициране на загуба на контрол. Резултатите също отразяват ниска чувствителност, но добра специфичност на метода. Sippel и сътр. (397) анализират 100 пациента с БА. Тези, които са съобщили за симптоми на астма по време на предходните 2 седмици, са имали значително по-високи нива на FeNO от тези без симптоми, независимо от това дали е била приложена ИКС терапия. Въпреки това, пациентите със симптоми на БА през последните 1 или 6 месеца, не са имали значително по-високи нива на FeNO в сравнение с тези без симптоми. Ежедневната употреба на SABA също корелира положително с FeNO, както и положителния бронходилататор отговор. Интерпретацията на резултатите от FeNO може да бъде затруднена при пациенти, които остават симптоматични въпреки лечението с КС, както и от вариациите в интензивността на активността на заболяването.

Над 20 години се проучва връзката на FeNO с еозинофилното възпаление. Значителен брой проучвания откриват корелацията на FeNO с еозинофилията в индуцирана храчка, в бронхоалвеоларен лаваж и/или в периферната кръв. Това определя полезността на метода за определяне контрола на астмата, оптимизиране на противовъзпалителната терапия или предвиждане отговора към ИКС при деца и възрастни (Табл.5).

	Материали	**Корелации**	**Наблюдения**
Silvestri и сътр. (395)	Периферна кръв	r=0.63; p<0.01	22 деца с ЛБА
Srunk и сътр. (407)	Периферна кръв	r=0.51; p<0.001	144 деца (6-17 години) с персистираща ЛБА и СТА
Jatakanon и сътр. (187)	Индуцирана храчка	r=0.48; p=0.003	35 пациента със стабилна БА
Mattes и сътр. (262)	Индуцирана храчка	r=0.35; p=0.09	25 деца със стабилна БА и 9 здрави контроли
Jones и сътр. (196)	Индуцирана храчка	r=0.62; p<0.001	78 пациенти с персистираща ЛБА и СТА
Payne и сътр. (311)	Бронхиална биопсия	r=0.54; p=0.03	31 деца с ТА
Obata и сътр. (294)	Индуцирана храчка	няма корелация	17 възрастни пациента с професионална БА
Piacentini и сътр. (322)	Индуцирана храчка	r=0.44; p=0.032	25 деца с персистираща СТА
Warke и сътр. (449)	БАЛ	r=0.78; p<0.001	71 деца (29 атопични ,15 атопични здрави контроли, 27 неатопични здрави контроли)
Berry и сътр. (43)	БАЛ Индуцирана храчка	r=0.59; p<0.001 няма корелация	13 здрави контроли 25 пациента с персистираща ЛБА и СТА 27 пациента с рефрактерна БА
Malerba и сътр. (256)	Индуцирана храчка	няма корелация	14 пациента с персистираща ЛБА и СТА
Lim и сътр. (244)	Бронхиална биопсия	няма корелация	32 пациента с БА
Crespo и сътр. (91)	Индуцирана храчка	r=0.29; p=0.016	110 възрастни пациента с персистираща БА
Adeel и сътр. (364)	Периферна кръв	r=0.53; p=0.01	94 възрастни пациента с рефрактерна БА
Gao и сътр. (129)	Индуцирана храчка	r=0.46; p<0.001	75 пациента с неконтролирана БА

Табл.5 Доказателства за корелации между еозинофилия и FeNO при пациенти с БА. БАЛ – бронхоалвеоларен лаваж

Получените резултати са противоречиви: от положителни корелации, без корелации до конфликтни резултати в едно и също изследване.

Интерес представлява проучването на Crespo и сътр. (91) за дисоциация между нивата на FeNO и еозинофилията в индуцирана храчка. При изследване на 110 пациента с БА, провеждащи поддържаща терапия с ИКС, е установен дискрепанс между FeNO и еозинофилите в храчка при 46 пациента (41.8%). От тях 34 (73.9%) са с FeNO < 50 ppb и висок еозинофилен процент в храчката, 12 (26.1%) са с FeNO ≥ 50 ppb и нормални нива на еозинофили в храчката, като тези пациенти са показали различни клинични и възпалителни характеристики.

Korevaar и сътр. (220) представят мета-анализ на минимално инвазивни маркери за наличие на еозинофилия в дихателните пътища. Те анализират 17 проучвания (n=2405), в които е използван FeNO като маркер за еозинофилия (средна AUC 0.75[95%CI 0.72-0.78]). Обобщените данни за чувствителността и специфичността при откриване на еозинофили ≥ 3% при възрастни са: 0.66 (0.057-0.85) и 0.66 (0.65-0.85) за FeNO. FeNO има умерена диагностична точност за еозинофилно възпаление, което дава основание на авторите да заключат, че употреба му, като единствен заместващ маркер за еозинофилия на дихателните пътища при пациенти с БА може да доведе до значителен брой фалшиви положителни или фалшиви отрицателни резултати (220).

Насоките от 2011 год. на ATS (108) относно интерпретацията на FeNO в клиничната практика силно препоръчват използването на FeNO при диагностицирането на еозинофилно възпаление на дихателните пътища. Авторите препоръчват гранични стойности за ниски нива на FeNO < 25 ppb (20 ppb при деца), при които еозинофилното възпаление и отзивчивостта към ИКС са по-малко вероятни. Стойности на FeNO > 50 ppb (35 ppb при деца) са оценени като високи, при които еозинофилното възпаление и отговора към ИКС са силно вероятни, а стойностите между 25 ppb и 50 ppb (20-35 ppb при деца) трябва да се тълкуват предпазливо в клиничния контекст.

Резултатите на Korevaar и сътр. обаче оспорват тази концепция, тъй като чувствителността на FeNO < 25 ppb варира от 0.52 до 0.86 при възрастни. Това означава, че на всеки 100 пациента с БА и еозинофилия на дихателните пътища, 48 могат да бъдат грешно определени, като такива без еозинофилия на дихателните пътища, и може да им бъде отказано ефективно лечение. Въпреки че тези прагове могат да бъдат релевантни в специфични подгрупи на БА, тези находки показват, че резултатите на FeNO трябва да се интерпретират много по-предпазливо в общата популация на БА.

Gao и сътр. (129) докладват гранична стойност на FeNO 35.5 ppb, като предиктивна за спутумна еозинофилия (AUC 0.707, p=0.004, сензитивност 67.3%, специфичност 73.9%). Броят на еозинофилите в спутума и високото FeNO при пациенти с БА се асоциират с ускорен годишен спад на белодробната функция (84, 439)

Фактът, че няма корелация при лечението с анти-IL-5 (Mepolizumab) между намаляването на еозинофилите и нивата на FeNO поддържа концепцията, че двата биомаркера не са в непосредствена връзка един с друг (150, 310). FeNO се влияе допълнително от Т2 алергичното възпаление, подкрепено от намаляване нивата на

FeNO след лечение с инхибитори и/или антагонисти на IL-4 и IL-13 (Lebrikizumab, Dupilizumab) (16, 26, 37, 87, 154). Agache и сътр. чрез клъстерен анализ установяват повишение на FeNO, както в група с еозинофилна средно-тежка и ТА, така и в група с лека, неeозинофилна БА (14).

През 2018 г. GINA приема становището, че повишението на FeNO е асоциирано с еозинофилното и тип 2 възпаление при БА (117, 139).

Препоръките на GINA(139) по отношение FeNO са:

- Не е утвърден метод за потвърждение или изключване на диагнозата бронхиална астма
- Повишение се отчита и при неастматични състояния – еозинофилен бронхит, алергичен ринит и др.
- Не е повишен при някой фенотипи на БА, като неутрофилната БА
- Различни фактори повлияват нивата на FeNO
- При възрастни стероидно-наивни пациенти (най-вече непушачи), нива на FeNO > 50 ppb са свързани с добър краткосрочен отговор към ИКС
- Няма дългосрочни проучвания за безопасността от въздържане от ИКС при пациент с начално нисък FeNO
- При пациенти с БА FeNO не се препоръчва за вземане на решение за въздържане от ИКС
- Повишение на FeNO при възрастни пациенти с алергична БА, които провеждат ИКС терапия е рисков фактор за екзацербации (472).
- При деца и млади възрастни с БА воденето на терапията според FeNO е свързано с редукция на броя пациенти с ≥ 1 екзацербация (OR 0.67 [95%CI 0.51-0.90]) и на честотата на екзацербациите (средна разлика -0.27 [-0.49- -0.06] за година) при сравнение с терапия базирана на препоръки (320).
- Воденето на терапията според FeNO не се препоръчва в общата популация на възрастни пациенти (321). Необходими са допълнителни проучвания за идентифициране на групи, които биха имали полза от този подход, определяне честотата на мониториране на FeNO и дефиниране на гранични стойности на FeNO за конкретните групи.

В България изследвания на азотния окис са провеждани до момента предимно при деца с БА. В. Юрукова в своя дисертационен труд установява повишени нива на FeNO

при деца с ЛБА и отчитат повлияването на нивата от лечение с ИКС, корелация с еозинофилите в кръвта, но не и връзка с функционалните показатели (8–10).

По-късно Р. Маркова в своята дисертация потвърждава повишението на FeNO при деца с БА и понижението от КС терапия, отчита повишението на FeNO с възрастта и връзката му с еозинофилното възпаление и предлага диагностичен алгоритъм за деца (5).

Т.Стоева и Н.Генкова допринасят значително със своята работа за допълнително познаване на БА при деца чрез оценката на FeNO (1, 6).

Дефинирането на клинично полезна гранична стойност за FeNO все още се обсъжда и зависи от изследваната популация и клиничните условия и цели. Следователно, нормалните граници могат да варират значително (380) и горната граница на нормата варира значително между 25 и повече от 50 ppb, в зависимост от изучаваната популация. (367). Мета-анализ на Wang и сътр., в който са включени 43 проучвания с общо 13 747 пациента на различна възраст доказа умерена точност на FeNO при диагностиката на БА с чувствителност 0.80, 0.69, 0.53, 0.41 и специфичност 0.64, 0.78, 0.85, 0.93 при съответните гранични стойности, както следва < 20, 20-29, 30-39 и ≥40 ppb.

За идентифициране на еозинофилна БА граничните стойности на FeNO варират широко - от 19 ppb до 76 ppb (135, 433), но най-често авторите използват стойности от 20 до 35 ppb. (109, 313).

Mogensen и сътр. използват гранични стойности за FeNO при възрастни и деца, както следва 25/20, 35/30 или 50/35 ppb, запазвайки константна граничната стойност за кръвните еозинофили (300 cells/microL). Те установяват, че междинните стойности за FeNO отразяват сигнификантна корелация на едновременно повишение на изследваните маркери със симптомите и екзацербациите (276).

2.8. Системни маркери при БА

2.8.1 Абсолютен брой на еозинофилите в периферна кръв

В много проучвания броят на еозинофилите в спутума се оценява като фенотипен идентификатор при пациенти с БА. Селектирането на пациентите, зависи от инвазивните методи за осигуряване на проби. Индуцирането на спутум и провеждането на фибробронхоскопия (ФБС) често са трудно осъществими в ежедневната клинична практика. Ето защо интересът на изследователите е насочен към идентифициране на неинвазивни системни биомаркери.

Еозинофилните прекурсори произхождат от костния мозък и след диференциация мигрират към белите дробове чрез кръвния поток (360). Ролята на кръвните еозинофили, като маркер за тъканна еозинофилия при бронхиална астма е доказана в редица проучвания (125, 443)

Степента на кръвната еозинофилия корелира с тежестта на заболяването и честотата на екзацербациите [162]. Все по-често броят на еозинофилите в кръвта се признава, като важен биомаркер за идентифициране на пациентите с умерено тежка и тежка неконтролирана БА с редуциран отговор към инхалаторната терапия, повишен риск от екзацербации (90) и честа употреба на СКС, които биха имали добър отговор към биологична терапия с моноклонални антитела за намаляване на кръвната и тъканната еозинофилия.

Sterk и сътр. сравняват три биомаркера - еозинофили в периферната кръв, FeNO и нивата на серумния периостин, за оценка на достоверността им за отразяването на броя еозинофили в спутума в крос секционно проучване (443). Те използват праг от 270 еозинофили/μL и отчитат позитивна и негативна предиктивни стойности от респективно 79% и 91% за предсказване на еозинофилия в спутума ≥ 3%. Техните данни са в съответствие с тези на Zhang и колеги, които идентифицират 260 еозинофили/μL, като оптимална гранична стойност (475). Резултатите от двете строго независими проучвания показват, че еозинофилите в кръвта са достатъчно точен биомаркер, отразяващ процента еозинофили в спутума. Тези данни са окуражаващи, като се има предвид широката достъпност на автоматизирани хематологични анализатори в повечето клинични лаборатории. Sterk и сътр. докладват, че нивото на FeNO също има предиктивна сила за еозинофилия в спутума.

В контраст на тези данни, Hastie и сътр. (164) показаха, че еозинофилите в кръвта и спутума не винаги корелират добре, с R стойност от 0.19 с приблизително 40% погрешна класификация.

Katz и сътр. (206) прилагат гранични стойности от 150 cells/microL. Wenzel и сътр. (452) съобщава, че еозинофилите в кръвта над 300 cells/microL могат да идентифицират пациенти с неконтролирана умерена до тежка форма на БА, които биха имали благоприятен клиничен отговор към биологичната терапия.

В проучването PREDUNA (471), Zeiger и сътр. демонстрират асоциация на високите кръвни еозинофили с неконтролирана БА и висока терапевтична стъпка според критериите на GINA. Те прилагат гранична стойност от 400 cells/microL, която е показала най-значима връзка с риск от екзацербации при сравнение с други три гранични нива (150, 200, 300 cells/microL).

Mogensen и сътр. анализират данни при 1 419 пациента с БА на възраст от 6-79 год. в периода 2007-2012 (NHANES) и установяват, че едновременното повишение на FeNO и кръвните еозинофили (FeNO ≥ 25 ppb при възраст ≥12 год. и кръвни еозинофили ≥300 cells/microL) са свързани с повече симптоми и влошена белодробна функция, като единствено повишението на еозинофилите свързват с по-чести екзацербации (276).

Таргетирането на IL-5 беше въведено в практиката като потенциална терапия за превенция и потискане на еозинофилно-медиираното възпаление (81).

Големи, рандомизирани проучвания (MENSA, SIRIUS, DREAM) с анти IL-5 антитяло (Mepolizumab) при пациенти с умерено тежка и тежка БА на лечение с ИКС потвърдиха биологичния ефект на терапията, силно изразен при селектирани пациенти с данни за еозинофилно възпаление (41, 173, 310). Видът на възпалението е потвърден чрез изследване на биомаркери, включващи еозинофили в кръвта и ниво на FeNO, като единствено броя на еозинофилите в кръвта се асоциира с ефекта от лечението(310). Постигната е значима редукция на дневната доза ОКС и клинично значимите екзацербации (41). В MENSA и SIRIUS, критерий за включването на пациентите с БА е наличието на кръвни еозинофили ≥ 150 cells/microL при започване на лечението или ≥ 300 cells/microL в предходните 12 месеца (41, 298).

Моноклонално антитяло срещу IL-5 (reslizumab), използвано при неконтролирана ТА, показва значителна ефективност по отношение на белодробната функция, еозинофилията в спутума и резултата от ACQ в субгрупа от пациенти с носна полипоза

(72). Пациенти с абсолютен брой еозинофили в кръвта ≥ 400 cells/microL са с по-отчетливо подобрение при лечение с reslizumab, отколкото тези с по-нисък брой клетки (46, 88).

Таргетна терапия с афуколизирано моноклонално антитяло с висок афинитет към IL-5Rα (Benralizumab), бързо и значително редуцира, както циркулиращите така и спутумните зрели еозинофили, еозинофилни прогенетори и IL-5Rα+ ILC2. Тези промени са свързани с намаляване на дозата на поддържащите ОКС, подобряване на контрола на БА и подобрение на функцията след лечение (381).

2.8.2 Общо ниво на имуноглобулин Е (IgE) в периферна кръв

IgE е идентифициран през 1966 г. като фактор, медииращ незабавна свръхчувствителност. IgE се различава от други изотипове антитела, като се намира предимно в тъканите, където е тясно свързан с мастоцитите и базофилите чрез рецептор с висок афинитет. В това клетъчно свързано състояние IgE се задържат в тъканите и нивата на свободния серумен IgE са най-ниските от всички класове имуноглобулини. Във времето общият IgE е получавал прогресивно по-малко внимание при БА до разработването на анти-IgE терапията с Omalizumab (178).

IgE е отличителен белег на тип 1 свръхчувствителност, но механизмите, регулиращи производството на IgE, остават слабо разбрани (463). Смята се, че синтезът на IgE се осъществява чрез различни биосинтетични пътища на рекомбинантно превключване между класовете антитела (CSR) в В-клетките. В-клетки могат да претърпят CSR до IgE чрез CD40 активиране от интерлевкин IL-4 или IL-13, произведени от Th2 и ILC2 (95, 405, 406).

Биологичната роля на IgE е сложна и е свързана с способността му да влияе върху функционирането на имунни и структурни клетки, участващи в патогенезата на хроничното алергично възпаление. IgE медиираните биологични пътища са свързани с взаимодействия със специфични рецептори. Идентифицирани са два класа рецептори: рецептори с висок афинитет (FceRI) и нисък (или FcεRII).

Рецепторът с висок афинитет на IgE, т.е. FceRI, конститутивно се експресира върху мастоцити и базофили като тетрамер. Следвайки кръстосано свързване с IgE на рецептора, каскада от вътреклетъчни събития води до клетъчното активиране и дегранулация. FceRI рецепторите се експресират не само по повърхността на мастоцити

и базофили, но също и от дендритни клетки, гладкомускулни клетки на дихателните пътища, епителни клетки, ендотелни клетки и еозинофили (222, 264, 353, 393). Доказано е, че човешките кръвни еозинофили експресират всички вериги на FceRI рецептора и могат да бъдат повлияни от IgE антитела (345). Действителната функция на този рецептор върху човешки еозинофили остава непълно определена (214). Въпреки това, директният ефект на IgE върху еозинофилите се подкрепя от демонстрацията, че Omalizumab може да индуцира апоптоза на тези клетки (214) и оказва благоприятен ефект при хипереозинофилна, неатопична БА свързана с назална полипоза независимо от атопичния статус (130). Общият серумен IgE тясно корелира с риска от БА (65) и с бронхиалната хиперреактивност (379), независимо от алергенната специфичност.

Могат да бъдат идентифицирани три основни "високи-IgE" (126) астма/фенотипи въз основа на повишен общ серумен IgE: алергична астма (където се наследява тенденцията към високо IgE), алергична бронхопулмонална аспергилоза (където IgE синтез е задвижван от Aspergillus) и хипереозинофилна астма, свързана с назална полипоза и колонизация на S. aureus. При неалергични пациенти е открит IgE отговор насочен към ентеротоксин-продуциращи S. aureus, които колонизират горните дихателни пътища на тези пациенти (428). Стафилококови суперантигени са молекули, които могат директно да индуцират поликлонално Т- и В-клетъчно активиране, като S. aureus също индуцира експресия на TSLP в кожата от пациенти с атопичен дерматит (442).

Използването на общите IgE, като фенотипен идентификатор в клъстерните проучвания е ограничено, поради липса на значими различия в нивата при предварително определените клъстерни групи (279), въпреки корелацията им с еозинофилията в спутума (375). Повишените нива на общи серумни IgE се използва клинично, като селекционен биомаркер за лечение с Omalizumab и за определяне на дозата му. Насоките препоръчват лечение с Omalizumab, като допълнителна терапия за пациенти с тежка алергична астма и общо ниво на серумния IgE ≥ 30 IU/ml. Свободният серумен IgE намалява в отговор на Omalizumab и това намаляване е свързано с намален брой екзацербации (152, 416). Във фаза III на INNOVATE (178), общият серумен IgE е предиктор на ефикасността на лечението. Обаче, когато Bousquet и сътр. (53) обединява данни от седем рандомизирани контролирани проучвания на Omalizumab, установява че степента на екзацербациите и качеството на живот са подобрени, независимо от серумните нива на общите IgE преди лечението. Няма ясна гранична стойност на

серумните нива на общите IgE за предсказване на оптималната ефикасност от Omalizumab и данните в подкрепа на използването му като селекционен биомаркер са ограничени.

Ползата, наблюдавана при анти-IgE терапия при БА се свързва освен с блокиране на антиген-специфичния IgE механизъм, така и с допълнително повлияване на вирусно-индуцирано или суперантиген-индуцирано IgE/FceRI сигнализиране, което може да бъде от особено значение при пациенти с тежко заболяване и (частична) резистентност към КС (126).

В действителност, средното относително намаление на екзацербациите при лечение с Omalizumab е значително по изразено при пациенти с кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL (71). Серумните нива на общ IgE не се свързват с отговора към Mepolizumab или Benralizumab (79, 310).

Busse и сътр. (67), Pavord и Bush (309) също докладват еозинофилните маркери (еозинофилите в кръвта> 2%, FeNO> 20 ppb), като по-добри биомаркери за отговора към Omalizumab. В post hoc анализ на биомаркери в проучването EXTRA, Т2-висок профил (т.е. кръвни еозинофили> 260 cells/microL или FeNO> 19.5 ppb) се свързва със значително намаляване на екзацербациите при лечение с Omalizumab.

Еозинофилните биомаркери могат глобално да идентифицират "Т2-медиирана БА", но е вероятно да съществуват субфенотипи, които да реагират по различен начин на IgE или Т2 цитокинова таргетна терапия, вероятно в резултат на различен цитокинов профил (384).

2.8.3 Серумни нива на периостин

Периостинът е 90-kDa матрицелуларен протеин, член на семейство fasciclin-съдържащи протеини, който се кодира от POSTN ген (240). Първите съобщения за него са през 1993 година от Takeshita и сътр., като остеобласт специфичен фактор 2 (OSF-2) (419). Следващи изследвания показват, че той се експресира в разнообразни тъкани, включително в ембрионалният периост, пародонтални връзки, плацента, сърдечни клапи, надбъбречни жлези, бели дробове и щитовидна жлеза (240). Периостинът се секретира от епителните клетки и фибробластите в отговор на стимулация с TGFβ и IL-4/IL-13 (цитокини свързани с Th2 медиираното възпаление при астма), и се свързва с други екстрацелуларни компоненти – колаген I, III и V, фибронектин, тенасцин-C (203, 260). Takayama и сътр. първи установяват отлагането на периостин в субепителния

слой на дихателните пътища при пациенти с БА (418). ДНК анализ на епителни клетки от дихателните пътища при БА, показа свръхекспресия на гени, регулиращи нивото на периостин (260). Експресията на периостин в бронхиалните епителни клетки корелира със задебелението на базалната мембрана в дихателните пътища (391).

Генната експресия на POSTIN, който кодира периостин се индуцира в бронхиалните епителни клетки след *in vitro* стимулация с рекомбинантен IL-13 и корелира с повишени нива на IL-13 и IL-5 в дихателните пътища и с персистиращо еозинофилно възпаление (192, 461). Периостинът в серума на пациенти с БА отразява нивото на продукцията му в дихателните пътища (260).

Серумният периостин е идентифициран в бронхоскопско, проучвателно, изследване на биомаркери, свързани с КС-рефрактерна БА (BOB-CAT) (192), като най-добрият предиктор за еозинофилия в дихателните пътища при пациенти с тежка форма на БА, които остават симптоматични въпреки максималното лечение с ИКС (> 1000 μg дневно еквивалент на *fluticasone dipropionate*; средни ФЕО1 60%, ACQ - 2.7). Превъзходството на серумния периостин за предсказване на локалната еозинофилия е показано чрез логистичен регресионен анализ, който обхваща броя на еозинофилите в кръвта, FeNO и серумните нива на IgE (n = 59) (192).

В BOB-CAT проучването са използвани предварително определени оптимални гранични стойности за броя на еозинофилите в спутума – 3% и 22 еозинофили/mm² в общата площ на биопсията (192). Средното ниво на серумния периостин е значително по-високо при пациенти с "еозинофилно-висока" БА, дефинирани, като такива с еозинофилия в спутума и в тъканните биопсии. При част от пациентите е наблюдавано повишение на еозинофили само в спутума или само в тъканта, но не и при двете заедно. Серумните нива на периостина са сензитивни и при двете групи пациенти. Пациенти със серумни нива на периостин по-високи от 25 ng/ml показват 85% вероятност за еозинофилия в дихателните пътища (192).

Разработените серумни тестове за периостин, използвани при няколко популации от пациенти с БА в изследователски проучвания и рандомизирани плацебо-контролирани, клинични проучвания показват, че нивата на серумния периостин са в положителна корелация с FeNO, ECP, тотални IgE и броя на еозинофилите в спутума, бронхиалната тъкан и периферна кръв (29, 192, 210). Серумният периостин, еозинофилията в периферна кръв и FeNO са прогностични за повишена честота на

тежки екзацербации на БА в плацебо рамото на голямо клинично изпитване с Omalizumab (моноклонално антитяло срещу IgE) (EXTRA study). Същите биомаркери са предиктивни относно клиничната полза от лечението с Omalizumab (156).

Пациенти с повишени нива на серумен периостин показват подобрение на белодробната функция и редуциране на броя на екзацербациите при започване на анти IL-13 терапия. Тези резултати са наблюдавани в 3 различни рандомизирани клинични проучвания с две различни анти-IL-13 антитела (lebrikizumab или tralokinumab), при участие над 1100 пациента с умерено тежка и тежка БА (55, 87, 155). Lebrikizumab намалява нивата на серумния периостин и FeNO при средно тежка БА до тези, наблюдавани при здрави контроли (29).

Докато броят на еозинофили в кръвта, FeNO и нива на серумен периостин са маркери за цялостна, комплексна оценка на Th2/еозинофилно възпаление, серумният периостин ни предоставя ясна, конкретна информация за хроничното възпаление и ремоделирането на Th2/еозинофилните дихателни пътища. Периостинът може да се окаже ключова молекула, която свързва ремоделирането на бронхите с еозинофилния/Th2 медииран отговор при БА (202).

В мултицентрово, кохортно проучване на KiHAC са оценени факторите, свързани с ускорен спад на белодробната функция при 224 астматици получаващи лечение с ИКС (средна възраст 62.3 години, 171 жени) (202). Целта на проучването е да се идентифицират серумни биомаркери и генетични фактори свързани с годишното снижение на белодробната функция при пациенти с астма провеждащи продължително лечение с ИКС. Проследена е промяна във ФЕО1 - в началото и една година след лечение с ИКС. Нивата на серумният периостин са измерени чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) Shino-test. Резултатите показват, че серумното ниво на периостин при пациенти с БА (средно: 92.8 ng/ml) е значително по-високо от нивото му при 66 здрави контроли (средно: 39.1 ng/ml). Установена е слаба, но значима положителна корелация между нивата на периостин и броя на еозинофилите в кръвта, нива на серумни IgE или нива на ECP (202).

Хроничният риносинуит, оценен чрез самостоятелно попълнен въпросник също е фактор, свързан с повишени серумни нива на периостин при тази популация. Сред серумните маркери, които включват ECP, CRP, IL-6, IL-17, нивото на периостина е единственият биомаркер свързан с по-голям годишен спад на ФЕО1. При използване на

дихотомни данни за високо (≥ 95 ng/ml; n= 85) и ниско (< 95 ng/ml) ниво на серумния периостин, които са определени чрез сравнение със здрави индивиди, високото серумно ниво е свързано със спад на ФЕО1 с 30 ml или повече годишно (202).

Th2/еозинофилното възпаление не винаги се повлиява от КС. Това важи и за продукцията на периостин. Проучвания *in vitro* доказват, че КС лечение ефективно намалява IL-4/IL-13-индуцираната продукция на периостин от епителни клетки и фибробласти, но не инхибира TGF-β-свързаното производство от фибробласти или IL-4/IL-13-индуцираната продукция на периостин от ендотелни клетки в микросъдовете(389, 418, 461). При стероидно-наивни пациенти с астма, инициирането на ИКС терапия (еквивалент на *fluticasone propionate* 400 μg дневно) намалява серумния периостин на 24-та седмица, но само с 5.4% спрямо базалното ниво. Системното противовъзпалително лечение е в състояние да понижи серумното ниво на периостин, докато ефекта на ИКС изглежда минимален. Това е в контраст с промените в нивата на FeNO, които значително намаляват с 27.4% от изходното ниво на 12-та седмица в групата на стероидно-наивни пациенти (n = 37) (260). Нивото на FeNO може да отразява острото възпаление в дихателните пътища, докато нивото на серумният периостин, вероятно е свързано с хронично или латентно възпаление и ремоделиране на дихателните пътища. В тази насока са необходими допълнителни изследвания за потвърждаване на предварителните констатации. За разлика от FeNO и броя на еозинофилите в кръвта, серумните нива на периостин са стабилни и с малка вариабилност, изисквания необходими за надеждността на биомаркера. Установените средни коефициенти на вариация (CV) за FeNO, еозинофилният брой в кръвта и ниво на серум периостин една седмица след включване в клинично проучване за Lebrikizumab (анти IL-13 антитяло) в периода за подготовка са респективно 19.8%, 21.3% и 5.0% (87). В проучването BOBCAT, CV за FeNO и серум периостин, на 2-3 седмица са респективно 8.2% и 2.2% (192).

Agache и сътр. не откриват връзка на серумния периостин с еозинофилния брой в спутума или кръвта дори след стратификация на пациентите според нивата на общ IgE (14). Серумните нива на периостин не корелират с IL-5 или IL-13. Тези данни са в съответствие с проучването на Wagener и сътр. (443), които представят данни за това, че серумните нива на периостин не биха могли да разграничат еозинофилно от нееозинофилно възпаление в дихателните пътища. Sterk и сътр. също не наблюдават

асоциация на серумното ниво на периостин с еозинофилията, което е в противоречие с предходни проучвания, като не е изяснено несъответствието в данните (443).

Matsusaka и сътр. идентифицират фенотип на пациенти с високи нива на серумен периостин, който е представен от по-възрастни пациенти, с по-висока честота на късно начало на БА, фиксирана обструкция, назална коморбидност и еозинофилия (261).

Различията в данните свързани със серумните нива на периостин може да отразяват наличието на различни подтипове на Th-2 БА. Възможно е периостинът да е свързан с фенотип на възрастни пациенти с фиксирана обструкция, еозинофилия, които са неатопични.

Точната роля на периостина за определяне на белодробната функция е все още неясна, въпреки връзката му с редица патогенетични механизми при БА, включително с развитие на субепителна фиброза и повишена продукция на муцин от гоблетовите клетки. Субепителното натрупване на периостин потенцира адхезията и придвижването на еозинофили в екстрацелуларния матрикс на дихателните пътища (184).

Необходими са допълнителни изследвания за валидизиране и изясняване на потенциалната полезност на серумния периостин, като биомаркер. Бъдещи проучвания следва да оценят неговото значение за клиничната практика, тъй като е доказано, че високи нива на периостин могат да бъдат свързани с редица състояния на повишена клетъчна пролиферация, стрес и тъканна увреда и ангиогенеза, които не са свързани с Th-2 имунен отговор (28, 77, 85, 466). Тези съображения трябва да насочат клиницистите към интегриран подход, който съчетава изясняване на връзки между клинични характеристики и молекулярни патологични механизми. Необходими са допълнителни проучвания проектирани внимателно, за да се прецени дали серумния периостин, самостоятелно или в комбинация с други по-конвенционални биомаркери, може да се използва за преосмисляне на налагащите се фенотипове астма и за селекция на пациентите за провеждане на индивидуализирана терапия насочена към Th-2 възпалението (77).

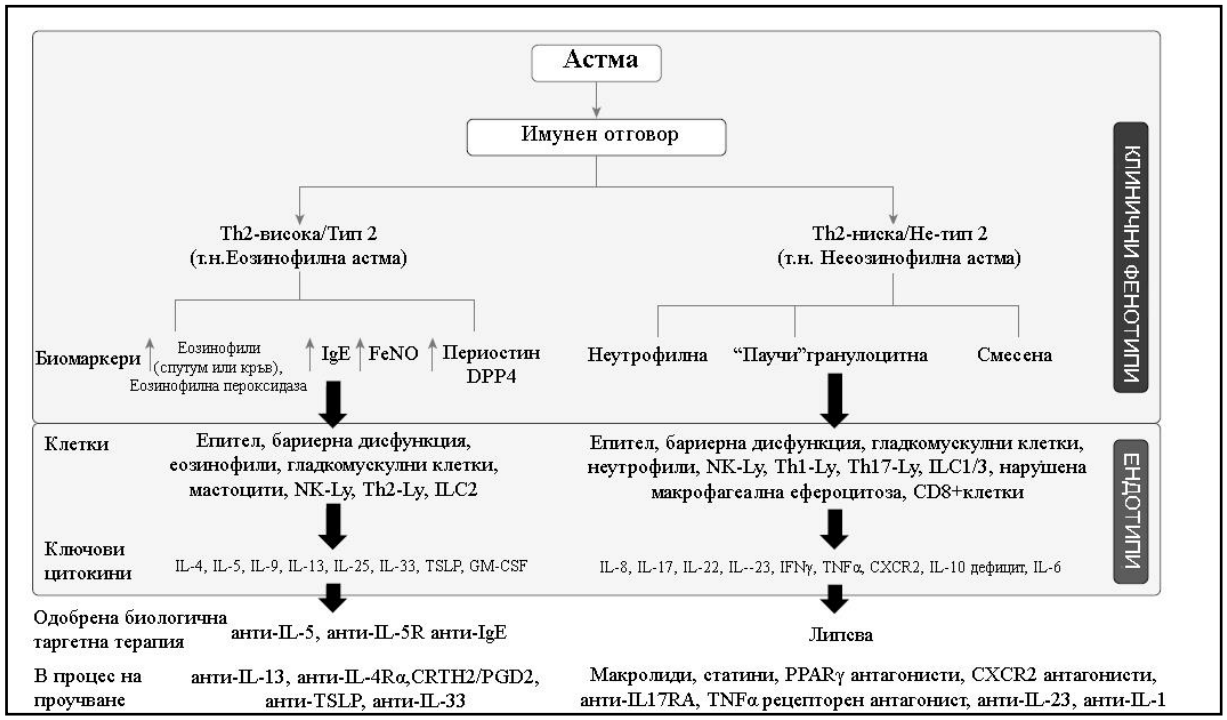
2.9. Изводи от литературния обзор

Хетерогенността на бронхиалната астма налага провеждане на комплексна оценка на пациентите и анализирането на множество фактори и показатели. Дефиницията на заболяването събира множество подгрупи с различни прояви, риск и не напълно ясни подлежащи механизми за развитие.

Клъстерни проучвания подкрепят идеята, че клинико-възпалителните модели за фенотипизиране на астмата са променливи, но чрез тях могат да бъдат идентифицирани фенотипи, които остават стабилни във времето и подлежат на персонализиран подход за лечение (455). Въпреки нарастващите данни в областта на БА и утвърждаване на конкретни фено- и ендотипи, окончателното групиране на пациентите и връзката им с патобиологията остават несигурни.

Фенотипизирането може да бъде базирано на клинични, функционални, инфламаторни, имунологични и генетични характеристики. Наблюдава се припокриване между клиничните клъстери, но техните възпалителни профили под влияние от околните фактори може да ги направи променливи във времето. Това води до необходимост от боравене с биомаркери или по-скоро панел от биомаркери, които да ни служат за по-точно класифициране на пациентите в отделни подгрупи на БА.

Настоящата концепция за два големи ендотипа на БА – Т2 висока и Т2 ниска БА, предстои да се развива и да се анализират механизмите на припокриване, прогресия и изменчивост на утвърдените фенотипи свързани с тях (Фиг.9).



Фиг.9 Настояща концепция за астма фено/ендотипизирането.

Напредването в характеризирането на отделни астма фенотипове е важно за: 1) по-добро разбиране на етиологичните механизми на астмата; 2) идентифициране на конкретни причини; 3) разработване на нови терапевтични мерки, които ще бъдат

ефективни за всички пациенти с астма и 4) възможност за по-успешно лечение и превенция на астмата. Днес има големи изследователски възможности поради развитие и установяване на техники за идентифициране на неинвазивни системни биомаркери. Има възможност индивидуализирано да се анализира всеки пациент чрез методи за интегриране на данни от различни източници.

Продължават да се разработват терапии, които предстои да бъдат насочени според индивидуалните подлежащи механизми на заболяването при всеки пациент отделно. Правилната селекция на пациентите е от основно значение за постигане на добър отговор от избраната терапевтична стратегия.

III. Цел и задачи

Цел

Да се формират и анализират отделни фенотипи на възрастни пациенти със средно-тежка и тежка бронхиална астма на базата на биометрични, функционални, клинични, възпалителни и имунологични характеристики и биомаркери и да се определи терапевтичното поведение чрез алгоритъм, приложим в рутинната клинична практика.

Задачи

1. Да се определи и оцени клиничното значение на пола, възрастта, началото и продължителността на бронхиалната астма, коморбидностите и тютюнопушенето при възрастни пациенти със средно-тежка и тежка бронхиална астма и да се анализират техните асоциации с контрола, тежестта, възпалителните и имунологични маркери.
2. Да се определят контрола, честотата на екзацербациите, функционалните характеристики и тежестта на бронхиалната астма и да се анализират факторите свързани с тях.
3. Да се изследват и анализират атопичен статус, общи IgE, фракция на издишан азотен окис, кръвни еозинофили и С-реактивен протеин и да се потърси асоциация с останалите изследвани клинични и имунологични характеристики.
4. Да се изследват серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A и периостин и да се определят гранични стойности на базата на резултати получени при здрави контроли с цел дефиниране на групи с високи и ниски нива на серумните маркери и да се анализират техните различия.
5. Да се групират пациентите според утвърдени биомаркери и да се анализират различията в техния възпалителен и имунологичен профил.
6. Да се проведе непреднамерен клъстерен анализ с дефиниране на клъстерни групи в изследваната популация с цел идентифициране на отделни фенотипи.
7. Да се определи терапевтичното поведение чрез алгоритъм, приложим в рутинната клинична практика.

IV. Материал и методи

Настоящото крос-секционно проучване се проведе след разрешение на Комисията по Етика на Научните Изследвания в Медицински Университет – София в периода 2015-2019 година.

4.1 Изследвана популация

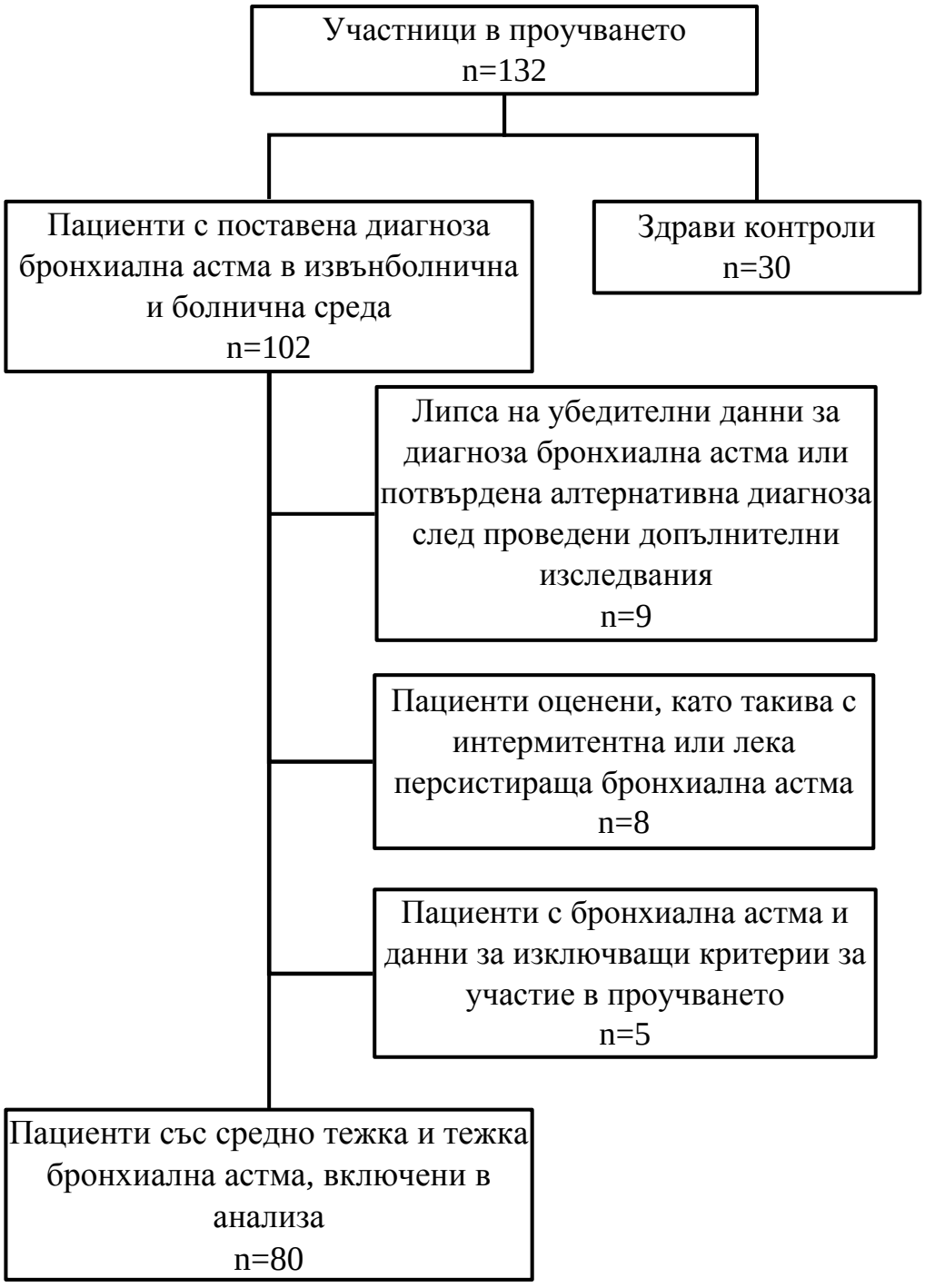
След подписване на информирано съгласие (виж. приложение 1), в проучването взеха участие 132 възрастни, от които 30 сравними по възраст и пол здрави контроли (ЗК) и 102 пациента с бронхиална астма (БА). Диагнозата БА беше поставена според критериите на GINA на базата на събраната медицинска информация и проведените изследвания. Тежестта на заболяването се определи според международните препоръки и критерии на GINA (средно-тежка БА = стъпка 3, тежка БА = стъпка 4 и 5) и ATS/ERS 2014 [необходимост от висока доза ИКС и допълнителен контролиращ медикамент (ДДБА, Montelukast, Theophylline), и/или използването на ОКС над 6 месеца през последната година (стъпка 4, 5 според GINA), за да се предотврати загубата на контрол, или остава неконтролирана, въпреки това лечение].

В крайния анализ бяха включени 80 пациента със средно-тежка (СТА) и тежка бронхиална астма (ТА), при които през последните 4 седмици не са настъпили промени в терапията (фиг. 10).

Включващи критерии за участие в проучването бяха следните: поставена диагноза БА на базата на типични клинични симптоми, проявена вариабилност и реверзибилност на бронхиалната обструкция, обективизирана с положителен бронходилататорен тест по изискване на международните ръководства (GINA; BTS/SIGN; EPR-3), подписана писмена форма на информирано съгласие, възраст между 18 и 75 години, регулярно провеждана поддържаща терапия с ИКС или комбинация ИКС и ДДБА през последните 4 седмици (терапевтична стъпка 3, 4 и 5 по GINA), преди включване в проучването.

Изключващи критерии за участие в проучването бяха следните: екзацербация, наложила провеждането на СКС терапия през последните 4 седмици преди изследването, активна инфекция или такава довела до хоспитализация или лечение през последните 4 седмици преди изследването, интерстициална белодробна болест или друго значимо белодробно заболяване освен БА, злокачествено заболяване, автоимунно заболяване, остър или хроничен хепатит, цироза, бъбречна недостатъчност, тежки сърдечно-съдови и ендокринологични заболявания, известна имунна недостатъчност –

HIV инфекция, провеждане на терапия с ЛТРА, депо КС препарати, моноклонални антитела, имуномодулираща или имуносупресираща терапия, специфична десенсибилизация, злоупотреба с алкохол и наркотични вещества или бременност.



Фиг. 10 Схема на изследваната популация

След проведената предварителна селекция на пациентите, отговарящите на заложените критерии бяха поканени за визита при спазване на хигиенно-диетичен режим, адекватен за провеждане на ФИД, FeNO и хематологични изследвания.

4.2 Методи

4.2.1 Анкетна карта и въпросници

Всички пациенти попълниха анкетна карта (виж. приложение 2). Събра се подробна информация относно първа изява, продължителност и ход на бронхиалната астма. Оцени се терапията, придържането към нея и техниката на инхалиране. Информирахме се за коморбидности и рискови фактори за развитие на бронхиална астма и други белодробни заболявания. По анамнестични и документални данни се оцени честотата на екзацербациите през последната една година.

Използвана беше валидираната скала на Morisky, Green, Levine за оценка на придържането към терапията (MGL), която се състои от четири елемента, които определят причините за неспазване: забравяне, безгрижие, чувство за подобрение или влошаване. Резултатът варира между 0 (силно придържащи се) и 4 (силно не придържащи се).

В анализа са включени тежките екзацербации, довели до прием на СКС за 3 или повече дни, посещение на спешен център или хоспитализация.

Извърши се подробен физикален преглед. Проведоха се антропометрични измервания за определяне на височината и теглото. Индексът на телесна маса (ИТМ) се изчисли по формулата: телесно тегло/ръст^2 (kg/m^2). В зависимост от ИТМ бяха определени ката пациенти с: нормално тегло – ИТМ 18.5 – 24.9; наднормено тегло – ИТМ 25 – 29.9; затлъстяване – ИТМ ≥ 30.

Оцени се експозицията на тютюнев дим, като пациентите бяха разделени в следните групи: настоящи пушачи, бивши пушачи (отказ от тютюнопушене от над 1 година) и непушачи. Пакетогодините бяха изчислени по формула (брой изпушени цигари на ден) х (брой години тютюнопушене)/20.

Използваха се следните въпросници за оценка контрола на БА (виж. приложение 3):

- *Тест за контрол на астмата* - Asthma Control Test (ACT). Той включва четири въпроса за симптоми и употреба на бързодействащ инхалатор при нужда и един въпрос за самооценка нивото на контрол за последните 4 седмици. Резултатите варират от 5 до 25 точки. От 20 до 25 точки се отнасят за добре контролирана БА. От 16 до 19 точки –

недобре контролирана БА и от 5 до 15 точки – много лош контрол на БА. Минималната клинично значима разлика е 3 точки.

- *Въпросник за контрол на астмата* (ACQ 5,6,7). ACQ7 включва 5 въпроса за симптоми и един въпрос за употреба на бързодействащ инхалатор при нужда през последните 7 дни и актуална стойност на пребронходилататорен ФЕО1 в процент от предвидената. 0-0.75 точки – добър контрол, 0.75 -1.49 точки – сива зона, ≥ 1.50 – лош контрол. Минималната клинично значима разлика е 0.5. ACQ5 включва само 5 въпроса за оценка контрола над симптомите.

- *Оценка на контрола над симптомите през предходните 4 седмици чрез 4-те въпроса препоръчани от GINA*: дневни повече от два пъти седмично, нощни симптоми, употреба на инхалатор при нужда повече от два пъти седмично, ограничения във физическата активност поради симптоми на БА. Оценката на контрола се определя като: неконтролирана при 3-4 положителни отговора, частично контролирана при 1-2 положителни отговора, контролирана при 0 положителни отговора.

Оценка на терапията:

- Стъпка 3: Препоръчва се комбинация от ниска доза ИКС/ДДБА и при нужда КДБА или използването на ниска доза ИКС в комбинация с Formoterol, като контролираща и при нужда терапия. Като алтернатива при възрастни и юноши се прилага средна доза ИКС, като монотерапия или ниска доза ИКС в комбинация с ЛТРА или ниска доза Theophylline с удължено освобождаване.

- Стъпка 4: Препоръчва се средна доза ИКС/ДДБА и при нужда КДБА или използването на ниска доза ИКС в комбинация с Formoterol, като контролираща и при нужда терапия. Като алтернатива могат да се използват високи дози ИКС, като монотерапия или средни дози ИКС/ДДБА с добавяне на дълго-действащ М-холинолитик (Tiotropium), ЛТРА или ниска доза Theophylline с удължено освобождаване.

- Стъпка 5: Насока за фенотипна оценка. Висока доза ИКС/ДДБА (за 3-6 месеца, след това преоценка). Добавяне на Tiotropium, Azithromycin, анти-IgE, анти-IL-5, анти-IL-4R терапия. Бронхиална термопластика. Алтернатива е лечението с ниски дози ОКС.

4.2.2 Изследване на фракцията на азотен окис в издишан въздух (FeNO)

Проведе се изследване на фракцията на азотен окис в издишан въздух (FeNO) чрез системата NIOX MINO (Aerocrine, Sweden). Резултатът е представен в мерни единици – частици на милиард (ppb). Измерването се извърши при следните условия:

предварително определяне на нивата на азотен окис в околната среда, стайна температура 16-30°C, атмосферно налягане: 700-1060 hPa, влажност: 20-60% (некондензираща среда), издишан дебит по време на изследването: 50 ml/s ± 10% BTPS, диапазон на измерване: 5 – 300 ppb, време на издишване: 10 секунки. Проведени бяха 3 опита и се използва средната аретметична стойност за анализ след ежемесечна калибрация с биологични контроли.

4.2.3 Спирометрия

Чрез стандартна форсирана спирометрия се определиха основни функционални параметри. Използван беше спирометър MiniSpir® (софтуер WinspiroPRO® версия 6.8.0; Italy) със зададени предвидени стойности на глобалната белодробна инициатива (GLI). При анализа се използваха и сравниха, както данните получени, като процент от предвидената стойност, така и препоръчвани за употреба от GLI, LLN и Z score. Проведе се бронходилататорен тест (БДТ) с 400 mcg Salbutamol с отчитане на отговора след 15-20 мин, след преустановяване инхалирането на КДБА 6-8 часа преди извършване на спирометрията и на ДДБА 24 часа преди изследването. Повишение на постбронходилататорният ФЕО1 с над 200 мл и 12% от изходните стойности се прие за положителен БДТ. Фиксирана бронхиална обструкция беше дефинирана, като стойности на съотношението ФЕО1/ФВК < LLN след бронходилатация или проведено противовъзпалително лечение.

4.2.4 Кожно-алергични проби (КАП)

Проведоха се КАП за оценка на атопичния статус на пациентите. Проведоха се тестове с най-често срещаните инхалаторни алергени - микрокърлежи в домашен прах (D.pteronyssinus, D.farinae), полени, треви, плесени, плевели, котка, куче, морско свинче, пух, пера, като резултатите се отчетоха на 15 мин. в сравнение с положителна контрола към хистамин и отрицателна контрола. Тестовете се проведоха в Клиника по алергология към УМБАЛ „Александровска“.

4.2.5 Кръвни изследвания и серумни маркери

Еднократно чрез венепункция се взе кръв в 1 епруветка от 2 мл с K3EDTA за определяне на ПКК и ДКК, 2 епруветки от 5 мл с гел и клот активатор за сепариране на серум.

Пълна кръвна картина се изследва чрез автоматична методика с апарат Medonic M 20 S. Абсолютният брой и процентното съотношение на клетките в периферна кръв

беше определено след мануално микроскопско изброяване на 300 клетки от натривка на периферна кръв оцветена по метода на Романовски-Гимза.

Серумът се отдели след центрофугиране на 1000 x g за 10 минути и разделен в отделни криоепруветки, всяка с количество 250-500 µl, след това пробите бяха съхранявани на температура - 80°C в хладилник (SO-LOW, USA, модел C85-3) до провеждането на изследванията.

Измерването на общите серумни IgE (EUROIMMUN Total IgE ELISA, Germany) се проведе в Клиника по клинична имунология към УМБАЛ „Александровска“.

Алерген-специфични IgE антитела към Staphilococcus aureus ентеротоксин B се измериха чрез флуороензимноимунен метод и затворена система ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden) в Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ).

Определянето на серумните нива на CRP (Roche, Germany), IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A (Diaclone ELISA, France) и серумен периостин (Cusabio ELISA, China) се проведе в Клиника по клинична лаборатория и имунология към УМБАЛ „Свети Иван Рилски“.

4.2.6 Определяне на общи IgE

Общите IgE се изследваха чрез метода ELISA с кит за количествено определяне на IgE (EUROIMMUN Total IgE ELISA, Germany). За изследването бяха необходими 25 µl серум, отделени от венозна кръв. Върху PVC фабрични стрипове, натоварени с поликлонални антитела насочени срещу човешки IgE се накапваха 25 µl от Standart 0, 1, 2, 3, 4, 5 и серум на пациентите. Непосредствено след това се накапа IgE биотин конюгирано антитяло. След инкубация от 30 мин. на стайна температура последва трикратно промиване с промивен разтвор и поставяне на 100 µl ензимен конюгат (античовешко IgE). След инкубация 30 мин. на стайна температура последва отново трикратно промиване с промивен разтвор и поставяне по 100 µl субстрат TMB във всяко гнездо на плаката. След това се проведе нова инкубация на стайна температура за 15 мин. Реакцията се прекрати с 100 µl стоп разтвор. Резултатът се отчете спектрофотометрично чрез апарат ELISA Reader при дължина на вълната 450 nm. Определиха се стойностите на абсорбциите на стандартите и на серумите на пациентите и резултата се отчете по стандартна крива в IU/ml.

4.2.7 Определяне на специфични IgE към Staphilococcus aureus ентеротоксин B

Определянето на серумните нива на специфични IgE към Staphilococcus aureus ентеротоксин B се извърши по флуороензимноимунен метод (FPIA) с апарата ImmunoCAP. Тест алергените са ковалентно свързани върху твърд носител-ImmunoCap. Изследвания 40 µl серум автоматично се диспергира в ImmunoCap, натоварен с алергена, срещу който се търсят антитела. Последва инкубация при постоянна температура 37 градуса и промиване. Добави се анти IgE, маркирано с β-галактозид/метилумбелиферил-β-D-галактозид. След втора инкубация от 24 мин и промиване, се добави ензимният субстрат метилумбелиферил-β-D-галактозидаза. Последва още една инкубация за 9 мин, спиране на ензимната реакция и отчитане на флуоресценцията, генерирана от свободния метилумбелиферил. Броят на отчетените светлинни импулси бе преобразувана в цифрова стойност. Така описаният процес се извърши напълно автоматизирано. Резултатът бе представен в kUA/l. Обхватът за измерване бе 0,1-100 kUA/L. Резултати над 0.35 kUA/L се приеха за положителни.

4.2.8 Определяне на серумен IL-5

За определяне на IL-5 в серум използвахме Human IL-5 ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). Необходими материали за провеждане на теста: 96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 250 pg/ml, една лиофилизирана контрола (113±28 pg/ml), 10-пъти концентриран Standard Diluent Buffer, Standard Diluent Buffer (Human serum), биотинилирано второ антитяло и неговия дилуент, HRP-стрептавидин и неговия разтворител, 200-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита:

1. Възстановяване на лиофилизиран стандарт чрез добавяне на 1.29 ml от Standard Diluent Buffer (Human serum), което дава работна концентрация 250 pg/ml. Приготвяне на понижаващите разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 125, 62.5, 31.25, 15.62 и 7.81.

2. Лиофилизираната контрола се приготви чрез добавяне на 1 ml разреден Standard Diluent Buffer (Human serum). Пациентските проби не се разреждат.

3. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).

4. Приготви се биотинилираното анти-антитяло (240 µl от концентрата в 6360 µl от специалния за него дилуент).

5. 96-ямковата плака се накапва с по 100 µl от Standard Diluent Buffer (Human serum) (0 стандарт), стандартите, контролата и пациентски проби. Плаката се покрива с адхезивно фолио и следва инкубиране за 2 часа на стайна температура.

6. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

7. Към всяко гнездо се добавят по 50 µl от предварително приготвеното биотинилирано антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира 1 час. 10 минути преди изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 µl) се добавят 500 µl от специалния разтворител за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидина – 10 ml от разтворителя се смесват със 150 µl от разредения стрептавидин.

8. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

9. Добавяне на 100 µl от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.

10. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

11. Добавяне по 100 µl от готовия за употреба Субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.

12. Прекратяване на ензимната реакция с 100 µl стопиращ разтвор.

13. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm

14. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите

Резултатите се отчетоха на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта. Получените стойности оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

4.2.9 Определяне на серумен IL-6

За определяне на IL-6 в серум използвахме Human IL-6 ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). Необходими материали за провеждане на теста: 96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 200 pg/ml, една лиофилизирана контрола, 10-пъти концентриран Standard Diluent Buffer, биотинилирано второ антитяло и неговия дилуент, HRP-стрептавидин и неговия разтворител, 200-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита:

1. Разреждане на Standard Diluent Buffer 1:10 (1 ml Standard Diluent Buffer + 9 ml дестилирана вода).

2. Лиофилизираният стандарт се възстанови чрез добавяне на 1.44 ml от разредения Standard Diluent Buffer, което дава работна концентрация 200 pg/ml. Приготвиха се понижаващите разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 100, 50, 25, 12.5 и 6.25.

3. Лиофилизираната контрола се приготвя чрез добавяне на 1 ml разреден Standard Diluent Buffer. Пациентските проби не се разреждат.

4. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).

5. Приготвя се биотинилираното анти-антитяло (240 µl от концентрата в 6360 µl от специалния за него дилуент).

6. 96-ямковата плака се накапва с по 100 µl от Standard Diluent Buffer (Blank), стандартите, контролата и пациентски проби.

7. Към всяко гнездо се добавят по 50 µl от предварително приготвеното биотинилирано антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира 1 час. 10 минути преди изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 µl) се добавят 500 µl от специалния разредител за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидина – 10 ml от дилуента се смесват със 150 µl от разредения стрептавидин.

8. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

9. Добавяне на 100 µl от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.

10. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

11. Добавяне по 100 µl от готовия за употреба Субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.

12. Прекратяване на ензимната реакция с 100 µl стопиращ разтвор.

13. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm

14. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите

Резултатите се отчететоха на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 6 стандарта. Получените стойности оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

4.2.10 Определяне на серумен IL-13

За определяне на IL-13 в серум използвахме Human IL-13 ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). Необходими материали за провеждане на теста: 96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 100 pg/ml, една лиофилизирана контрола (50±12 pg/ml), 10-пъти концентриран Standard Diluent Buffer, Standard Diluent Buffer (Human serum), биотинилирано второ антитяло и неговия дилуент, HRP-стрептавидин и неговия дилуент, 200-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита:

1. Лиофилизираният стандарт се възстановява чрез добавяне на 1.22 ml от Standard Diluent Buffer (Human serum), което дава работна концентрация 100 pg/ml. Приготвиха се понижаващи разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125.
2. Лиофилизираната контрола се приготви чрез добавяне на 1.0 ml разреден Standard Diluent Buffer (Human serum). Пациентските проби не се разреждат.
3. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).
4. Приготвя се биотинилираното анти-антитяло (240 µl от концентрата в 6360 µl от специалния за него дилуент).
5. 96-ямковата плака се накапва с по 100 µl от Standard Diluent Buffer (Human serum) (0 стандарт), стандартите, контролата и пациентски проби.
6. Към всяко гнездо се добавят по 50 µl от предварително приготвеното биотинилирано антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира 1 час и 30 минути. 10 минути преди изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 µl) се добавят 500 µl от специалния разтворител за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидина – 10 ml от разтворителя се смесват със 150 µl от разредения стрептавидин.
7. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.
8. Добавяне на 100 µl от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.
9. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.
10. Добавяне по 100 µl от готовия за употреба Субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.

11. Прекратяване на ензимната реакция с 100 µl стопиращ разтвор.
12. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm
13. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите

Резултатите се отчетоха на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта. Получените стойности оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

4.2.11 Определяне на серумен IL-17A

За определяне на IL-17A в серум използвахме Human IL-17A ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). Необходими материали за провеждане на теста: 96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 100 pg/ml, 10-пъти концентриран Standard Diluent Buffer, биотинилирано второ антитяло и неговия разтворител, HRP-стрептавидин и неговия разтворител, 200-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита:

1. Разреждане на Standard Diluent Buffer 1:10 (1 ml Standard Diluent Buffer + 9 ml дестилирана вода).
2. Лиофилизираният стандарт се възстанови чрез добавяне на 0.89 ml от разредения Standard Diluent Buffer, което дава работна концентрация 100 pg/ml. Приготвят се понижаващи разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 50, 25, 12.5, 6.25 и 3.125. Контрола в кита няма.
3. Пациентските проби се разреждат в отделни фиолки 1:2 (120 µl от пробата се в 120 µl от разредения Standard Diluent Buffer).
4. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).
5. 96-ямковата плака се накапва с по 100 µl от Standard Diluent Buffer (Blank), стандартите и разредените пациентски проби. Покрива се с фолио и се инкубира 2 часа на стайна Т. 10 минути преди изтичане на времето за инкубация се приготвя биотинилираното анти-антитяло (240 µl от концентрата в 6360 µl от специалния за него дилуент.
6. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.
7. Към всяко гнездо се добавят по 50 µl от предварително приготвеното биотинилирано антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира 1 час. 10 минути преди

изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 µl) се добавят 500 µl от специалния разтворител за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидин – 10 ml от разтворителя се смесват със 150 µl от разредения стрептавидин.

8. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

9. Добавяне на 100 µl от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.

10. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

11. Добавяне по 100 µl от готовия за употреба Субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.

12. Прекратяване на ензимната реакция с 100 µl стопиращ разтвор.

13. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm

14. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите.

Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта и Blank. Получените стойности оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива. Получената концентрация на пробите беше умножена по дилуентен фактор 2 поради първоначалното разреждане.

4.2.12 Определяне на серумен IL-8

За определяне на IL-8 в серум използвахме Human IL-8 ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). Необходими материали за провеждане на теста: 96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 250 pg/ml, една лиофилизирана контрола (1050±262 pg/ml), 10-пъти концентриран Standard Diluent Buffer, Standard Diluent Buffer (Human serum), биотинилирано второ антитяло и неговия разтворител, HRP-стрептавидин и неговия разтворител, 200-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита:

1. Лиофилизираният стандарт се възстановява чрез добавяне на 1.22 ml от Standard Diluent Buffer (Human serum), което дава работна концентрация 2000 pg/ml. Приготвят се понижаващите разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 1000, 500, 250, 125, 62.5.

2. Лиофилизираната контрола се приготви чрез добавяне на 1.5 ml разреден Standard Diluent Buffer (Human serum). Пациентските проби не се разреждат.

3. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).

4. Приготвя се биотинилираното анти-антитяло (240 µl от концентрата в 6360 µl от специалния за него разтворител).

5. 96-ямковата плака се накапва с по 100 µl от Standard Diluent Buffer (Human serum) (0 стандарт), стандартите, контролата и пациентски проби.

6. Към всяко гнездо се добавят по 50 µl от предварително приготвеното биотинилирано антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира 1 час. 10 минути преди изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 µl) се добавят 500 µl от специалния разтворител за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидина – 10 ml от разтворителя се смесват със 150 µl от разредения стрептавидин.

7. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

8. Добавяне на 100 µl от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.

9. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

10. Добавяне по 100 µl от готовия за употреба Субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.

11. Прекратяване на ензимната реакция с 100 µl стопиращ разтвор.

12. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm

13. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите

Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта. Получените стойности оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

4.2.13 Определяне на серумен периостин

За определяне на периостин в серум използвахме Human periostin/osteoblast specific factor 2 (POSTN) ELISA kit (Cusabio). Необходими материали за провеждане на теста са 96-гнездова микротитърна плака, 4 броя фолио за покриване на плаката, 2 броя лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 400 ng/ml, 10-пъти концентриран Sample Diluent, биотинилирано второ антитяло (100x) и неговия

разтворител, HRP-стрептавидин (100x) и неговия разтворител, 25-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор.

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита:

1. Пациентските проби се разреждат със Sample Diluent 1:10 (25 µl проба с 225 µl Sample Diluent).

2. Лиофилизираният стандарт се възстановява чрез добавяне на 1.00 ml от Sample Diluent, което дава работна концентрация 400 ng/ml. Приготвят се понижаващите разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 200, 100, 50, 25, 12.5 и 6.25.

3. Приготвяне на Wash разтвор (20 ml от концентрата се разтварят в 500 ml дестилирана вода).

4. 96-ямковата плака се накапва с по 100 µl от Sample Diluent (Blank), стандартите и пациентски проби. Плаката се покрива с фолио и се инкубира за 2 ч в инкубатор на 37°C.

5. Течността от гнездата се отстранява. Плаката не се измива.

6. Приготвя се биотинилирано антитяло (100 µl от концентрата в 9900 µl от специалния за него разтворител).

7. Към всяко гнездо се добавят по 100 µl от предварително приготвеното биотинилирано антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира 1 час в инкубатор на 37°C.

8. Приготвя се стрептавидин (100 µl от концентрата в 9900 µl от специалния за него разтворител).

9. Измиване на плаката трикратно с по 200 µl от разредения WASH разтвор във всяко гнездо и подсушаване.

10. Добавяне на 100 µl от разреден стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 1 час в инкубатор на 37°C.

11. Измиване на плаката трикратно с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.

12. Добавяне по 90 µl от готовия за употреба Субстратен разтвор и инкубиране за 15-30 минути на тъмно в инкубатор на 37°C.

13. Стопиране на ензимната реакция с 50 µl стопиращ разтвор.

14. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm

15. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите

Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта. Получените стойности оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (ng/ml) съгласно построената калибрационна крива.

Получената концентрация на пробите беше умножена по дилуентен фактор 10 поради първоначалното разреждане.

4.2.14 Определяне на серумни нива на CRP

За определяне на серумни нива на CRP се приложи имунотурбидиметричен анализ с частици CRP LX (Latex) (Roche, Germany), чрез клинико-химичен анализатор анализатор Cobas Integra 400 Plus, Roche.

4.2.15 Статистически методи

Статистическият анализ се извърши с помощта на статистически пакети – SPSS for Windows, версия 19.0 (IBM,SPSS statistics inc.) и MedCalc® statistical software for Windows версия 13.0.6.0.

Категориите променливи са представени в проценти, а количествените като средна стойност и стандартно отклонение (SD) или като медиана с горна и долна четвърт на обхвата (IQR).

За ниво на статистическа значимост е приета стойност на $p<0.05$.

Приложени са следните методи:

А. Методи за проверка на хипотези

1. Параметрични методи:

1.1. Т-тест за две независими извадки (Independent Samples T-test) – сравнение на две средни стойности;

2. Непараметрични методи

2.1. Методи на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и Шапиро- Уйлк (Shapiro-Wilk) – проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива;

2.2. Метод на Ман-Уйтни (Mann-Whitney U test) – сравняване на средни стойности (рангове), когато разпределението не е нормално;

2.3 Метод на Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis) – множествено сравнение на повече от две средни стойности, когато разпределението не е нормално;

2.4. Метод хи-квадрат (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test) – търсене на връзка между две качествени променливи;

Б. Описателни методи и методи за оценка

1.Вариационен анализ на количествени променливи – средна стойност, стандартно отклонение (SD) и 95% доверителен интервал (CI) на средната стойност, медиана, интерквартилен обхват (IQR).;

2.Честотен анализ на качествени променливи, който включва абсолютни честоти, относителни честоти (в проценти);

3. Графични изображения.

B. Корелационен и регресионен анализ

1.Коефициент на линейна корелация – параметричен (Pearson) и непараметричен (Spearman);

Корелационната зависимост се класифицира по степен на зависимост (сила) по следния начин: изключително голяма при коефициент- $r > 0.9$; голяма – $0.7 \leq r \leq 0.9$, значителна – $0.5 \leq r \leq 0.7$, умерена - $0.3 \leq r \leq 0.5$, слаба - $r < 0.3$.

Знакът на корелационния коефициент определя дали зависимостта е положителна (правопропорционална) или отрицателна (обратнопропорционална).

2.Логистичен регресионен анализ (univariate/multivariate – еднофакторен/многофакторен) – за оценка на риска от дадено събитие чрез отношението на шансовете (Odds Ratio);

C. ROC крива анализ с определяне зоната под кривата (AUC)

D. Клъстерен анализ - Клъстерният анализ е многомерен статистически метод за установяване на относително еднородни групи от единици, основаващи се на избрани характеристики. Тези групи се наричат клъстери, от английската дума cluster – група от близко лежащи обекти. Стандартизират се променливите величини изразени в различни мерки. Йерархичен анализ - постъпково обединяване на "близки" обекти

V. Резултати

Общи характеристики на изследваните групи БА и ЗК

	БА (n=80)	ЗК (n=30)	p
Възраст, години	*45.2 ±14.2*	*43.4 ±13.3*	0.516
Жени/мъже	52/28 (65/35%)	22/8 (73.3/26.7%)	0.407
ИТМ, kg/m^2	26.7 (22.8-30.7)	25.3 (21.6-28)	0.280
Затлъстяване, не/да	57/23 (71.3/28.8%)	6 (20%)	0.602
Тютюнопушене, не/бивш/настоящ	38/23/19 (47.50/28.75/23.75%)	17/6/7 (56.7/23.3/20%)	0.606
Пакетогодини	3.6 (0-11)	0 (0-7)	0.349
Начало, възраст	*33.3 ±12*	-	-
Начало, групи <20/20-40/>40	22/29/29 (27.5/36.25/36.25%)	-	-
Продължителност, год.	8.50 (3-18.75)	-	-
Лошо придържане	21 (26.3%)		
КАП /+/	19/61 (23.8/76.3%)	-	-
Ринит, не/да	19/61 (23.7/76.3%)	-	-
ACQ5 резултат	1.00 (0.20-2.15)	-	-
ACQ7 резултат	1.00 (0.32-2.25)	-	-
ACT резултат	21 (16-24)	-	-
Неконтролирана БА (GINA)	44 (55%)	-	-
Екзацербации за 1 год.	1 (0-2)	-	-
Екзацербации, >1 за год.	56 (70%)	-	-
Тежка БА (ATS/ERS)	35 (43.8%)	-	-
Терапия стъпка 4/5 (GINA)	58 (72.5%)	-	-
Висока доза ИКС	40 (50%)	-	-
Ниска доза ОКС	10 (12.5%)	-	-
Общ IgE, IU/ml	119.95 (42.30-289.51)	5.85 (2.10-15.50)	<0.001
Общ IgE >100 IU/ml	44 (55%)	0	-
FeNO, ppb	29.5 (18.3-47.8)	10 (6.8-13.3)	<0.001
b-Eos, cells/microL	322 (205-509)	105 (79-185)	<0.001
b-Neu, 10^9L	4.65 (3.51-5.94)	4.45 (3.25-4.90)	-
CRP, mg/L	2.07 (0.85-4.66)	-	-
Пре ФВК, Z score	-0.94 (-1.88; -0.07)	0.73 (0; 1.13)	<0.001
Пре ФЕО1, Z score	-1.49 (-2.78; -0.49)	0.40 (-0.53; 1.23)	<0.001
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.35 (-2.30; 0.04)	-0.06 (-0.50; 0.37)	<0.001
Пост ФВК, Z score	-0.61 (-1.42; 0.05)	-	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.13 (-2.20; -0.16)	-	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.94 (-1.86; 0.27)	-	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	25 (31.3%)	-	-
Промяна на ФЕО1, %	5 (0-13.50)	-	-

Резултатите са представени в брой (%), средна ± стандартно отклонение (SD) (*Italic*), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Student's t-test или Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; ЗК – здрави контроли; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин

Табл. 6 Общи характеристики на изследваните групи на пациенти с БА и ЗК.

Основните характеристики на групите БА и ЗК са представени на табл.6. ЗК са неатопични, с нормални спирометрични функционални показатели и без история или симптоми на белодробни заболявания или друга тежка коморбидност. Те съответстваха по пол, възраст, ИТМ и тютюнопушене на групата БА. Пациентите с БА бяха със статистически значимо по-високи нива на общи IgE, FeNO и кръвни еозинофили и по-ниски функционални характеристики (ФВК, ФЕО1, съотношение ФЕО1/ФВК) ($p<0.05$ за всички сравнения) (табл.6).

5.1 Резултати към задача 1: Определяне и оценка на пола, възрастта, началото и продължителността на БА, коморбидностите и тютюнопушенето при възрастни пациенти със средно-тежка и тежка бронхиална астма и анализ на техните асоциации с контрола, тежестта, възпалителните и имунологични маркери.

5.1.1 Разпределение по пол

В изследваната група с БА, преобладаваше женският пол (52 жени – 65% и 28 мъже – 35%). Не установихме значими различия спрямо началото на БА, продължителност, контрол, симптоми, тютюнопушене, FeNO, кръвни еозинофили, серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A и периостин при сравнение по пол. При мъжете установихме значимо по-високи нива на серумни общи IgE ($p=0.044$) и по-висок ИТМ ($p=0.015$), а при жените наблюдавахме значимо по-висок брой екзацербации през последната една година ($p=0.014$) (табл.7, приложение 4).

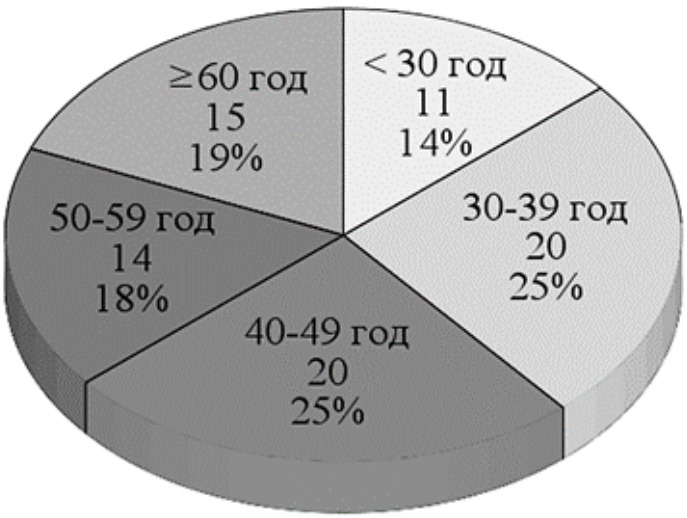
	Жени (n=52)	**Мъже (n=28)**
Начало	36 (20-50)	31 (19-45)
Възраст	43 (34-58)	41 (34-58)
Продължителност	8 (2-17)	13 (6-21)
Пакетогодини	3.9 (0-11)	1.8 (0-11)
Лошо придържане	15 (28.8%)	6 (21.4%)
ИТМ, kg/m^{2*}	**25 (22-30)**	**29 (25-33)**
КАП /+/	39 (75%)	22 (78.6%)
ACQ5 резултат	1.2 (0.1-2.1)	0.9 (0.2-2.0)
ACQ7 резултат	1.17 (0.29-2.29)	0.86 (0.50-2.14)
АСТ резултат	19 (17-24)	22 (17-25)
Неконтролирана БА (GINA)	30 (57.7%)	14 (50%)
Тежка БА (ATS/ERS)	20 (38.5%)	15 (53.6%)
Екзацербации*	**1 (1-2)**	**1 (0-1)**
FeNO, ppb	30 (19-50)	30 (20-43)
b-Eos, cells/microL	307 (188-507)	330 (244-514)
b-Neu, 10^9L	4.39 (3.50-5.53)	5.43 (3.98-6.50)
Пре ФВК, Z score	-0.96 (-1.78; 0.01)	-0.91 (-1.88; -0.28)
Пре ФЕО1, Z score	-1.49 (-2.68; -0.49)	-1.53 (-2.94; -0.46)
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.21 (-1.96; -0.08)	-1.59 (-2.84; 0.09)
Пост ФВК, Z score	-0.55 (-1.41; 0.15)	-0.72 (-1.43; -0.24)
Пост ФЕО1, Z score	-1.09 (-1.95; -0.14)	-1.26 (-2.69; -0.21)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.88 (-1.64; 0.31)	-1.39 (-2.56; 0.15)
Серумни нива:		
IL-5, pg/ml	2.17 (1.50-3.18)	2.53 (1.95-3.33)
Периостин, ng/ml	1.86 (1.30-1.98)	1.78 (1.08-2.15)
IL-13, pg/ml	1.10 (0.35-1.69)	1,07 (0.69-3.20)
IL-17A, pg/ml	3.06 (0.49-24.85)	0.59 (0.48-13.95)
IL-6, pg/ml	1.54 (0.91-2.23)	1.06 (0.60-2.27)
IL-8, pg/ml	1.83 (0-4.50)	1.20 (0.10-5.85)
Общ IgE, IU/ml*	**107.3 (34-210.5)**	**211.5 (56.9-428.5)**
CRP, mg/L	2.00 (0.76-4.64)	2.10 (1.01-4.51)

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; IL-8 беше изследван при n=46 жени и n=24 мъже; Серумен периостин беше изследван при n=26 жени и n=16 мъже; *p<0.05

Табл.7 Характеристика на пациентите с БА при разделение по пол

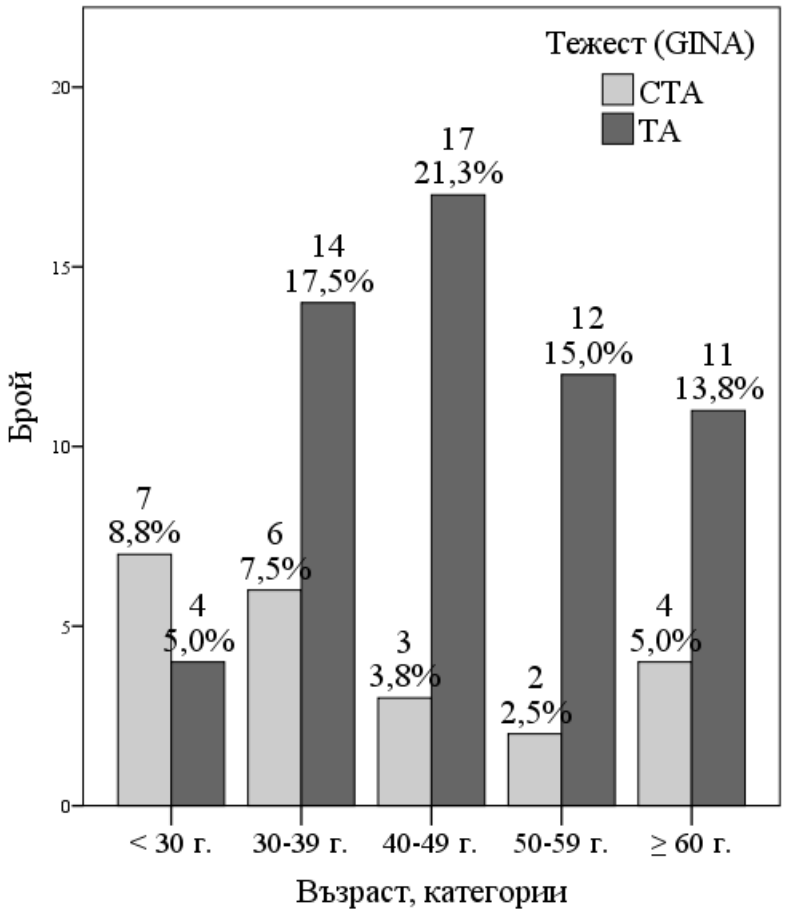
5.1.2 Разпределение по възраст

Средната възраст беше 45.38 ±14.16 в диапазона от 19 год. до 74 год. Преобладаваха пациентите на възраст между 30 и 49 год. (фиг.11).



Фиг.11 Разпределение на пациентите с БА по възраст

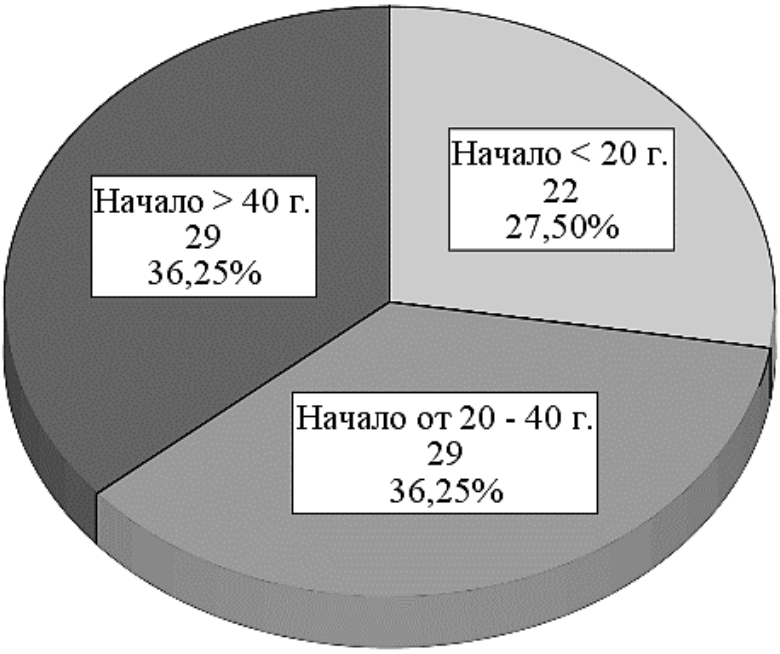
Установихме по-висока честота на тежка БА (GINA) във възрастовите групи над 30 години ($\chi 2$ – 10.07, p=0.039) (фиг.12)



Фиг.12 Тежест на БА според разпределението по възраст

5.1.3 Начало на БА

Средната възраст на изява на БА в изследваната от нас популация беше 33.34 ±12.01 години, а средната продължителност - 8.50 (3-18.75) години. При 22 (27.50%) се установи начало на БА преди 20-годишна възраст, при 29 (36.25%) – начало между 20-40-годишна възраст, а при 29 (36.25%) начало след 40-годишна възраст. Доминираха пациентите с късна изява на БА (≥ 20 год.) (n=58; 72.50%) (фиг.13).



Фиг.13 Разпределение на пациентите с БА според възрастта на начална изява на БА

При сравнение на пациентите с ранно (<20 г.) и късно (≥20 г.) начало на БА не наблюдавахме статистически значими различия според пол, ИТМ, тютюнопушене, придържане, тежест, контрол, екзацербации, терапия, белодробна функция, нива на CRP и общи IgE, абсолютен брой на кръвни еозинофили и неутрофили, и серумни нива на изследваните интерлевкини и периостин (виж приложение 7). Статистически значимо повече пациенти с ранно начало на БА бяха с данни за алергенна сенсибилизация (95.5%) при сравнение с пациентите с късно начало на БА (69%) ($p<0.05$).

Характеристики на пациентите с ранно начало на БА:

Пациентите с ранно начало бяха на средна възраст 34 (27-40) г. със средна продължителност на заболяването 23 (16-29) г. В групата доминраха жените (n=13;

59.1%) и пациентите с атопия (n=21; 95.5%). Настоящите тютюнопушачи при БА с ранно начало бяха 4 (18.2%), а в 31.8% от случаите установихме лошо придържане към терапията. Коморбидностите в групата бяха със следната изява: ринит при 18 (81.8%), AERD при 6 (27.3%), затлъстяване при 5 (22.7%), ГЕРБ при 8 (36.4%) пациента. Неконтролирана БА установихме при 13 (59.1%) пациента, а ТА (ATS/ERS 2014) при 9 (40.9%). Средната честота на екзацербациите през последната една година беше 1 (0-2). Половината от пациентите в групата бяха на висока доза ИКС, а 2 (9.1%) на ниска доза ОКС. Разпределеението в групата според терапевтичната стъпка беше, като следва: стъпка 3 – n=6 (27.3%), стъпка 4 и 5 - n=16 (72.7%). Средното ниво на общи IgE беше 181 (52-400) IU/ml, на FeNO - 29 (20-46) ppb, а на кръвните еозинофили и неутрофили - 244 (183-464) cells/microL и 4.54 (3.42-6.22)x10^9L, респективно. Резултатите от функционалните изследвания, въпросниците за контрол и серумните нива на CRP, периостин и изследваните интерлевкини са отразени в табл. 8 и 9.

Характеристики на пациентите с късно начало на БА:

Пациентите с късно начало бяха на средна възраст 49 (39-60) год. със средна продължителност на заболяването 6 (2-12) г. Отново домираше женският пол (n=39; 67.2%), като атопия установихме при по-нисък процент пациенти в сравнение с БА с ранно начало (n=40; 69%). Настоящите тютюнопушачи бяха 15 (25.9%), а в 24.1% от случаите установихме лошо придържане към терапията. Коморбидностите в групата бяха със следната изява: ринит при 43 (74.1%), AERD при 4 (6.9%), затлъстяване при 18 (31%), ГЕРБ при 16 (27.6%) пациента. Неконтролирана БА установихме при 31 (53.4%) пациента, а ТА (ATS/ERS 2014) при 26 (44.8%). Средната честота на екзацербациите през последната една година беше 1 (0-1.25). Половината от пациентите в групата бяха на висока доза ИКС, а 8 (13.8%) на ниска доза ОКС. Разпределеението в групата според терапевтичната стъпка беше, като следва: стъпка 3 – n=16 (27.6%), стъпка 4 и 5 - n=42 (72.4%). Средното ниво на общи IgE беше 113 (36-254) IU/ml, на FeNO - 30 (18-53) ppb, а на кръвните еозинофили и неутрофили - 367 (229-512) cells/microL и 4.73 (3.52-5.72)x10^9L. Резултатите от функционалните изследвания, въпросниците за контрол и серумните нива на CRP, периостин и изследваните интерлевкини са отразени в табл. 8.

	Начало < 20 год. n=22; 27.5%	Начало ≥ 20 год. n=58; 72.5%	p
Възраст, години	34 (27-40)	49 (39-60)	<0.001
Жени/мъже	13/9 (59.1/40.9%)	39/19 (67.2/32.8%)	-
ИТМ, kg/m^2	26 (23-31)	27 (23-31)	-
Затлъстяване, не/да	17/5 (77.3/22.7%)	40/18 (69/31)	-
Тютюнопушене, не/бивш/настоящ	12/6/4 (54.5/27.3/18.2%)	26/17/15 (44.8/29.3/25.9%)	-
Пакетогодини	0 (0-4)	5 (0-15)	-
Продължителност, год.	23 (16-29)	6 (2-12)	<0.001
Лошо придържане	7 (31.8%)	14 (24.1%)	-
КАП, отр/моно/поли	1/6/15 (4.5/27.3/68.2%)	18/13/27 (31/22.4/46.6%)	0.043
Ринит, не/да	4/18 (18.2/81.8%)	15/43 (25.9/74.1%)	-
ГЕРБ	8 (36.4%)	16 (27.6%)	-
ACQ5 резултат	0.70 (0.15-1.85)	1.20 (0.15-2.60)	-
ACQ7 резултат	0.71 (0.29-2.04)	1.14 (0.39-2.36)	-
ACT резултат	21 (18-25)	20 (16-24)	-
Неконтролирана БА (GINA)	13 (59.1%)	31 (53.4%)	-
Екзацербации за 1 год.	1 (0-2)	1 (0-1.25)	-
Екзацербации, >1 за год.	8 (36.4%)	14 (24.1%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	9 (40.9%)	26 (44.8%)	-
Терапия стъпка 4/5	16 (72.7%)	42 (72.4%)	-
Висока доза ИКС	11 (50%)	29 (50%)	-
Ниска доза ОКС	2 (9.1%)	8 (13.8%)	-
Общ IgE, IU/ml	181 (52-400)	113 (36-254)	-
Общ IgE >100 IU/ml	12 (54.5%)	32 (55.2%)	-
FeNO, ppb	29 (20-46)	30 (18-53)	-
FeNO ≥ 30 ppb	10 (45.5%)	30 (51.7%)	-
FeNO > 50 ppb	4 (18.2%)	15 (25.9%)	-
b-Eos, cells/microL	244 (183-464)	367 (229-512)	-
b-Eos ≥ 300 cells/microL	8 (36.4%)	34 (58.6%)	-
b-Neu, 10^9L	4.54 (3.42-6.22)	4.73 (3.52-5.72)	-
CRP, mg/L	2.20 (0.69-6.20)	2.05 (0.88-4.38)	-
Пре ФВК, Z score	-0.51 (-2.02;0.56)	-0.98 (-1.75; -0.15)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.15 (-3.13; -0.33)	-1.61 (-2.71; -0.50)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.39 (-2.76; 0.11)	-1.21 (-2.16; 0.08)	-
Пост ФВК, Z score	-0.41 (-1.69; 0.49)	-0.74 (-1.23; 0.03)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.15 (-2.35; -0.22)	-1.12 (-2.19; -0.02)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-1.05 (-2.30; 0.20)	-0.94 (-1.82; 0.30)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	9 (40.9%)	16 (27.6%)	-
Промяна на ФЕО1, %	2 (0-10)	7 (1.75-15)	-
IL-5, pg/ml	2.73 (1.56-3.39)	2.19 (1.80-3.32)	-
IL-6, pg/ml	1.09 (0.64-1.73)	1.64 (0.92-2.35)	-
IL-8, pg/ml *	1.73 (0-5.66)	1.63 (0-4.61)	-
IL-13, pg/ml	1.17 (0.34-7.28)	1.06 (0.55-1.43)	-
IL-17A, pg/ml	0.78 (0.45-27.08)	3.96 (0.49-20.75)	-
Периостин, ng/ml **	1.83 (0.98-1.94)	1.86 (1.21-2.12)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; * IL-8 беше измерен при n=22 с начало < 20 г. и n=48 с начало ≥ 20 г.; **Периостин беше измерен при n=14 с начало < 20 г. и n=28 с начало ≥ 20 г.

Табл.8 Сравнение на БА според възраст на начална изява (ранно и късно начало)

Характеристики на пациентите с начало на БА след 40 год. възраст:

Пациентите с начало на БА след 40 год. възраст бяха на средна възраст 59 (53-66) год. със средна продължителност на заболяването 6 (2-11) г., предимно жени (n=20; 69%), като атопия установихме при по-нисък процент пациенти в сравнение с БА с ранно начало (n=19; 65.5%). Настоящите тютюнопушачи бяха 4 (13.8%), а в 31% от случаите установихме лошо придържане към терапията. Коморбидностите в групата бяха със следната изява: ринит при 23 (79.3%), AERD при 2 (6.9%), затлъстяване при 9 (31%), ГЕРБ при 8 (27.6%). Неконтролирана БА установихме при 14 (48.3%) пациента, а ТА (ATS/ERS 2014) при 12 (41.4%), като честотата е подобна на тази в останалите групи определени според начало на БА. Средната честота на екзацербациите през последната една година беше 1 (0-1.5). На висока доза ИКС бяха 48.3%, а 2 (6.9%) бяха на ниска доза ОКС. Разпределеението в групата според терапевтичната стъпка беше, като следва: стъпка 3 – n=5 (17.2%), стъпка 4 и 5 - n=24 (82.8%). Средното ниво на общи IgE беше 114 (34-254) IU/ml, на FeNO - 30 (19-50) ppb, а на кръвните еозинофили и неутрофили - 390 (280-519) cells/microL и 4.16 (3.46-5.27)x10^9L, респективно.

При директно сравнение на двете групи пациенти с БА с начало < 20 год. и с начало > 40 год. установихме статистически сигнификантно, по-висока честота на неатопични пациенти при БА с начало > 40 год. (n=10; 34.5% в сравнение с n=1; 4.5%) ($\chi 2$ – 6.654, p=0.036) и по-висока честота на пациенти с кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL (n=19; 65.5%, в сравнение с n=8; 36.4%) ($\chi 2$–4.268, p=0.039). При БА с начало > 40 год. установихме статистически значимо повишение в серумните нива на IL-6 (2.03 (1.45-3.35) pg/ml), при сравнение с останалите две групи (начало < 20 г. и начало 20-40 г., p=0.004 и p=0.001, респективно). Не открихме различия в серумните нива на CRP, общи IgE, периостин и останалите интерлевкини (табл. 9).

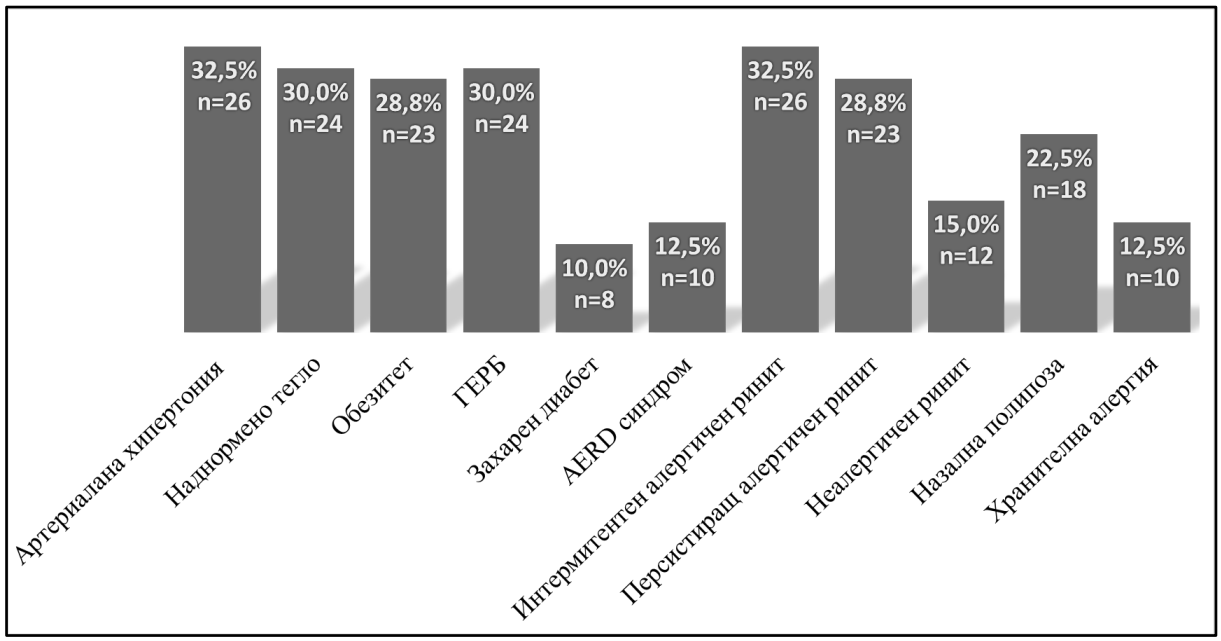
	Начало < 20 год. n=22; 27.5%	Начало 20-40 год. n=29; 36.25%	Начало > 40 год. n=29; 36.25%	p
Възраст, години	34 (27-40)	39 (33-43)	59 (53-66)	<0.001
Жени/мъже	13/9 (59.1/40.9%)	19/10 (65.5/34.5%)	20/9 (69/31)	-
ИТМ, kg/m^2	26 (23-31)	28 (23-31)	27 (23-31)	-
Затлъстяване, не/да	17/5 (77.3/22.7%)	20/9 (69/31%)	20/9 (69/31%)	-
Тютюнопушене, не/бивш/настоящ	12/6/4 (54.5/27.3/18.2%)	11/7/11 (37.9/24.1/37.9%)	15/10/4 (51.7/34.5/13.8%)	-
Пакетогодини	0 (0-4)	5 (0-15)	0 (0-12)	-
Продължителност, год.	23 (16-29)	5 (2-15)	6 (2-11)	<0.001
Лошо придържане	7 (31.8%)	5 (17.2%)	9 (31%)	-
КАП, отр/моно/поли	1/6/15 (4.5/27.3/68.2%)	8/8/13 (27.6/27.6/44.8%)	10/5/14 (34.5/17.2/48.3%)	-
Ринит, не/да	4/18 (18.2/81.8%)	9/20 (31/69%)	6/23 (20.7/79.3%)	-
AERD	6 (27.3%)	2 (6.9%)	2 (6.9%)	0.048
ГЕРБ	8 (36.4%)	8 (27.6%)	8 (27.6%)	-
ACQ5 резултат	0.70 (0.15-1.85)	1.20 (0.20-3.00)	1.20 (0-2.10)	-
ACQ7 резултат	0.71 (0.29-2.04)	1.28 (0.36-2.71)	1.00 (0.28-2.21)	-
ACT резултат	21 (18-25)	19 (15-23)	22 (17-25)	-
Неконтролирана БА (GINA)	13 (59.1%)	17 (58.6%)	14 (48.3%)	-
Екзацербации за 1 год.	1 (0-2)	1 (0-3)	1 (0-1.5)	-
Екзацербации, >1 за год.	8 (36.4%)	7 (24.1%)	7 (24.1%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	9 (40.9%)	14 (48.3%)	12 (41.4%)	-
Терапия стъпка 4/5	16 (72.7%)	18 (62.1%)	24 (82.8%)	-
Висока доза ИКС	11 (50%)	15 (51.7%)	14 (48.3%)	-
Ниска доза ОКС	2 (9.1%)	6 (20.7%)	2 (6.9%)	-
Общ IgE, IU/ml	181 (52-400)	111 (34-300)	114 (34-254)	-
Общ IgE >100 IU/ml	12 (54.5%)	15 (51.7%)	17 (58.6%)	-
FeNO, ppb	29 (20-46)	29 (17-59)	30 (19-50)	-
FeNO ≥ 30 ppb	10 (45.5%)	14 (48.3%)	16 (55.2%)	-
FeNO > 50 ppb	4 (18.2%)	8 (27.6%)	7 (24.1%)	-
b-Eos, cells/microL	244 (183-464)	320 (189-511)	390 (280-519)	-
b-Eos ≥ 300 cells/microL	8 (36.4%)	15 (51.7%)	19 (65.5%)	-
b-Neu, 10^9L	4.54 (3.42-6.22)	5.04 (3.89-6.56)	4.16 (3.46-5.27)	-
CRP, mg/L	2.20 (0.69-6.20)	2.10 (0.51-4.66)	2.00 (1.26-4.33)	-
Пре ФВК, Z score	-0.51 (-2.02;0.56)	-0.97 (-1.80; -0.07)	-0.98 (-1.83; -0.19)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.15 (-3.13; -0.33)	-1.69 (-2.72; -0.76)	-1.52 (-2.62; -0.19)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.39 (-2.76; 0.11)	-1.41 (-2.43; -0.31)	-0.90 (-2.01; 0.46)	-
Пост ФВК, Z score	-0.41 (-1.69; 0.49)	-0.72 (-1.18; 0.09)	-0.76 (-1.48; 0.04)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.15 (-2.35; -0.22)	-1.13 (-2.12; -0.29)	-1.05 (-2.44; 0.09)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-1.05 (-2.30; 0.20)	-1.15 (-1.83; 0.05)	-0.66 (-1.81; 0.49)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	9 (40.9%)	9 (31%)	7 (24.1%)	-
Промяна на ФЕО1, %	2 (0-10)	7 (1.5-16.5)	7 (1-12.5)	-
IL-5, pg/ml	2.73 (1.56-3.39)	2.18 (1.77-3.33)	2.20 (1.83-3.33)	-
IL-6, pg/ml	1.09 (0.64-1.73)	1.10 (0.41-1.86)	2.03 (1.45-3.35)	<0.001[1]
IL-8, pg/ml *	1.73 (0-5.66)	1.15 (0-3.46)	2.98 (0-6.09)	-
IL-13, pg/ml	1.17 (0.34-7.28)	1.06 (0.89-1.27)	1.06 (0-3.20)	-
IL-17A, pg/ml	0.78 (0.45-27.08)	10.41 (0.50-27.10)	0.57 (0.48-7.78)	-
Периостин, ng/ml **	1.83 (0.98-1.94)	1.93 (1.49-2.13)	1.78 (1.18-2.15)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis с post hoc анализ. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; * IL-8 беше измерен при n=22 с начало < 20 г., n=24 с начало 20-40 г. и n=24 с начало >40 г.; **Периостин беше измерен при n=14 с начало < 20 г., n=10 с начало 20-40 г. и n=18 с начало > 40 г.; [1] P<0.05 при сравнение на групата с начало > 40 г. и останалите две групи.

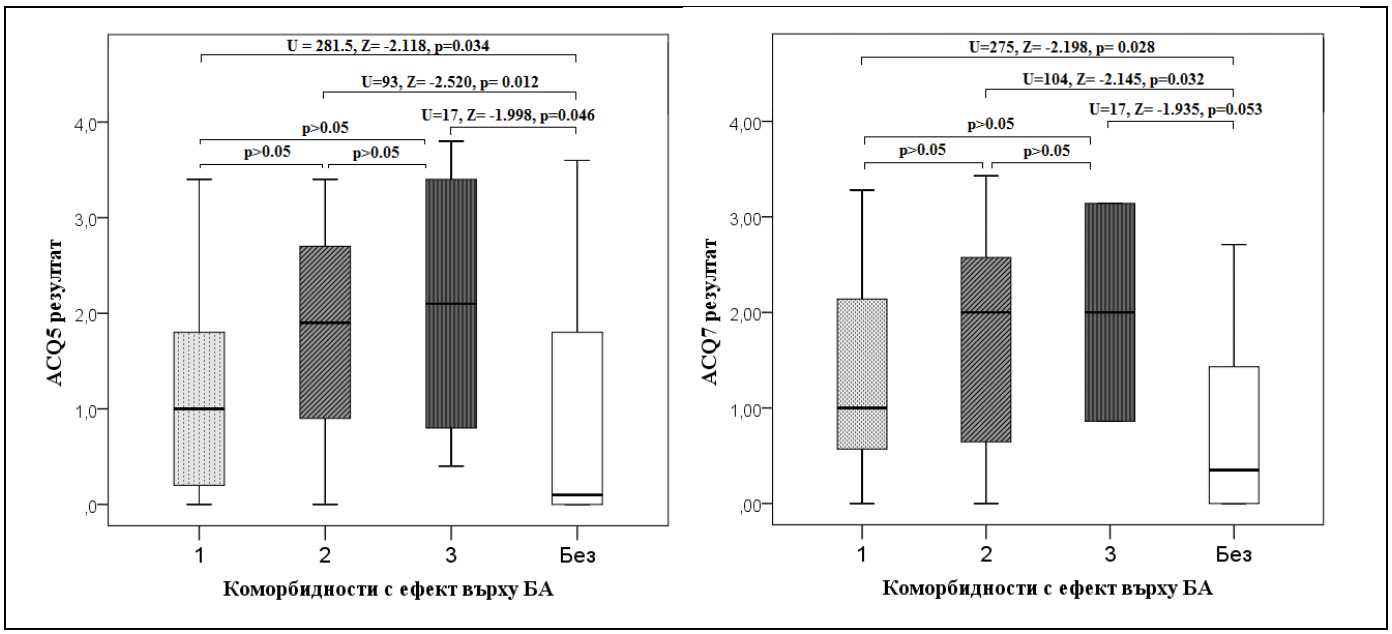
Табл. 9 Субанализ на БА според възраст на начална изява при разделение на групата с късно начало на две подгрупи (начало 20-40 г. и начало >40 г.)

5.1.4 Коморбидности

На фиг.14 е представена честотата на съпътстващите заболявания (персистиращ ринит, AERD синдром, ГЕРБ и затлъстяване) при БА, според които се определиха следните подгрупи: пациенти без коморбидности (n=22; 27.5%), с една коморбидност (n=38; 47.5%), с две коморбидности (n=16; 20%), с три и повече коморбидности (n=4; 5%). При сравнение между подгрупите установихме статистически сигнификантно по-висок резултат от ACQ5 ($\chi 2$ – 8.562, p=0.022) и ACQ7 ($\chi 2$ – 7.497, p=0.036) в групите на пациентите с една и повече коморбидности, което е свързано с по-изявени симптоми и лош контрол на заболяването (фиг.15).



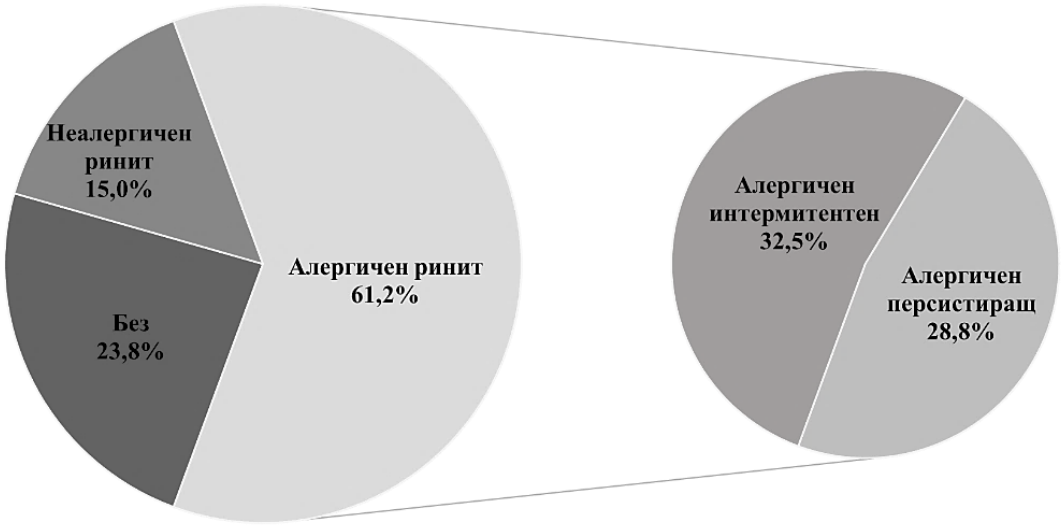
Фиг.14 Честота на съпътстващите заболявания в групата на пациенти с БА, n=80



Фиг.15 Влияние на коморбидностите върху контрола на БА

5.1.4.1 Ринит

Честота на ринит при БА в нашето проучване беше 76.3% (n=61). Неалергичен ринит установихме при 12 (15%), алергичен персистиращ ринит при 23 (28.8%), а алергичен интермитентен ринит при 26 (32.5%) пациенти с БА (фиг.16).



Фиг.16 Честота и характеристика на ринита при пациентите с БА

Серумните нива на общи IgE са значително по-високи при БА с алергичен ринит (220.5 (83.55 – 408.49) IU/ml) в сравнение с нивата при БА с неалергичен ринит (48.2 (8.65 – 79.18) IU/ml) и нивата при БА без съпътстващ ринит (48.2 (29.2-177.5) IU/ml) (χ2

– 12.218, p<0.001). Пациентите с БА и алергичен ринит показаха по-ранно начало на БА (28 (16.5-47) години) при сравнение с групата на БА с неалергичен ринит (44 (31.75-54.50) години) (U=177, Z=-2.124, p=0.034). При БА с персистиращ алергичен ринит установихме сигнификантно по-висок резултат от ACQ5 (1.6 (0.6-3.0)) (U=123.5, Z=-3.548, p<0.001) и ACQ7 (1.85 (0.71-3.0)) (U=120, Z=-3.592, p<0.001), по-нисък резултат от ACT (19 (14-24)) (U=193, Z=-2.148, p=0.032), по-висок брой левкоцити (8.00 (6.25-9.50)) (U=192.5, Z=-2.134, p=0.033), кръвни еозинофили (416 (192-576) cells/microL) (U=192, Z=-2.104, p=0.035) и неутрофили (5.049 (3.792-6.204) 10^9L) (U=187, Z=-2.244, p=0.025) и по-нисък Z score за пре- (-1.71 (-2.40- -0.87)) (U=186.5, Z=-2.334, p=0.020) и пост ФЕО1/ФВК (-1.34 (-2.01-0.12)) (U=192.5, Z=-2.134, p=0.033) при сравнение с БА и алергичен интермитентен ринит.

Ние установихме сигнификантно комбинирано повишение на серумните нива на IL-6 (1.645 (0.955-2.455) pg/ml) и IL-8 (3.100 (1.00-11.05) pg/ml) при пациентите с БА и персистиращ алергичен ринит при сравнение с БА и интермитентен алергичен ринит (0.650 (0.270-1.575) pg/ml за IL-6 и 0.750 (0-4.10) pg/ml за IL-8) (U=192,Z=-2.144; p=0.032 и U=124, Z=-2.061; p=0.039, респективно). Серумният IL-6 беше значимо по-висок при БА с персистиращ ринит (алергичен и неалергичен) (1.79 (1.13-2.62) pg/ml) в сравнение с БА с интермитентен ринит или без прояви на ринит (1.20 (0.60-1.96) pg/ml) (U=571,Z=-2.105,p=0.035).

5.1.4.2 AERD

При 10 (12.5%) от пациентите с БА установихме AERD.

Всички пациенти с AERD показаха тежка форма на БА (GINA) с висока честота на персистираща бронхиална обструкция (n=6, 60%) ($\chi 2$ – 4.397, p=0.036) и чести екзацербации (при 50% се установиха повече от 1 екзацербация през последната година).

При AERD бяха сигнификантно повишени кръвните левкоцити (U=156.5, Z=-2.816, p=0.005), еозинофили (U=135.5, Z=-3.121, p=0.002) и неутрофили (U=165.5, Z=-2.124, p= 0.007), и серумен IL-5 (U=176.5, Z=-2.525, p= 0.012), а сигнификантно по-ниски бяха пре- (U=183, Z=-2.430, p=0.015) и пост ФЕО1/ФВК (U=156, Z= -2.822, p=0.005) при сравнение с БА без AERD, (Табл.10).

	AERD		p
	Не	Да	
Възраст	42 (34-58)	44 (38-57)	-
Пол, жени	47 (67.1%)	5 (50%)	-
ИТМ, kg/m2	27 (23-31)	28 (23-31)	-
Пакетогодини	3.88 (0-12)	0 (0-5)	-
Начало	36 (20-49)	19 (16-37)	-
КАП /+/	52 (74.3%)	9 (90%)	-
ACQ5 резултат	1.0 (0-2)	1.6 (0.6-3)	-
ACQ7 резултат	0.93 (0.28-2.14)	2.00 (0.71-2.86)	-
АСТ резултат	21 (16-24)	21 (18-25)	-
Неконтролирана БА (GINA)	38 (54.3%)	6 (60%)	-
Екзацербации / 1 година	1 (0-1)	2 (0-2)	-
Терапия, стъпка 4/5	48 (68.6%)	10 (100%)	*0.037*
Тежка БА (ATS/ERS)	28 (40%)	7 (70%)	-
CRP, mg/L	2.07 (0.83-4.61)	2.74 (1.20-6.50)	-
WBC, 10/9L	7.3 (5.8-8.9)	9.5 (8-12.3)	*0.005*
b-Eos, cells/microL	295 (200-468)	819 (416-960)	*0.002*
b-Neu, 10/9L	4.483 (3.477-5.607)	6.080 (5.040-8.241)	*0.007*
FeNO, ppb	30 (18-47)	27 (22-65)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.36 (-2.72- -0.36)	-1.91 (-3.30- -1.14)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.00 (-2.05- -0.05)	-1.82 (-2.93- -1.16)	*0.034*
Промяна ФЕО1, ml	140 (40-290)	30 (0-140)	*0.035*
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.15 (-2.03-0.12)	-2.30 (-2.99- -1.35)	*0.015*
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.83 (-1.74-0.31)	-2.08 (-3.14- -1.38)	*0.005*
Серумен IL-5, pg/ml	2.17 (1.75-3.15)	3.30 (2.95-18.1)	*0.012*
Серумен IL-13, pg/ml	1.07 (0.60-1.80)	1.17 (0.4-1.92)	-
Серумен периостин, ng/ml	1.88 (1.38-2.04)	1.29 (0.85-2.08)	-
Серумен IL-6, pg/ml	1.42 (0.72-2.03)	2.40 (1.03-3.47)	-
Серумен IL-8, pg/ml	1.58 (0-4.58)	2.58 (0.60-7.65)	-
Серумен IL-17A, pg/ml	1.38 (0.48-19.5)	0.87 (0.5-26.9)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	107.3 (39.3-245)	230.65 (56.8-499.5)	-

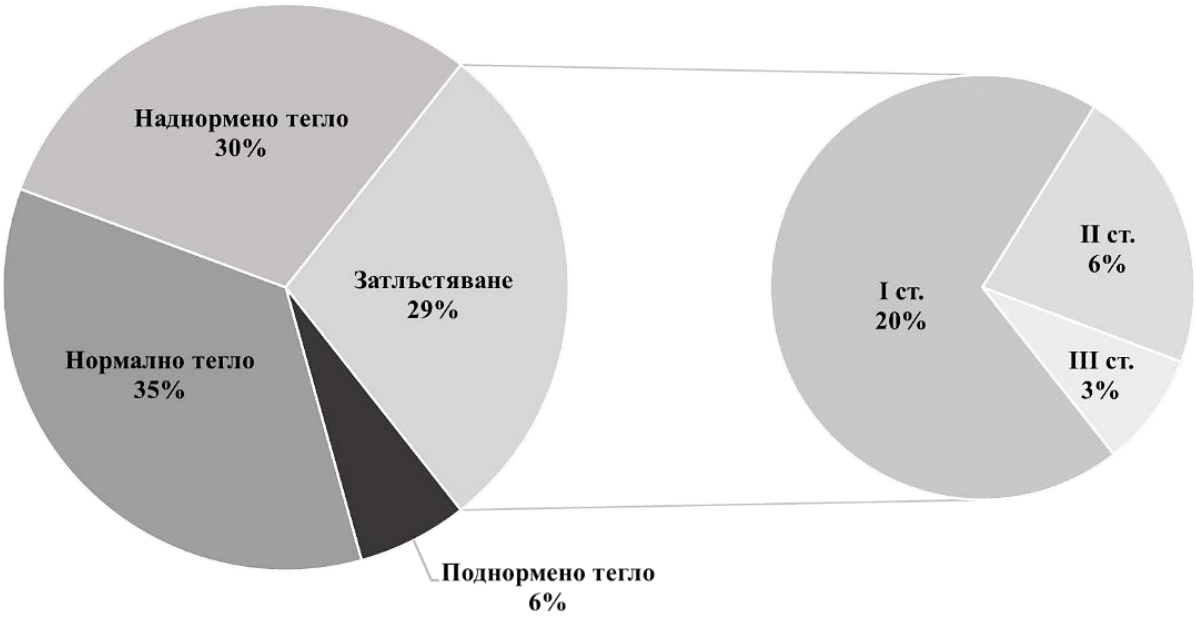
Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: WBC – бели кръвни клетки; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин; IL-8 беше изследван при n=60 без AERD и n=10 с AERD; Серумен периостин беше изследван при n=36 с AERD и n=6 без AERD;

Табл.10 Характеристики на пациентите с AERD синдром

5.1.4.3 Затлъстяване

Средната стойност на ИТМ при БА в нашето проучване беше 26.72 (22.75 – 30.75). Преобладаваха пациентите с нормално телесно тегло (n=28; 35%). Затлъстяване установихме при 23 (28.8%) пациента с БА, а разпределението по степени е отразено на Фиг.17. Доминираха пациентите с I ст. затлъстяване (n=16; 20%). При 7 (9%) от пациентите се наблюдаваше втора и трета степен затлъстяване. По-висока честота на затлъстяване се установи при мъжете (p=0.041). Не открихме значими различия в изследваните клинични и възпалителни показатели в групата на пациентите с БА и затлъстяване при сравнение с пациентите с БА и нормално или наднормено тегло (виж

приложение 5). ИТМ корелира положително със серумните нива на CRP (r=0.402, p<0.001). Установихме сигнификантно повишение на CRP (2.81 (1.34.80) mg/L) и кръвни еозинофили (410 (252-548) cells/microL) при БА с ИТМ ≥ 25 (p=0.008 и p=0.003 респективно) при сравнение с БА и ИТМ < 25 (табл.11).



Фиг.17 Разпределение на пациентите с БА по ИТМ

	ИТМ < 25 n=33; 41.3%	ИТМ ≥ 25 n=47; 58.8%	p
Възраст, години	41 (29-58)	46 (37-58)	-
Жени/мъже	26/7 (78.8/21.2%)	26/21 (55.3/44.7%)	0.030
Тютюнопушене, не/бивш/настоящ	15/10/8 (45.5/30.3/24.2%)	23/13/11 (48.9/27.7/23.4%)	-
Пакетогодини	3.75 (0-10)	2 (0-15)	-
Начало	31 (19-47)	36 (19-49)	-
Продължителност, год.	9 (3-15)	8 (3-20)	-
Лошо придържане	11 (23.4%)	10 (30.3%)	-
Ринит, не/да	9/24 (27.3/72.7%)	10/37 (21.3/78.7%)	-
ГЕРБ	7 (21.2%)	17 (36.2%)	-
КАП /+/	24 (72.7%)	37 (78.7%)	-
ACQ5 резултат	0.80 (0-1.80)	1.20 (0.20-2.40)	-
ACQ7 резултат	0.86 (0.28-2.14)	1.42 (0.42-2.29)	-
АСТ резултат	21 (17-25)	21 (16-24)	-
Неконтролирана БА (GINA)	18 (54.5%)	26 (55.3%)	-
Екзацербации за 1 год.	1 (1-2)	1 (0-2)	-
Екзацербации, >1 за год.	10 (30.3%)	12 (25.5%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	11 (33.3%)	24 (51.1%)	-
Терапия стъпка 4/5 (GINA)	21 (63.6%)	37 (78.8%)	-
Висока доза ИКС	14 (42.4%)	26 (55.3%)	-
Ниска доза ОКС	4 (12.1%)	6 (12.8%)	-
Общ IgE, IU/ml	111 (47-221)	154 (39-356)	-
Общ IgE >100 IU/ml	19 (57.6%)	25 (53.2%)	-
FeNO, ppb	29 (18-46)	30 (21-54)	-
FeNO ≥ 30 ppb	16 (48.5%)	24 (51.1%)	-
FeNO > 50 ppb	6 (18.2%)	13 (27.7%)	-
b-Eos, cells/microL	238 (146-405)	410 (252-548)	0.003
b-Eos ≥ 300 cells/microL	12 (36.4%)	30 (63.8%)	0.015
b-Neu, 10^9L	4.15 (3.42-5.62)	4.98 (3.81-6.20)	-
CRP, mg/L	1.15 (0.54-3.95)	2.81 (1.31-4.80)	0.008
Пре ФВК, Z score	-0.59 (-1.53; 0.49)	-0.98 (-2.08; -0.22)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.34 (-2.68; -0.22)	-1.69 (-3.00; -0.56)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.12 (-2.02; -0.32)	-1.42 (-2.50; 0.12)	-
Пост ФВК, Z score	-0.30 (-1.36; 0.53)	-0.79 (-1.45; -0.17)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.03 (-1.95; 0.09)	-1.21 (-2.67; -0.26)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.71 (-1.72; 0.18)	-1.23 (-2.19; 0.31)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	8 (24.2%)	17 (36.2%)	-
Промяна на ФЕО1, %	6 (0-12.5)	4 (0-15)	-
IL-5, pg/ml	2.10 (1.60-3.20)	2.45 (1.80-3.35)	-
IL-6, pg/ml	1.43 (0.69-2.10)	1.46 (0.75-2.46)	-
IL-8, pg/ml *	1.40 (0-4.40)	2..00 (0.20-5.00)	-
IL-13, pg/ml	0.95 (0-2.13)	1.11 (0.93-1.80)	-
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.48-17.35)	4.92 (0.48-27.60)	-
Периостин, ng/ml **	1.89 (1.49-2.16)	1.68 (1.18-1.93)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U тест. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; * IL-8 беше измерен при n=31 с ИТМ < 25 и n=39 с ИТМ ≥ 25; **Периостин беше измерен при n=20 с ИТМ < 25 и n=22 с ИТМ ≥ 25;

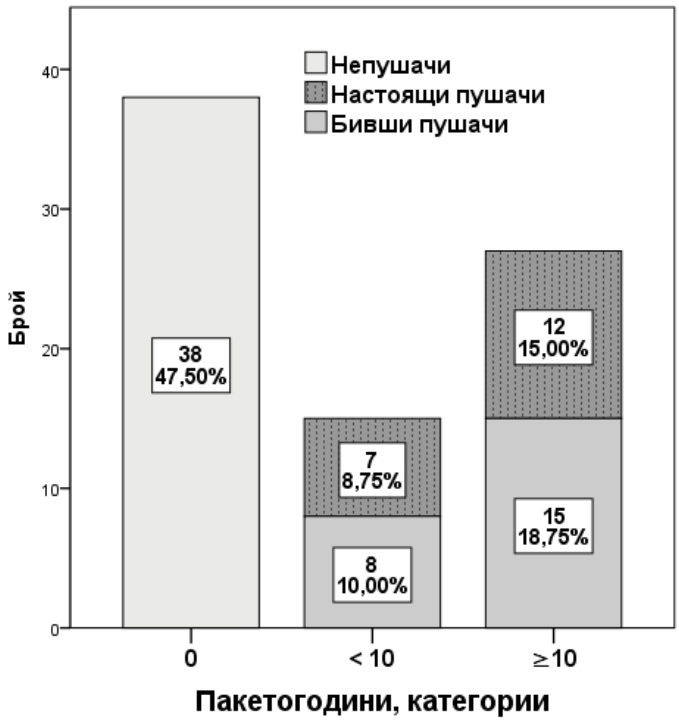
Табл. 11 Характеристики на пациентите според ИТМ

5.1.4.4 ГЕРБ

Симптоми на ГЕРБ се установиха при 24 (30%) от пациентите с БА, като при тях броя пакетогодини (U=476.5, Z=-2.175, p=0.030) беше статистически значимо по-голям в сравнение с пациентите без прояви на ГЕРБ.

5.1.5 Тютюнопушене и БА

При 42 (52.5%) пациенти с БА установихме експозиция на цигарен дим (настоящи n=19 (23.75%) и бивши n=23 (28.75%) тютюнопушачи). Непушачите бяха 38 (47.5%). При 27 (33.75%) установихме експозиция ≥ 10 пакетогодини (фиг.18).



Фиг.18 Разпределение на пациентите с БА според пакетогодини

Пациентите с експозиция ≥ 10 пакетогодини имаха следните статистически значими характеристики при сравнение, с непушачи и пациенти с експозиция < 10 пакетогодини:

- по-висока честота на ГЕРБ (n=13; 48.1%, в сравнение с n=11; 20.8%) (χ2–6.392, p=0.011)

- по-често неконтролирана БА (ACQ7≥1.5) (n=15; 55.6%, в сравнение с n=17; 32.1%) (χ2-4.109, p=0.043)

- по-високи резултати за ACQ 5, 6 и 7 [1.80 (0.60-3.00); 1.50 (0.67-2.67); 1.71 (0.86-2.57), в сравнение с 0.80 (0-1.90; 0.67 (0-1.75); 0.86 (0.28-2.14) , респективно], (p=0.021, p=0.024, p=0.043 респективно)

- по-висок процент БА с късно начало (≥ 20 год. възраст) (n=24, 88.9%, в сравнение с n=34; 64.2%), (χ2–5.490, p=0.019)

При това разделение на пациентите не наблюдавахме значими различия по пол, ИТМ, атопия, терапия, тежест, екзацербации, абсолютен брой на кръвни еозинофили и неутрофили, нива на FeNO, серумни нива на общи IgE, CRP, периостин и изследваните интерлевкини.

При сравнение на настоящите тютюнопушачи с непушачи/бивши тютюнопушачи установихме следните характеристики на настоящите тютюнопушачи (табл.12):

- доминиране на женският пол (n=16; 84.2%) (χ2–4.042, p=0.044)

- по-висока честота на СТА (n=15; 78.9%) (χ2–5.216, p=0.022)

- по-висок процент на терапия от стъпка 3 (n=13; 68.4%) (χ2–20.928, p<0.001)

- по-висок процент на пациенти с FeNO<30ppb (n=15; 78.9%) (χ2-8.352, p=0.004)

- по-ниски нива на FeNO [20 (11-29) ppb] (p=0.008)

Установихме тенденция за по-висока честота на непридържане към терапията на активните тютюнопушачи (n=8; 42.1%) при сравнение с непушачи и бивши пушачи (n=13; 21.3%) (χ2 - 3.236; p=0.072).

	Непушачи n=38; 47.5%	Бивши пушачи n=23; 28.8%	Настоящи пушачи n=19; 23.8%	p
Възраст, години	49 (35-64)	44 (37-56)	37 (27-49)	0.046*
Жени	23 (60.5%)	13 (56.5%)	16 (84.2%)	-
ИТМ, kg/m^2	27 (23-31)	27 (23-31)	26 (21-31)	-
Пакетогодини	0	10 (6-15)	10 (4.5-15)	-
Начало	33 (17-51)	38 (19-49)	30 (20-39)	-
Лошо придържане	7 (18.4%)	6 (26.1%)	8 (42.1%)	-
Ринит, да	27 (71.1%)	20 (87%)	14 (73.7%)	-
ГЕРБ	8 (21.1%)	8 (34.8%)	8 (42.1%)	-
ACQ5 резултат	0.80 (0-2.05)	1.80 (0.60-2.60)	0.60 (0.20-1.80)	-
ACQ7 резултат	0.86 (0.28-2.28)	1.71 (0.57-2.57)	1.00 (0.28-2.00)	-
АСТ резултат	21 (17-25)	19 (16-23)	23 (15-25)	-
Неконтролирана БА (GINA)	19 (50%)	15 (65.2%)	10 (52.6%)	-
Екзацербации	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	-
Екзацербации, >1 г	10 (26.3%)	7 (30.4%)	5 (26.3%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	20 (52.6%)	11 (47.8%)	4 (51.1%)	-
Терапия стъпка 4/5	32 (84.3%)	20 (87%)	6 (31.6%)	<0.001
Висока доза ИКС	23 (60.5%)	13 (56.5%)	4 (21.1%)	0.002
Ниска доза ОКС	5 (13.2%)	4 (17.4%)	1 (5.3%)	-
Общ IgE, IU/ml	96 (39-285)	127 (57-390)	133 (51-206)	-
Общ IgE >100 IU/ml	19 (50%)	14 (60.9%)	11 (57.9%)	-
FeNO, ppb	31 (22-56)	31 (19-60)	20 (10-29)	0.026*
FeNO ≥ 30 ppb	23 (60.5%)	13 (56.5%)	4 (21.1%)	0.015
b-Eos, cells/microL	328 (198-513)	385 (228-516)	238 (124-425)	-
b-Eos, %	4 (2.3-7)	5 (4-7)	3 (2-5)	0.023#
b-Eos ≥ 300 cells/microL	20 (52.6%)	15 (65.2%)	7 (36.8%)	-
b-Neu, 10^9L	5.04 (3.65-6.05)	3.79 (3.25-5.75)	4.98 (3.99-5.67)	-
CRP, mg/L	2.30 (1.18-4.88)	1.88 (0.51-4.70)	2.00 (0.64-4.32)	-
Пре ФВК, Z score	-1.10 (-1.91; -0.01)	-0.59 (-2.13; 0.01)	-0.87 (-1.36; -0.16)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.65 (-3.04; -0.54)	-1.52 (-3.00; -0.21)	-1.27 (-2.11; -0.36)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.56 (-2.75;0.12)	-1.47 (-2.40; -0.67)	-0.74 (-1.53; 0.37)	-
Пост ФВК, Z score	-0.78 (-1.43; -0.00)	-0.28 (-1.73; 0.42)	-0.55 (-0.88; 0.10)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.19 (-2.39; -0.22)	-1.16 (-2.48; 0.10)	-0.57 (-1.48; -0.26)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-1.17 (-2.51; 0.16)	-0.89 (-2.19; -0.21)	0.16 (-1.26; 0.52)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	14 (36.8%)	8 (34.8%)	3 (15.8%)	-
Промяна на ФЕО1, %	3.5 (0-15)	7 (2-12)	3 (0-14)	-
IL-5, pg/ml	2.18 (1.36-3.24)	2.15 (1.90-3.31)	2.40 (1.80-3.55)	-
IL-6, pg/ml	1.42 (0.89-2.26)	1.65 (0.70-2.31)	1.10 (0.52-2.16)	-
IL-8, pg/ml[1]	0.60 (0-4.58)	1.52 (0-4.88)	3.05 (0.48-5.28)	-
IL-13, pg/ml	1.17 (0.98-2.91)	0.95 (0-1.15)	1.06 (0-5.45)	-
IL-17A, pg/ml	4.96 (0.51-27.60)	0.77 (0.45-24.50)	0.57 (0.42-6.51)	Δ
Периостин, ng/ml[2]	1.95 (1.53-2.11)	1.50 (1.03-1.96)	1.88 (1.16-1.93)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis с post hoc анализ. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; [1] IL-8 беше измерен при n=33 непушачи, n=20 бивши пушачи, n=17 настоящи пушачи; [2] Периостин беше измерен при n=17 непушачи, n=12 бивши пушачи, n=13 настоящи пушачи;

*p<0.05 при сравнение на непушачи с настоящи пушачи

#p<0.05 при сравнение на бивши с настоящи пушачи

Δp<0.05 при сравнение на непушачи с бивши пушачи

Табл.12 Характеристики на пациентите според експозицията на тютюнев дим

При 11 от пациентите с експозиция на цигарен дим установихме персистираща бронхиална обструкция, въпреки високата бронхиална реверзибилност. Не наблюдавахме различия в честотата на персистираща бронхиална обструкция между

групите при сравнение според активност и продължителност на тютюнопушенето. (виж приложение 6).

5.2 Резултати към задача 2: Определяне на контрол, честота на екзацербации, функционални характеристики и тежест на БА и анализ на факторите свързани с тях

5.2.1 Контрол на БА

Контролът на заболяването се оцени по три метода: GINA, ACQ (5,6 и 7), ACT.

Средните стойности за ACQ 5,6 и 7 бяха както следва - 1.00 (0.20-2.15), 0.83 (0.17-1.83), 1.00 (0.32-2.25), а за ACT съответно - 21 (16-24).

Според критериите на GINA, пълен контрол установихме при 36 (45%) от пациентите, частичен контрол при 20 (25%), а лош контрол при 24 (30%) (табл. 14).

Пациентите с лош контрол на БА в нашето проучване бяха по-възрастни, провеждат по-често терапия стъпка 4 и 5 и при по-висок процент установихме съпътстващ алергичен ринит. Неконтролираната БА беше с по-чести екзацербации и по-високи нива на кръвни еозинофили. Повишени стойности на FeNO установихме при пациентите с лош контрол в сравнение с тези с пълен контрол на БА (U=284,Z=-2.227, p=0.026). Въпреки, че средната стойност за пакетогодините бе по-висока в подгрупата с лош контрол, резултатът не достигна статистически значима достоверност. Сигнификантно по-ниски стойности за пре- и пост ФЕО1 измерихме при пациентите с лош контрол в сравнение с тези с пълен контрол на БА (U=282, Z=-2.271, p=0.023, U=275, Z=-2.369, p=0.018, респективно).

Не наблюдавахме статистически значими разлики в серумните нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A, периостин, общи IgE и CRP между групите на пълно, частично и лошо контролирана БА (табл. 13).

		Контрол GINA			p
		Пълен n=36 (45%)	Частичен n=20 (25%)	Лош n=24 (30%)	
Възраст		43 (33-59)	38 (30-43)	50 (41-61)	[1]
Жени		22 (61.1%)	12 (60.0%)	18 (75.0%)	-
ИТМ, kg/m^2		26 (23-30)	25 (22-34)	27 (24-30)	-
Затлъстяване		10 (27.8%)	7 (35%)	6 (25%)	-
ГЕРБ		10 (27.8%)	7 (35%)	7 (29.2%)	-
Начало		35 (19-51)	21 (7.25-35)	39 (25-51)	[2]
Лошо придържане		9 (25%)	7 (35%)	5 (20.8%)	-
Настоящи тютюнопушачи		9 (25%)	6 (30%)	4 (16.7%)	-
Пакетогодини		0 (0-9.5)	3.9 (0-10)	5.5 (0-15)	-
КАП /+/		28 (77.8%)	16 (80%)	17 (70.8%)	-
Терапия, стъпка	стъпка 3	12 (33.3%)	9 (45.0%)	1 (4.2%)	<0.05
	стъпка 4/5	24 (66.7%)	11 (55.0%)	23 (95.8%)	
Алергичен персистиращ ринит		8 (22.2%)	4 (20.0%)	11 (45.8%)	<0.05
ACQ5 резултат		0.20 (0-0.95)	0.90 (0.45-1.80)	2.90 (2.05-3.20)	*
ACQ6 резултат		0.17 (0-0.79)	0.75 (0.50-1.67)	2.59 (1.71-3.00)	*
ACQ7 резултат		0.42 (0.04-0.86)	1.00 (0.61-2.11)	2.79 (2.14-3.11)	*
АСТ резултат		24 (22-25)	19 (17-22)	14 (11-18)	*
Екзацербации/1 год.		1 (0-1)	1 (0-2)	2 (1-4)	[3]
Тежка БА (ATS/ERS)		9 (25%)	7 (35%)	19 (79.2%)	<0.05
b-Eos, cells/microL		240 (139-412)	305 (222-462)	473 (361-779)	[3]
b-Neu, 10^9L		4.39 (3.44-5.69)	5.25 (3.53-5.93)	4.90 (3.85-6.79)	-
FeNO, ppb		26 (18-41.5)	31.5 (12-56)	36.5 (22-74)	[4]
Пре ФЕО1, Z score		-0.99 (-2.26; -0.18)	-1.67 (-3.20; -0.63)	-2,26 (-3.11; -0.79)	[4]
Пост ФЕО1, Z score		-0.65 (-1.81; 0.17)	-1.15 (-2.47; -0.41)	-1.60 (-2.83; -0.26)	[4]
промяна ФЕО1, %		2 (0-10)	5.5 (2-16)	7.5 (3-15)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score		-1.30 (-1.88; 0.05)	-1.15 (-2.54; 0.31)	-1.51 (-2.38; -0.04)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score		-0.88 (-1.44; 0.45)	-0.96 (-1.99; 0.31)	-1.13 (-2.12; 0.21)	-
Серумен IL-5, pg/ml		2.10 (1.47-3.08)	2.38 (1.27-3.46)	2.33 (1.92-5.20)	-
Серумен IL-13, pg/ml		1.04 (0.08-1.71)	1.15 (0.88-4.78)	1.10 (0.92-2.23)	-
Серумен IL-17A, pg/ml		0.77 (0.50-17.9)	2.75 (0.44-24.9)	5.17 (0.47-26.5)	-
Серумен IL-6, pg/ml		1.17 (0.51-2.19)	1.48 (0.76-2.42)	1.57 (1.16-2.53)	-
Серумен IL-8, pg/ml		0.83 (0-4.44)	2.42 (0-5.43)	2.03 (0-7.26)	-
Серумен периостин, ng/ml		1.73 (1.29-2.11)	1.90 (0.98-1.98)	1.93 (1.18-2.08)	-
Серумен общ IgE, IU/ml		91.7 (32.6-346.6)	129.9 (40-269)	134 (60.7-217)	-
CRP, mg/l		2.00 (0.68-4.46)	2.53 (0.66-5.03)	2.35 (1.23-4.58)	-

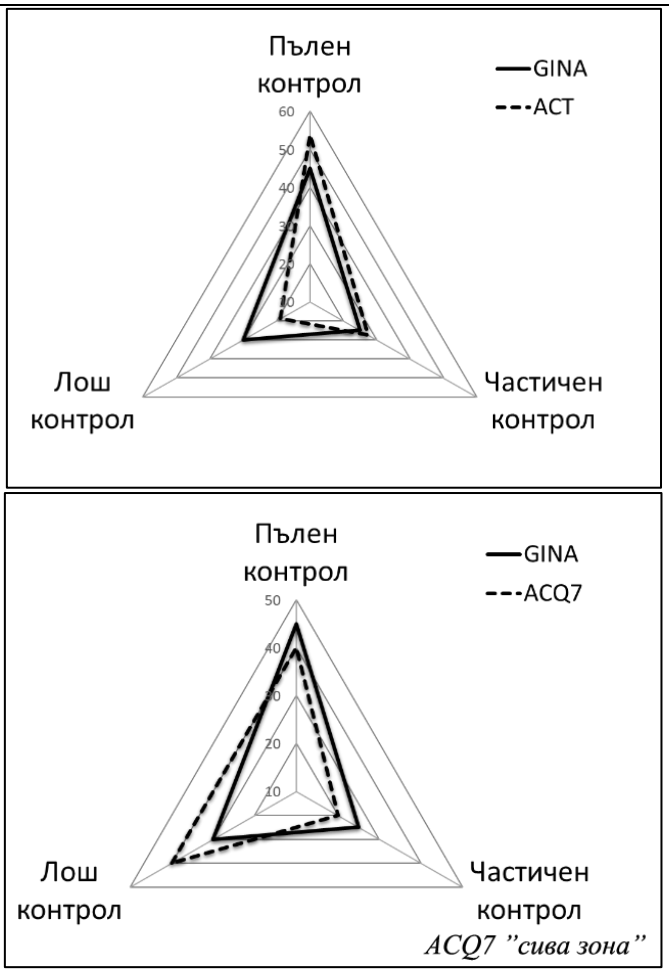
Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis post hoc анализ. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин; IL-8 беше изследван при n=32 с пълен, n=18 с частичен и n=20 с лош контрол; Серумен периостин беше изследван при n=21 с пълен, n=10 с частичен и n=11 с лош контрол; * p<0.05 м/у всички групи; [1] p<0.05 м/у частичен и лош контрол; [2] p<0.05 м/у частичен и пълен, частичен и лош контрол; [3] p<0.05 м/у лош и частичен, лош и пълен контрол; [4] p<0.05 м/у лош и пълен контрол;

Табл.13 Характеристика на пациентите според постигнатия контрол (GINA)

При сравнение на използваните тестове за оценка на контрола, установихме че АСТ има 58.3% съвпадение с GINA критериите за определяне на лош контрол. Съвпадението за ACQ 5, 6 и 7 е съответно 95.8%, 91.7%, 95.8% (табл.14, фиг.19).

		Контрол GINA			
		Пълен n=36 (45%)	Частичен n=20 (25%)	Лош n=24 (30%)	
Контрол ACT	Пълен	33 (91.7%)	9 (45.0%)	1 (4.2%)	43 (53.8%)
	Частичен	3 (8.3%)	10 (50.0%)	9 (37.5%)	22 (27.5%)
	Лош	0	1 (5.0%)	14 (58.3%)	15 (18.8%)
Контрол ACQ5	Пълен	26 (72.2%)	8 (40.0%)	0	34 (42.5%)
	Сива зона	9 (25.0%)	4 (20.0%)	1 (4.2%)	14 (17.5%)
	Лош	1 (2.8%)	8 (40.0%)	23 (95.8%)	32 (40%)
Контрол ACQ6	Пълен	27 (75.0%)	10 (50.0%)	0	37 (46.3%)
	Сива зона	8 (22.2%)	4 (20.0%)	2 (8.3%)	14 (17.5%)
	Лош	1 (2.8%)	6 (30.0%)	22 (91.7%)	29 (36.3%)
Контрол ACQ7	Пълен	25 (69.4%)	7 (35.0%)	0	32 (40%)
	Сива зона	10 (27.8%)	5 (25.0%)	1 (4.2%)	16 (20%)
	Лош	1 (2.8%)	8 (40.0%)	23 (95.8%)	32 (40%)
Съкращения: GINA - Global Initiative for Asthma (Глобалната инициатива за астма); ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата;					

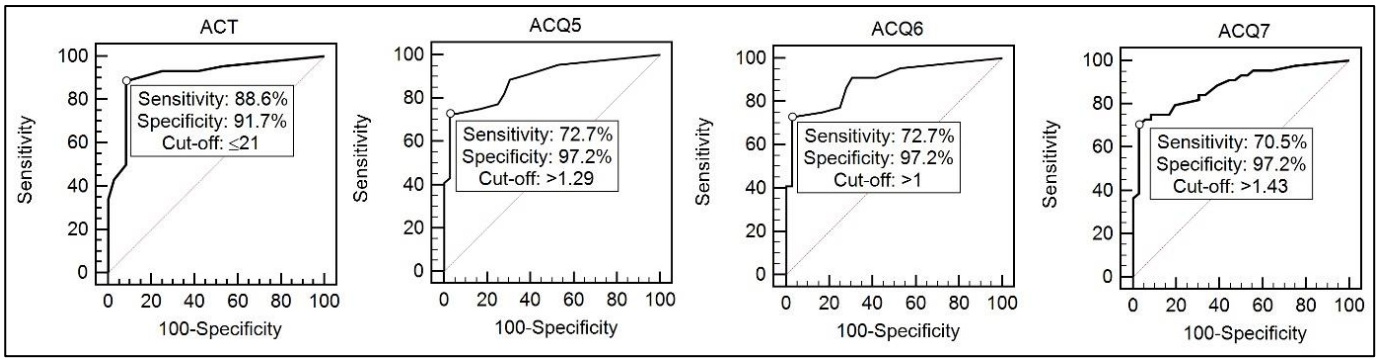
Табл.14 Сравнение между методите за оценка на контрола



Фиг.19 Разпределение на пациентите с БА (%) според контрола оценен чрез различни методи

Обединихме частично контролирана и лошо контролирана БА според GINA в група наречена неконтролирана БА. Така дефинирахме две подгрупи на контролирана (n=36; 45%) и неконтролирана БА (n=44; 55%) и проведохме ROC AUC анализ за

установяване способността на ACT и ACQ за идентифициране на пациентите с неконтролирана БА (Фиг.20).



Фиг.20 ROC AUC анализ на ACT, ACQ5,6,7 за разграничаване на неконтролирана от контролирана БА според GINA

Зоната под кривата (AUC) за ACT беше 0.91 (95%CI 0.83-0.96), SE 0.035, p<0.001 и Youden index J 0.803 с асоцииран критерий ≤ 21. Граничната стойност, която най-добре разграничаваше неконтролирана БА (GINA) за ACT беше ≤ 21 с чувствителност 88.6% (95%CI 75.4-96.2) и специфичност 91.7% (95%CI 77.5-98.2). Гранична стойност от ≤ 19 беше с чувствителност 77.3% и специфичност 91.7%.

AUC за ACQ5 беше 0.89 (95%CI 0.80-0.95), SE 0.038, p<0.001 и Youden index J 0.699 с асоцииран критерий >1.29. Граничната стойност, която най-добре разграничаваше неконтролирана БА (GINA) за ACQ5 беше >1.29 с чувствителност 72.7% (95%CI 57-85) и специфичност 97.2% (95%CI 85.5-100). Граничната стойност от > 0.6 имаше значително по-добра чувствителност от 81.8% за сметка на по-ниска специфичност от 72.2%.

AUC за ACQ6 беше 0.89 (95%CI 0.80-0.95), SE 0.038, p<0.001 и Youden index J 0.699 с асоцииран критерий >1. Граничната стойност, която най-добре разграничаваше неконтролирана БА (GINA) за ACQ6 беше >1 с чувствителност 72.7% (95%CI 57-85) и специфичност 97.2% (95%CI 85.5-100).

AUC за ACQ7 беше 0.88 (95%CI 0.79-0.94), SE 0.038, p<0.001 и Youden index J 0.676 с асоцииран критерий >1.43. Граничната стойност, която най-добре разграничаваше неконтролирана БА (GINA) за ACQ7 беше >1.43 с чувствителност 70.5% (95%CI 54.8-83.2) и специфичност 97.2% (95%CI 85.5-100). Гранична стойност от > 0.75 беше с чувствителност 84% и специфичност 67%.

	Чувствителност	Специфичност	Правилно класифицирани	PPV	NPV
ACQ7 /праг от 1.43/	70.54	97.22	82.50	96.88	72.92
ACT /праг от 21/	88.64	91.67	90.00	86.84	92.86

Табл.15 Характеристики на ACQ7 и ACT при диагностициране на неконтролирана БА. Съкращения: PPV-позитивна предиктивна стойност; NPV-негативна предиктивна стойност.

При ACQ >1.43 има 96.88% вероятност БА да не е контролирана.

При ACQ < 1.43 има 72.96% вероятност БА да е добре контролирана.

При ACT ≤ 21 има 92.86% вероятност БА да не е контролирана.

При ACT > 21 има 86.84% вероятност БА да е добре контролирана.

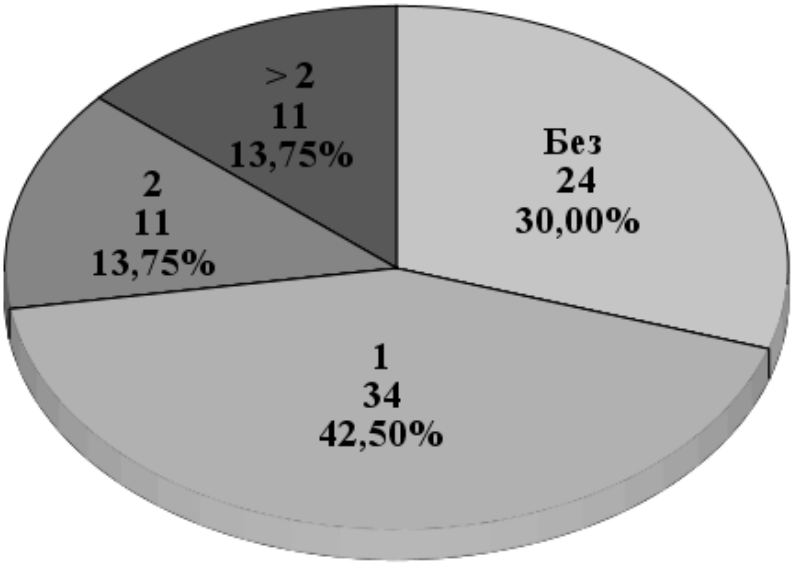
Приложихме комбинирана оценка на контрола от трите метода (GINA, ACT и ACQ7) и установихме, че при 47 (58.8%) от пациентите има данни от един или повече метода за непълен контрол на БА.

При тези пациентите с непълен контрол на БА (n=47; 58.8%) установихме следните корелации:

- ACQ5 и абсолютен брой на кръвните еозинофили: r=0.495, p<0.001
- ACQ5 и екзацербации: r=0.319, p=0.029
- ACQ7 и абсолютен брой на кръвните еозинофили или: r=0.538, p<0.001
- ACQ7 и екзацербации: r=0.413, p=0.004
- ACT и абсолютен брой на кръвните еозинофили: r= -0.405, p=0.005
- Абсолютен брой на кръвните еозинофили и FeNO: r=0.432, p=0.002
- FeNO и промяна на ФЕО1 при БДТ (%): r=0.311, p=0.033
- CRP и ИТМ: r=0.475, p=0.001
- Абсолютен брой на кръвните неутрофили и ИТМ: r=0.302, p=0.039
- Пре ФЕО1 и серумен периостин: r=-0.437, p=0.042
- Пост ФЕО1 и серумен периостин: r=-0.475, p=0.026
- Серумен IL-6 и възраст: r=0.323, p=0.027
- Серумен IL-6 и серумен IL-8: r=0.327, p=0.040

5.2.2 Екзацербации

Средната честота на екзацербациите през последната една година в нашето проучване беше 1 (0-2) екзацербации.



Фиг.21 Честота на екзацербациите при пациентите с БА

Броят на екзацербациите през изминалата година при БА корелираше значително с:

- ACQ5 резултата (r=0.376, p=0.001; CI 95% (0.170-0.550))
- ACQ7 резултата (r=0.405, p<0.001; CI 95% (0.204-0.574))
- ACT резултата (r= -0.356, p=0.001; CI 95% (-0.534- -0.148))
- Нивата на FeNO (r=0.315, p=0.004; CI 95% (0.102-0.500))

Броят на екзацербациите при ТА корелираше позитивно с броя пакетогодини: r=0.360, p=0.034.

Разделихме пациентите на две групи:

1. ≤ 1 екзацербация през изминалата година (n=58, 72.5%)

2. >1 екзацербация през изминалата година (n=22, 27.5%) – чести екзацербации

Установихме следните рискови фактори за чести екзацербации при корекция на данните спрямо възраст и пол:

- Неконтролирана БА според GINA: OR 8.64 (95%CI 2.23-33.52), p=0.002

- Кръвни еозинофили ≥ 550 cells/microL: OR 8.16 (95%CI 2.00-33.30), p=0.003
- FeNO > 30 ppb: OR 5.96 (95%CI 1.82-19.46), p=0.003
- ACQ5 ≥ 1.50: OR 5.66 (95%CI 1.84-17.45), p=0.003
- ACQ7 ≥ 1.50: OR 5.59 (95%CI 1.82-17.10), p=0.003
- Назални полипи: OR 5.01 (95%CI 1.33-18.89), p=0.017
- Тежка астма (ATS/ERS): OR 4.060 (95%CI 1.360-12.12), p=0.012
- Персистиращ алергичен ринит: OR 3.70 (95%CI 1.20-11.38), p=0.023
- Серумни нива на IL-5 > 3.30 pg/ml: OR 3.50 (95%CI 1.12-10.93), p=0.031
- Пост ФЕО1/ФВК < LLN: OR 3.41 (95%CI 1.10-10.60), p=0.034
- АСТ < 20: OR 3.21 (95%CI 1.11-9.32), p=0.032

5.2.3 Функционални показатели

Функционалните характеристики на пациентите с БА са изведени в табл.16, 17 и 18. При 25 (31.3%) установихме персистираща бронхиална обструкция, от които 18 (72%) бяха с ТА ($\chi2$=11.792, p=0.001), а 6 (24%) с AERD ($\chi2$=4.397,p=0.036). Освен с лош контрол ACQ7 - 2.14 (1.14-2.64) (U=370,Z=-3.301,p=0.001), фиксираната бронхиална обструкция се асоцииране и с по-висок еозинофилен брой в периферна кръв - 425 (263-659) cells/microL (U=464,Z=-2.315,p=0.021).

		БА, n=80
Пре ФВК, Z score		-0.94 (-1.88; -0.07)
Пост ФВК, Z score		-0.61 (-1.42; 0.05)
Пре ФЕО1, Z score		-1.49 (-2.78; -0.49)
Пре ФЕО1	<LLN	38 (47.5%)
Пост ФЕО1, Z score		-1.13 (-2.20; -0.16)
Пост ФЕО1	<LLN	29 (36.3%)
Пре ФЕО1/ФВК, Z score		-1.35 (-2.30; 0.04)
Пре ФЕО1/ФВК	<LLN	33 (41.3%)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score		-0.94 (-1.86; 0.27)
Пост ФЕО1/ФВК	<LLN	25 (31.3%)
Промяна на ФЕО1, %		5 (0-13.50)
Резултатите са представени като n (%), медиана и интерквартилен обхват. Съкращения: LLN – долна граница на нормата; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек; ФВК – форсиран витален капацитет;		

Табл. 16 Функционални характеристики на пациентите с БА.

	Пре ФЕО1/ФВК	
	≥LLN	<LLN
промяна ФЕО1, ml	60 (0-170)	240 (130-430)
промяна ФЕО1, %	2 (0-6)	13 (7-20)
Резултатите са представени като медиана и интерквартилен обхват; Съкращения: LLN – долна граница на нормата; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек; ФВК – форсиран витален капацитет;		

Табл. 17 Бронходилататорен отговор на ФЕО1

	Пре ФЕО1/ФВК > LLN n=46; 57.5%	ФЕО1/ФВК нормализиране след БДТ n=9; 11.3%	Пост ФЕО1/ФВК < LLN след БДТ n=25; 31.3%	p
Възраст, години	40 (32-56)	49 (36-61)	44 (35-59)	-
Жени	33 (71.7%)	6 (66.7%)	13 (52%)	-
ИТМ, kg/m^2	27 (23-33)	25 (23-28)	27 (23-30)	-
Пакетогодини	4.25 (0-12)	0 (0-14)	0 (0-10)	-
Бивши/Настоящи пушачи	12/15 (26.1/32.6%)	3/1 (33.3/11.1%)	8/3 (32/12%)	-
Пакетогодини ≥ 10	17 (37%)	3 (33.3%)	7 (28%)	-
Начало	36 (19-50)	43 (35-52)	28 (17-44)	Δ
Продължителност	7 (2.75-14)	3 (2-10.5)	18 (6.5-27.5)	0.001#Δ
Лошо придържане	12 (26.1%)	4 (44.4%)	5 (20%)	-
КАП /+/	39 (84.8%)	7 (77.8%)	15 (60%)	-
Ринит, да	35 (76.1%)	6 (66.7%)	20 (80%)	-
Назални полипи	6 (13%)	3 (33.3%)	9 (36%)	-
ГЕРБ	14 (30.4%)	4 (44.4%)	6 (24%)	-
AERD	3 (6.5%)	1 (11.1%)	6 (24%)	-
ACQ5 резултат	0.60 (0-1.85)	0.80 (0.30-2.10)	1.80 (0.80-2.60)	-
ACQ7 резултат	0.71 (0.14-1.85)	0.86 (0.72-2.00)	2.14 (1.14-2.64)	0.003#
АСТ резултат	22 (18-25)	22 (15-24)	19 (16-23)	-
Неконтролирана БА	24 (52.2%)	3 (33.3%)	17 (68%)	-
Екзацербации	1 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-2.5)	-
Екзацербации, >1 г	9 (19.6%)	3 (33.3%)	10 (40%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	14 (30.4%)	3 (33.3%)	18 (72%)	0.003
Терапия стъпка 4/5	29 (63%)	7 (77.8%)	22 (88%)	-
Висока доза ИКС	15 (32.6%)	4 (44.4%)	21 (84%)	0.001
Ниска доза ОКС	4 (8.7%)	1 (11.1%)	5 (20%)	-
Общ IgE, IU/ml	113 (47-278)	181 (66-472)	85 (35-264)	-
Общ IgE >100 IU/ml	26 (56.5%)	7 (77.8%)	11 (44%)	-
FeNO, ppb	26 (16-40)	60 (22-121)	31 (23-66)	0.013*#
FeNO ≥ 30 ppb	20 (43.5%)	6 (66.7%)	14 (56%)	-
FeNO > 50 ppb	6 (13%)	5 (55.6%)	8 (32%)	0.012
b-Eos, cells/microL	283 (190-463)	324 (101-686)	425 (264-659)	#
b-Eos, %	4 (2.75-5)	4 (2-7)	5 (3-7.5)	-
b-Eos ≥ 300 cells/microL	20 (43.5%)	5 (55.6%)	17 (68%)	-
b-Neu, 10^9L	4.08 (3.46-5.84)	4.42 (3.43-5.42)	5.42 (4.28-6.08)	-
CRP, mg/L	1.70 (0.80-4.93)	4.10 (1.09-4.90)	2.36 (0.90-4.31)	-
Промяна на ФЕО1, %	2 (0-6.25)	15 (7.5-19)	12 (3.5-20.5)	<0.001*#
IL-5, pg/ml	2.13 (1.77-3.20)	2.65 (1.28-3.48)	2.50 (1.91-3.20)	-
IL-6, pg/ml	1.36 (0.72-2.21)	1.75 (0.31-2.89)	1.40 (0.95-2.27)	-
IL-8, pg/ml[1]	1.55 (0-4.65)	2.05 (0.38-4.10)	1.38 (0-6.94)	-
IL-13, pg/ml	1.08 (0.53-1.83)	0.87 (0-1.11)	1.16 (0.97-5.80)	Δ
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.46-16.68)	14.50 (0.54-27.55)	1.63 (0.50-27.25)	-
Периостин, ng/ml[2]	1.78 (1.16-2.04)	2.11 (1.16-2.65)	1.88 (1.31-1.96)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis с post hoc анализ. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; [1] IL-8 беше измерен при n=39 с нормална функция; n=9 с нормализиране на ФЕО1/ФВК след БДТ, n=22 с персистиращ ФЕО1/ФВК <LLN; [2] Периостин беше измерен при n=25 с нормална функция; n=4 с нормализиране на ФЕО1/ФВК след БДТ, n=13 с персистиращ ФЕО1/ФВК <LLN; БДТ – бронходилататорен тест;
*p<0.05 при сравнение на ФЕО1/ФВК норма с ФЕО1/ФВК нормализиране след БДТ
#p<0.05 при сравнение на ФЕО1/ФВК норма с ФЕО1/ФВК < LLN след БДТ
Δp<0.05 при сравнение на ФЕО1/ФВК нормализиране след БДТ с ФЕО1/ФВК < LLN след БДТ

Табл. 18 Характеристики на пациентите според наличие и персистиране на белодробна обструкция установена чрез ФЕО1/ФВК

Установихме следните корелационни зависимости между изследваните функционални характеристики и останалите показатели в общата група на пациентите с БА:

- Пре ФЕО1 z score и ACQ5: r= -0.310; p=0.005
- Пре ФЕО1 z score и ACQ6: r=-0.317; p=0.004
- Пре ФЕО1 z score и ACQ7: r= -0.524; p<0.001
- Пре ФЕО1 z score и ACT: r=0.324; p=0.003
- Пост ФЕО1 z score и ACQ5: r= -0.316; p=0.004
- Пост ФЕО1 z score и ACQ6: r=-0.322; p=0.004
- Пост ФЕО1 z score и ACQ7: r= -0.520; p<0.001
- Пост ФЕО1 z score и ACT: r=0.317; p=0.004
- Реверзибилност на ФЕО1% и FeNO: r= 0.394; p<0.001
- Реверзибилност на ФЕО1 мл. и FeNO: r= 0.353; p=0.001

Корелациите на ФЕО1 с ACQ и ACT останаха да персистират само в групата на пациентите с начална нормална белодробна функция (виж приложение 9).

При пациентите с пост ФЕО1/ФВК <LLN след БДТ установихме следните корелации:

- Пост ФЕО1 z score и CRP: r= -0.519; p=0.008
- Пост ФВК z score и CRP: r= -0.505; p= 0.010
- CRP и ИТМ: r= 0.530; p=0.006

При ТА установихме корелация на пост ФЕО1/ФВК с продължителността на БА: r= -0.385, p=0.023

5.2.4 Тежест

		Тежест (ATS/ERS 2014)		
		Средно-тежка	Тежка	
Тежест (GINA)	Средно-тежка	n=22	0	n=22 27.5%
	Тежка	n=23	n=35	n=58 72.5%
		n=45 56.3%	n=35 43.8%	n=80 100.0%

Табл.19 Разпределение на пациентите според тежестта на БА определена чрез критериите на GINA и ATS/ERS

I. Според критериите на GINA: ТА (трудна за лечение БА – стъпка 4 и 5) установихме при 58 (72.5%) от пациентите, а СТА (стъпка 3) при 22 (27.5%). При ТА преобладаваше женски пол (n=36; 62.1%) и възрастта над 40 години (n=40; 69%). С полисенсибилизация бяха 30 (51.7%) от пациентите с ТА, моносенсибилизирани бяха 14 (24.1%), а неатопични - 14 (24.1%).

Пълен контрол (според ACQ7) беше постигнат при 18 (31%) от пациентите с тежка БА в сравнение с 14 (63.6%) при пациентите със СТА ($\chi2$ = 7.621, p=0.022). Персистираща бронхиална обструкция се срещаше по-често в при ТА (n=22; 37.9%) ($\chi2$=4.382, p=0.036). Само 6 (10.3%) с ТА и 13 (59.1%) със СТА бяха настоящи пушачи, 32 (55.2%) с ТА и 6 (27.3%) със СТА съответно бяха непушачи, 20 (34.5%) с ТА и 3 (13.6%) със СТА – бивши пушачи ($\chi2$=20.983, p<0.001). Всички пациенти с AERD бяха с ТА (GINA) (виж. горе).

Ние наблюдавахме при ТА (GINA) сигнификантно по-висок резултат за ACQ5 - 1.345 (0.200-2.600) (U=431, Z=-2.243,p=0.025) и ACQ7 - 1.430 (0.428-2.605) (U=411, Z=-2.445,p=0.014), и по-нисък резултат за АСТ - 19 (16-23) (U=422, Z=-2.342,p=0.019). ТА се характеризираше с повишени кръвни еозинофили (383 (231-519) cells/microL) (U=434, Z=-2.198, p=0.028), висок FeNO (30.5 (21.8-60.5) ppb) (U=422, Z=-2.323, p=0.020) и по-ниски функционални показатели – пост ФЕО1 (Z score -1.500 (-2.670- -0.095)) (U=436, Z=-2.171, p=0.030) и пост ФЕО1/ФВК (Z score -1.190 (-2.205-0.158)) (U=422, Z=-2.328, p=0.020).

II. Според критериите на ATS/ERS 2014 (табл.20): ТА установихме при 35 (43.8%). Подобно на характеристиката на ТА по GINA (виж по-горе): преобладаваше женският пол (n=20; 57.1%), пациентите над 40-годишна възраст (n=26; 74.3%), като 19 (54.3%) бяха с полисенсибилизация към инхалаторни алергени, а 4 (11.4%) бяха настоящи пушачи. При 7 (20%) установихме AERD. Пълен контрол (според ACQ7) беше постигнат при по-нисък процент (n=5; 14.3%) от пациентите с тежка БА в сравнение с пациентите със средно-тежка БА (n=27; 60%) ($\chi 2$ = 20.571, p<0.001). Подобен резултат установихме и при сравнение на двете групи според постигнат контрол оценен с ACT ($\chi 2$=14.819, p<0.001). Персистираща бронхиална обструкция се срещаше по-често в групата на пациентите с ТА (n=18; 51.2%) ($\chi 2$=11.792, p=0.001), като процента е по-висок от този наблюдаван при ТА оценена според GINA.

При ТА (ATS/ERS 2014) наблюдавахме значимо по-висок резултат за ACQ5 - 2.00 (1.00-3.00) (U=369, Z=-4.097, p<0.001) и ACQ7 - 2.14 (1.10-2.86) (U=287, Z=-4.867, p<0.001), и по-нисък резултат за ACT - 17 (14-21) (U=357, Z=-4.211, p<0.001). ТА статистически значимо се различаваше от СТА по следните характеристики: повишени кръвни еозинофили (470 (290-651) cells/microL) (U=395, Z=-3.812, p=0.001), повишени серумни общи IgE (181 (59-349) IU/ml) (U=584, Z=-1.974, p=0.048), по-чести екзацербации (1(1-2)) (U=547, Z=-2.467, p=0.014), по-ниски функционални показатели – пост ФЕО1 (Z score -2.06 (-2.78- -1.25)) (U=294, Z=-4.786, p<0.001) и пост ФЕО1/ФВК (Z score -1.68 (-2.79- -0.14)) (U=459, Z=-3.186, p=0.001) и по-висок серумен IL-8 (3.25 (0.50-10.15) pg/ml) (U=430, Z=-1.988, p=0.047).

	Тежест (ATS/ERS)		p
	СТА n=45	ТА n=35	
Възраст	40 (32-56)	46 (40-58)	-
Пол, жени	32 (71.1%)	20 (57.1%)	-
ИТМ, kg/m2	25 (22 - 30)	28 (24-33)	-
Затлъстяване	10 (22.2%)	13 (37.1%)	-
Пакетогодини	4.50 (0-10)	0 (0-11)	-
Тютюнопушене, не/бивш/да	18/12/15 (40/26.7/33.3%)	20/11/4 (57.1/31.4/11.4%)	-
Лошо придържане	21 (46.7%)	0	*<0.001*
Начало	32 (18-48)	35 (20-48)	-
КАП /+/	34 (75.6%)	27 (77.1%)	-
ГЕРБ	13 (28.9%)	11 (31.4%)	-
Ринит, алергичен/неалергичен	27/8 (60/17.8%)	22/4 (62.9/11.4%)	-
AERD	3 (6.7%)	7 (20%)	-
Назални полипи	6 (13.3%)	12 (34.3%)	*0.026*
ACQ5 резултат	0.40 (0-1.20)	2.00 (1.00-3.00)	*<0.001*
ACQ7 резултат	0.57 (0.14-1.14)	2.14 (1.10-2.86)	*<0.001*
ACT резултат	23 (19-25)	17 (14-21)	*<0.001*
Неконтролирана БА (GINA)	18 (40%)	26 (74.3%)	*0.002*
Екзацербации / 1 година	1 (0-1)	1 (1-2)	*0.014*
Терапия, стъпка 4/5	23 (51.1%)	35 (100%)	*<0.001*
Висока доза ИКС	5 (11.1%)	35 (100%)	*<0.001*
Ниска доза ОКС	1 (2.2%)	9 (25.7%)	*0.002*
CRP, mg/L	1.62 (0.66-4.56)	2.81 (1.20-5.10)	-
WBC, 10/9L	7.20 (5.70-8.50)	8.10 (6.10-9.74)	-
b-Eos, cells/microL	244 (147-398)	470 (290-651)	*<0.001*
b-Neu, 10/9L	4.42 (3.50-5.53)	5.04 (3.60-6.20)	-
FeNO, ppb	28 (16-47)	31 (22-62)	-
Пре ФВК, z score	-0.33 (-1.07; 0.55)	-1.65 (-2.37; -0.93)	*<0.001*
Пост ФВК, z score	-0.26 (-0.98; 0.55)	-1.15 (-1.86; -0.53)	*<0.001*
Пре ФЕО1, Z score	-0.77 (-1.61; -0.15)	-2.49 (-3.18; -1.69)	*<0.001*
Пост ФЕО1, Z score	-0.50 (-1.14; 0.15)	-2.06 (-2.78; -1.25)	*<0.001*
Промяна ФЕО1, ml	80 (0-270)	150 (50-260)	-
Промяна ФЕО1, %	3 (0-10.5)	7 (2-15)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-0.96 (-1.77; 0.47)	-1.93 (-2.98; -0.65)	*0.003*
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.66 (-1.39; 0.59)	-1.68 (-2.79; -0.14)	*0.001*
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	7 (15.6%)	18 (51.4%)	*0.001*
Серумен IL-5, pg/ml	2.18 (1.55-3.15)	2.40 (1.90-3.28)	-
Серумен IL-13, pg/ml	1.06 (0.30-1.80)	1.15 (0.95-1.67)	-
Серумен периостин, ng/ml	1.78 (1.18-2.00)	1.93 (1.38-2.15)	-
Серумен IL-6, pg/ml	1.50 (0.60-2.20)	1.40 (0.98-2.27)	-
Серумен IL-8, pg/ml	0.75 (0-3.98)	3.25 (0.50-10.15)	*0.047*
Серумен IL-17A, pg/ml	0.59 (0.45-18.70)	5.34 (0.51-26.15)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	85 (37-229)	181 (59-349)	*0.048*

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: WBC – бели кръвни клетки; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин; ИКС – инхалаторен кортикостероид; LLN – долна граница на нормата; IL-8 беше изследван при n=41 със СТА и n=29 с ТА; Серумен периостин беше изследван при n=27 със СТА и n=15 с ТА;

Табл.20 Характеристики на пациентите според тежестта на БА (ERS/ATS).

Корелации при ТА (ATS/ERS критерии):

- ACQ7 и екзацербациите: r = 0.684, p<0.001
- АСТ и екзацербациите: r = -0.485, p=0.003
- ACQ7 и АСТ: r = -0.730, p<0.001
- ACQ7 и броя кръвни еозинофили: r = 0.379, p=0.025
- CRP и серумен периостин: r = 0.657, p=0.008
- броя кръвни еозинофили и серумен IL-5: r = 0.416, p=0.013
- FeNO и екзацербациите: r = 0.429, p=0.010
- FeNO и серумен IL-13: r = 0.414, p=0.014
- Пост ФЕО1/ФВК и продължителност на БА: r = -0.385, p=0.023
- Брой екзацербации и пакетогодини: r = 0.360, p =0.034

5.3 Резултати към задача 3: Определяне и анализиране на атопичен статус, общи IgE, кръвни еозинофили, FeNO и CRP

5.3.1 Атопичен статус

Резултатите от проведените КАП доказаха сенсибилизация при 61 (76.3%), а при 42 (52.5%) - полисенсибилизация. Негативни КАП установихме при 19 (23.8%) пациента с БА.

Характеристики на атопичната БА (табл. 21):

Пациентите с атопична БА бяха на средна възраст 41 (33-57) г. Доминиращ беше женския пол. Затлъстяване установихме при 29.5%. Настоящи тютюнопушачи бяха 26.2% със средна експозиция от 3.5 (0-10) пакетогодини. Началото на БА беше на средна възраст от 30 (17-47) г. с продължителност 10 (3.5-19.5) г. В 23% установихме лошо придържане към терапията. Честотата на ринит беше 80.3%, а на ГЕРБ 29.5%. Средните стойности за ACQ7 и АСТ бяха както следва: 0.86 (0.29-2.14) и 22 (17-25). Неконтролирана БА установихме при 33 (54.1%) от пациентите с атопична БА. При 18 (29.5%) установихме данни за повече от 1 екзацербация през последната една година. ТА (ATS/ERS) имаха 27 (44.3%). Средните серумни нива на общи IgE бяха статистически сигнификантно по-високи при сравнение с неатопичната БА - 177.5 (78.4 - 366) IU/ml (U=163,Z=-4.709,p<0.001) и 67.2% имаха нива на общ IgE > 100 IU/ml. Средното ниво на FeNO беше 29 (18-44) ppb, а броя на кръвните еозинофили - 295 (196-486) cells/microL. Белодробните функционални показатели в групата бяха както следва: пре ФЕО1, Z score -1.27 (-2.31; -0.26); пре ФВК, Z score -0.63 (-1.78; 0.35); пре

ФЕО1/ФВК, Z score -1.17 (-1.96; 0.12); пост ФЕО1, Z score -1,03 (-2.03; -0.03); пост ФВК, Z score -0.42 (-1.41; 0.34); пост ФЕО1/ФВК, Z score -0.83 (-1.64; 0.31). При 15 (24.6%) установихме персистираща бронхиална обструкция при средно повишение на ФЕО1 след бронходилатация 4 (0-11) %. Средните серумни нива на интерлевкините и периостин са отразени на табл. 21.

Характеристики на неатопичната БА (табл. 21):

Пациентите с неатопична БА бяха на средна възраст 51 (35-63) г. Женският пол отново доминираше с по висока честота (68.4%). Затлъстяване установихме при 26.3%. Настоящи тютюнопушачи бяха 15.8% със средна експозиция от 3.75 (0-15) пакетогодини. Началото на БА беше на средна възраст значимо по-късна от атопичната БА - 43 (30-53) год. (U=389,Z=-2.149,p=0.032) с продължителност 6 (2-18) г. В 36.8% установихме лошо придържане към терапията. Честотата на ринит беше 63.2%, а на ГЕРБ 31.6%. Средните стойности за ACQ7 и ACT бяха както следва: 1.71 (0.71-2.29) и 18 (15-23). Неконтролирана БА установихме при 11 (57.9%) от пациентите с неатопична БА. При 4 (21.1%) установихме данни за повече от 1 екзацербация през последната една година. ТА (ATS/ERS) имаха 8 (42.1%) от пациентите с неатопична БА. Средните серумни нива на IgE бяха 32 (6.8-53) IU/ml и 15.8% от пациентите с неатопична БА имаха нива на общи IgE > 100 IU/ml. Средното ниво на FeNO беше 30 (18-83) ppb, като значително по-висок процент неатопична БА (n=8; 42.1%), в сравнение с атопичната БА (n=11; 18%) бяха с ниво на FeNO > 50 ppb ($\chi 2$ – 4.636, p=0.031). Броя на кръвните еозинофили в групата неатопична ЛА беше 385 (238-522) cells/microL. Белодробните функционални показатели в групата бяха значимо по-ниски при сравнение с атопичната БА: пре ФЕО1, Z score -2.64 (-3.40; -0.63) (U=364,Z=-2.437,p=0.015); пре ФВК, Z score -1.41 (-2.38; -0.89); пре ФЕО1/ФВК, Z score -2.01 (-2.77; -0.65); пост ФЕО1, Z score -1.77 (-2.85; -0.50) (U=378,Z=-2.273,p=0.023); пост ФВК, Z score -1.09 (-1.51; -0.35); пост ФЕО1/ФВК, Z score -1.82 (-2.79; -0.21). При 10 (52.6%) установихме персистираща бронхиална обструкция ($\chi 2$ – 5.302, p=0.021) при средно повишение на ФЕО1 след бронходилатация 10% (3-17%) (U=406,Z=-1.987,p=0.047). Средните серумни нива на интерлевкини и периостин са отразени на табл. 21.

Не намерихме сигнификантна разлика между атопична БА и неатопична БА при сравнение по тежест, контрол, екзацербации, пакетогодини, ИТМ, симптоми, кръвни еозинофили и неутрофили, серумни нива на IL-5, IL-6, IL-17A, IL-13, IL-8 или

периостин (p>0.05, за всички сравнения). Не намерихме разлика в честотата на ТА (GINA) при атопична (n=14, 73.7%) и неатопична БА (n=44, 72.1%) ($\chi 2$ -0.018, p=0.895).

	Атопична БА n=61; 76.2%	Неатопична БА n=19; 23.8%	p
Възраст, години	41 (33-57)	51 (35-63)	-
Жени/мъже	39/22 (63.9/36.1%)	13/6 (68.4/31.6%)	-
ИТМ, kg/m^2	27 (23-31)	26 (23-31)	-
Затлъстяване, не/да	43/18 (70.5/29.5%)	14/5 (73.7/26.3%)	-
Тютюнопушене, не/бивш/настоящ	29/16/16 (47.5/26.2/26.2%)	9/7/3 (47.4/36.8/15.8%)	-
Пакетогодини	3.5 (0-10)	3.75 (0-15)	-
Начало	30 (17-47)	43 (30-53)	0.032
Продължителност, год.	10 (3.5-19.5)	6 (2-18)	-
Лошо придържане	14 (23%)	7 (36.8%)	-
Ринит, не/да	12/49 (19.7/80.3%)	7/12 (36.8/63.2%)	-
ГЕРБ	18 (29.5%)	6 (31.6%)	-
ACQ5 резултат	0.80 (0.20-2.10)	1.40 (0-2.60)	-
ACQ7 резултат	0.86 (0.29-2.14)	1.71 (0.71-2.29)	-
АСТ резултат	22 (17-25)	18 (15-23)	-
Неконтролирана БА (GINA)	33 (54.1%)	11 (57.9%)	-
Екзацербации за 1 год.	1 (0-2)	1 (0-1)	-
Екзацербации, >1 за год.	18 (29.5%)	4 (21.1%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	27 (44.3%)	8 (42.1%)	-
Терапия стъпка 4/5	44 (72.1%)	14 (73.7%)	-
Висока доза ИКС	30 (49.2%)	10 (52.6%)	-
Ниска доза ОКС	6 (9.8%)	4 (21.1%)	-
Общ IgE, IU/ml	178 (78-366)	32 (6.8-53)	<0.001
Общ IgE >100 IU/ml	41 (67.2%)	3 (15.8%)	<0.001
FeNO, ppb	29 (18-44)	30 (18-83)	-
FeNO ≥ 30 ppb	30 (49.2%)	10 (52.6%)	-
FeNO > 50 ppb	11 (18%)	8 (42.1%)	0.031
b-Eos, cells/microL	295 (196-486)	385 (238-522)	-
b-Eos ≥ 300 cells/microL	30 (49.2%)	12 (63.2%)	-
b-Neu, 10^9L	4.68 (3.55-5.88)	4.42 (3.51-6.01)	-
CRP, mg/L	2.04 (0.94-4.75)	2.36 (0.50-4.30)	-
Пре ФВК, Z score	-0.63 (-1.78; 0.35)	-1.41 (-2.38; -0.89)	0.010
Пре ФЕО1, Z score	-1.27 (-2.31; -0.26)	-2.64 (-3.40; -0.63)	0.015
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.17 (-1.96; 0.12)	-2.01 (-2.77; -0.65)	-
Пост ФВК, Z score	-0.42 (-1.41; 0.34)	-1.09 (-1.51; -0.35)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.03 (-2.03; -0.03)	-1.77 (-2.85; -0.50)	0.023
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.83 (-1.64; 0.31)	-1.82 (-2.79; -0.21)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	15 (24.6%)	10 (52.6%)	0.021
Промяна на ФЕО1, %	4 (0-11)	10 (3-17)	0.047
IL-5, pg/ml	2.22 (1.79-3.40)	2.30 (1.55-3.15)	-
IL-6, pg/ml	1.40 (0.68-2.11)	1.89 (0.96-3.24)	-
IL-8, pg/ml *	1.85 (0.05-4.69)	0.55 (0-4.74)	-
IL-13, pg/ml	1.08 (0.87-2.13)	1.04 (0-1.45)	-
IL-17A, pg/ml	3.00 (0.52-21.90)	0.51 (0.45-31.40)	-
Периостин, ng/ml **	1.86 (1.27-2.08)	1.74 (1.18-2.06)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U тест. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; * IL-8 беше измерен при n=52 с атопична БА и n=18 с неатопична БА; **Периостин беше измерен при n=30 с атопична БА и n=12 с неатопична БА;

Табл. 21 Характеристики на атопична и неатопична БА.

Субанализ на групата атопична БА

При атопичната БА установихме две подгрупи на БА с високо еозинофилно възпаление (≥300 cells/microL) и БА с ниско еозинофилно възпаление (<300 cells/microL). Сравнение между подгрупите е представено на табл. 22

	Атопична БА, n=61		
	Нееозинофилна n=31; 50.8%	Еозинофилна n=30; 49.2%	
Възраст	37 (30-49)	47 (39-57)	0.046
Пол, жени	21 (67.7%)	18 (60%)	-
ИТМ, kg/m2	25 (22-30)	28 (25-34)	-
Затлъстяване	7 (22.6%)	11 (36.7%)	-
Пакетогодини	3.5 (0-10)	2 (0-13)	-
Тютюнопушене, не/бивш/да	14/7/10 (45.2/22.6/32.3%)	15/9/6 (50/30/20%)	-
Лошо придържане	9 (29%)	5 (16.7%)	-
Начало <12/12-40/>40 г.	14/11/6 (45.2/35.5/19.4%)	7/10/13 (23.3/33.3/43.3%)	-
Начало	24 (10-38)	38 (21-49)	0.023
Продължителност	14 (5-23)	7 (2.75-17)	-
ГЕРБ	8 (25.8%)	10 (33.3%)	-
AERD	2 (6.5%)	7 (23.3%)	-
Назални полипи	4 (12.9%)	10 (33.3%)	-
ACQ5 резултат	0.40 (0-1.20)	1.70 (0.55-3.00)	0.001
ACQ7 резултат	0.57 (0.14-1.14)	1.72 (0.71-2.75)	0.001
ACT резултат	23 (19-25)	19 (14-23)	0.020
Неконтролирана БА (GINA)	13 (41.9%)	20 (66.7%)	0.050
Тежка БА (ATS/ERS)	8 (25.8%)	19 (63.3%)	0.003
Екзацербации / 1 година	1 (0-2)	1 (0-2)	-
Терапия, стъпка 4/5	20 (64.5%)	24 (80%)	-
Висока доза ИКС	10 (32.3%)	20 (66.7%)	0.017
Ниска доза ОКС	2 (6.5%)	4 (13.3%)	-
CRP, mg/L	1.88 (0.67-4.70)	2.40 (1.28-5.16)	-
b-Neu, 10/9L	4.01 (3.25-5.46)	5.27 (4.32-6.57)	0.002
FeNO, ppb	27 (16-42)	31.5 (22-55)	-
Пре ФЕО1, Z score	-0.85 (2.32; 0.08)	-1.51 (-2.43; -0.56)	-
Пост ФЕО1, Z score	-0.64 (-1.99; 0.25)	-1.14 (-2.19; -0.16)	-
Промяна ФЕО1, ml	70 (0-260)	135 (18-267)	-
Промяна ФЕО1, %	2 (0-10)	6 (0.75-11)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.14 (-1.78; 0.37)	-1.42 (-2.12; 0.05)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.66 (-1.43; 0.52)	-1.11 (-1.70; 0.26)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	7 (22.6%)	8 (26.7%)	-
Серумен IL-5, pg/ml	2.10 (1.00-3.20)	2.45 (1.94-3.50)	-
Серумен IL-13, pg/ml	1.07 (0.60-2.75)	1.08 (0.89-1.83)	-
Серумен периостин, ng/ml	1.91 (1.66-2.08)	1.56 (0.94-2.06)	-
Серумен IL-6, pg/ml	0.93 (0.52-1.65)	1.71 (1.14-2.82)	0.004
Серумен IL-8, pg/ml	1.23 (0-4.33)	2.90 (0.28-9.29)	-
Серумен IL-17A, pg/ml	1.63 (0.52-19.50)	4.96 (0.52-24.73)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	171 (52-364)	193 (107-428)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – C-реактивен протеин; ИКС – инхалаторен кортикостероид; LLN – долна граница на нормата; IL-8 беше изследван при n=28 с атопична, нееозинофилна и n=24 при атопична, еозинофилна; Серумен периостин беше изследван при n=16 с атопична, нееозинофилна и n=14 при атопична, еозинофилна

Табл. 22 Анализ на пациентите с атопия според нивото на кръвните еозинофили.

Субанализ на групата неатопична БА

При неатопичната БА установихме две подгрупи на БА с високо еозинофилно възпаление (≥300 cells/microL) и БА с ниско еозинофилно възпаление (<300 cells/microL). Това подразделение и сравнение с групата на атопична БА е представено в табл. 23

Подгрупа на неатопична еозинофилна БА (n=13) (Табл.23):

При 12 установихме данни за брой кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL. При 1 пациент кръвните еозинофили бяха 294 cells/micoL, но поради висок FeNO 178 ppb той беше включен в групата на неатопична, еозинофилната БА, при което пациентите в тази група бяха 13 (16.3%).

Пациентите с неатопична, еозинофилна БА бяха на средна възраст 54 (43-66) г. ($p<0.05$ при сравнение с атопична БА). Женският пол доминираше. Затлъстяване установихме в 30.8%. Настоящи тютюнопушачи бяха 7.7% със средна експозиция от 3.75 (0-17) пакетогодини. Началото на БА беше на средна възраст от 43 (26-54) год. с продължителност 6 (2.5-20) г. При 4 (30.8%) пациента установихме лошо придържане към терапията. Честотата на ринит беше 61.5%, а на ГЕРБ 23.1%. Средните стойности за ACQ7 и ACT бяха както следва: 2.14 (1.24-2.86) ($p<0.05$ при сравнение с атопичната БА и неатопичната, нееозинофилна БА) и 18 (12-22). Неконтролирана БА установихме при 10 (76.9%) ($p<0.05$) от пациентите с неатопична, еозинофилна БА. При 4 (30.8%) установихме данни за повече от 1 екзацербация през последната една година. ТА (ATS/ERS) имаха 7 (53.8%) от пациентите с неатопична, еозинофилна БА. Средните серумни нива на IgE бяха 57 (31-94) IU/ml, като 23.1% от пациентите с неатопична, еозинофилна БА имаха нива на общи IgE > 100 IU/ml. Средното ниво на FeNO беше 67 (23-91) ppb ($p<0.05$ при сравнение с атопичната БА и неатопичната, нееозинофилна БА), а броя на кръвните еозинофили - 511 (383-797) cells/microL ($p<0.05$ при сравнение с атопичната БА и неатопичната, нееозинофилна БА). Белодробните функционални показатели в групата бяха значително по-ниски при сравнение с атопичната БА и неатопичната, нееозинофилна БА (Табл.23): пре ФЕО1, Z score -3.03 (-3.44; -2.09); пре ФВК, Z score -1.49 (-2.42; -1.21); пре ФЕО1/ФВК, Z score -2.46 (-3.10; -0.89); пост ФЕО1, Z score -2.67 (-2.90; -1.53); пост ФВК, Z score -1.31 (-1.82; -0.78); пост ФЕО1/ФВК, Z score -1.93 (-3.19; -0.87). При 9 (69.2%) от неатопичните, еозинофилни пациенти с БА установихме персистираща бронхиална обструкция ($\chi 2$ – 10.582,

p=0.005) при средно повишение на ФЕО1 след бронходилатация 13 (5.5-18.5) % (χ2 – 6.072, p=0.048). Средните серумни нива на интерлевкини и периостин са отразени на табл. 23.

Подгрупа на неатопична, нееозинофилна БА

Установихме, че при малка група пациенти (n=6; 7.5%) липсват данни за алергенна сенсибилизация или повишение на брой кръвни еозинофили (≥300 cells/microL) – неатопична, нееозинофилна БА.

Пациентите с неатопична, нееозинофилна БА бяха на средна възраст 42 (33-60) г. Женският пол доминираше с честота 66.7%. Затлъстяване установихме при 16.7%. Настоящи тютюнопушачи бяха 33.3% (n=2) със средна експозиция от 6 (0-15) пакетогодини. Началото на БА беше на средна възраст от 39 (30-55) год. с продължителност 3 (1.75-6) г. В 50% установихме лошо придържане към терапията. Честотата на ринит беше 66.7%, а на ГЕРБ 50%. Средните стойности за ACQ7 и ACT бяха както следва: 0.57 (0.11-1.43) и 20 (17-24). Неконтролирана БА установихме при 1 (16.7%). Липсваха чести екзацербатори в групата. ТА (ATS/ERS) имаше 1 (16.7%) от пациентите с неатопична, нееозинофилна БА. Средните серумни нива на IgE бяха 5.6 (2.9-16) IU/ml. Средното ниво на FeNO беше 19 (11-25) ppb, а броя на кръвните еозинофили - 161 (98-245) cells/microL. Белодробните функционални показатели в групата бяха както следва: пре ФЕО1, Z score -0.81 (-2.79; -0.31); пре ФВК, Z score -0.88 (-1.84; -0.17); пре ФЕО1/ФВК, Z score -0.82 (-2.02; 0.76); пост ФЕО1, Z score -0.69 (-1.78; -0.22); пост ФВК, Z score -0.44 (-0.95; 0.15); пост ФЕО1/ФВК, Z score -0.57 (-1.79; 0.72). При 1 (16.7%) установихме персистираща бронхиална обструкция при средно повишение на ФЕО1 след бронходилатация 4 (0-21)%. Средните серумни нива на интерлевкини и периостин са отразени на табл. 23.

Установихме значимо по-високи серумни нива на IL-13 в групата на атопична БА (1.08 (0.87-2.13) pg/ml) и неатопична, еозинофилна БА (1.15 (0.48-9.30) pg/ml) при сравнение с групата на неатопична, нееозинофилна БА (0.03 (0-0.88) pg/ml) (U=74,Z=-2.413,p=0.016). Не установихме статистически значими различия в серумните нива на останалите интерлевкини и периостин при сравнение между групите.

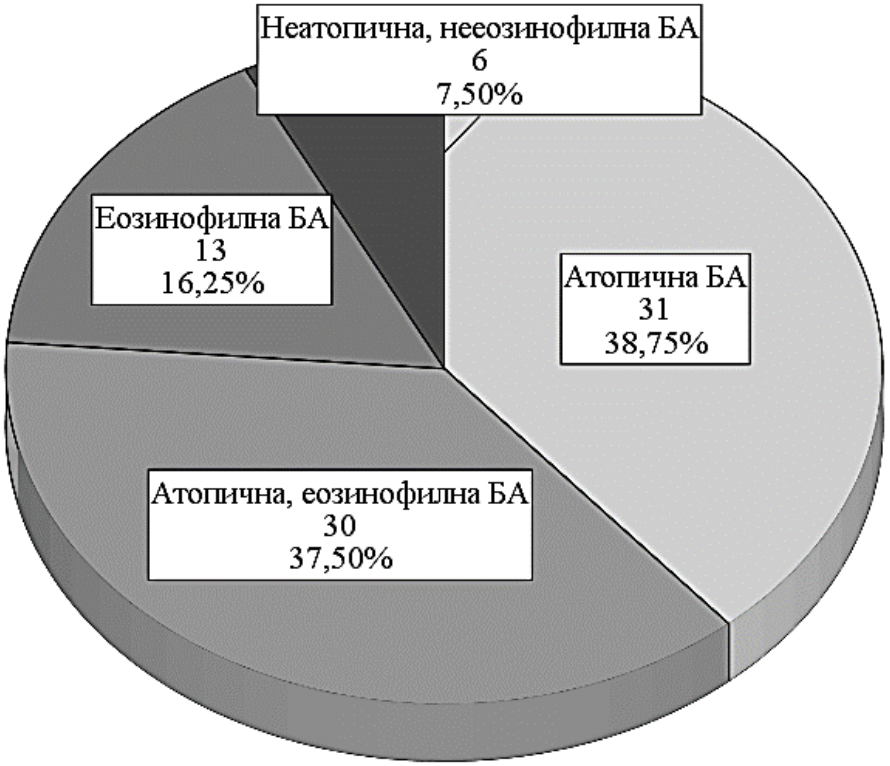
	Атопична БА n=61; 76.2%	Неатопична еозинофилна n=13; 16.3%	Неатопична неeозинофилна n=6; 7.5%	p
Възраст, години	41 (33-57)	54 (43-66)	42 (33-60)	*
Жени/мъже	39/22 (63.9/36.1%)	9/4 (69.2/30.8%)	4/2 (66.7/33.3%)	-
ИТМ, kg/m^2	27 (23-31)	28 (23-31)	24 (20-28)	-
Затлъстяване, не/да	43/18 (70.5/29.5%)	9/4 (69.2/30.8%)	5/1 (83.3/16.7%)	-
Пакетогодини	3.5 (0-10)	3.75 (0-17)	6 (0-15)	-
Начало	30 (17-47)	43 (26-54)	39 (30-55)	-
Продължителност, год.	10 (3.5-19.5)	6 (2.5-20)	3 (1.75-6)	#
Лошо придържане	14 (23%)	4 (30.8%)	3 (50%)	-
Ринит	49 (80.3%)	8 (61.5%)	4 (66.7%)	-
ГЕРБ	18 (29.5%)	3 (23.1%)	3 (50%)	-
ACQ5 резултат	0.80 (0.20-2.10)	1.80 (1.15-2.60)	0.40 (0-1.70)	-
ACQ7 резултат	0.86 (0.29-2.14)	2.14 (1.24-2.86)	0.57 (0.11-1.43)	0.040 *,Δ
ACT резултат	22 (17-25)	18 (12-22)	20 (17-24)	-
Неконтролирана БА (GINA)	33 (54.1%)	10 (76.9%)	1 (16.7%)	0.047
Екзацербации за 1 год.	1 (0-2)	1 (1-2)	0.5 (0-1)	-
Екзацербации, >1 за год.	18 (29.5%)	4 (30.8%)	0	-
Тежка БА (ATS/ERS)	27 (44.3%)	7 (53.8%)	1 (16.7%)	-
Терапия стъпка 4/5	44 (72.1%)	11 (84.6%)	3 (50%)	-
Висока доза ИКС	30 (49.2%)	9 (69.2%)	1 (16.7%)	-
Ниска доза ОКС	6 (9.8%)	4 (30.8%)	0	-
Общ IgE, IU/ml	178 (78-366)	57 (31-94)	5.6 (2.9-16)	<0.001*,#,Δ
Общ IgE >100 IU/ml	41 (67.2%)	3 (23.1%)	0	<0.001
FeNO, ppb	29 (18-44)	67 (23-91)	19 (11-25)	0.012*,Δ
FeNO ≥ 30 ppb	30 (49.2%)	9 (69.2%)	1 (16.7%)	-
FeNO > 50 ppb	11 (18%)	8 (61.5%)	0	0.001
b-Eos, cells/microL	295 (196-486)	511 (383-797)	161 (98-245)	0.001*,#,Δ
b-Eos ≥ 300 cells/microL	30 (49.2%)	12 (92.3%)	0	0.001
b-Neu, 10^9L	4.68 (3.55-5.88)	5.03 (3.48-6.14)	4.04 (3.38-6.65)	-
CRP, mg/L	2.04 (0.94-4.75)	2.60 (0.93-4.49)	1.02 (0.48-5.08)	-
Пре ФВК, Z score	-0.63 (-1.78; 0.35)	-1.49 (-2.42; -1.21)	-0.88 (-1.84; -0.17)	0.014*
Пре ФЕО1, Z score	-1.27 (-2.31; -0.26)	-3.03 (-3.44; -2.09)	-0.81 (-2.79; -0.31)	0.008*,Δ
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.17 (-1.96; 0.12)	-2.46 (-3.10; -0.89)	-0.82 (-2.02; 0.76)	*
Пост ФВК, Z score	-0.42 (-1.41; 0.34)	-1.31 (-1.82; -0.78)	-0.44 (-0.95; 0.15)	0.038*,Δ
Пост ФЕО1, Z score	-1.03 (-2.03; -0.03)	-2.67 (-2.90; -1.53)	-0.69 (-1.78; -0.22)	0.008*,Δ
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.83 (-1.64; 0.31)	-1.93 (-3.19; -0.87)	-0.57 (-1.79; 0.72)	0.035*
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	15 (24.6%)	9 (69.2%)	1 (16.7%)	0.005
Промяна на ФЕО1, %	4 (0-11)	13 (5.5-18.5)	4 (0-21)	0.048*
IL-5, pg/ml	2.22 (1.79-3.40)	2.65 (1.63-5.00)	2.00 (1.41-2.24)	-
IL-6, pg/ml	1.40 (0.68-2.11)	1.90 (1.05-3.52)	1.66 (0.52-2.92)	-
IL-8, pg/ml[1]	1.85 (0.05-4.69)	0 (0-4.55)	3.55 (0.25-18.45)	-
IL-13, pg/ml	1.08 (0.87-2.13)	1.15 (0.48-9.30)	0.03 (0-0.88)	0.049#Δ
IL-17A, pg/ml	3.00 (0.52-21.90)	0.50 (0.43-33.65)	0.51 (0.44-15.66)	-
Периостин, ng/ml[2]	1.86 (1.27-2.08)	1.74 (1.24-1.94)	1.64 (0.88-2.12)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis с post hoc анализ. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; [1] IL-8 беше измерен при n=52 с атопична БА, n=13 с неатопична, еозинофилна БА и n=5 с неатопична, неeозинофилна БА; [2] Периостин беше измерен при n=30 с атопична БА, n=8 с неатопична, еозинофилна БА и n=4 с неатопична, неeозинофилна БА;
*p<0.05 при сравнение на атопична БА с неатопична,еозинофилна БА
#p<0.05 при сравнение на атопична БА с неатопична, неeозинофилна БА
Δp<0.05 при сравнение на неатопична, еозинофилна БА с неатопична, неeозинофилна БА

Табл. 23 Характеристики на атопична БА, неатопична еозинофилна БА и неатопична, неeозинофилна БА

		Пре ФЕО1/ФВК > LLN N=46; 57.5%	ФЕО1/ФВК нормализиране след БДТ N=9; 11.3%	Пост ФЕО1/ФВК < LLN след БДТ N=25; 31.3%	
Атопична	Брой	39	7	15	61
	%	63.9%	11.5%	24.6%	100.0%
Неатопична, еозинофилна	Брой	4	0	9	13
	%	30.8%	0%	69.2%	100.0%
Неатопична, неозинофилна	Брой	3	2	1	6
	%	50.0%	33.3%	16.7%	100.0%

Табл. 24 Белодробна функция при различните фенотипи формирани според атопия и еозинофилия.



Фиг.22 Разпределение на пациентите с БА според атопичен статус и абсолютен еозинофилен кръвен брой

На табл. 25 е представен сравнителен анализ между пациентите с атопична, неозинофилна БА, атопична, еозинофилна БА и неатопична, еозинофилна БА.

	Атопична БА		Неатопична, еозинофилна БА n=13
	Нееозинофилна n=31	Еозинофилна n=30	
Възраст*	37 (30-49) ‡	47 (39-57)	54 (43-66)
Пол, жени	21 (67.7%)	18 (60%)	9 (69.2%)
ИТМ, kg/m2	25 (22-30)	28 (25-34)	28 (23-31)
Затлъстяване	7 (22.6%)	11 (36.7%)	4 (30.8%)
Пакетогодини	3.5 (0-10)	2 (0-13)	3.75 (0-17)
Тютюнопушене, не/бивш/да	14/7/10 (45.2/22.6/32.3%)	15/9/6 (50/30/20%)	6/6/1 (46.2/46.2/7.7%)
Лошо придържане	9 (29%)	5 (16.7%)	4 (30.8%)
Начало*	24 (10-38) ‡	38 (21-49)	43 (26-54)
Продължителност	14 (5-23)	7 (2.75-17)	6 (2.5-20)
ГЕРБ	8 (25.8%)	10 (33.3%)	3 (23.1%)
AERD	2 (6.5%)	7 (23.3%)	1 (7.7%)
Назални полипи	4 (12.9%)	10 (33.3%)	3 (23.1%)
ACQ5 резултат*	0.40 (0-1.20) ‡	1.70 (0.55-3.00)	1.80 (1.15-2.60)
ACQ7 резултат*	0.57 (0.14-1.14) ‡	1.72 (0.71-2.75)	2.14 (1.24-2.86)
ACT резултат*	23 (19-25) ‡	19 (14-23)	18 (12-22)
Неконтролирана БА (GINA)*	13 (41.9%)	20 (66.7%)	10 (76.9%)
Тежка БА (ATS/ERS)*	8 (25.8%)	19 (63.3%)	7 (53.8%)
Екзацербации / 1 година	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (1-2)
Терапия, стъпка 4/5	20 (64.5%)	24 (80%)	11 (84.6%)
Висока доза ИКС*	10 (32.3%)	20 (66.7%)	9 (69.2%)
Ниска доза ОКС	2 (6.5%)	4 (13.3%)	4 (30.8%)
CRP, mg/L	1.88 (0.67-4.70)	2.40 (1.28-5.16)	2.60 (0.93-4.49)
b-Eos, cells/microL*	200 (97-250)	486 (414-613)	511 (383-797)
b-Neu, 10/9L*	4.01 (3.25-5.46)	5.27 (4.32-6.57) ˣ	5.03 (3.48-6.14)
FeNO, ppb*	27 (16-42) Δ	31.5 (22-55)	67 (23-91)
Пре ФЕО1, Z score*	-0.85 (2.32; 0.08) Δ	-1.51 (-2.43; -0.56)	-3.03 (-3.44; -2.09)#
Пост ФЕО1, Z score*	-0.64 (-1.99; 0.25) Δ	-1.14 (-2.19; -0.16)	-2.67 (-2.90; -1.53) #
Промяна ФЕО1, %*	2 (0-10)	6 (0.75-11)	13 (5.5-18.5) #
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.14 (-1.78; 0.37) Δ	-1.42 (-2.12; 0.05)	-2.46 (-3.10; -0.89)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score*	-0.66 (-1.43; 0.52) Δ	-1.11 (-1.70; 0.26)	-1.93 (-3.19; -0.87) #
Пост ФЕО1/ФВК < LLN*	7 (22.6%)	8 (26.7%)	9 (69.2%)
Серумен IL-5, pg/ml	2.10 (1.00-3.20)	2.45 (1.94-3.50)	2.65 (1.63-5.00)
Серумен IL-13, pg/ml	1.07 (0.60-2.75)	1.08 (0.89-1.83)	1.15 (0.48-9.30)
Серумен периостин, ng/ml	1.91 (1.66-2.08)	1.56 (0.94-2.06)	1.74 (1.24-1.94)
Серумен IL-6, pg/ml*	0.93 (0.52-1.65) ‡	1.71 (1.14-2.82)	1.90 (1.05-3.52)
Серумен IL-8, pg/ml	1.23 (0-4.33)	2.90 (0.28-9.29)	0 (0-4.55)
Серумен IL-17A, pg/ml	1.63 (0.52-19.50)	4.96 (0.52-24.73)	0.50 (0.43-33.65)
Серумен общ IgE, IU/ml*	171 (52-364) Δ	193 (107-428)	57 (31-94) #

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин; ИКС – инхалаторен кортикостероид; LLN – долна граница на нормата; IL-8 беше изследван при n=28 с атопична, нееозинофилна, при n=24 с атопична, еозинофилна и при n=13 с неатопична, еозинофилна БА; Серумен периостин беше изследван при n=16 с атопична, нееозинофилна, при n=14 с атопична, еозинофилна и при n=8 с неатопична еозинофилна БА

*p<0.05; # p<0.05 при сравнение на атопична, еозинофилна БА и неатопична, еозинофилна БА; ‡ p<0.05 при сравнение на атопична, нееозинофилна БА с атопична, еозинофилни БА и с неатопична, нееозинофилна БА; Δ p<0.05 при сравнение на атопична, нееозинофилна БА с неатопична, еозинофилна БА; ˣ p<0.05 при сравнение на атопична, нееозинофилна БА с атопична, еозинофилна БА

Табл. 25 Сравнителен анализ между пациентите с атопична, нееозинофилна БА, атопична, еозинофилна БА и неатопична еозинофилна БА

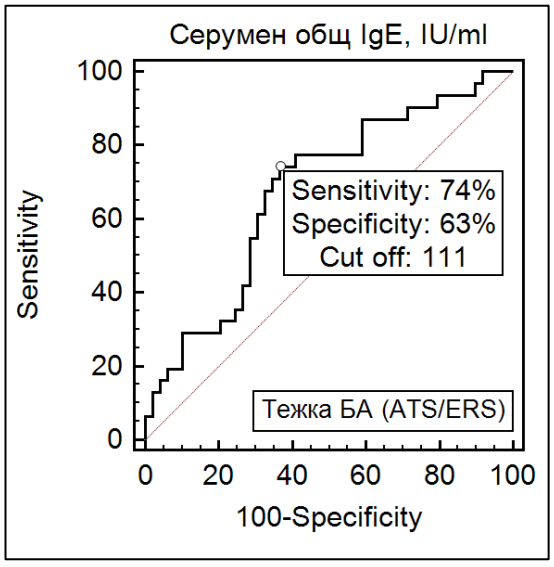
5.3.2 Нива на общ имуноглобулин Е (IgE) в периферна кръв и специфични IgE към Staphilococcus aureus ентеротоксин B (SEB-IgE)

Ние установихме средна стойност (медиана) на серумните общи IgE 119.95 (42.30-289.51) IU/ml,с максимална измерена стойност - 1983 IU/ml и минимална – 0.1 IU/ml.

Не установихме корелации в нивата на серумните общи IgE с останалите изследвани скалови вариабилни в цялата група пациенти с БА (n=80).

Значително по-високи нива на IgE установихме при атопични пациенти (177.50 (78.40-366.0) IU/ml) в сравнение с неатопични (U=163, Z-4.709, p<0.001), при БА с интермитентен (142.70 (68.9-364.0) IU/ml) или персистиращ (277.00 (126.50-499.50) IU/ml) алергичен ринит в сравнение с БА с неалергичен ринит или без ринит (χ2=21.418, p<0.001). Пациентите с ТА (ATS/ERS) също бяха с по-високи общи IgE (181 (57-390) IU/ml) в сравнение със СТА (U=584, Z=-1.974, p=0.048). (виж приложение 7).

От проведения ROC AUC анализ установихме, че граничната стойност от 111 IU/ml има чувствителност 74% (95%CI 55-88) и специфичност 63% (95%CI 48-77) за идентифициране на пациентите с тежка БА (ATS/ERS) AUC 0.750 (95%CI 0.639-0.860), SE 0.057, p<0.0001, Youden index J 0.406 фиг.23



Фиг.23 ROC AUC анализ за възможността на серумните общи IgE да идентифицират пациенти с ТА

Серумните общи IgE нямаха възможност да разграничават неконтролирана от контролирана БА в нашето проучване (AUC p=NS).

При пациентите с нива на общи IgE ≥ 100 IU/ml установихме по-висока честота на ТА (n=25; 56.8%) и по-висок процент пациенти, провеждащи лечение с висока доза ИКС (n=27; 61.4%), при сравнение с тези с общ IgE < 100 IU/ml (ТА при n=10; 27.85%; употреба на ИКС при n=13; 36.1%) (χ2-6.785, p=0.009; χ2-9.096, p=0.011, респективно).

Не установихме значими асоциации на нивата на общи IgE с другите изследвани възпалителни и имунологични характеристики.

При 12 (15%) пациента с БА установихме положителен резултат за sIgE към Staphilococcus aureus ентеротоксин B, като в групата доминираше женския пол (n=8; 66.7%). При 5 (41.7%) от пациентите с позитивни SEB-IgE установихме моносенсибилизация към друг алерген, а при 7 (58.3%) - полисенсибилизация. При 9 (75%) от тях имаше клинични данни за ринит (интермитентен n=4, 33.3%, персистиращ n=5, 41.7%). Нивата на общи IgE в тази група (294.25 (152.00-631.50) IU/ml) бяха значително повишени (U=187, Z=-2.978, p=0.003). FeNO и броят кръвни еозинофили бяха сигнификантно по-ниски при пациентите с положителни SEB-IgE (18 (12-28) ppb), (216 (176-342) cells/microL) (p<0.05).

Не наблюдавахме различия в контрол, функция, тежест, екзацербации, серумни нива на интерлевкините и периостин, свързани с положителен резултат за SEB-IgE при сравнение с групата с отрицателен резултат.

5.3.3 Абсолютен еозинофилен брой в периферна кръв (b-Eos)

Средната стойност (медиана) на абсолютния брой кръвни еозинофили беше 322 (205-509) cells/microL (максимална измерена стойност - 2125 cells/microL; минимална измерена стойност – 41 cells/microL)

Установихме следните корелации на броя еозинофили в периферна кръв с:

- ACQ5 резултат: r=0.441 (95%CI 0.247-0.604), p<0.001
- ACQ7 резултат: r=0.473 (95%CI 0.283-0.628), p<0.001
- ACT резултат: r=-0.334 (95%CI -0.516- -0.124), p=0.002

При ТА (ATS/ERS) кръвните еозинофили корелираха с:

- ACQ7: r = 0.379, p=0.025

- серумен IL-5: r=0.416, p=0.013

При неконтролирана БА кръвните еозинофили корелираха с:

- ACQ5: r=0.495, p<0.001
- ACQ7: r=0.538, p<0.001
- ACT: r= -0.405, p=0.005
- FeNO: r=0.432, p=0.002

Значително по-висок брой кръвни еозинофили установихме при неконтролирана БА, оценена чрез ACQ7≥1.5 (473 (324-697) cells/microL) (U=401, Z=-3.604, p<0.001) и ACT<20 (425 (267-518) cells/microL) (U=545,Z=-2.422, p=0.015). Броят на кръвните еозинофили беше значително по-висок при AERD (819 (416-960) cells/microL) (U=136,Z=-3.121,p=0.002), при FeNO>50ppb (462 (385-792) cells/microL) (U=353,Z=-2.561,p=0.010) и пост ФЕО1/ФВК < LLN (425 (267-576) cells/microL) (U=465,Z=-2.315,p=0.021). Установихми значимо по-високи кръвни еозинофили при ТА (ATS/ERS) (470 (290-651) cells/microL) (U=395, Z=-3.812,p=0.001), при пациентите с ИТМ ≥25 (410 (252-548) cells/microL) (U=471, Z=-2.981, p=0.003) и при тези на висока доза ИКС (465 (278-562) cells/microL) ($\chi2$=15.309, p<0.001) или СКС като стъпка 5 в терапията (645 (294-1106) cells/microL) (U=184, Z=-2.415, p=0.016) (виж приложение 7). При допълнителен анализ установихме, че 90 % от пациентите на лечение с ниски дози СКС или висока доза ИКС имаха добро придържане към терапия.

Гранични стойности за броя на кръвните еозинофили, cells/microL	Екзацербации >1		Неконтролирана, GINA		Тежка, ATS/ERS	
	$\chi2$	p	$\chi2$	p	$\chi2$	p
<100 (11.3%) vs ≥100 (88.8%)	1.46	0.23	0.46	0.50	1.91	0.17
<150 (16.3%) vs ≥150 (83.8%)	0.08	0.77	3.68	0.06	5.08	***<0.05***
<200 (22.5%) vs ≥200 (77.5%)	0.39	0.53	4.41	***<0.05***	6.92	***<0.05***
<250 (35%) vs ≥250 (65%)	0.03	0.88	9.09	***<0.05***	11.74	***<0.05***
<300 (47.5%) vs ≥300 (52.5%)	0.05	0.82	7.05	***<0.05***	8.94	***<0.05***
<350 (52.5%) vs ≥350 (47.5%)	0.60	0.44	10.21	***<0.05***	8.28	***<0.05***
<400 (58.8%) vs ≥400 (41.3%)	0.96	0.33	4.90	***<0.05***	11.99	***<0.05***
<450 (65%) vs ≥450 (35%)	0.47	0.50	4.70	***<0.05***	13.41	***<0.05***
<500 (73.8%) vs ≥500 (26.3%)	3.37	0.07	1.57	0.21	12.18	***<0.05***
<550 (83.8%) vs ≥550 (16.3%)	9.02	***<0.05***	1.27	0.26	6.94	***<0.05***

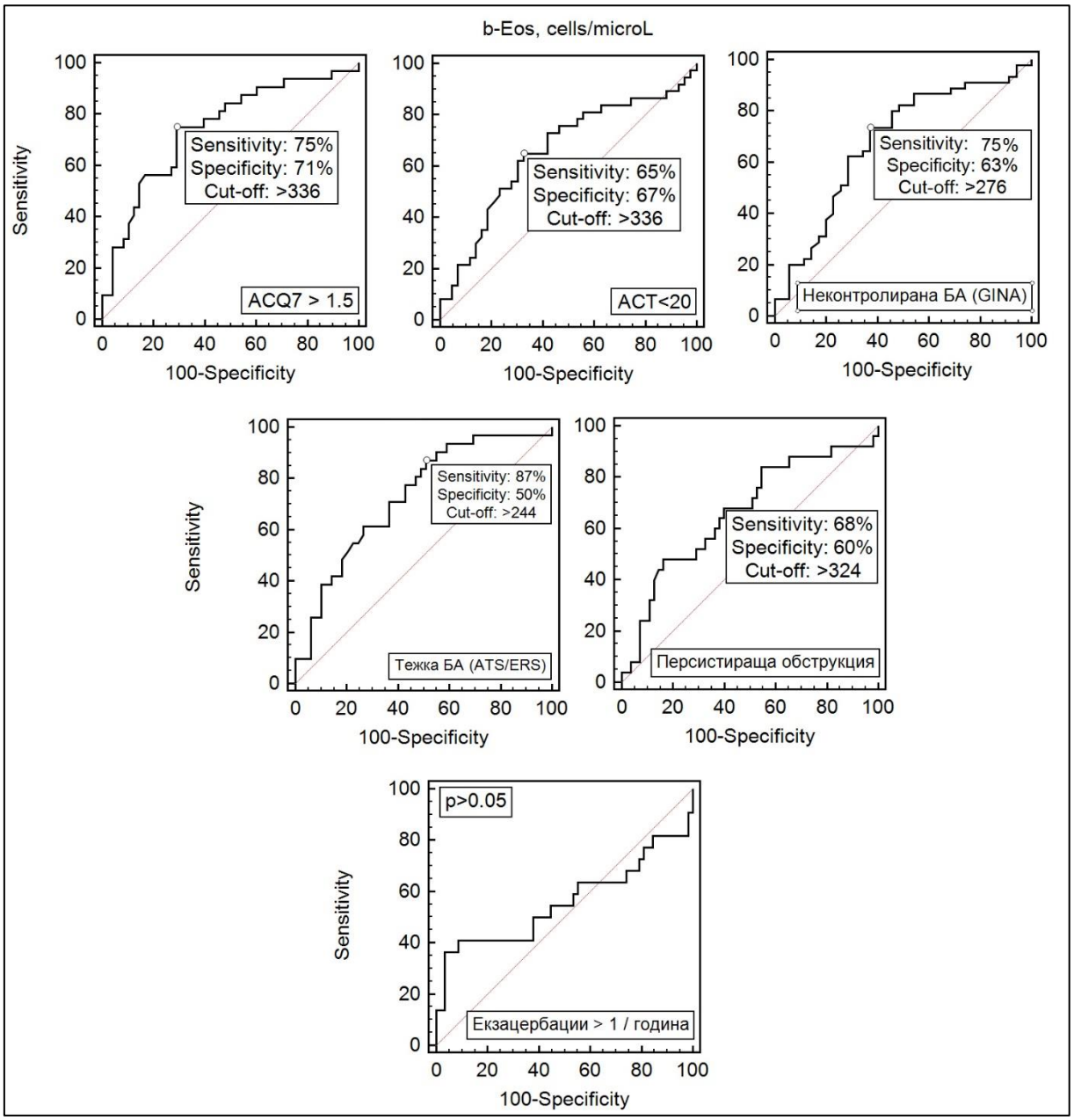
Табл.26 Екзацербации, тежест и контрол според различни гранични стойности за броя на кръвните еозинофили.

Повишение на броя на кръвните еозинофили ≥ 550 cells/microL се асоцииране с настъпване на повече от 1 екзацербация/година. Ние установихме, че още при гранични

стойности от 150 и 200 cells/microL има значими различия в честотата на неконтролирана и тежка БА (табл.26).

Определихме възможността на кръвните еозинофили за отличаване на пациентите с неконтролирана БА, ТА и персистираща бронхиална обструкция (фиг.24):

- Неконтролирана от тези с контролирана БА (GINA) е с чувствителност 75% (95%CI 60-87) и специфичност 63% (95%CI 46-79) за гранична стойност > 276 cells/microL, Youden index J 0.389 при AUC 0.683 (95%CI 0.570-0.783), SE=0.062, p=0.029.
- Неконтролирана от тези с контролирана БА (ACQ7≥1.5) е с чувствителност 75% (95%CI 57-89) и специфичност 71% (95%CI 56-83) за гранична стойност > 336 cells/microL, Youden index J 0.458 при AUC 0.744 (95%CI 0.634-0.835), SE=0.058, p<0.0001.
- Неконтролирана от тези с контролирана БА (ACT<20) е с чувствителност 65% (95%CI 48-80) и специфичност 67% (95%CI 52-81) за гранична стойност > 336 cells/microL, Youden index J 0.323 при AUC 0.658 (95%CI 0.543-0.760), SE=0.063, p=0.012.
- ТА от тези със СТА (ATS/ERS 2014) е с чувствителност 87 % (95%CI 70-96) и специфичност 50% (95%CI 34-64) за гранична стойност > 244 cells/microL, при AUC 0.750 (95%CI 0.639-0.860), SE=0.057, p<0.0001.
- Персистираща бронхиална обструкция (post FEV1/FVC < LLN) е с чувствителност 68% (95%CI 47-85) и специфичност 60% (95%CI 46-73) за гранична стойност > 324 cells/microL при AUC 0.662 (95%CI 0.528-0.797), SE=0.069, p=0.018.



Фиг.24 ROC AUC анализ за способността на броя на кръвните еозинофили да идентифицира пациенти с неконтролирана БА, тежка БА, БА с персистираща обструкция и БА с чести екзацербации (повече от 1 екзацербация за година).

Характеристиките на нееозинофилна БА (кръвни еозинофили < 300 cells/microL) и еозинофилна БА (кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL) са отразени на табл.27

	Абсолютен брой кръвни еозинофили		p
	< 300 cells/microL n=38; 47.5%	≥ 300 cells/microL n=42; 52.5%	
Възраст	37 (31-58)	49 (40-57)	0.038
Пол, жени	26 (68.4%)	26 (61.9%)	-
ИТМ, kg/m2	24 (22-30)	28 (25-32)	0.044
Затлъстяване	8 (21.1%)	15 (35.7%)	-
Пакетогодини	2.75 (0-10)	3.88 (0-15)	-
Тютюнопушене, не/бивш/да	18/8/12 (47.4/21.1/31.6%)	20/15/7 (47.6/35.7/16.7%)	-
Лошо придържане	12 (31.6%)	9 (21.4%)	-
Начало <12/12-40/>40 г.	9/19/10 (23.7/50/10%)	2/21/19 (4.8/50/45.2%)	0.028
Начало	28 (12-43)	38 (22-49)	*0.053*
КАП /+/	31 (81.6%)	30 (71.4%)	-
ГЕРБ	11 (28.9%)	13 (31%)	-
AERD	2 (5.3%)	8 (19%)	*0.063*
Назални полипи	5 (13.2%)	13 (31%)	*0.057*
ACQ5 резултат	0.40 (0-1.30)	1.80 (0.60-2.85)	<0.001
ACQ7 резултат	0.57 (0.14-1.21)	1.93 (0.82-2.75)	<0.001
АСТ резултат	23 (18-25)	19 (14-22)	0.010
Неконтролирана БА (GINA)	15 (39.5%)	29 (69%)	0.008
Тежка БА (ATS/ERS)	10 (26.3%)	25 (59.5%)	0.003
Екзацербации / 1 година	1 (0-2)	1 (0-2)	-
Терапия, стъпка 4/5	24 (63.2%)	34 (81%)	-
Висока доза ИКС	12 (31.6%)	28 (66.7%)	0.002
Ниска доза ОКС	3 (7.9%)	7 (16.7%)	-
CRP, mg/L	1.75 (0.64-4.73)	2.48 (1.19-4.42)	-
b-Neu, 10/9L	4.00 (3.21-5.48)	5.10 (4.06-6.56)	0.001
FeNO, ppb	24 (15-41)	37 (22-67)	0.008
Пре ФЕО1, Z score	-0.94 (-2.39; -0.16)	-1.95 (-3.07; -0.69)	0.021
Пост ФЕО1, Z score	-0.65 (-1.93; 0.21)	-1.40 (-2.68; -0.43)	0.026
Промяна ФЕО1, ml	80 (0-252)	150 (40-290)	-
Промяна ФЕО1, %	3 (0-10)	7 (1.75-15)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.05 (-1.77; 0.40)	-1.67 (-2.63; -0.17)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.69 (1.44; 0.53)	-1.36 (-2.19; 0.14)	*0.060*
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	8 (21.1%)	17 (40.5%)	*0.061*
Серумен IL-5, pg/ml	2.08 (1.34-3.13)	2.48 (1.94-3.46)	*0.076*
Серумен IL-13, pg/ml	1.04 (0.04-2.44)	1.09 (0.89-1.83)	-
Серумен периостин, ng/ml	1.93 (1.61-2.11)	1.60 (1.08-1.94)	-
Серумен IL-6, pg/ml	0.98 (0.58-1.91)	1.71 (1.14-2.91)	0.008
Серумен IL-8, pg/ml	1.58 (0-4.61)	2.03 (0-4.73)	-
Серумен IL-17A, pg/ml	1.04 (0.47-18.90)	2.85 (0.49-25.78)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	99 (27-273)	134 (55-302)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин; ИКС – инхалаторен кортикостероид; LLN – долна граница на нормата; IL-8 беше изследван при n=34 с нееозинофилна БА и при n=36 с еозинофилна БА; Серумен периостин беше изследван при n=21 с еозинофилна БА и при n=21 с нееозинофилна БА

Табл.27 Характеристики на еозинофилна и нееозинофилна БА.

5.3.4 Фракция на издишан азотен окис (FeNO)

Средната стойност (медиана) на FeNO беше 29.5 (18.3-47.8) ppb с максимално измерен резултат - 178 ppb и минимален – 7 ppb.

Установихме следните корелации на нивата на FeNO с:

- кръвни еозинофили, %: r=0.387 (95%CI 0.183-0.559), p<0.001

- екзацербации: r=0.315 (95%CI 0.102-0.500), p=0.004

Корелации на FeNO при ТА (ATS/ERS критерии) с:

- екзацербации: r =0.429, p=0.010

- серумен IL-13: r=0.414, p=0.014

Корелации на FeNO при неконтролирана БА с:

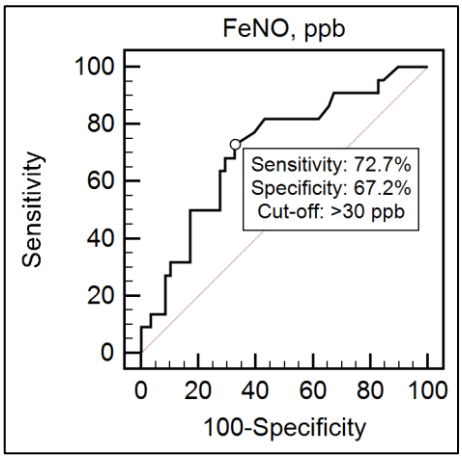
- броя кръвни еозинофили: r=0.432, p=0.002

- промяна на ФЕО1 при БДТ (%): r=0.311, p=0.033

Установихме значително по-високи нива на FeNO при непушачи и бивши пушачи в сравнение с настоящите тютюнопушачи ($\chi 2$=7.286, p=0.026) и при лечение със средна и висока доза ИКС в сравнение с лечение с ниска доза ИКС ($\chi 2$=11.284, p=0.004). Пациентите на ниски дози СКС, като стъпка 5 в терапията (U=168, Z=-2.649, p=0.008) бяха с по-висок FeNO в сравненеие с тези на по-ниска стъпка в лечението.

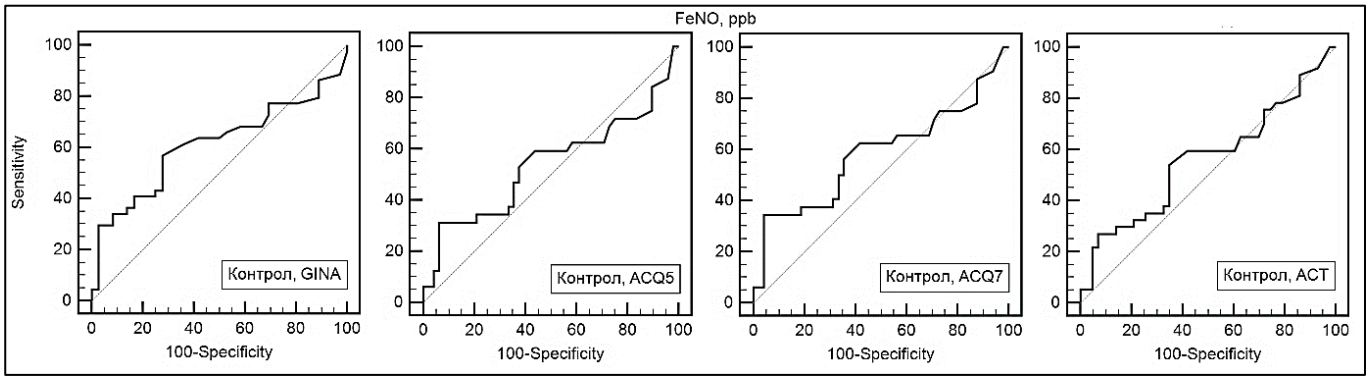
FeNO беше значимо повишен при пациенти с >1 екзацербации през последната година (U=366, Z=-2.932, p=0.003) и пре ФЕО1/ФВК < LLN (U=522, Z=-2.479, p=0.013). Нивата на FeNO бяха по-високи в при пациентите с кръвни еозинофили ≥ 250 cells/microL (U=475,Z=-2.558,p=0.011) (виж приложение 7).

От проведения ROC AUC анализ установихме, че граничната стойност на FeNO от 30 ppb имаха чувствителност 72.7% (95%CI 50-89) и специфичност 67.2% (95%CI 54-79) за идентифициране на чести екзацербатори с БА (> 1 екзацербации/година) AUC 0.713 (95%CI 0.601-0.809), SE 0.065, p=0.001, Youden index J 0.399 (фиг.25).



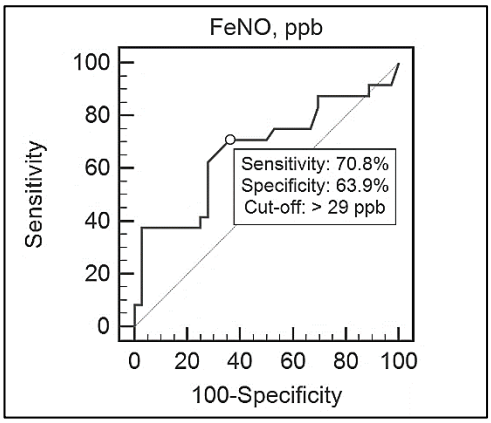
Фиг. 25 ROC AUC анализ за възможността на FeNO да идентифицира пациенти с БА с повече от 1 екзацербация за година.

FeNO нямаше възможност да разграничи неконтролирани от контролирани пациенти с БА в нашето проучване (AUC p=NS) (фиг. 26).



Фиг.26 ROC AUC анализ на FeNO за разграничаване на неконтролирана БА от контролирана, p>0.05 (NS)

Способността на FeNO за дискриминиране на пациентите с лош контрол от тези с пълен контрол, определен по GINA, (в анализа не са включени пациенти с частичен контрол) беше с чувствителност 70.8% (95%CI 49-87) и специфичност 63.9% (95%CI 46-79) за гранична стойност > 29 ppb при AUC 0.671 (95%CI 0.537-0.787), SE=0.076, p=0.025 (Фиг.27).



Фиг.27 ROC AUC анализ на FeNO за разграничаване на пациентите с лош контрол от тези с пълен контрол (GINA) (в анализа не са включени пациентите с частичен контрол)

Гранични стойности за FeNO, ppb	Екзацербации >1		Неконтролирана, GINA		Тежка, ATS/ERS	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
< 20 (26.3%) vs ≥ 20 (73.8%)	4.615	***0.032***	0.627	0.429	7.060	***0.008***
< 25 (40%) vs ≥ 25 (60%)	6.019	***0.014***	1.423	0.233	1.905	0.168
< 30 (50%) vs ≥ 30 (50%)	9.028	***0.003***	5.051	***0.025***	1.270	0.260
< 35 (60%) vs ≥ 35 (40%)	10.042	***0.002***	4.074	***0.044***	0.212	0.645
< 40 (63.8%) vs ≥ 40 (36.3%)	6.851	***0.009***	2.033	0.154	0.104	0.747
< 45 (72.5%) vs ≥ 45 (27.5%)	7.705	***0.006***	3.853	0.050	0.036	0.850
< 50(76.3%) vs ≥ 50 (23.8%)	4.934	***0.026***	5.774	***0.016***	0.133	0.716

Табл. 28 Екзацербации, тежест и контрол според различни гранични стойности за FeNO.

Разпределението на пациентите при зададени предварително гранични стойности според препоръките на ATS от 2011 г. беше както следва: < 25 ppb: n=32 (40%), 25-50 ppb: n=29 (36.3%), > 50 ppb: n=19 (23.8%). Нива на FeNO > 50 ppb бяха асоциирани с пре ФЕО1/ФВК < LLN (n=12; 63.2%) (χ^2=4.935, p=0.026), пре ФЕО1 < LLN (n=13; 68.4%) (χ^2=4.373, p=0.037), кръвни еозинофили ≥ 250 cells/microL (n=16; 84.2%) (χ^2=4.042, p=0.044) и неконтролирана БА (n=15; 78.9%) (χ^2=5.774, p=0.016). Пациентите с FeNO > 50 ppb имаха значително по-високи нива на кръвни еозинофили (462 (385-792) cells/microL) (U=353, Z=-2.561, p=0.010) и по-ниски функционални показатели (пре ФЕО1/ФВК, Z score -1.99 (-2.50;-1.42), пост ФЕО1/ФВК, Z score -1.40 (-1.93; -1.10)) (U=319, Z=-2.945, p=0.003, U=332, Z=-2.804, p=0.00, респективно) в сравнение с пациентите с FeNO ≤ 50 ppb (еозинофили 276 (191-469) cells/microL, пре ФЕО1/ФВК, Z score -0.90 (-2.03; 0.36), пост ФЕО1/ФВК, Z score -0.54 (-1.82; 0.45)). Пациентите с FeNO > 50 ppb демонстрираха по-изразен бронходилататорен отговор и

промяна във ФЕО1 с 11 (4-20) %, в сравнение с 3 (0-10) % за пациентите с FeNO ≤ 50 ppb (U=320, Z=-2.963, p=0.003).

Честота на пациентите с кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL според различни гранични стойности за FeNO е показана на табл. 29

		Кръвни еозинофили cells/microL			
		< 300		≥ 300	
		Брой	%	Брой	%
FeNO, категории	< 30 ppb	23	60.5%	17	40.5%
	≥ 30 ppb	15	39.5%	25	59.5%
	≤ 50 ppb	34	89.5%	27	64.3%
	> 50 ppb	4	10.5%	15	35.7%

Табл.29 Асоциация на нивата на FeNO с кръвните еозинофили

5.3.5 С-реактивен протеин (CRP)

Средната стойност (медиана) на CRP беше 2.07 (0.85-4.66) mg/l, с максимална измерена стойност - 16.50 mg/l и минимална – 0.10 mg/l.

Установихме корелации на нивата на CRP при БА с:

- пост ФЕО1, Z score: r=-0.307 (95%CI -0.494 - -0.094), p=0.006
- пост ФВК, Z score: r=-0.372 (95%CI -0.547 - -0.165), p=0.001
- IL-6, pg/ml: r=0.340 (95%CI 0.129-0.520), p=0.002
- ИТМ: r=0.402 (95%CI 0.200-0.571), p<0.001

Корелации на CRP при СТА:

		CRP, mg/L	IL-6, pg/ml	b-Neu, 10/9L	Възраст	ИТМ
CRP, mg/L	Корелационен коефициент	1,000	0,434**	0,331*	0,155	0,424**
	p	.	0,003	0,026	0,309	0,004
	n	45	45	45	45	45
IL-6, pg/ml	Корелационен коефициент	0,434**	1,000	0,495**	0,427**	0,208
	p	0,003	.	0,001	0,003	0,171
	n	45	45	45	45	45
b-Neu, 10/9L	Корелационен коефициент	0,331*	0,495**	1,000	-0,143	0,103
	p	0,026	0,001	.	0,348	0,499
	n	45	45	45	45	45
Възраст	Корелационен коефициент	0,155	0,427**	-0,143	1,000	0,265
	p	0,309	0,003	,348	.	0,079
	n	45	45	45	45	45
ИТМ	Корелационен коефициент	0,424**	0,208	0,103	0,265	1,000
	p	0,004	0,171	0,499	0,079	.
	N	45	45	45	45	45

Табл. 30 Корелации на CRP и IL-6 в групата на СТА
** p<0.01; * p<0.05

Корелации на CRP при неконтролирана БА с:

- ИТМ: r=0.475, p=0.001

Корелации на CRP при ТА (ATS/ERS критерии) с:

- серумен периостин: r = 0.657, p=0.008

CRP беше най-нисък във възрастова категория < 30 год. (0.7 (0.56-2.04) mg/l) при сравнение с възрастови категории 50-59 год. и ≥ 60 год. (p<0.05). При сравнение на останалите възрастови категории нямаше статистическа значимост. Не установихме зависимости в нивата на CRP според тежест, контрол, брой екзацербации, тютюнопушене, съпътстващи коморбидности, нива на еозинофилен брой, FeNO и серумни интерлевкини с изключение на IL-6.

5.4 Резултати към задача 4: Изследване и анализиране на серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A и периостин при пациенти с БА и ЗК

Не установихме значима разлика в нивата на серумен IL-5, периостин, IL-13, IL-17A, IL-6, IL-8 и общи IgE при сравнение по пол на ЗК (виж приложение 8).

Серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A и периостин бяха статистически значимо по-високи при БА в сравнение със ЗК (табл.31).

	БА, n=80			ЗК, n=30			p
	медиана	IQR	мин-макс	медиана	IQR	мин-макс	
IL-5	2.24	1.79-3.28	0-46.75	1.93	0.30-3.10	0-5.20	0.032
IL-6	1.45	0.73-2.25	0-22.40	0.45	0.10-1.37	0-12.80	<0.001
IL-8*	1.63	0-4.68	0-99	0.45	0-1.70	0-10	0.047
IL-13	1.08	0.45-1.89	0-157.10	0.31	0-1.20	0-5.40	0.014
IL-17A	1.04	0.48-24.45	0.38-46.30	0.41	0.35-0.48	0-0.64	<0.001
Периостин**	1.86	1.18-2.08	0.63-2.83	1.08	0.93-1.20	0.20-1.30	<0.001

Съкращения: IL – интерлевкин, IQR – интерквартилен обхват, БА – бронхиална астма, ЗК – здрави контроли. Нивата на изследваните интерлевкини са представени в pg/ml, а на периостин в ng/ml; *n=70; **n=42; Използван е Mann-Whitney U-test;

Табл.31 Серумни нива на изследваните интерлевкини и периостин при БА и ЗК.

5.4.1 Серумни нива на интерлевкин 5 (IL-5)

Ние измерихме средна стойност (медиана) на серумните нива на IL-5 при БА - 2.24 (1.79-3.28) pg/ml. Максималната измерена стойност беше 46.75 pg/ml, а минималната – 0 pg/ml.

Серумните нива на IL-5 при ТА (ATS/ERS критерии) корелираха с:

- абсолютния брой кръвни еозинофили: r = 0.416, p=0.013

Използвахме 95-я персентил от групата на ЗК за IL-5 (4.60 pg/ml), като гранична стойност, за да дефинираме подгрупи пациенти с нисък IL-5 (≤4.60 pg/ml) (n=73, 91.3%) и висок IL-5 (>4.60 pg/ml) (n=7, 8.8%). Пациентите с висок IL-5 имаха значително по-високи кръвни еозинофили (852 (295-1230) cells/microL) (U=103, Z=-2.605, p=0.009), неконтролирана БА (ACQ7 - 2.86 (1.43-3.14), ACT - 17 (10-19)) (U=107, Z=-2.532, p=0.011, U=123, Z=-2.284, p=0.022) и по-чести екзацербации (2 (1-5)) през последната 1 година (U=130, Z=-2.261, p=0.024) на фона на терапия от стъпка 4/5 и значимо по-висока честота на употреба на СКС (табл.32).

	Серумни нива на IL-5		p
	≤4.60 pg/ml n=73; 91.3%	>4.60 pg/ml n=7; 8.8%	
Възраст	42 (33-58)	51 (38-64)	-
Жени/Мъже	47/26 (64.4/35.6%)	5/2 (71.4/28.6%)	-
ИТМ	27 (23-30)	27 (26-31)	-
Затлъстяване	21 (28.8%)	2 (28.6%)	-
Настоящи пушачи	18 (24.7%)	1 (14.3%)	-
Пакетогодини	3.5 (0-10)	0 (0-9.5)	-
Начало	32 (19-49)	37 (21-51)	-
КАП /+/	57 (78.1%)	4 (57.1%)	-
AERD	7 (9.6%)	3 (42.9%)	0.011
ACQ5 резултат	1.00 (0-1.90)	2.60 (1.80-3.00)	0.016
ACQ7 резултат	0.86 (0.29-2.14)	2.86 (1.43-3.14)	0.011
ACT резултат	22 (17-25)	17 (10-19)	0.022
Екзацербации за 1 година	1 (0-1)	2 (1-5)	0.024
Терапия стъпка 4/5	51 (69.9 %)	7 (100 %)	-
Ниска доза ОКС	5 (6.8%)	5 (71.4%)	<0.001
Неконтролирана БА	38 (52.1%)	6 (85.7%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	30 (41.1%)	5 (71.4%)	-
CRP, mg/L	2.00 (0.77-4.64)	4.10 (1.50-6.60)	-
WBC, 10/9L	7.70 (5.85-9.35)	7.90 (5.90-10.40)	-
b-Eos, cells/microL	318 (196-486)	852 (295-1230)	0.009
b-Neu, 10/9L	4.68 (3.50-5.88)	4.01 (3.79-6.45)	-
FeNO, ppb	29 (18-46.5)	39 (21-104)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.37 (-2.72; -0.42)	-2.11 (-3.40; -1.14)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.05 (-2.12; -0.14)	-1.43 (-2.93; -1.16)	-
промяна ФЕО1, ml	120 (15-260)	100 (0-290)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.34 (-2.30; 0.09)	-1.35 (-3.44; -0.65)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.89 (-1.86; 0.31)	-1.11 (-3.14; -0.64)	-
IL-13, pg/ml	1.06 (0.33-1.44)	1.92 (1.15-11.50)	-
Периостин, ng/ml	1.84 (1.18-2.02)	2.01 (1.54-2.21)	-
IL-6, pg/ml	1.40 (0.68-2.21)	2.03 (1.27-4.73)	-
IL-8, pg/ml	1.60 (0-4.65)	2.05 (0.60-6.10)	-
IL-17A, pg/ml	1.12 (0.48-21.90)	0.59 (0.54-25.40)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	114 (42.3-289.5)	175 (13.4-499.5)	-
Общ IgE > 100 IU/ml	39 (53.4%)	5 (71.4%)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин

Табл.32 Сравнение на подгрупите с нисък и висок серумен IL-5

5.4.2 Серумни нива на интерлевкин 6 (IL-6)

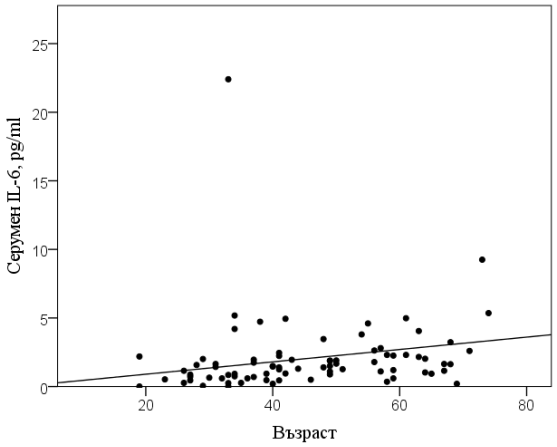
Ние определихме средната стойност (медиана) на серумните нива на IL-6 при БА - 1.45 (0.73-2.25) pg/ml при максимално измерена стойност - 22.40 pg/ml и минимална – 0 pg/ml.

Серумните нива на IL-6 корелираха с:

- Кръвните неутрофили, 10^9/L: r=0.337 (95%CI 0.126-0.518), p=0.002
- CRP, pg/ml: r=0.340 (95%CI 0.129-0.520), p=0.002
- WBC, 10^9/L: r=0.318 (95%CI 0.105-0.502), p=0.004
- Възрастта: r=0.393 (CI 95% (0.189-0.564), p<0.001
- Начало на заболяването: r=-0.381 (95%CI 0.176-0.555), p<0.001

Корелации на серумни нива на IL-6 при неконтролирана БА с:

- възраст: r=0.323, p=0.027
- IL-8: r=0.327, p=0.040



Фиг.28 Корелация между серумните нива на IL-6 и възрастта при пациентите с БА

Използвахме 95-я персентил от групата на ЗК за IL-6 (3.70 pg/ml), като гранична стойност, за да дефинираме подгрупи пациенти с нисък IL-6 (≤3.70 pg/ml) (n=69, 86.3%) и висок IL-6 (>3.70 pg/ml) (n=11, 13.8%). Пациентите с висок IL-6 имаха значително по-висок CRP (4.34 (1.62-6.60) mg/ml) (U=229, Z=-2.110, p=0.035), WBC (9.70 (7.70-11.80) 10^9/L) (U=237, Z=-1.991, p=0.046) и по-високи нива на IL-8 (4.88 (3.63-16.68) pg/ml) (U=130, Z=-2.893, p=0.004) (табл.33).

	Серумни нива на IL-6		p
	≤3.70 pg/ml N=69, 86.3%	>3.70 pg/ml N=11, 13.8%	
Възраст	41 (33-57)	54 (34-63)	-
Жени/Мъже	45/24 (65.2/34.8%)	7/4 (63.6/36.4%)	-
ИТМ	27 (23-30)	27 (24-35)	-
Затлъстяване	19 (27.5%)	4 (36.4%)	-
Ринит, персистиращ алергичен/неалергичен	19/11 (27.5/15.9%)	4/1 (36.4/9.1%)	-
Настоящи пушачи	16 (23.2%)	3 (27.3%)	-
Пакетогодини	3.5 (0-10)	7.0 (0-18)	-
Начало	32 (19-47)	53 (18-58)	-
КАП /+/	54 (78.3%)	7 (63.6%)	-
ACQ5 резултат	1.00 (0.10-2.10)	1.60 (0.60-3.20)	-
ACQ7 резултат	1.00 (0.29-2.14)	2.14 (0.43-2.29)	-
АСТ резултат	21 (16.5-24.5)	21 (15-22)	-
Екзацербации за 1 година	1 (0-2)	1 (1-2)	-
Терапия стъпка 4/5	50 (72.5%)	8 (72.7%)	-
Ниска доза ОКС	9 (13%)	1 (9.1%)	-
Неконтролирана БА	37 (53.6%)	7 (63.6%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	30 (43.5%)	5 (45.5%)	-
CRP, mg/L	2.00 (0.70-4.41)	4.34 (1.62-6.60)	0.035
WBC, 10/9L	7.30 (5.85-8.75)	9.70 (7.70-11.80)	0.046
b-Eos, cells/microL	295 (196-511)	396 (294-462)	-
b-Neu, 10/9L	4.42 (3.50-5.69)	6.02 (5.05-7.08)	-
FeNO, ppb	29 (18.5-46.5)	41 (11-68)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.37 (-2.78; -0.49)	-1.78 (-3.12; -0.36)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.13 (-2.20; -0.14)	-1.12 (-2.77; -0.36)	-
промяна ФЕО1, ml	120 (20-260)	100 (0-340)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.41 (-2.37; 0.02)	-0.67 (-2.03; 0.35)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.91 (-1.91; 0.24)	-0.96 (-1.38; 0.31)	-
IL-13, pg/ml	1.07 (0.38-1.69)	1.18 (0.92-4.65)	-
Периостин, ng/ml	1.85 (1.18-2.08)	1.93 (1.40-2.25)	-
IL-5, pg/ml	2.25 (1.77-3.33)	2.22 (2.05-2.95)	-
IL-8, pg/ml	0.83 (0-3.96)	4.88 (3.63-16.68)	0.004
IL-17A, pg/ml	1.63 (0.50-24.85)	0.52 (0.47-14.50)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	125.9 (42.3-303.2)	102.8 (32.3-181)	-
Общ IgE > 100 IU/ml	38 (55.1%)	6 (54.5%)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин

Табл.33 Сравнение на подгрупите с нисък и висок серумен IL-6

5.4.3 Серумни нива на интерлевкин 8 (IL-8)

	Серумни нива на IL-8		p
	≤ 8.30 pg/ml n=60, 85.7%	> 8.30 pg/ml n=10, 14.3%	
Възраст	41 (33-57)	44.5 (39-57)	-
Жени/Мъже	40/20 (66.7/33.3%)	6/4 (60/40%)	-
ИТМ	26 (23-30)	26 (24-34)	-
Затлъстяване	13 (21.7%)	4 (40%)	-
Ринит, персистиращ алергичен/неалергичен	15/11 (25/18.3%)	6/1 (60/10%)	-
Настоящи пушачи	14 (23.3%)	3 (30%)	-
Пакетогодини	3.5 (0-11)	2.00 (0-15)	-
Начало	31.5 (18.3-48.5)	35 (16.8-48.3)	-
КАП /+/	44 (73.3%)	8 (80%)	-
ACQ5 резултат	1.00 (0.05-1.80)	1.90 (0.85-3.05)	0.038
ACQ7 резултат	0.86 (0.32-2.11)	2.28 (1.29-2.90)	0.021
АСТ резултат	22 (18-25)	17 (14.8-23.5)	-
Екзацербации за 1 година	1 (0-1.75)	1.5 (0.75-2.50)	-
Терапия стъпка 4/5	41 (68.3%)	9 (90%)	-
Ниска доза ОКС	7 (11.7%)	2 (20%)	-
Неконтролирана БА	31 (51.7%)	7 (70%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	21 (35%)	8 (80%)	0.007
CRP, mg/L	2.00 (0.70-4.46)	3.90 (1.07-11.13)	-
WBC, 10/9L	7.35 (5.90-8.58)	9.40 (5.35-11.83)	-
b-Eos, cells/microL	307.5 (185-509)	339 (234-582)	-
b-Neu, 10/9L	4.41 (3.52-5.59)	6.08 (2.95-7.19)	-
FeNO, ppb	28.5 (17.3-53.5)	31 (19.3-52.3)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.31 (-2.60; -0.38)	-2.96 (-3.32; -1.43)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.04 (-2.04; -0.07)	-2.59 (-3.12; -0.52)	0.048
промяна ФЕО1, ml	160 (25-288)	90 (0-248)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.39 (-2.23; -0.19)	-1.18 (-3.20; 0.24)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.89 (-1.83; 0.24)	-1.23 (-3.23; 0.39)	-
IL-13, pg/ml	1.07 (0.33-3.93)	1.13 (0.04-3.23)	-
Периостин, ng/ml	1.83 (1.18-2.08)	1.93 (0.85-2.25)	-
IL-6, pg/ml	1.20 (0.60-2.03)	2.13 (1.33-6.20)	0.015
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.47-25.35)	0.57 (0.46-28.10)	-
IL-5, pg/ml	2.38 (1.48-3.50)	2.68 (2.03-3.26)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	91.7 (39-263)	194.4 (87.5-451.5)	-
Общ IgE > 100 IU/ml	29 (48.3%)	8 (80%)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин

Табл.34 Сравнение на подгрупите с нисък и висок серумен IL-8

Нивата на IL-8 в серума успяхме да определим при 70 от пациентите с БА.

Ние измерихме средни серумни нива (медиана) на IL-8 от 1.63 (0-4.68) pg/ml. Максималната измерена стойност беше 99 pg/ml, а минималната – 0 pg/ml.

Серумните нива на IL-8 при неконтролирана БА корелираха със:

- серумни нива на IL-6: r=0.327, p=0.040

При прилагане на 95-я персентил от групата на ЗК за IL-8 (8.30 pg/ml), като гранична стойност, дефинирахме подгрупи пациенти с нисък IL-8 (≤ 8.30 pg/ml) (n=60, 85.7%) и висок IL-8 (> 8.30 pg/ml) (n=10, 14.3%). Пациентите с висок IL-8 бяха предимно с неконтролирана БА (ACQ7 - 2.28 (1.29-2.90)) (U=163, Z=-2.303, p=0.021), с по-нисък пост ФЕО1, Z score (-2.59 (-3.12; -0.52)) (U=182, Z=-1.981, p=0.048) и по-висок IL-6 (2.13 (1.33-6.20) pg/ml) (U=156, Z=-2.425, p=0.015) (табл.34).

5.4.4 Серумни нива на интерлевкин 13 (IL-13)

Медианата на серумните нива на IL-13 при БА беше 1.08 (0.45-1.89) pg/ml. Максималната измерена стойност беше 157.10 pg/ml, а минималната – 0 pg/ml.

Серумните нива на IL-13 при ТА (ATS/ERS критерии) корелираха с:

- FeNO: r = 0.414, p=0.014

При прилагане на 95-я персентил от групата на ЗК за IL-13 (3.30 pg/ml), като гранична стойност, дефинирахме подгрупи пациенти с нисък IL-13 (≤3.30 pg/ml) (n=63, 78.8%) и висок IL-13 (>3.30 pg/ml) (n=17, 21.3%). Пациентите с висок IL-13 имаха значително по-високи нива на IL-5 (3.20 (2.53-4.10) pg/ml) (U=279, Z=-3.024, p=0.002) и по-нисък IL-17A (0.50 (0.45-0.78) pg/ml) (U=276, Z=-3.053, p=0.002) (табл.35).

	Серумни нива на IL-13		p
	≤3.30 pg/ml n=63, 78.8%	>3.30 pg/ml n=17, 21.3%	
Възраст	42 (34-57)	42 (31-63)	-
Жени/Мъже	42/21 (66.7/33.3%)	10/7 (58.8/41.2%)	-
ИТМ	27 (23-31)	27 (24-29)	-
Затлъстяване	21 (33.3%)	2 (11.8%)	-
Настоящи пушачи	13 (20.6%)	6 (35.3%)	-
Пакетогодини	3.75 (0-10)	0 (0-15)	-
Начало	34 (19-49)	39 (13-48)	-
КАП /+/	48 (76.2%)	13 (76.5%)	-
ACQ5 резултат	1.00 (0.20-2.40)	1.20 (0.10-2.00)	-
ACQ7 резултат	1.00 (0.29-2.29)	1.00 (0.50-2.00)	-
АСТ резултат	21 (16-24)	22 (18-25)	-
Екзацербации за 1 година	1 (0-2)	1 (0-1.5)	-
Терапия стъпка 4/5	48 (76.2%)	10 (58.8%)	-
Ниска доза ОКС	8 (12.7%)	2 (11.8%)	-
Неконтролирана БА	34 (54%)	10 (58.8%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	29 (46%)	6 (35.3%)	-
CRP, mg/L	2.00 (0.70-4.80)	2.36 (1.64-4.09)	-
WBC, 10/9L	7.40 (5.80-9.60)	8.00 (6.50-8.90)	-
b-Eos, cells/microL	324 (204-511)	320 (210-468)	-
b-Neu, 10/9L	4.42 (3.50-6.02)	5.19 (3.99-5.71)	-
FeNO, ppb	30 (20-54)	28 (13-43)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.49 (-2.71; -0.36)	-1.78 (-3.26; -0.69)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.13 (-2.06; -0.01)	-0.95 (-2.72; -0.25)	-
промяна ФЕО1, ml	90 (0-210)	240 (45-410)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.41 (-2.26; 0.06)	-0.96 (-2.65; 0.08)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.91 (-1.82; 0.24)	-1.11 (-2.33; 0.45)	-
IL-6, pg/ml	1.40 (0.60-2.23)	1.58 (0.91-2.45)	-
Периостин, ng/ml	1.81 (1.17-2.11)	1.93 (1.34-1.99)	-
IL-5, pg/ml	2.10 (1.55-3.00)	3.20 (2.53-4.10)	0.002
IL-8, pg/ml	1.65 (0-4.70)	0.75 (0-4.75)	-
IL-17A, pg/ml	6.08 (0.51-26.9)	0.50 (0.45-0.78)	0.002
Серумен общ IgE, IU/ml	126 (39.3-318.2)	111 (58.6-246.5)	-
Общ IgE > 100 IU/ml	34 (54%)	10 (58.8%)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин

Табл.35 Сравнение на подгрупите с нисък и висок серумен IL-13

5.4.5 Серумни нива на интерлевкин 17А (IL-17A)

	Серумни нива на IL-17A		p
	≤ 0.62 pg/ml n=38, 47.5%	> 0.62 pg/ml n=42, 52.5%	
Възраст	47.5 (34-58.8)	41 (33-57.3)	-
Жени/Мъже	23/15 (60.5/39.5%)	29/13 (69/31%)	-
ИТМ	26 (23-29)	28 (24-31)	-
Затлъстяване	8 (21.1%)	15 (35.7%)	-
Настоящи пушачи	12 (31.6%)	7 (16.7%)	-
Пакетогодини	4.25 (0-15)	0 (0-10)	-
Начало	36.5 (19-49)	32.5 (17.8-45.3)	-
КАП /+/	26 (68.4%)	35 (83.3%)	-
ACQ5 резултат	1.00 (0.15-1.80)	1.10 (0.15-2.85)	-
ACQ7 резултат	1.14 (0.39-2.00)	0.93 (0.29-2.71)	-
АСТ резултат	21.5 (17.8-25)	21 (15.5-23)	-
Екзацербации за 1 година	1 (0-1)	1 (0.75-2)	-
Терапия стъпка 4/5	24 (63.2%)	34 (81%)	-
Ниска доза ОКС	3 (7.9%)	7 (16.7%)	-
Неконтролирана БА	20 (52.6%)	24 (57.1%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	15 (39.5%)	20 (47.6%)	-
CRP, mg/L	2.43 (1.15-4.83)	2.00 (0.69-4.55)	-
WBC, 10/9L	7.90 (5.90-9.78)	7.70 (5.78-9.33)	-
b-Eos, cells/microL	322 (218-468)	357 (186-519)	-
b-Neu, 10/9L	4.86 (3.64-6.46)	4.59 (3.41-5.63)	-
FeNO, ppb	22.5 (16-40.3)	34.5 (22.5-60.5)	0.021
Пре ФЕО1, Z score	-1.80 (-3.05; -0.50)	-1.38 (-2.66; -0.28)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.14 (-2.53; -0.34)	-1.13 (-2.05; -0.09)	-
промяна ФЕО1, ml	110 (0-290)	120 (35-260)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.21 (-2.53; 0.61)	-1.42 (-2.28; -0.40)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.94 (-2.06; 0.65)	-0.99 (-1.84; 0.12)	-
IL-13, pg/ml	0.48 (0-11.43)	1.10 (0.99-1.26)	-
Периостин, ng/ml	1.86 (1.18-2.08)	1.78 (1.04-2.11)	-
IL-6, pg/ml	1.73 (0.88-2.61)	1.35 (0.60-2.02)	-
IL-8, pg/ml	2.63 (0-6.25)	1.48 (0.31-3.53)	-
IL-5, pg/ml	2.65 (2.09-3.61)	2.03 (1.00-3.03)	0.005
Серумен общ IgE, IU/ml	98.9 (41-208.8)	148 (48.4-383.5)	-
Общ IgE > 100 IU/ml	19 (50%)	25 (59.5%)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин

Табл.36 Сравнение на подгрупите с нисък и висок серумен IL-17A

Средните (медиана) серумни нива на IL-17A при БА бяха 1.04 (0.48-24.45) pg/ml с максимална измерена стойност - 46.30 pg/ml и минимална – 0.38 pg/ml.

Серумните нива на IL-17A корелираха със:

- серумен периостин: r=0.397 (95%CI 0.106-0.625), p=0.009

Чрез прилагане на 95-я персентил от групата на ЗК за IL-17A (0.62 pg/ml), като гранична стойност, дефинирахме подгрупи пациенти с нисък IL-17A (≤ 0.62 pg/ml) (n=38, 47.5%) и висок IL-17A (> 0.62 pg/ml) (n=42, 52.5%). Пациентите с висок IL-17A имаха значително по-високи FeNO (34.5 (22.5-60.5) ppb) (U=558, Z=-2.313, p=0.021) и по-нисък IL-5 (2.03 (1.00-3.03) pg/ml) (U=504, Z=-2.839, p=0.005) (табл.36).

5.4.6 Серумни нива на периостин

Нивата на периостин в серума бяха измерени при 42 от пациентите с БА. Средните серумни нива на периостин при БА бяха 1.86 (1.18-2.08) ng/ml при максимална измерена стойност - 2.83 ng/ml и минимална – 0.63 ng/ml.

Установихме следните корелации между нивата на периостин и:

- IL-17A, pg/ml: r=0.397 (95%CI 0.106-0.625), p=0.009

Ние намерихме корелация между серумните нива на периостин и CRP (r = 0.657, p=0.008) при ТА (ATS/ERS критерии).

Интересно, при неконтролирана БА наблюдавахме корелации на серумен периостин с функционалните характеристики:

- пре ФЕО1: r=-0.437, p=0.042
- пост ФЕО1: r=-0.475, p=0.026

Използвахме 95-я персентил от групата на ЗК за периостин (1.30 pg/ml), като гранична стойност, за да дефинираме подгрупи пациенти с нисък периостин (≤ 1.30 pg/ml) (n=12, 28.6%) и висок периостин (> 1.30 pg/ml) (n=30, 71.4%). Пациентите с висок периостин показаха сигнификантно по-високи нива IL-17A (0.52 (0.45-0.57) pg/ml) (U=95, Z=-2.371, p=0.018) и асоциация с по-висока честота на пре ФЕО1<LLN (n=18; 60%) (χ^2=4.200, p=0.040) (табл.37).

	Серумни нива на периостин		p
	≤ 1.30 ng/ml n=12, 28.6%	> 1.30 ng/ml n=30, 71.4%	
Възраст	47 (35-55)	42.5 (33-59)	-
Жени/Мъже	7/5 (58.3/41.7%)	19/11 (63.3/36.7%)	-
ИТМ	26 (24-29)	24 (22-30)	-
Затлъстяване	2 (16.7%)	6 (20%)	-
Настоящи пушачи	4 (33.3%)	9 (30%)	-
Пакетогодини	4.75 (1.75-15)	2.75 (0-10)	-
Начало	38 (17.5-51.3)	33 (17.5-47.3)	-
КАП /+/	8 (66.7%)	22 (73.3%)	-
ACQ5 резултат	1.30 (0.40-2.15)	0.50 (0-1.80)	-
ACQ7 резултат	1.50 (0.75-2.07)	0.79 (0.28-2.00)	-
АСТ резултат	19 (16.5-25)	23.5 (18.5-25)	-
Екзацербации за 1 година	0.5 (0-1)	1 (0-2)	-
Терапия стъпка 4/5	7 (58.3%)	20 (66.7%)	-
Ниска доза ОКС	0	3 (10%)	-
Неконтролирана БА	7 (68.3%)	14 (46.7%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	4 (33.3%)	11 (36.7%)	-
CRP, mg/L	2.02 (1.25-4.37)	2.43 (0.66-4.79)	-
WBC, 10/9L	7.15 (5.82-11.32)	8.05 (5.90-9.78)	-
b-Eos, cells/microL	429 (251-556)	289 (196-404)	-
b-Neu, 10/9L	4.42 (3.35-7.67)	5.43 (3.89-6.46)	-
FeNO, ppb	25.5 (16.3-76.3)	23.5 (16-43)	-
Пре ФЕО1, Z score	-0.81 (-2.10; -0.40)	-2.06 (-3.14; -0.76)	-
Пре ФЕО1<LLN	3 (25%)	18 (60%)	0.040
Пост ФЕО1, Z score	-0.73 (-1.94; -0.10)	-1.33 (-2.53; -0.55)	-
промяна ФЕО1, ml	65 (2.50-178)	190 (7.50-375)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-0.55 (-2.37; 0.64)	-1.50 (-2.70; 0.24)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.23 (-2.25; 0.64)	-1.25 (-2.06; 0.39)	-
IL-13, pg/ml	0.20 (0-9.70)	1.63 (0-11.93)	-
IL-8, pg/ml	0.45 (0-5.70)	2.63 (0-6.25)	-
IL-6, pg/ml	1.68 (0.74-2.62)	1.73 (0.93-2.54)	-
IL-17A, pg/ml	0.43 (0.41-0.49)	0.52 (0.45-0.57)	0.018
IL-5, pg/ml	2.38 (1.86-3.38)	2.93 (2.18-3.95)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	94.4 (43-267)	114.7 (42-216)	-
Общ IgE > 100 IU/ml	6 (50%)	16 (53.3%)	-

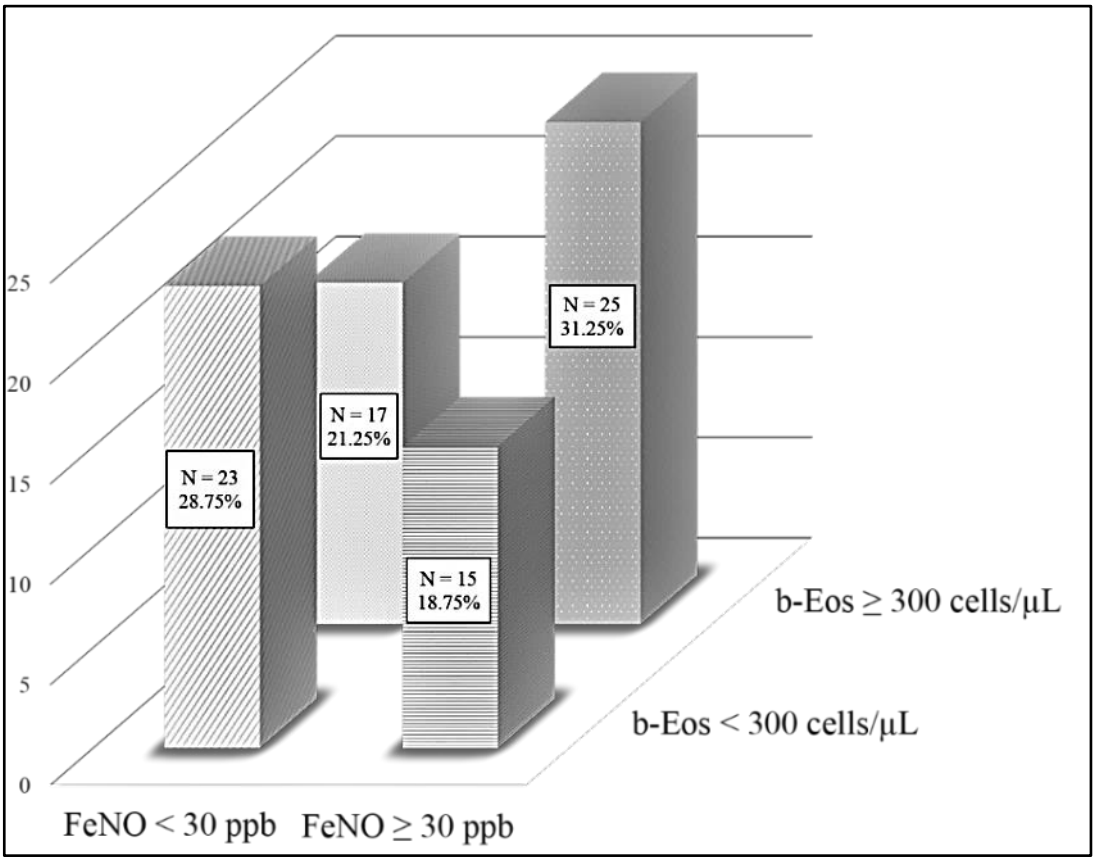
Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин

Табл.37 Сравнение на подгрупите с нисък и висок серумен периостин

5.5 Резултати към задача 5: Групиране на пациентите с БА според утвърдени биомаркери и анализ на техния възпалителен и имунологичен профил

Използвахме средните нива на FeNO и кръвните еозинофили (b-Eos), като гранична стойност (FeNO ≥ 30 ppb и b-Eos ≥ 300 cells/microL), за да разделим пациентите на 4 основни групи (базирана на биомаркери фенотипизация):

- Нисък FeNO/Ниски еозинофили: n=23, 28.8%
- Нисък FeNO/Високи еозинофили: n=17, 21.3%
- Висок FeNO/Ниски еозинофили: n=15,18.8%
- Висок FeNO/Високи еозинофили: n=25, 31.3%



Фиг.29 Разпределение на пациентите в четири групи според FeNO и еозинофилите в кръвта.

Установихме статистически значими различия между групите при сравнение по възраст, ИТМ, тютюнопушене, пакетогодини, начало на БА, контрол, екзацербации, тежест, терапия, кръвни неутрофили, CRP, бронхиална реверзибилност (табл.38). Нивата на общи IgE бяха без статистически значими различия между групите, докато честотата на атопичните пациенти (позитивни КАП) беше както следва: група 1 – 78.3%, група 2 – 76.2%, група 3 – 86.7%, група 4 – 68% (табл.38).

Серумните нива на IL-5 бяха сигнификантно по-високи в група 2 ($p < 0.05$ за всички сравнения). Нивата на IL-6 и IL-13 бяха статистически сигнификантно повишени в групи 2, 3 и 4 ($p < 0.05$ в сравнение със ЗК). IL-6 беше сигнификантно повишен в група 2 и 4 при сравнение с група 1. Не наблюдавахме статистически значими разлики в нивата на IL-8 между анализираните групи и ЗК, но се отчете тенденция за по-висок IL-8 в група 1 при сравнение със ЗК. Нямаше значителна разлика в нивата на IL-13 между предварително дефинираните групи БА. Установихме, че IL-17A е значително повишен във всичките 4 групи на БА, в сравнение със ЗК ($p < 0.05$), като най-високи нива на IL-17A се намериха в групи 3 и 4. Серумните нива на периостин бяха сигнификантно повишени във всички групи при сравнение със ЗК (табл. 39, 40, фиг.30).

При 21 (26.3%) от пациентите установихме повишение на FeNO или комбинирано повишение на FeNO и b-Eos на фона на висока доза ИКС или СКС и добро придържане.

	↓FeNO/↓b-Eos Група 1 N=23 (28.8%)	↓FeNO/↑b-Eos Група 2 N=17 (21.3%)	↑FeNO/↓b-Eos Група 3 N=15 (18.8%)	↑FeNO/↑b-Eos Група 4 N=25 (31.3%)	p
	T2 ниска БА при атопични пушачи	T2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване	T2 висока БА с атопия и чести екзацербации	T2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна БА	
Възраст, години	*37.9 ±13.9*	*51.5 ±12.6*	*49 ±16.3*	*45.8 ±12.6*	0.010[1]
Пол, жени/мъже	17/6 73.9/26.1%	9/8 52.9/47.1%	9/6 60/40%	17/8 68/32%	-
ИТМ, kg/m^2	24.3 (20.3-27.8)	29.6 (25.9-33.9)	25.7 (22.7-30.3)	26.7 (23.7-30.1)	0.033[2]
Затлъстяване	4 (17.4%)	8 (47.1%)	4 (26.7%)	7 (28%)	-
Тютюнопушене Не/Ех/Да	7/5/11 30.4/21.7/47.8%	8/5/4 47.1/29.4/23.5%	11/3/1 73.3/20/6.7%	12/10/3 48/40/12%	0.026
Пакетогодини	5 (0-10)	4 (0-10)	0 (0-2)	3.8 (0-15)	*
Начало, възраст	28 (19-38)	43 (19-51)	25 (7-57)	37 (28-49)	**
Начало, групи <20/20-40/>40	7/12/4 30.4/52.2/17.4%	5/3/9 29.4/17.6/52.9%	7/2/6 46.7/13.3/40%	3/12/10 12/48/40%	0.026
КАП отр/моно/поли	5/5/13 21.7/21.7/56.5%	4/3/10 23.5/17.6/58.8/	2/5/8 13.3/33.3/53.3%	8/6/11 32/24/44%	-
ACQ5	0.6 (0-1.6)	1 (0.2-2.0)	0.2 (0-1.2)	2.2 (1.0-3.0)	0.001[3]
ACQ7	0.71 (0.14-1.43)	1.42 (0.29-2.14)	0.29 (0.14-0.86)	2.14 (1.10-2.86)	<0.001[4]
ACT	22 (18-25)	22 (16-25)	23 (17-25)	18 (13-21)	0.006[5]
Неконтролирана БА	10 (43.5%)	7 (41.2%)	5 (33.3%)	22 (88%)	0.001
Екзацербации	1 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (1-2.5)	0.007[6]
Екзацербации > 1/год.	4 (17.4%)	1 (5.9%)	6 (40%)	11 (44%)	0.021
Тежка БА (ATS/ERS)	6 (26.1%)	9 (52.9%)	4 (26.7%)	16 (64%)	0.024
Терапия, стъпка 4/5	11 (47.8%)	13 (76.5%)	13 (86.7%)	21 (84%)	0.018
Висока доза ИКС	6 (26.1%)	9 (52.9%)	6 (40%)	19 (76%)	0.001
Ниска доза ОКС	0	1 (5.9%)	3 (20%)	6 (24%)	0.051
Придържане, лошо	8 (34.8%)	4 (23.5%)	4 (26.7%)	5 (20%)	-
Общ IgE, IU/ml	94.9 (13.4-220.5)	85.1 (38.9-247.1)	102.8(42.9-356)	174.7 (65-374.1)	-
Общ IgE > 100 IU/ml	11 (47.8%)	8 (47.1%)	8 (53.3%)	17 (68%)	-
FeNO, ppb	16 (10-23)	21 (16-24)	42 (30-54)	62 (40-86)	<0.001[7]
b-Eos, cells/microL	207 (118-260)	504 (389-626)	200 (94-250)	476 (413-767)	<0.001[8]
b-Neu, 10^{9}L	4.0 (3.5-5.6)	5.7 (4.7-6.6)	3.3 (2.6-5.5)	5.0 (4.1-6.2)	<0.006[9]
CRP, mg/L	1.13 (0.56-3.40)	3.57 (2.00-8.05)	3.86 (1.12-6.10)	1.78 (0.70-4.21)	0.023[10]
Пре ФЕО1, Z score	-1.12 (-2.39;0.20)	-2.15 (-3.33;-0.41)	-0.85 (-3.07;-0.16)	-1.81 (-2.78;-0.87)	-
ПреФЕО1/ФВК, Z score	-0.96 (-1.69;0.47)	-1.53 (-2.86;0.47)	-1.34 (-1.92;0.12)	-1.91 (-2.43;-0.54)	-
ПреФЕО1/ФВК < LLN	6 (26.1%)	8 (47.1%)	6 (40%)	13 (52%)	-
Пост ФЕО1, Z score	-0.89 (-1.91; 0.25)	-1.83 (-2.77; -0.37)	-0.64 (-2.05; 0.20)	-1.36 (-2.44; -0.37)	-
ПостФЕО1/ФВК, Z score	-0.54 (-1.43; 0.56)	-1.34 (-2.62; 0.46)	-0.82 (-1.68; 0.24)	-1.40 (-1.88; -0.045)	-
ПостФЕО1/ФВК < LLN	4 (17.4%)	7 (41.2%)	4 (26.7%)	10 (40%)	-
промяна ФЕО1, %	3 (0-8)	2 (0-12)	5 (0-17)	8 (4-17)	0.028[11]
Промяна ФЕО1, ml	60 (0-230)	50 (0-195)	100 (10-390)	180 (80-320)	0.049[11]

Резултатите са представени като n (%), средна ± стандартно отклонение (SD) (*Italic*), медиана и интерквартилен обхват (IQR); Стойността на p е получена чрез Kruskal-Wallis и ANOVA с post hoc анализ. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test.

[1] p<0.05 група 1 сравнена с групи 2, 3 и 4;

[2] p<0.05 група 1 сравнена с група 2;

[3] p<0.05 група 4 сравнена с групи 1, 2 и 3;

[4] p<0.05 група 4 сравнена с групи 1 и 3;

[5] p<0.05 група 4 сравнена с групи 1, 2 и 3;

[6] p<0.05 група 4 сравнена с групи 1, 2 и група 2 сравнена с група 3;

[7] p<0.05 групи 1 и 2 сравнени с групи 3 и 4;

[8] p<0.05 групи 1 и 3 сравнени с групи 2 и 4;

[9] p<0.05 група 2 сравнена с групи 1, 3 и група 3 сравнена с група 4;

[10] p<0.05 група 1 сравнена с групи 2, 3 и група 2 сравнена с група 4;

[11] p<0.05 група 4 сравнена с група 1 и 2;

[*] p<0.05 група 1 сравнена с група 3;

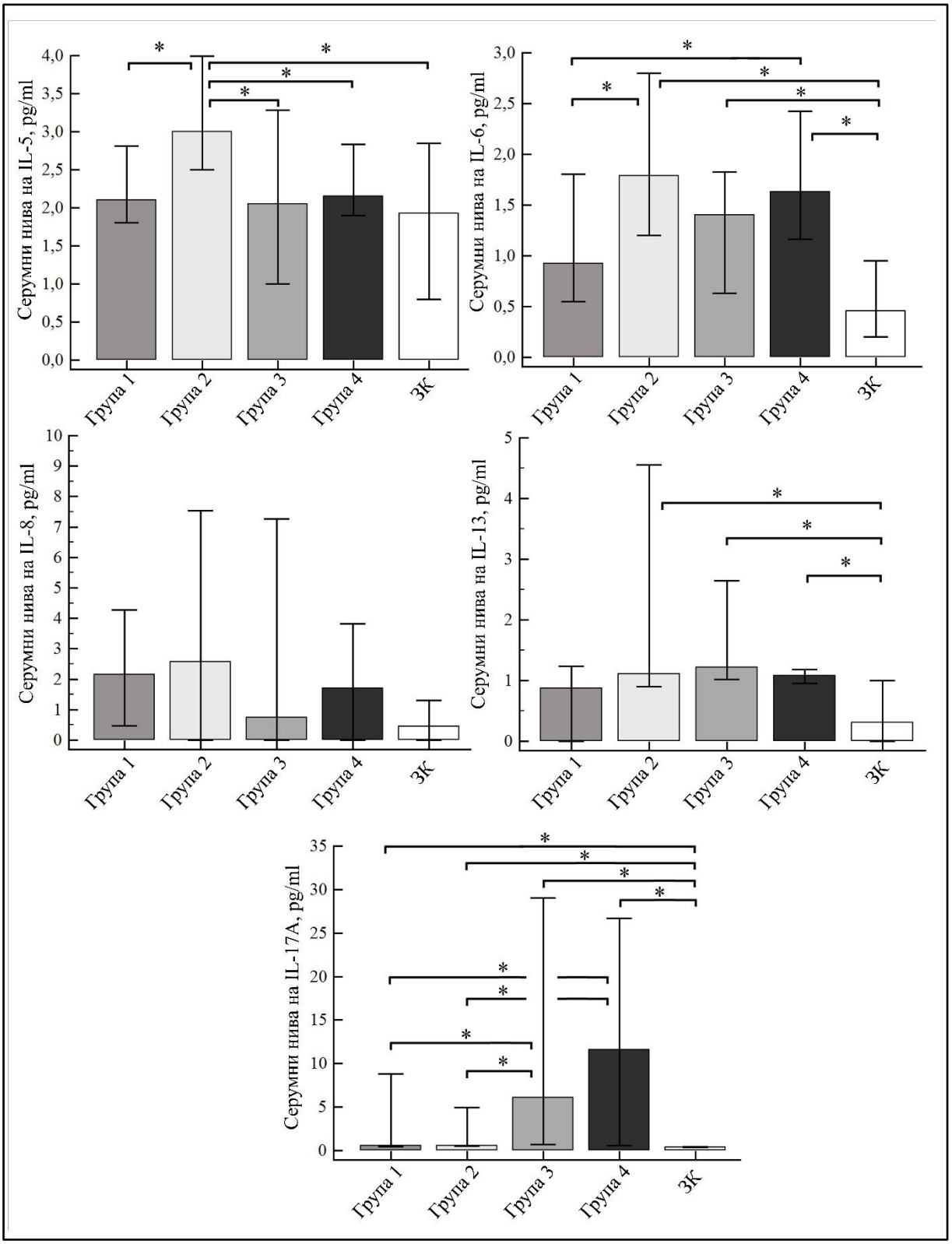
[**] p<0.05 група 1 сравнена с група 4;

Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин; ИКС – инхалаторен кортикостероид; ОКС – орален кортикостероид; LLN – долна граница на нормата;

Табл.38 Демографски, клинични, функционални и възпалителни характеристики на изследваните групи, формирани на базата на FeNO и b-Eos

	↓FeNO/↓b-Eos Група 1 N=23 (28.8%)	↓FeNO/↑b-Eos Група 2 N=17 (21.3%)	↑FeNO/↓b-Eos Група 3 N=15 (18.8%)	↑FeNO/↑b-Eos Група 4 N=25 (31.3%)	p
	Т2 ниска БА при атопични пушачи	Т2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване	Т2 висока БА с атопия и чести екзацербации	Т2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна БА	
IL-5, pg/ml	2.10 (1.75-2.95)	3.00 (2.36-4.10)	2.05 (1.00-3.31)	2.15 (1.48-3.15)	0.035
IL-6, pg/ml	0.93 (0.45-1.96)	1.79 (1.07-3.02)	1.40 (0.60-1.89)	1.63 (1.13-3.05)	-
IL-8*, pg/ml	2.15 (0.15-4.73)	2.58 (0-8.69)	0.75 (0-7.45)	1.70 (0-4.50)	-
IL-13, pg/ml	0.87 (0-1.43)	1.11 (0.63-8.00)	1.22 (1.00-2.75)	1.08 (0.90-1.33)	-
Периостин**, ng/ml	1.90 (1.18-2.10)	1.53 (1.03-2.15)	1.95 (1.74-2.29)	1.73 (1.03-1.94)	-
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.42-11.90)	0.55 (0.47-5.76)	6.08 (0.56-29.60)	11.60 (0.51-28.20)	0.024
Резултатите са представени като n (%), медиана и интерквартилен обхват. Използван е статистически метод за сравнение Kruskal-Wallis с post hoc анализ; *IL-8 е изследван при n=70: Група 1 – n=21; Група 2 – n=14; Група 3 – n= 13; Група 4 – n=22; ** периостин е изследван при n=42: Група 1 – n=15; Група 2 – n=12; Група 3 – n=6; Група 4 – n=9;					

Табл.39 Нива на изследваните серумни цитокини и периостин в отделните групи, формирани на базата на FeNO и b-Eos.



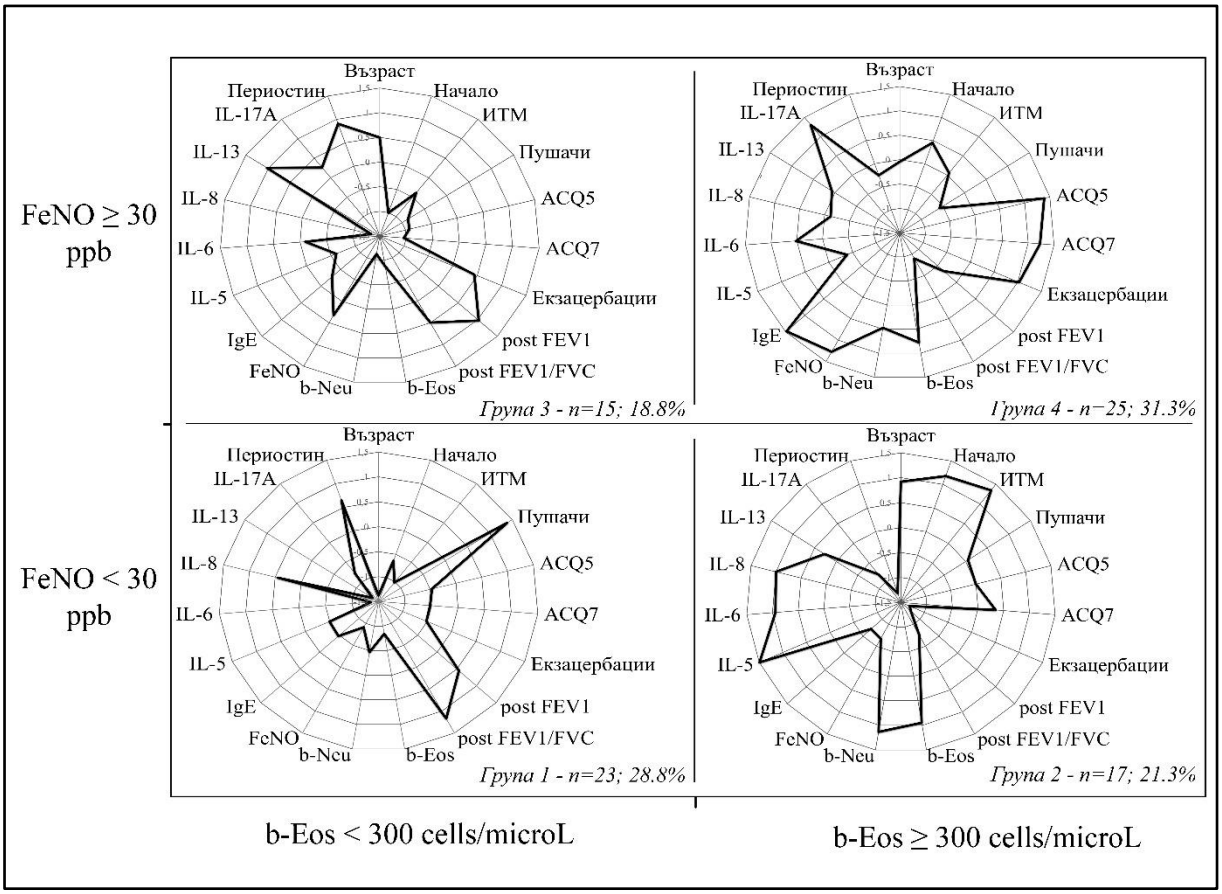
Фиг.30 Интергрупови сравнения на серумните нива на интерлевкините. * p <0.05; P-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis post hoc анализ и корекция на Bonferroni; IL-8 се изследва при n = 70 пациента с БА: Група 1 - n=21; Група 2 - n=14; Група 3 - n=13; Група 4 - n=22; Съкращения: ЗК – здрави контроли; Данните са представени чрез медиана и 95% доверителен интервал.

	1 vs. ЗК	2 vs. ЗК	3 vs. ЗК	4 vs. ЗК	1 vs. 2	1 vs. 3	1 vs. 4	2 vs. 3	2 vs. 4	3 vs. 4
IL-5	0.184	**0.005**	0.531	0.126	**0.007**	0.643	0.877	**0.039**	**0.018**	0.511
IL-6	0.065	**0.001**	**0.022**	**0.001**	**0.014**	0.540	**0.029**	0.162	0.672	0.230
IL-8*	0.066	0.108	0.358	0.193	0.799	0.655	0.571	0.555	0.437	0.944
IL-13	0.665	**0.023**	**0.004**	**0.040**	0.108	0.053	0.153	0.850	0.626	0.321
Периостин**	**<0.001**	**<0.001**	**0.011**	**0.020**	0.542	0.330	0.233	0.111	0.915	0.087
IL-17A	**<0.001**	**<0.001**	**<0.001**	**<0.001**	0.869	**0.013**	**0.027**	**0.040**	**0.016**	0.780

Стойността на p е получена чрез Mann-Whitney U test. ЗК – здрави контроли; *IL-8 е изследван при n=70: Група 1 – n=21; Група 2 – n=14; Група 3 – n= 13; Група 4 – n=22; ** периостин е изследван при n=42: Група 1 – n=15; Група 2 – n=12; Група 3 – n=6; Група 4 – n=9;

Табл.40 Статистически анализ при сравнение на групите една с друга и със ЗК според демографски, клинични, функционални и възпалителни характеристики.

Комбинираната оценка на демографските, биометричните, клиничните, функционалните, имунологичните и възпалителните характеристики на пациентите в различните групи е представена чрез радарни графики (Фиг.31). Графиките показват визуализация на отделен модел за всяка група. Асоциациите между променливите са по-ясно представени.

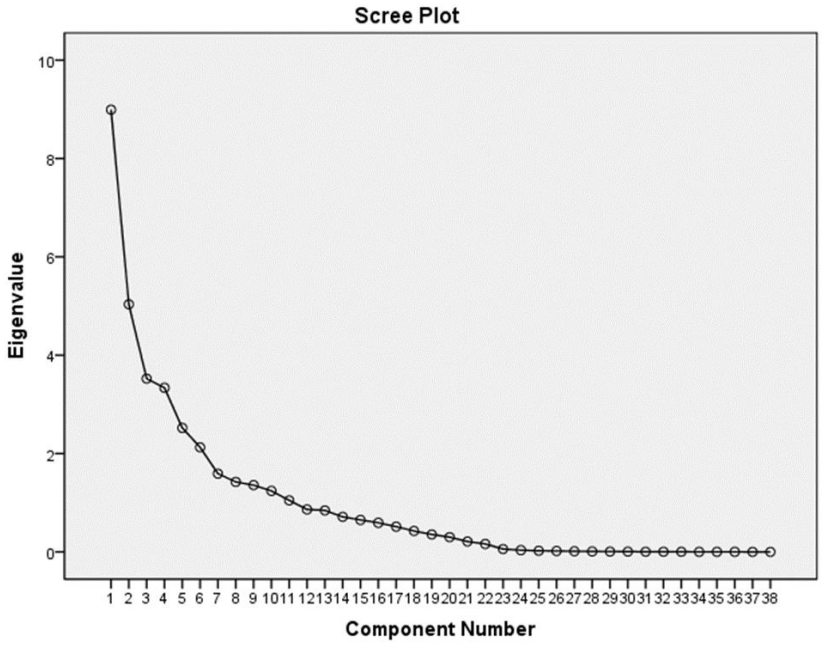


Фиг.31 Радарни графики за по-добра визуализация на характеристиките на групите във връзка със серумните нива на измерените интерлевкини. От центъра към периферията на графиката стойността на променливата се увеличава. Скалата от -1.5 до +1.5 представя z резултата за всяко измерване. Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; FVC – форсиран витален капацитет; FEV1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; IL – интерлевкин

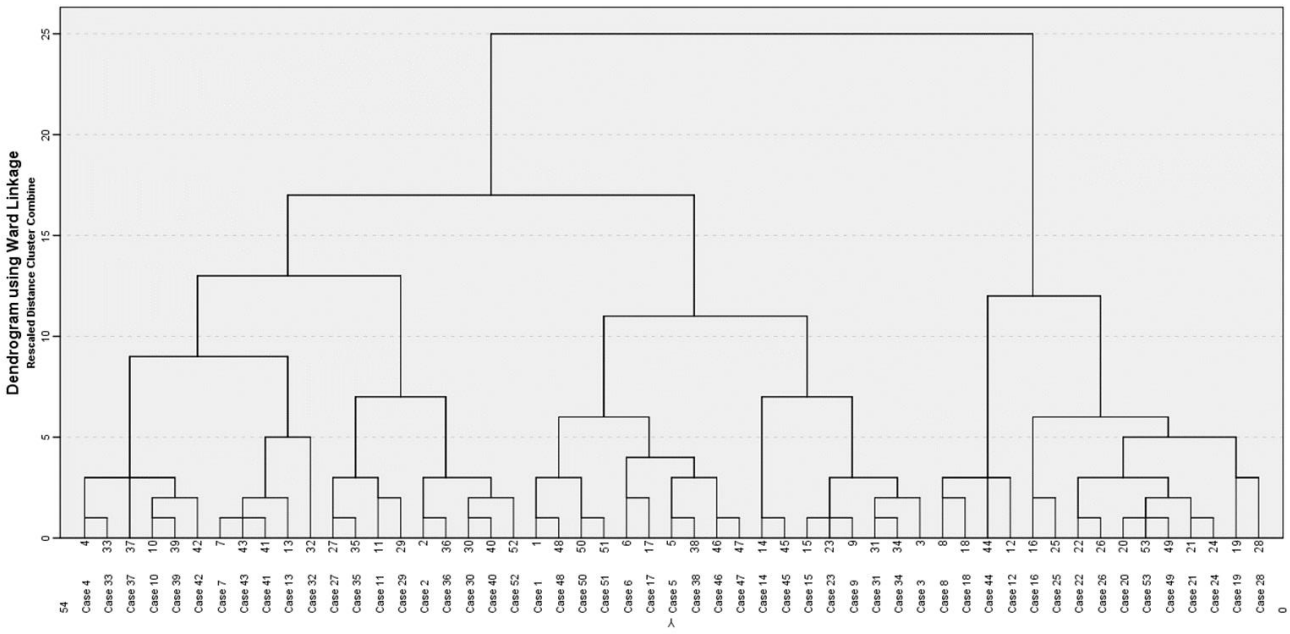
5.6 Резултати към задача 6: Провеждане на непреднамерен клъстерен анализ с дефиниране на клъстерни групи с цел идентифициране на отделни фенотипи

В анализа включихме само пациентите изпълняващи критериите за ТА (ATS/ERS) и тези с неконтролирана СТА. Така броят на пациентите взели участие в анализа е n=53.

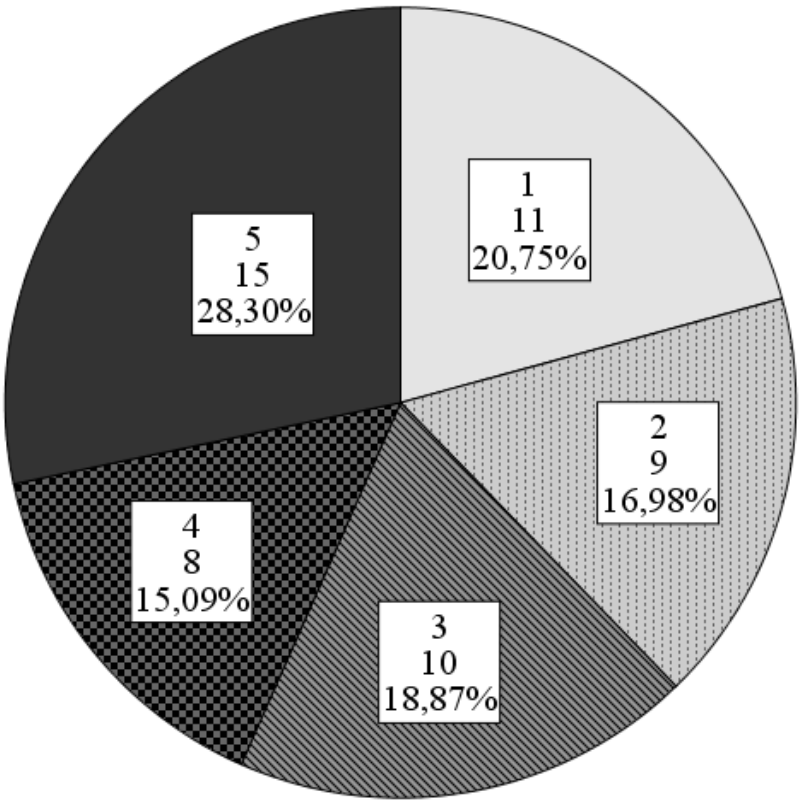
След проведен факторен анализ - принципен компонентен анализ (PCA) (фиг.32) на 38 вариабилни (серумните нива на IL-8 и периостин не бяха включени, тъй като не са изследвани при всички пациенти) селектирахме 11 от тях, които да бъдат използвани в клъстерен анализ: начало, ИТМ, ACQ6, пакетогодини, b-Eos, b-Neu, FeNO, пост ФВК, пост ФЕО1/ФВК, реверзибилност на ФЕО1, IL-17A. Проведохме йерархичен анализ (Hierarchical Cluster Analysis) чрез клъстерен метод на Вард (Ward`s method) с измерване на квадратичните евклидови разстояния (Squared Euclidean Distance). От дендрограма се ориентирахме за групирането на пациентите в 3 основни клъстера, 2 от тях с 2 подклъстера, общо 5 клъстера (Фиг.32, 33 и 34).



Фиг.32 Диаграма от факторния анализ (PCA).



Фиг.33 Дендрограма от проведения йерархичен анализ.



Фиг. 34 Процентно съотношение на пациентите в отделните клъстери.

Характеристиките на клъстерите са представени последователно в Табл. 41.

	Клъстер 1 N=11 (20.8%)	Клъстер 2 N=9 (17%)	Клъстер 3 N=10 (18.9%)	Клъстер 4 N=8 (15.1%)	Клъстер 5 N=15 (28.3%)	
	Тютюнопушене и късно начало		Атопична БА		Еозинофилна БА	
	Лоша белодробна функция с висока реверзибилност (ACO)	Запазена функция, повече симптоми при атопия и лошо придържане	Атопична БА с ранно начало и чести екзацербации	БА със затлъстяване при атопични мъже	Еозинофилна БА с късно начало	
Възраст, години	51.2 ±12.3	49.9 ±10	31.2 ±6.7	46.6 ±13.5	49.3 ±12.6	0.010
Пол, жени	7 (63.6%)	7 (77.8%)	7 (70%)	2 (25%)	11 (73.3%)	-
Начало, възраст	38.5 ±16.7	43.7 ±10.4	13.9 ±7.0	26.3 ±13.6	37.8 ±15.95	0.001
Продължителност	11 (6-18)	4 (1.5-10)	17 (11-23)	17 (7.25-32)	6 (3-18)	0.024
Начало, групи (<20; 20-40; >40)	2/3/6 (18.2/27.3/54.5%)	0/4/5 (0/44.4/55.6%)	8/2/0 (80/20/0%)	3/4/1 (37.5/50/12.5%)	2/7/6 (13.3/46.7/40%)	0.003
Пакетогодини	10 (4-22)	15 (0-21.5)	3.50 (0-6.25)	0 (0-0)	0 (0-12)	0.019
Тютюнопушене, не/бивши/да	2/6/3 (18.2/54.5/27.3%)	3/3/3 (33.3/33.3/33.3%)	4/3/3 (40/30/30%)	7/0/1 (87.5/0/12.5%)	9/5/1 (60/33.3/6.7%)	-
Пакетогодини >10 г	7 (63.6%)	6 (66.7%)	2 (20%)	1 (12.5%)	4 (26.7%)	0.031
AERD	0	0	0	3 (37.5%)	10 (66.7%)	0.015
ИТМ	23 (22-28)	27 (25-29)	23 (19-32)	32 (28-46)	28 (24-34)	-
Затлъстяване	1 (9.1%)	2 (22.2%)	3 (30%)	5 (62.5)	6 (40%)	-
ГЕРБ	3 (27.3%)	4 (44.4%)	4 (40%)	1 (12.5%)	5 (33.3%)	-
Ринит	6 (54.5%)	7 (77.8%)	9 (90%)	5 (62.5%)	11 (73.3%)	-
КАП отр/моно/поли	5/2/4 (45.5/18.2/36.4%)	2/2/5 (22.2/22.2/55.6%)	0/3/7 (0/30/70)	0/2/6 (0/25/75%)	7/1/7 (46.7/6.7/46.7%)	-
Общ IgE	61 (25-178)	114 (45-237)	214 (61-299)	225 (50-630)	126 (57-194)	-
Общ IgE > 100IU/ml	5 (45.5%)	6 (66.7%)	6 (60%)	5 (62.5%)	9 (60%)	-
Лошо придържане	3 (27.3%)	4 (44.4%)	3 (30%)	0	2 (13.3%)	-
ACQ5	1.40 (0.40-1.80)	3.20 (2.00-3.50)	0.50 (0.15-1.65)	1.30 (0.35-1.95)	2.60 (1.60-3.00)	<0.001
ACQ6	1.50 (0.33-1.67)	2.83 (1.75-3.17)	0.56 (0.13-1.46)	1.17 (0.29-1.79)	2.50 (1.67-2.83)	<0.001
ACQ7	1.85 (0.86-2.14)	2.71 (1.64-3.07)	0.64 (0.39-1.39)	1.64 (0.79-1.97)	2.71 (2.14-3.00)	0.002
ACT	19 (17-23)	14 (10-19)	20 (18-25)	19 (16-24)	16 (11-21)	0.011
Неконтролирана БА	8 (72.7%)	9 (100%)	9 (90%)	5 (62.5%)	13 (86.7%)	-
Контрол пълен/частичен/лош	3/6/2 (27.3/54.5/18.2%)	0/1/8 (0/11.1/88.9%)	1/7/2 (10/70/20%)	3/3/2 (37.5/37.5/25%)	2/3/10 (13.3/20/66.7%)	0.009
Екзацербации, брой	1 (0-3)	1 (1-3.5)	1.5 (0.75-2.25)	0.5 (0-1)	2 (1-5)	0.046
Екзацербации > 1/г.	3 (27.3%)	2 (22.2%)	5 (50%)	0	9 (66%)	0.037
Тежка БА (ATS/ERS)	6 (54.5%)	5 (55.6%)	4 (40%)	7 (87.5%)	13 (86.7%)	-
Терапия, стъпка 4/5	8 (72.7%)	7 (77.8%)	6 (60%)	7 (87.5%)	15 (100%)	-
Висока доза ИКС	7 (63.6%)	5 (55.6%)	5 (50%)	7 (87.5%)	14 (93.3%)	-
ОКС	1 (9.1%)	2 (22.2%)	1 (10%)	0	6 (40%)	-
ПреФЕО1	-3.20 ±0.74	-0.52 ±0.76	-1.09 ±1.43	-2.26 ±0.87	-2.69 ±1.12	<0.001
ПостФЕО1	-2.47 ±0.87	-0.14 ±0.55	-0.76 ±1.44	-2.18 ±0.80	-2.26 ±1.09	<0.001
ПреФВК	-2.04 ±1.13	-0.47 ±1.02	-0.86 ±1.39	-1.38 ±0.70	-1.74 ±1.04	0.027
ПостФВК	-1.17 ±1.19	-0.21 ±0.77	-0.85 ±1.42	-1.25 ±0.61	-1.39 ±0.96	-
ПреФЕО1/ФВК	-2.54 ±0.77	0.01 ±1.18	-0.43 ±1.13	-1.64 ±1.66	-2.01 ±1.16	<0.001
ПостФЕО1/ФВК	-2.41 ±0.74	0.14 ±0.84	-0.17 ±1.10	-1.69 ±1.55	-1.71 ±1.13	<0.001
постФЕО1/ФВК <LLN	9 (91.8%)	1 (11.1%)	1 (10%)	4 (50%)	8 (53.3%)	0.003
Промяна ФЕО1,%	16 (12-21)	5 (0-9)	4 (0.75-6.25)	1 (0-2.75)	10 (4-20)	<0.001
Промяна ФЕО1, мл.	250 (190-450)	90 (0-280)	130 (38-287)	25 (0-60)	180 (80-290)	0.006
FeNO, ppb	23 (15-47)	30 (9.5-40)	25 (12-43)	24 (17-33)	68 (39-104)	0.002
FeNO ≥ 30 ppb	4 (36.4%)	5 (55.6%)	4 (40%)	2 (25%)	13 (86.7%)	0.024
b-Eos	336 (220-410)	396 (324-512)	206 (80-298)	456 (262)	742 (504-861)	<0.001
b-Eos ≥ 300	7 (63.6%)	7 (77.8%)	2 (20%)	5 (62.5%)	14 (93.3%)	0.005
b-Eos, %	4 (3-5)	4 (3.5-7)	3.5 (1.75-4.25)	4.5 (3.25-5.75)	7 (5.60-8.00)	<0.001
b-Neu	5.38 ±1.35	5.77 ±2.46	3.82 ±1.04	6.33 ±2.01	5.19 ±1.91	0.012
CRP	2.36 (0.64-4.61)	1.50 (1.23-3.58)	1.13 (0.58-3.88)	4.14 (2.25-7.33)	2.81 (0.90-6.50)	-

Резултатите са представени в брой (%), средна и стандартно отклонение (SD) медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis с post hoc и корекция на Dunn и ANOVA с корекция на Brown-Forsythe и post hoc анализ Dunnett`s T3. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; БА – бронхиална астма; ACO – припокриване на астма и хронична обструктивна белодробна болест; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; Функционалните показатели са представени чрез Z score.

Табл. 41 Клинико-инфламаторни характеристики на клъстерите.

	Клъстер 1 N=11 (20.8%)	Клъстер 2 N=9 (17%)	Клъстер 3 N=10 (18.9%)	Клъстер 4 N=8 (15.1%)	Клъстер 5 N=15 (28.3%)	
	Тютюнопушене и късно начало		Атопична БА		Еозинофилна БА	
IL-5, pg/ml	2.35 (2.07-3.15)		2.48 (1.00-3.66)		2.50 (1.10-6.90)	-
IL-5>4.6 pg/ml	1 (5%)		0		5 (33.3%)	0.006
IL-6, pg/ml	1.93 (1.26-2.55)		0.98 (0.49-1.54)		1.40 (1.15-3.80)	0.009[1]
IL-6>3.7 pg/ml	4 (20%)		0		4 (26.7%)	-
IL-8, pg/ml	4.65 (0-10.50)		1.83 (0-3.95)		2.00 (0-4.45)	-
IL-8>8.3 pg/ml*	4 (26.7%)		2 (12.5%)		3 (20%)	-
IL-13, pg/ml	1.12 (0.01-12.78)		1.05 (0.26-1.66)		1.04 (1.15-1.41)	-
IL-13>3.3 pg/ml	7 (35%)		3 (16.7%)		2 (13.3%)	-
IL-17A, pg/ml	0.54 (0.43-5.26)		2.76 (0.44-25.13)		26.90 (14.50-35.30)	<0.001[2]
IL-17A>0.62 pg/ml	6 (30%)		9 (50%)		13 (86.7%)	0.004
	Лоша белодробна функция с висока реверзибилност (ACO)	Запазена функция, повече симптоми при атопия и лошо придържане	Атопична БА с ранно начало и чести екзацербации	БА със затлъстяване при атопични мъже	Еозинофилна БА с късно начало	
IL-5, pg/ml	2.65 (2.20-3.20)	2.15 (1.98-2.70)	1.98 (1.00-3.51)	3.18 (1.76-4.15)	2.50 (1.10-6.90)	-
IL-5>4.6 pg/ml	0	1 (11.1%)	0	0	5 (33.3%)	0.027
IL-6, pg/ml	1.79 (1.10-2.31)	2.03 (1.35-4.96)	0.93 (0.56-1.54)	0.98 (0.47-2.21)	1.40 (1.15-3.80)	0.041
IL-6>3.7 pg/ml	1 (9.1%)	3 (33.3%)	0	0	4 (26.7%)	-
IL-8, pg/ml	3.35 (0-8.60)	5.38 (0.38-31.28)	1.15 (0-3.31)	2.78 (0.23-9.40)	2.00 (0-4.45)	-
IL-8>8.3 pg/ml*	2 (22.2%)	2 (33.3%)	1 (10%)	1 (16.7%)	3 (20%)	-
IL-13, pg/ml	1.16 (0-13.20)	1.08 (0.53-12.50)	1.02 (0-1.66)	1.12 (0.49-3.76)	1.15 (1.04-1.41)	-
IL-13>3.3 pg/ml	4 (36.4%)	3 (33.3%)	1 (10%)	2 (25%)	2 (13.3%)	-
IL-17A, pg/ml	0.50 (0.42-0.58)	0.59 (0.44-5.93)	20.15 (0.44-29.45)	0.55 (0.45-5.79)	26.9 (14.5-35.3)	<0.001
IL-17A>0.62 pg/ml	2 (18.2%)	4 (44.4%)	6 (60%)	3 (37.5%)	13 (86.7%)	0.009

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis с post hoc анализ и корекция на Dunn. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; БА – бронхиална астма; ACO – припокриване на астма и хронична обструктивна белодробна болест; *IL-8 беше измерен при C1-n=9; C2-n=6; C3- n=10; C4-n=6; C5-n=15;

[1] p<0.05 при сравнение на атопична БА с еозинофилна БА и атопична БА с БА при тютюнопушене

[2] p<0.05 при сравнение на еозинофилна БА с атопична БА и еозинофилна БА с БА при тютюнопушене

Табл. 42 Имунологични характеристики на клъстерите.

	C1 vs. C2	C1 vs. C3	C1 vs. C4	C1 vs. C5	C2 vs. C3	C2 vs. C4	C2 vs. C5	C3 vs. C4	C3 vs. C5	C4 vs. C5
Възраст`		*			*				*	
Начало`		*			*				*	
Продължителност	*				*	*				
Пакетогодини		*	*	*		*				
ИТМ			*			*		*		
ACQ6	*			*	*	*			*	*
АСТ	*			*	*	*			*	
Екзацербации						*		*		*
ПреФЕО1`	*	*				*	*		*	
ПреФЕО1/ФВК`	*	*					*		*	
ПостФЕО1`	*	*				*	*		*	
ПостФЕО1/ФВК`	*	*					*		*	
Промяна на ФЕО1	*	*	*						*	*
Общ IgE										
FeNO				*			*		*	*
b-Eos				*	*		*	*	*	*
b-Neu`		*						*		
CRP						*		*		
IL-5										
IL-6		*			*	*				
IL-8										
IL-13										
IL-17A		*		*			*			*

*p<0.05; стойността на p е получена чрез Kruskal-Wallis с post hoc и корекция на Dunn или при ` с ANOVA с корекция на Brown-Forsythe и post hoc анализ Dunnett`s T3; С-клъстер

Табл. 43 Статистически анализ на клиничните, възпалителни и имунологични характеристики между клъстерите.

Сравнение на дефинираните клъстери със ЗК:

	Клъстер на тютюнопушачи vs. ЗК	Клъстер на атопична БА vs. ЗК	Клъстер на еозинофилна БА vs. ЗК
IL-5	-	-	0.029
IL-6	<0.006	-	0.002
IL-8*	0.022	-	-
IL-13	0.043	-	0.008
IL-17A	0.001	<0.001	<0.001

Стойността на p е получена чрез Mann-Whitney U test. ЗК – здрави контроли;

Табл.44 Сравнение на серумните ILs при клъстерите на тютюнопушачи, атопична и еозинофилна БА със ЗК

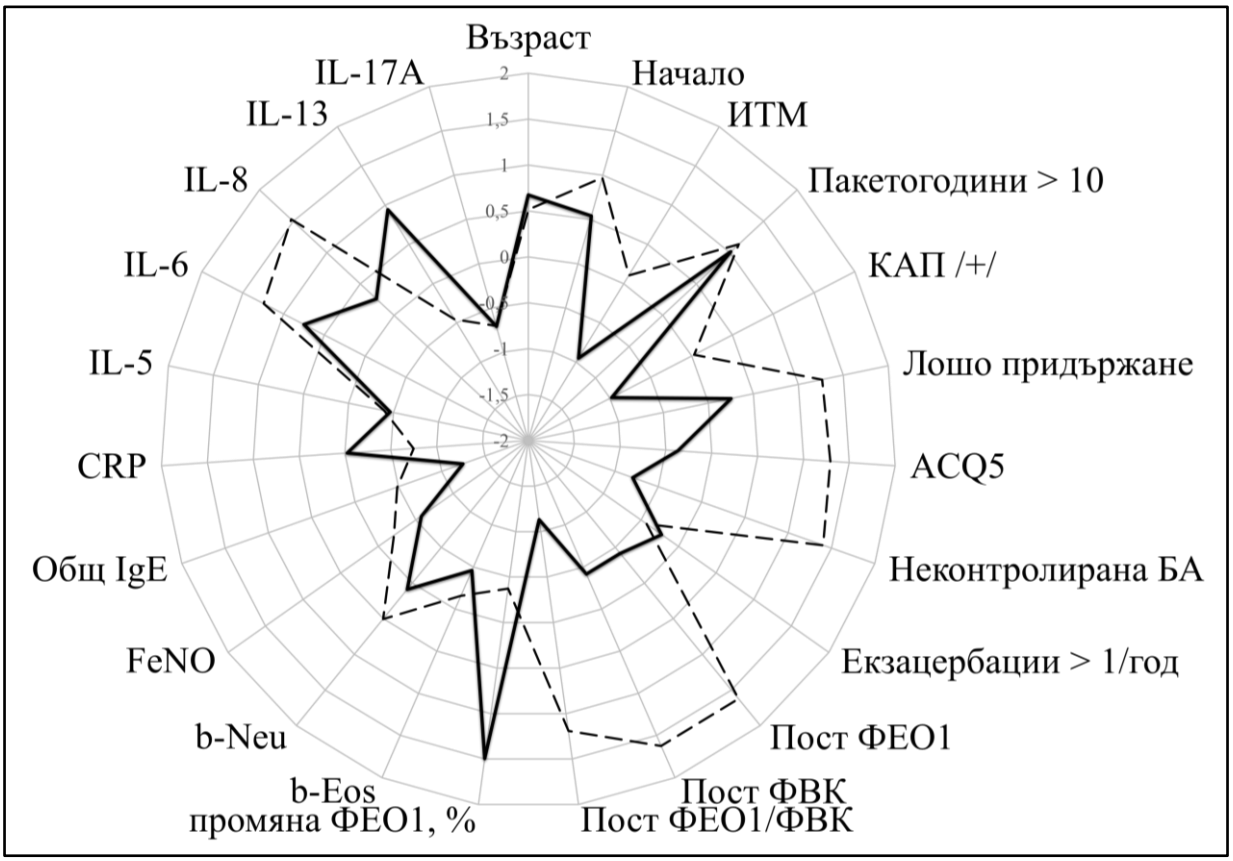
	C1 vs. ЗК	C2 vs. ЗК	C3 vs. ЗК	C4 vs. ЗК	C5 vs. ЗК
IL-5	-	-	-	-	0.029
IL-6	0.002	0.001	-	-	0.002
IL-8*	-	0.049	-	-	-
IL-13	-	-	-	-	0.008
IL-17A	0.017	0.003	0.001	0.009	<0.001

Стойността на p е получена чрез Mann-Whitney U test. ЗК – здрави контроли; *IL-8 беше измерен при C1-n=9; C2-n=6; C3- n=10; C4-n=6; C5-n=4; C6-n=11;

Табл. 45 Сравнение на серумните нива на ILs при основните клъстери със ЗК

При идентифицираната група на БА при тютюнопушачи с късно начало установихме значително повишение на IL-6, IL-8, IL-13 и IL-17A в серума при сравнение със ЗК.

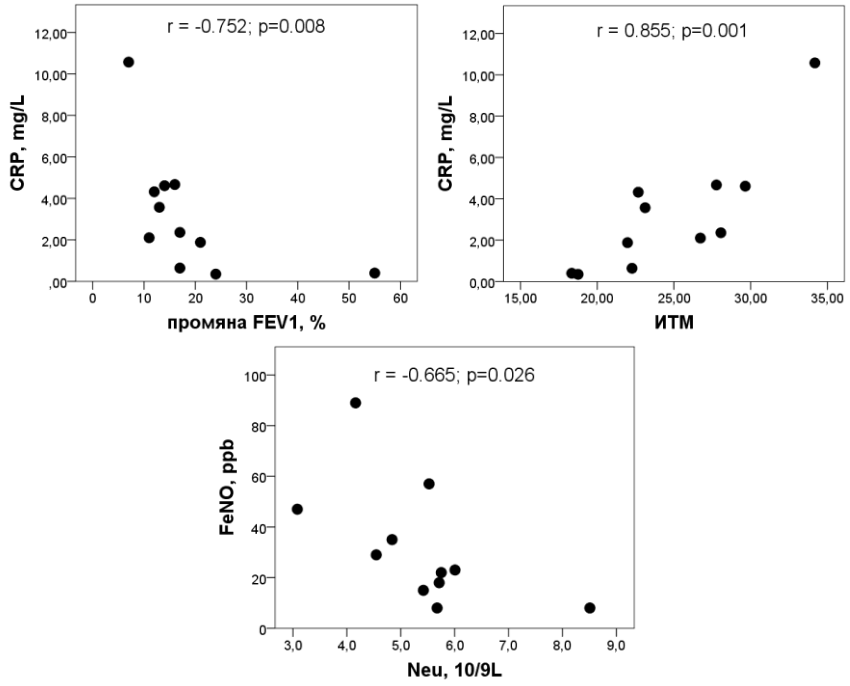
При сравнение с групата на атопична БА нивата на IL-6 бяха значимо по-високи при клъстера на тютюнопушачите. Нивата на IL-17A от друга страна бяха значимо по-високи при еозинофилния клъстер. Интересен е факта, че наблюдавахме еднаква честота на пациенти с висок IL-6 в клъстера на пушачите и еозинофилния клъстер. Честотата на пациентите с високи IL-13 от друга страна беше по-висока в групата на пушачите.



Фиг.35 Радарна графика на С1 (непрекъсната линия) и С2 (линия тип дълги тирета). От центъра към периферията на графиката стойността на променливата се увеличава. Скалата от -1.5 до +1.5 представя z резултата за всяко измерване. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; IL – интерлевкин; CRP – С реактивен протеин; промяна ФЕО1 – процентно повишение след БДТ

Клъстер 1 (С1): БА при пушачи с лоша белодробна функция и висока вариабилност, дълга продължителност

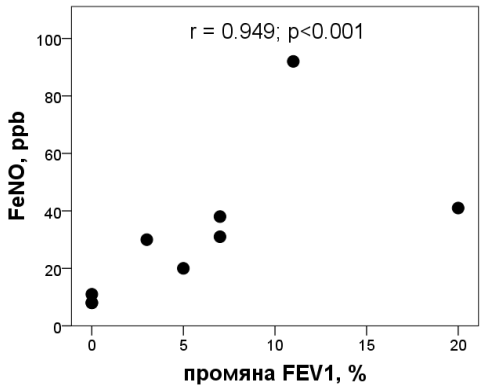
Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 51.2 год. със средна възраст на изява на БА 38.5 год. Доминираше женският пол, късното начало и голяма продължителност на БА - 11 (6-18) год. При 81.8% установихме експозиция на цигарен дим, а при 63.6% тази експозиция е продължила над 10 год. ИТМ беше нормален и само при 1 наблюдавахме затлъстяване. Честотата на ГЕРБ беше 27.3%, а на съпътстващ ринит 54.5%. КАП бяха позитивни при 54.5%, при средно ниво на общи IgE - 61 (25-178) IU/ml. Лошо придържане към терапията установихме при 27.3%. Контролът на БА беше лош, като 72.7% от пациентите бяха с недобре контролирана БА. 27.3% от пациентите бяха с чести екзацербации. Честотата на ТА в групата беше 54.5%. Белодробната функция беше намалена, като при 91.8% се установи персистираща бронхиална обструкция, въпреки високата реверзибилност на ФЕО1. Нивото на FeNO беше 23 (15-47) ppb. Средните нива на кръвните еозинофили бяха 336 (220-410) cells/microL. При 63.6% установихме кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL. Кръвните неутрофили бяха сигнификантно по-високи в сравнение с С3 и без значима разлика спрямо другите групи. CRP не показа статистически значими различия спрямо останалите групи. Пациентите в този клъстер бяха със значимо повишение на IL-6 и IL-17A при сравнение с ЗК. При 36.4% имаше данни за високо серумно ниво на IL-13.



Фиг. 36 Корелационни зависимости в С1

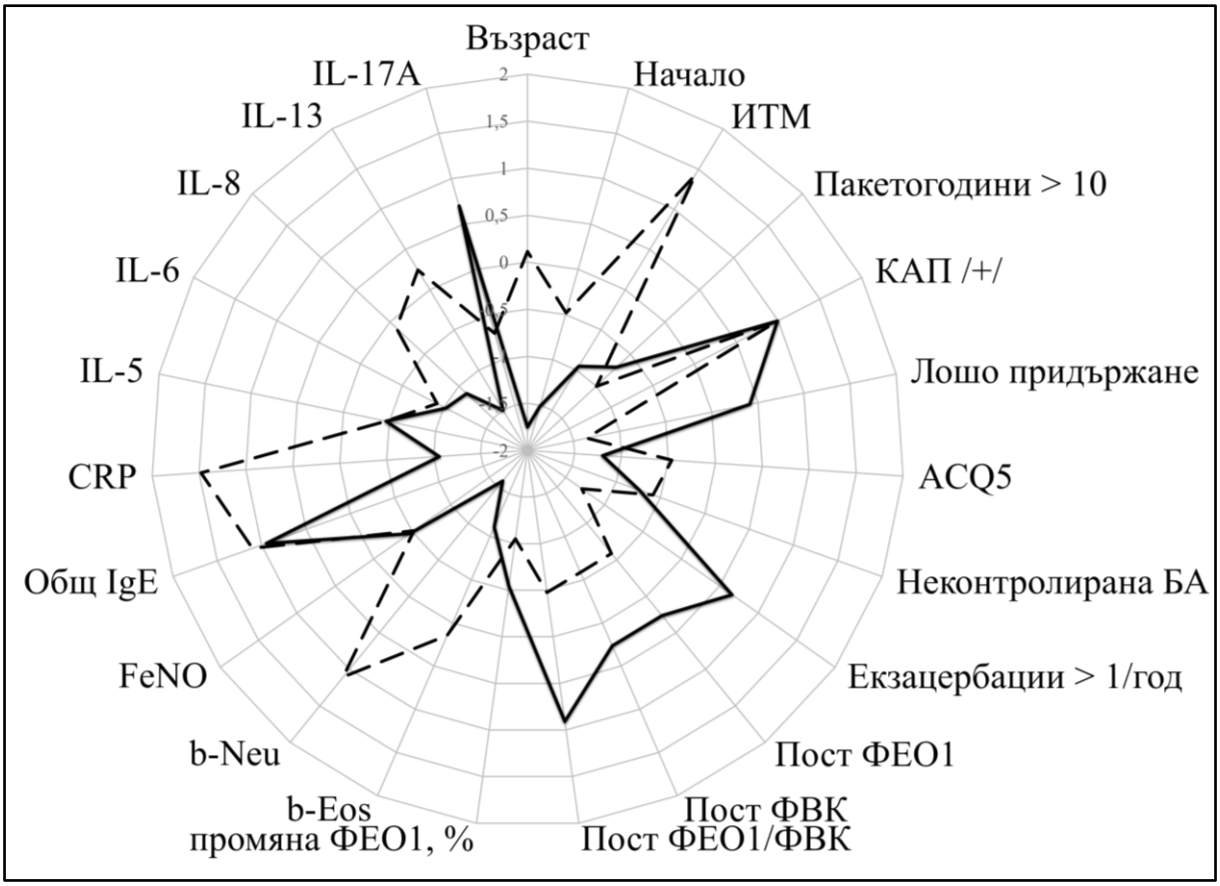
Клъстер 2 (С2): БА при тютюнопушачи със запазена белодробна функция, повече симптоми при атопия и лошо придържане

Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 49.9 год. със средна възраст на изява на БА 43.7 год. Доминираше женският пол и всички в групата бяха с късното начало на БА с кратка продължителност - 4 (1.5-10) год. При 66.7% установихме експозиция на цигарен дим, която е продължила над 10 год. ИТМ беше нормален и само 2 бяха със затлъстяване. Честотата на ГЕРБ (44.4%) и съпътстващ ринит (77.8%) беше по-висока от тази в С1. КАП бяха позитивни при по-висок процент (77.8%) пациенти в сравнение с С1 (54.5%), при средно ниво на общ IgE - 114 (45-237) IU/ml. Лошо придържане към терапията установихме при 44.4%. Контролът на БА беше по-лош от С1 и 100% от пациентите бяха с недобре контролирана БА. 22.2% от пациентите бяха с чести екзацербации. Честотата на ТА в групата беше 55.6%. Белодробната функция беше запазена, като само при 1 от пациентите установихме персистираща бронхиална обструкция. Средното ниво на FeNO беше 30 (9.5-40) ppb, а на кръвните еозинофили - 396 (324-512) cells/microL. При 77.8% установихме кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL. Средните нива на кръвните неутрофили и CRP бяха нормални. Пациентите в този клъстер бяха със сигнификантно повишение на IL-6, IL-8 и IL-17A при сравнение с ЗК.



Фиг. 37 Корелационни зависимости във С2

При идентифицираната група на атопична БА установихме единствено значително повишение на IL-17A в серума при сравнение със ЗК.



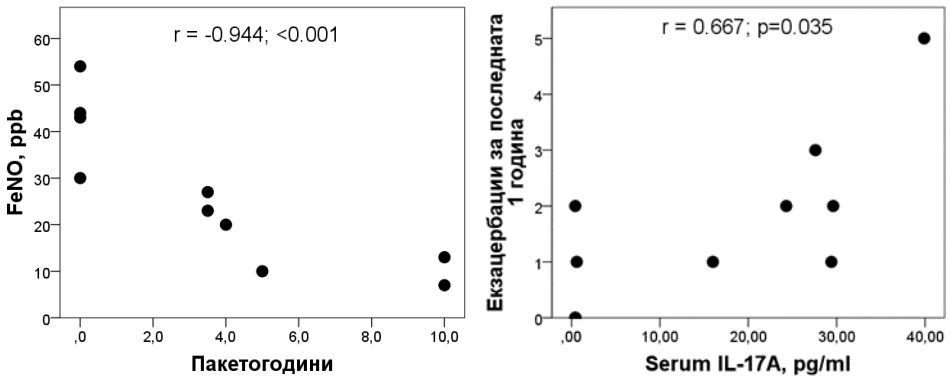
Фиг.38 Радарна графика на С3 (непрекъсната линия) и С4 (линия тип дълги тирета). От центъра към периферията на графиката стойността на променливата се увеличава. Скалата от -1.5 до +1.5 представя z резултата за всяко измерване. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; IL – интерлевкин; CRP – С реактивен протеин; промяна ФЕО1 – процентно повишение след БДТ

Тази група беше съставена от 2 отделни клъстера със следните характеристики:

Клъстер 3 (С3): Атопична БА с ранно начало и чести екзацербации

Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 31.2 год. и средна възраст на изява на БА 13.9 год. Доминираше женският пол, ранното начало и голяма продължителност на БА - 17 (11-23) год. При 60% установихме експозиция на цигарен дим, но с нисък брой

пакетогодини и само при 20% е продължила над 10 год. ИТМ беше нормален и само при 3 от пациентите в групата имаше данни за затлъстяване. Честотата на ГЕРБ беше 40%, а на съпътстващ ринит 90%. КАП бяха позитивни при всички пациенти в групата. Средното ниво на общи IgE беше 214 (61-299) IU/ml. Лошо придържане към терапията установихме при 30%. Средният резултат от въпросниците за оценка на контрола и симптомите беше добър. Малък беше дялът на пациентите с лош контрол на БА (20%), а доминираха тези с частичен/непълен (70%) контрол на БА. 50% от пациентите бяха с чести екзацербации. Честотата на ТА в групата беше 40%. Отчитаме факта, че по-висок процент (40%) от пациентите бяха на терапевтична стъпка 3 в сравнение с останалите клъстери. Белодробната функция беше запазена, като при 1 пациент се установи персистираща бронхиална обструкция. Средното нивото на FeNO беше 25 (12-43) ppb. Средното ниво на кръвните еозинофили беше 206 (80-298) cells/microL и само при 20% установихме кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL. Кръвните неутрофили и CRP бяха ниски. Пациентите в този клъстер бяха със статистически значимо повишение на IL-17A при сравнение с ЗК. Честотата на пациентите с повишен IL-17A в групата беше 60%.

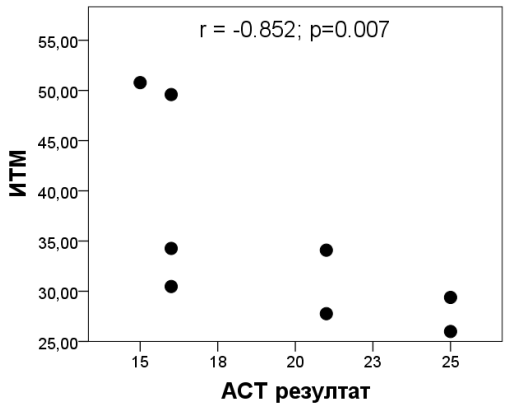


Фиг. 39 Корелационни зависимости в С3

Клъстер 4 (С4): БА със затлъстяване при атопични мъже

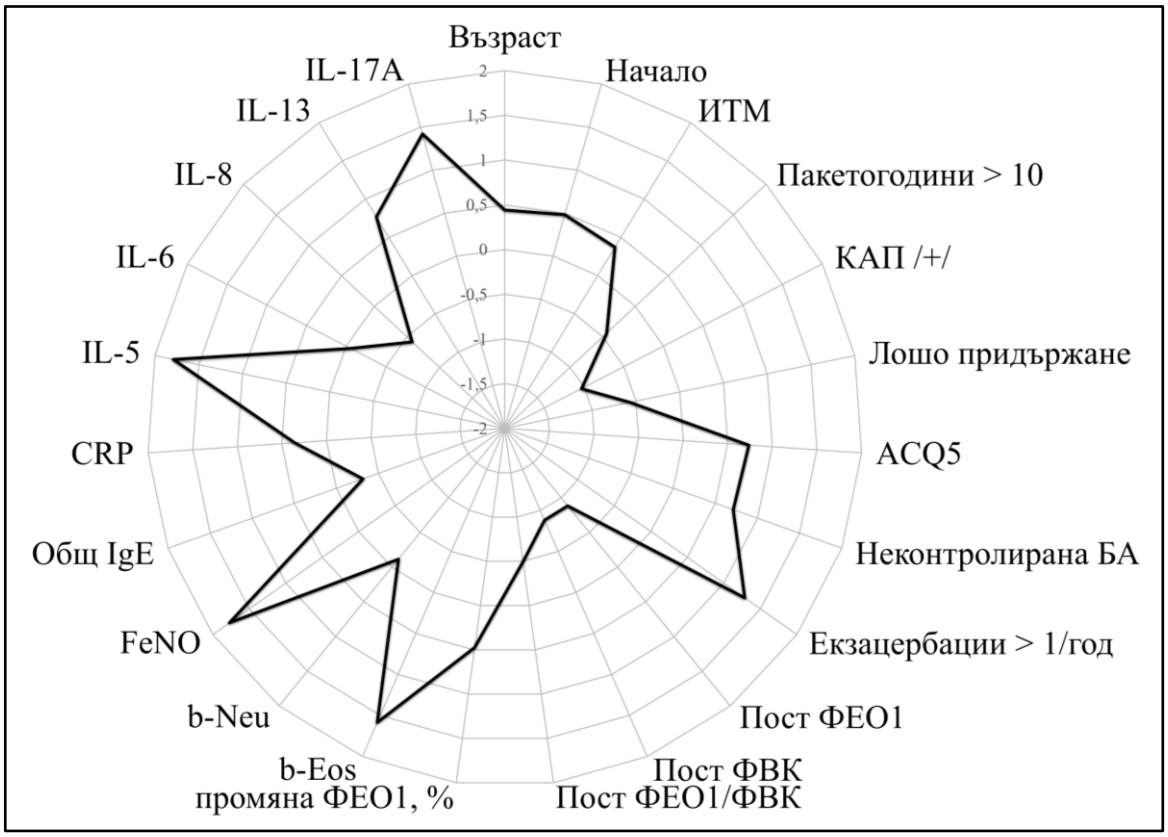
Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 46.6 год. със средна възраст на изява на БА 26.3 год. Доминираше мъжкият пол и по-късно начало на БА. Средната продължителност на заболяването беше 17 (7.25-32) год. При 1 пациент установихме експозиция на цигарен дим продължила над 10 год. ИТМ беше висок и 62.5% бяха със затлъстяване. Честотата на ГЕРБ беше ниска, а на съпътстващ ринит 62.5%. КАП бяха позитивни при всички, при средни нива на общи IgE 225 (50-630) IU/ml. Не установихме лошо придържане към терапията. Контролът на БА беше предимно

непълен, но честотата на екзацербациите беше ниска. Честотата на ТА в групата беше 87.5%. Отчитаме факта, че по-висок процент (87.5%) от пациентите бяха на терапевтична стъпка 4 в сравнение с С3. Белодробната функция беше намалена, като при 50% се установи персистираща бронхиална обструкция. Средното ниво на FeNO беше 24 (17-33) ppb. Средното ниво на кръвните еозинофили беше 456 (262) cells/microL. При 62.5% установихме кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL. Абсолютната стойност на кръвните еозинофили и неутрофили и CRP бяха по-високи в сравнение с С3. Пациентите в този клъстер бяха със значимо повишение на IL-17A при сравнение с ЗК.



Фиг. 40 Корелационни зависимости в С4

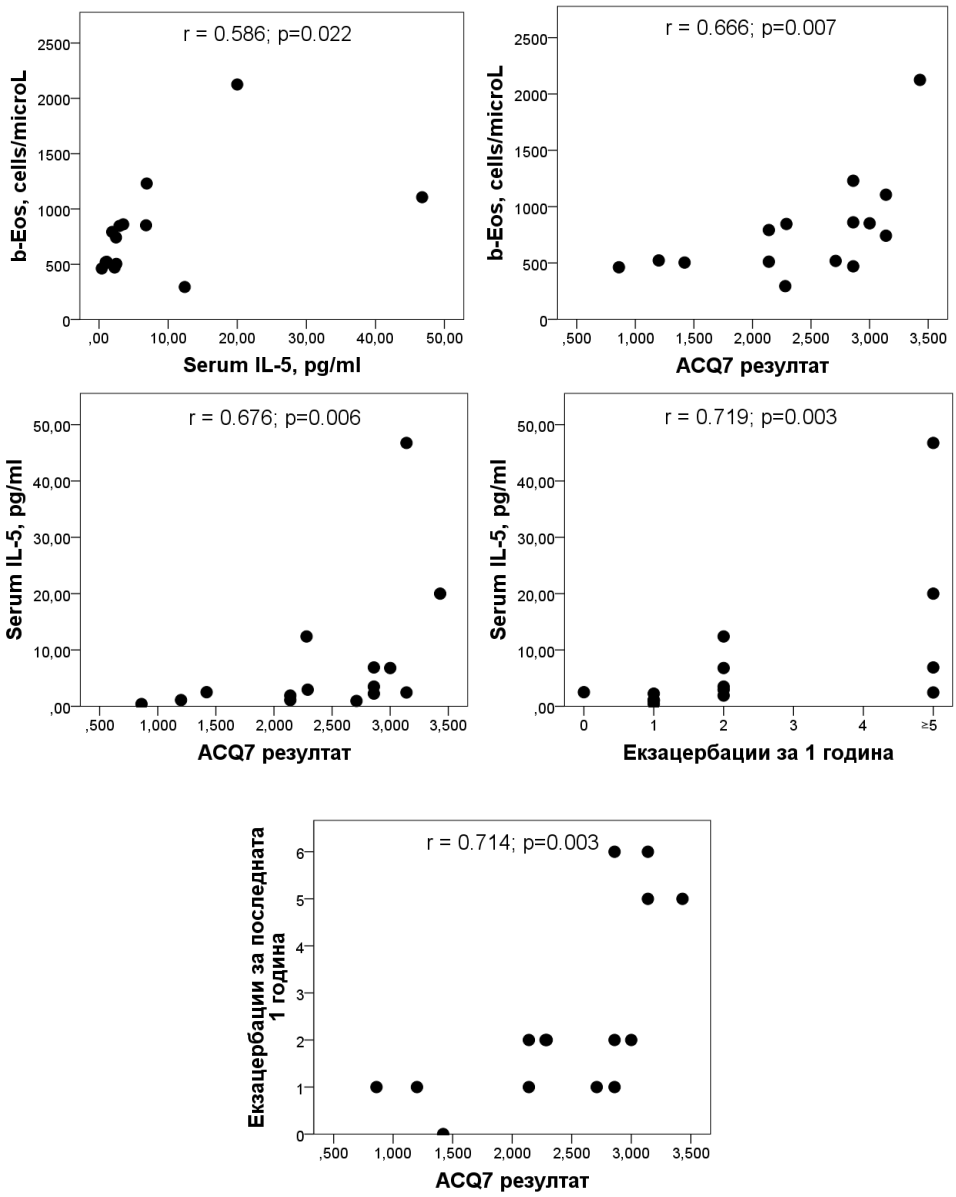
Клъстер 5 (С5): Еозинофилна БА с късно начало



Фиг.41 Радарна графика на С5 (непрекъсната линия). От центъра към периферията на графиката стойността на променливата се увеличава. Скалата от -1.5 до +1.5 представя z резултата за всяко измерване. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; IL – интерлевкин; CRP – С реактивен протеин; промяна ФЕО1 – процентно повишение след БДТ

Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 49.3 год. със средна възраст на изява на БА 37.8 год. Доминираше женският пол и късното начало, при по-кратка продължителност на БА. При 40% установихме експозиция на цигарен дим, като при 26.7% беше над 10 пакетогодини. ИТМ беше леко повишен и 40% бяха със затлъстяване. Честотата на съпътстващ ринит беше 73.3%, а на ГЕРБ 33.%. КАП бяха позитивни при 53.4%, при средно ниво на общ IgE 126 (57-194) IU/ml. Лошо придържане към терапията установихме при 2-ма пациенти в клъстера. Контролът на БА беше лош, като 86.7% бяха с недобре контролирана БА. 66% от пациентите бяха с

чести екзацербации. Честотата на ТА в групата беше 86.7%. Белодробната функция беше намалена, като при 53.3% се установи персистираща бронхиална обструкция. Нивото на FeNO беше 68 (39-104) ppb. Кръвните еозинофили бяха силно повишени - 742 (504-861) cells/microL. Кръвните неутрофили и CRP не се различаваха спрямо другите групи. Пациентите в този клъстер бяха със значимо повишение на IL-5, IL-6, IL-13 и IL-17A при сравнение с ЗК.



Фиг. 42 Корелационни зависимости в С5

5.7 Резултати към задача 7: Определяне на терапевтичното поведение чрез алгоритъм, приложим в рутинната клинична практика

Използвахме последните препоръки на GINA 2019 г. за избор на биологична терапия. При 3 (8.57%) от пациентите с ТА установихме постигнат контрол над симптомите, екзацербациите и белодрбната функция при приложение на висока доза ИКС и допълнителен поддържащ медикамент без употреба на СКС през последната една година. Останалите 32 (91.43%) пациента с ТА изпълняваха критериите на GINA 2019 за включване на биологично лечение (екзацербации, и/или недобър контрол, и/или употреба на СКС).

На базата на препоръките за определяне на Т2 ТА и не Т2 ТА на GINA 2019 установихме, че всички пациенти с ТА в нашето проучване попадат в групата на Т2 ТА (b-Eos ≥ 150 cells/microL и/или FeNO ≥ 20 ppb и/или алергична БА и/или нужда от СКС) спрямо един или повече от критериите.

При 4 (12.50%) от пациентите с Т2 ТА с данни за алергична БА в нашето проучване се установиха IgE < 30 IU/ml, поради което не бяха подходящи за включване на лечение с анти-IgE, а при 1 (3.13%) се установиха силно повишени нива на общи IgE (>1000 IU/ml), но поради високо телесно тегло попадна извън дозовия интервал на биологичната терапия с анти-IgE. При 5 (15.63%) не се потвърди сенсибилизация към целогодишен инхалаторен алерген, въпреки повишени общи IgE. Пациентите с Т2 ТА в нашето проучване, изпълняващи критериите на GINA 2019 за включване на лечение с анти-IgE (КАП и/или специфични IgE позитивни към инхалаторен алерген, серумни общи IgE и килограми включени в дозовия интервал, екзацербация през последната една година) бяха 22 (68.75%) пациента.

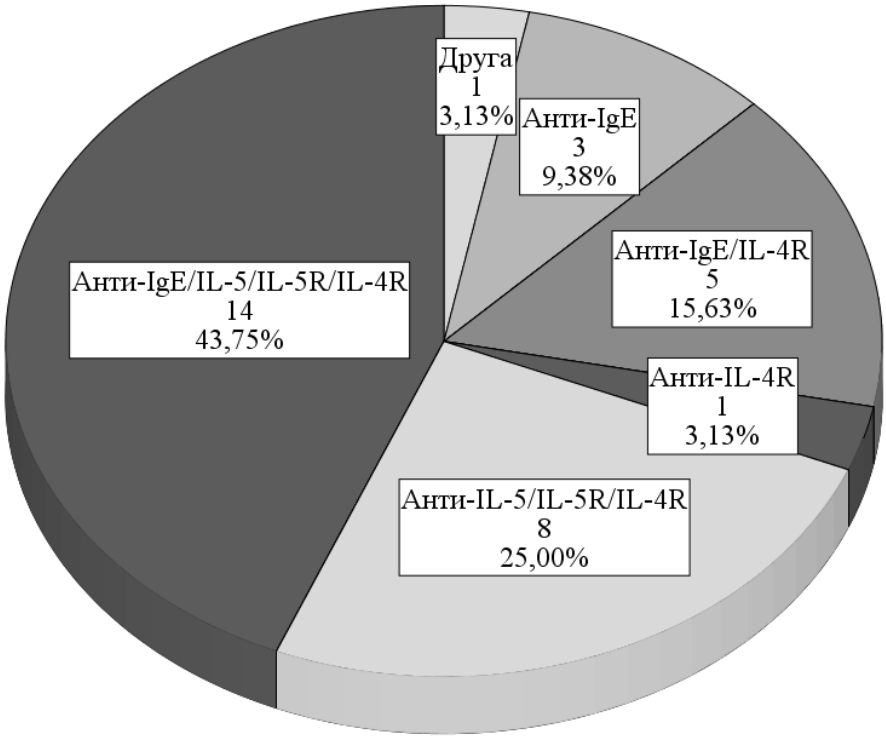
Пациентите с Т2 ТА в нашето проучване, изпълняващи критериите на GINA 2019 за включване на лечение с анти-IL5/IL5R (кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL, екзацербация през последната една година) бяха 22 (68.75%) пациента.

В документа на GINA 2019 граничната стойност на кръвните еозинофили за започване на лечение с анти IL-4R е обект все още на дискусия. Така в алгоритъма на страница 89 са описани критерии, включващи кръвни еозинофили ≥ 150 cells/microL или FeNO ≥ 25 ppb и екзацербация през последната една година, докато на страница 97 е заложена гранична стойност за кръвни еозинофили ≥ 150 cells/microL.

Въпрос на бъдещи изследвания и анализи е дали няма да се приеме използването на по ниската гранична стойност за определяне на еозинофилен фенотип БА.

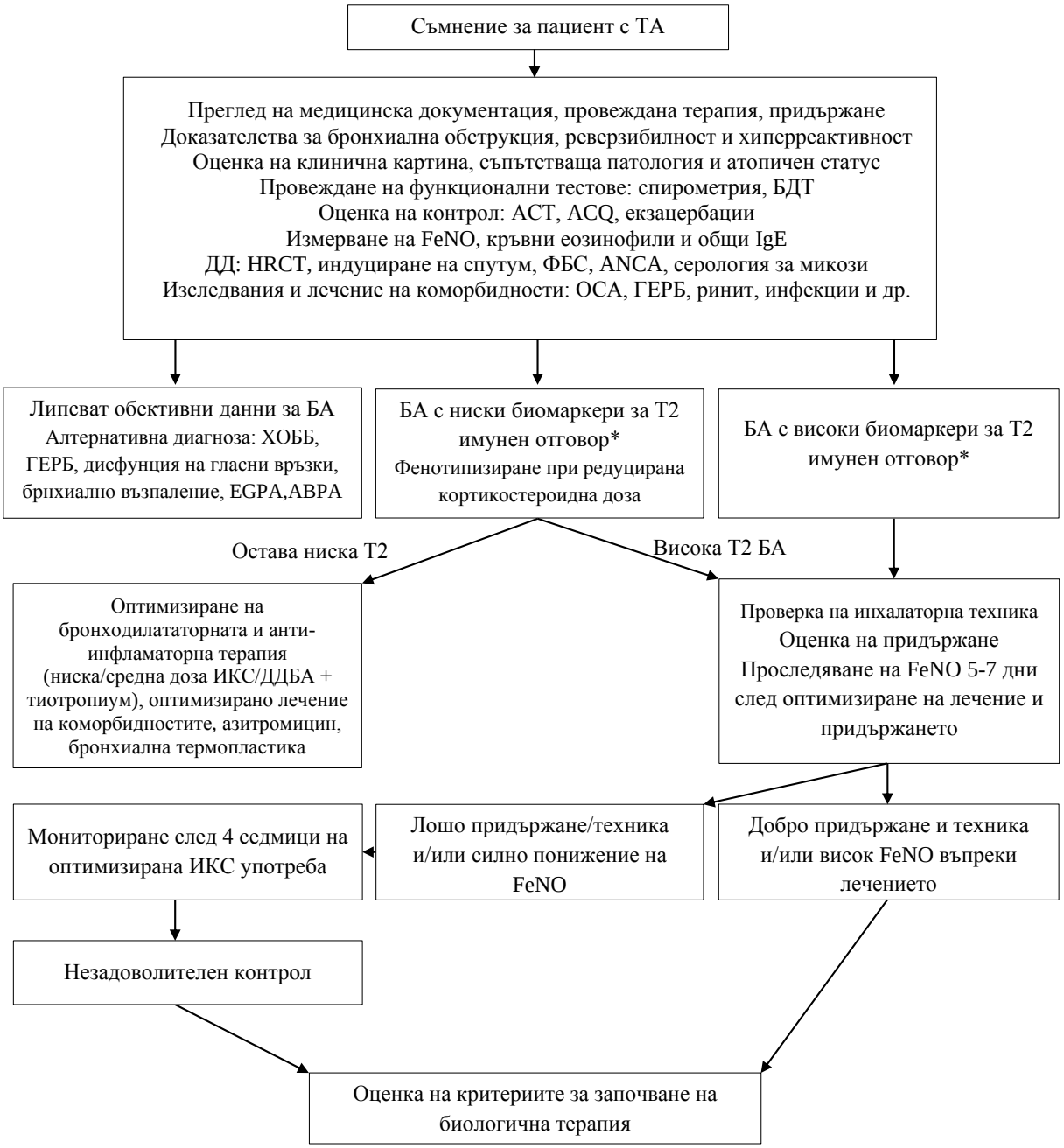
В нашето проучване при използване на критериите за кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL или FeNO ≥ 25 ppb и екзацербация през последната една година хипотетично 28 (87.50%) от пациентите с Т2 ТА биха били подходящи за включване на лечение с анти-IL4R.

Базирайки се на тези критерии, установихме, че голям процент от пациентите изпълняват критериите за повече от една биологична терапия (фиг.43).

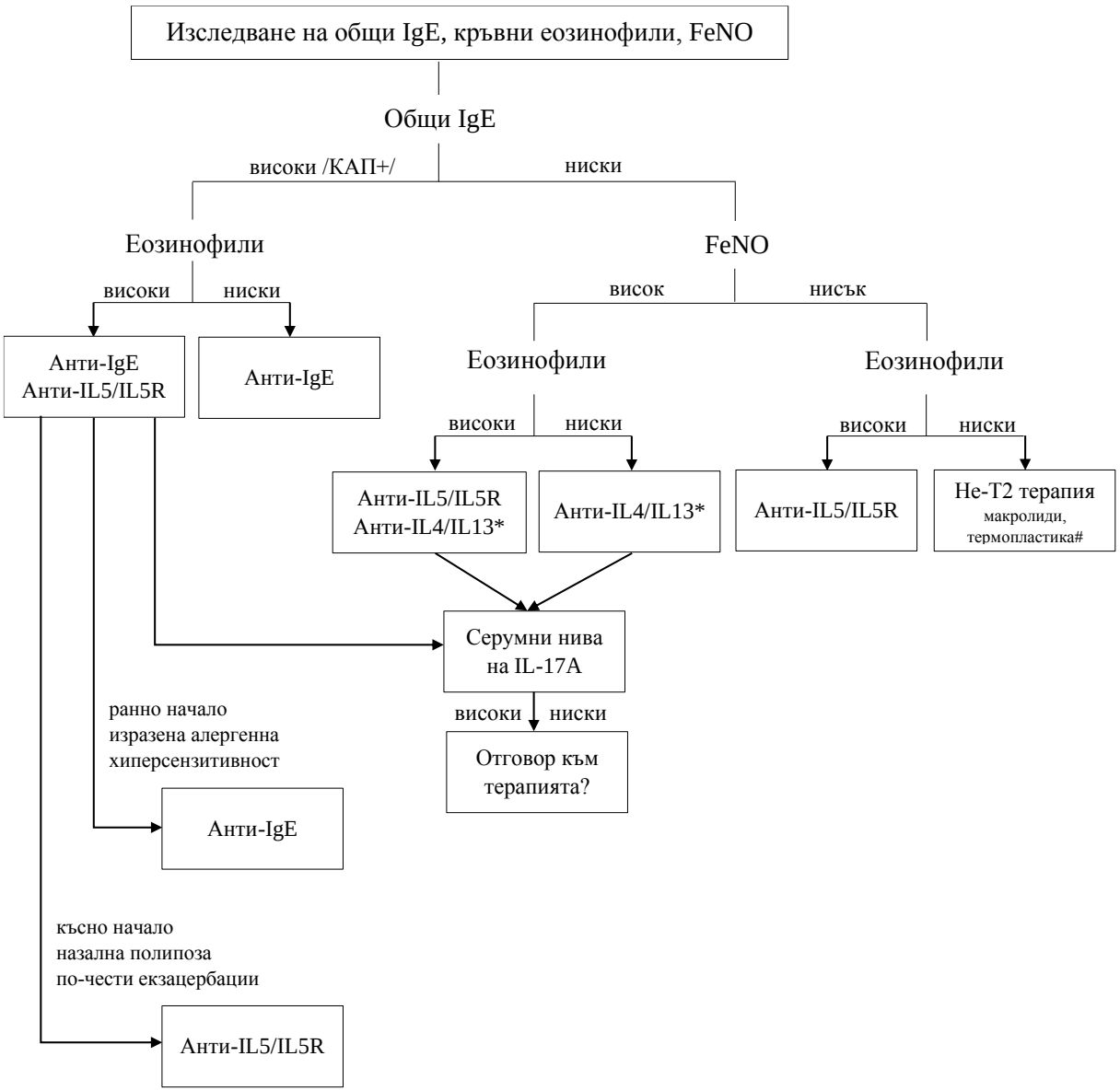


Фиг.43 Разпределение на пациентите с ТА според критериите на GINA 2019 за лечение с биологична терапия.

Базирайки се на данните от нашето проучване, изготвихме алгоритъм за оценка на пациентите суспектни за ТА (фиг.44) и избор на биологична терапия (фиг.45,46).



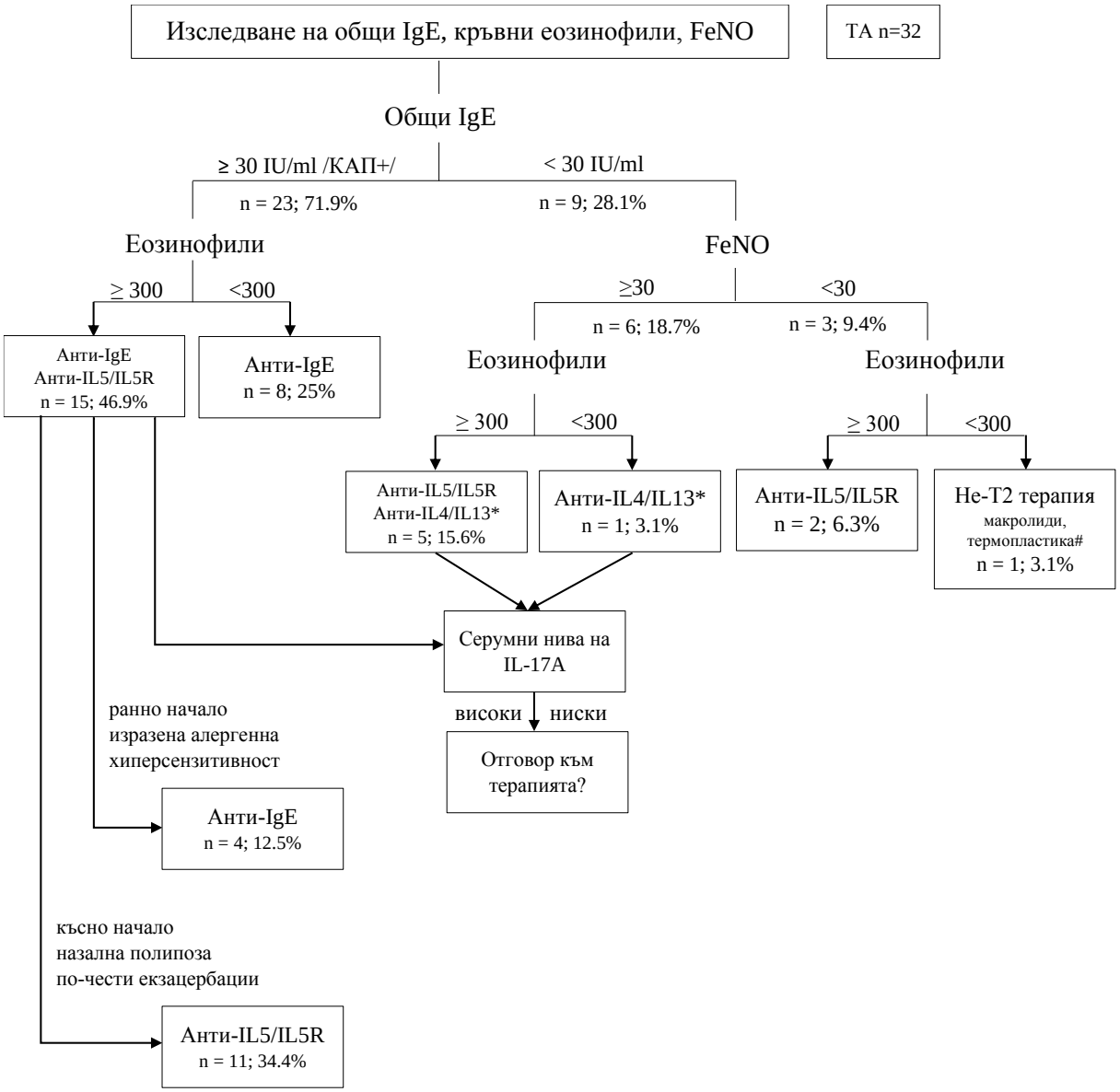
Фиг. 44 Алгоритъм за оценка и поведение при пациентr суспектни за ТА. *високи Т2 биомаркери са кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL и/или FeNO ≥ 30 ppb. Съкращения: ТА – тежка астма, БДТ – бронходилататорен тест, АСТ – астма контрол тест, ACQ – въпросник за оценка на контрола на астмата, FeNO – фракция издишан азотен окис, ФБС – фибробронхоскопия, HRCT – компютърна томография с висока резолюционна способност, ANCA - анти неутрофилни цитоплазмени антитела, ОСА – обструктивна сънна апнея, ГЕРБ – гастроезофагеална рефлуксна болест, ХОББ – хронична обструктивна белодробна болест, EGPA – еозинофилна грануломатоза с полиангиит, АВРА – алергична бронхопулмонална аспергилоза, Т2 – тип 2, ИКС – инхалаторен кортикостероид, ДДБА – дългодействащ бета2 агонист.



Фиг. 45 Алгоритъм за избор на биологично лечение на ТА. КАП – кожно-алергични проби * терапията не е одобрена за използване в Р.България, одобрена в САЩ и Европа, # при достъп до център провеждащ бронхиална термопластика

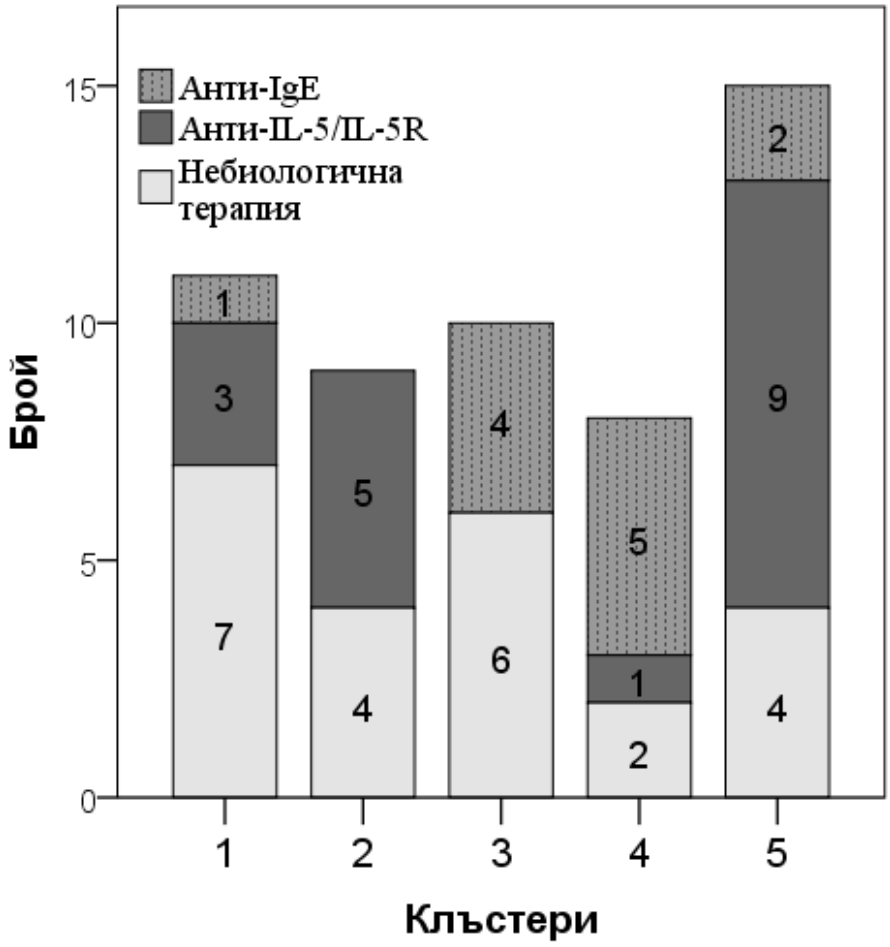
Според описания алгоритъм пациентите с ТА в нашето проучване, изпълняващи критериите за биологично лечение биха получили следните насоки за терапия: анти IgE при 12 (37.5%) пациента, анти IL-5/IL-5R при 18 (56.3%) (фиг.46). Двама от пациентите не изпълняват критериите за лечение с биологична терапия в България. При един от тях има данни за Т2 БА поради повишен FeNO и би бил кандидат за лечение с анти-IL-4/IL-13 при одобрение на лечението в страната, докато при другият пациент има данни за не Т2 БА. Възможностите за лечение включват още оптимизиране на КС терапия,

максимално лечение на коморбидностите, избягване на експозицията на алергени и вредности, лечение с макролиди, бронхиална термопластика.



Фиг. 46 Процентно разпределение на пациентите с ТА подходящи за биологична терапия в настоящото проучване според описания алгоритъм за лечение. КАП – кожно-алергични проби * терапията не е одобрена за използване в Р.България, одобрена в САЩ и Европа, # при достъп до център провеждащ бронхиална термопластика

Терапевтични стратегии при дефинираните клъстери на базата на разработените алгоритми (фиг.47):



Фиг. 47 Биологично лечение в дефинираните клъстери.

За всички клъстери: подобряване на придържането, лечение на коморбидноститие и прекратяване експозицията на вредности и иалергени

C1 – акцент на отказ от тютюнопушене, оптимална бронходилатация (дългодействащ М-холинолитик), анти-IgE (n=1; 9.1%), анти-IL-5/IL-5R (n=3; 27.%)

C2 – акцент на подобрено придържане и отказ от тютюнопушене, анти-IL-5 (n=5; 55.6%)

C3 – акцент на подобрено придържане (проследяване на FeNO след 5-7 дни), лечение на ринит, анти-IgE (n=4; 40%)

C4 – акцент на редукция на тегло, критичен анализ на ниските стойности на FeNO, анти-IgE (n=5; 62.5%), анти-IL-5/IL-5R (n=1; 12.5%)

C5 – ниска доза ОКС, оптимизирана инхалаторна терапия, анти-IgE (n=2; 13.3%), анти-IL-5/IL-5R (n=9; 60%)

VI. Обсъждане

В настоящото проучване ние включихме пациенти от стандартната амбулаторна практика оценени, като такива със СТА и ТА, както и пациенти с различна степен на придържане и съпътстваща експозиция на тютюнев дим с цел фенотипизиране на пациентите в реалната практика. Базирайки се на литературните данни решихме, че тези две групи пациенти имат най-голяма нужда от допълнително охарактеризиране с цел изготвяне на стратегии за подобрение на контрола над заболяването. Тежестта и контрола на БА може да се изменя във времето и липсват достатъчно лонгитудинални проучвания, които да определят стабилността на тежестта на БА. Johnson и сътр. (195) провеждат анализ на стабилността на контрола на симптомите при ЛБА и СТА при едногодишно проследяване на 429 пациенти и установяват, че контрола на симптомите остава стабилен само при 18% от участниците. Неконтролираната СТА в реалната клинична практика, може да доведе до ескалация на лечението и селекция в групата на ТА. Редица проучвания дефинират ТА, като хетерогенна група, обединена от по-високата си необходимост от медицински грижи, а сравнителните групи са предимно комбинирана кохорта от пациенти с ЛБА и СТА. Ние смятаме, че СТА се отличава от ЛБА и има повишен риск от преминаване към ТА при по-голяма продължителност на заболяването и персистиращо въздействие на неблагоприятни фактори от околната среда.

6.1 Обсъждане на резултатите към задача 1

Данните от нашето проучване потвърждават известни до момента данни за доминиране на женския пол при възрастни с БА, за разлика от БА при деца, където заболяването е по-често разпространено при мъжкия пол (47). При сравнение по пол установихме по-високи общи IgE при мъжете. Тази асоциация е коментирана в предходни проучвания (186, 306), но причината за това не е напълно изяснена. При жените с БА установихме значително по-висока честотата на екзацербациите, което е в подкрепа на предходни проучвания (223) и вероятно отразява сложни взаимодействия на половите хормони с имуно-регулаторните механизми при БА. Ние предполагаме, че по-високите нива на общи IgE при мъжете се дължат на по-честата изява на IgE-медиирана БА в ранна възраст, когато по-често ангажиран от заболяването е мъжкия пол, докато при жените честотата на екзацербациите е отражение на тежката БА в късна възраст, когато по-често ангажиран е женския пол.

Половината от участниците в нашето проучване бяха на възраст между 30-49 год, като пациенти над 30 год. показаха по-висока честота на ТА. Екипът по програмата SARP също потвърждава данните, че възрастта има силно въздействие върху тежестта на БА, като пациентите над 45 год. имат 2.73 пъти по-висока вероятност да са с ТА (473).

Възрастта на начална изява на БА се дискутира през последните няколко десетилетия, като характеристика обуславяща различия в етиологията, прогнозата и фенотипната изява на БА (100, 235, 274).

Могат да се намерят различни определения за фенотипа на БА с ранна или късна изява в литературата, като възрастта, която ги определя варира от 12 до 65 години (133, 274). Ние приложихме за гранична възрастта от 20 години и установихме, че пациентите с късна изява на БА доминираха в настоящото проучване. При 27.5% от участниците в проучването заболяването беше с ранно начало, но персистираше в средно-тежка и тежка форма и в зряла възраст. При пациентите с ранно начало на БА установихме по-висока честота на атопична БА, докато при тези с късно начало и най-вече при пациентите с начало на БА след 40 год. възраст, доминираше женския пол и неатопичната БА с повишение на кръвните еозинофили . Този резултат е в потвърждение на дългогодишни наблюдения и проучвания (211, 291).

Серумните нива на IL-6 бяха значимо повишени при пациенти с начало на БА след 40 год. възраст. Тези данни съответстваха на корелация, която установихме между нивата на IL-6 и възрастта, тъй като в тази група са селектирани по-възрастни пациенти. Не наблюдавахме други значими различия в контрола, тежестта, екзацербациите и другите изследвани възпалителни и имунологични показатели между пациентите с БА с ранно и късно начало.

Резултатите от нашето проучване потвърдиха данните в литературата (172), че коморбидностите имат пряко въздействие върху контрола на симптомите на БА. Съпътстващи прояви от ГДП, ГЕРБ и затлъстяване бяха свързани с по-лош контрол над симптомите, като комбинацията от повече коморбидности, съответно рефлектираше негативно над контрола на БА, най-вероятно поради ефект на натрупване.

Установихме висока честота на съпътстващ ринит, предимно при атопичните пациенти (алергичен интермитентен ринит - 32.5%, алергичен персистиращ - 28.8%, неалергичен – 15%), подобно на данните цитирани при ТА (алергичен ринит - 44-55%

(343, 386), неалергичен ринит - около 15% (61)). Пациентите с алергичен ринит бяха с по-високи IgE и по-ранно начало на заболяването, поради асоциацията на алергичното възпалението на горните дихателни пътища с атопична БА в млада възраст. Пациентите с персистиращ алергичен ринит и БА демонстрираха по-лош контрол на симптомите, по-високи нива на кръвни клетки (еозинофили и неутрофили), серумен IL-6 и IL-8, и влошена белодробна функция при сравнение с пациентите с БА и интермитентен ринит. Повишение на серумен IL-6 установихме при пациентите с персистиращи (алергични и неалергични) прояви от ГДП. В потвърждение на нашите данни са доказателства в литературата за асоциация на IL-6 генен полиморфизъм с повишен риск от развитие на алергичен ринит (476). Badorrek и сътр. докладват данни за повишение на IL-6 в назален лаваж след експозиция на алергени при пациенти с алергичен ринит (31), докато Watts и сътр. (450) свързват повишението на IL-6 и IL-8 предимно с ендотип на инфекциозен ринит.

Ние не наблюдавахме различия в нивата на IL-6 и IL-8 при сравнение на пациентите с персистиращ алергичен и персистиращ неалергичен ринити и БА. Възможно е това изолирано повишение на IL-6 да е свързано с бактериална колонизация при пациентите с персистиращи симптоми, независимо от атопичния статус, и да отразява системна възпалителна реакция в организма.

Честотата на AERD в нашето проучване беше 12.5%, като 7 (20%) от пациентите с ТА (ATS/ERS 2014) бяха с AERD, което е в съответствие с данните на Rajan и сътр. (346) за 15% разпространение на AERD при астматични пациенти. Нашите данни показват асоциация на AERD с ТА, персистираща бронхиална обструкция и чести екзацербации, аналогично на литературните данни (98, 420, 439). Установихме повишен клетъчен брой на кръвни левкоцити, неутрофили и еозинофили, както и по-високи нива на IL-5. Назалната полипоза най-често е придружена от Т2, еозинофилно възпаление, което може да обясни периферната еозинофилия и високите нива на IL-5 (448), а комбинираното повишение на кръвните неутрофили, вероятно се дължи на по-високата употреба на СКС в групата на AERD от една страна или на смесен възпалителен еозинофилно/неутрофилен фенотип при AERD от друга.

Честотата на затлъстяването в нашето проучване беше 28.8%, като при ТА честотата беше по-висока (37.1%) в сравнение със СТА (22.2%) (p=0.144), аналогично на други проучвания при ТА в Европа (266). Различията в статистическа значимост в честотата на затлъстяване между ТА и СТА в нашето проучване и това на McDonald и

сътр. (266), обясняваме с факта, че сравнението в тяхното проучване е между пациенти с ТА и такива с не-ТА (СТА и ЛБА), както и вследствие на различната демографска характеристика на пациенти в двете проучвания. При пациентите с наднормено тегло и затлъстяване установихме, очаквано повишение на CRP. Данни от скорошни проучвания установяват, че мастната тъкан при пациентите със затлъстяване и БА се различава от мастната тъкан при пациенти със затлъстяване без БА. Висцералната мастна тъкан на пациентите със затлъстяване и БА има значително по-високи нива на макрофаги, особено М1 макрофаги, в сравнение с мастната тъкан на затлъстели хора без БА, и това корелира с циркулиращите нива на CRP (314). Пациентите в нашето проучване с неконтролирана БА също показаха повишение на CRP и кръвните неутрофили пропорционално на ИТМ в групата. Този резултат отразява зависимости в групата на неконтролирани затлъстели пациенти с по-висока експресия на системни възпалителни маркери.

От друга страна при пациентите с наднормено тегло и затлъстяване в общата група на контролирани и неконтролирани пациенти с БА установихме допълнително завишени нива на кръвни еозинофили при сравнение с пациентите с нормален ИТМ. Този резултат съответства на данни, които получихме във фенотипния и клъстерен анализ описани по-долу. Идентифицирана беше група пациенти със затлъстяване, предимно мъже с високи кръвни еозинофили при ниски нива на FeNO. Характеристиките на отделните фенотипи, коментираме в резултати към задача 5 и 6. Известно е, че затлъстяването повлиява имунния отговор, променя функцията на Т-клетките и миграцията на еозинофилите, и модулира възпалението от тип 2 в подгрупа на пациенти с БА (15, 68). Подкрепяме идеята на Lugogo и сътр., че механизмите, които медиират еозинофилното възпаление при БА със затлъстяване вероятно са подобни на тези медииращи еозинофилията при пациенти с нормално тегло (253). Въздействието на метаболитната дисфункция и оксидативен стрес (218) може да доведе до понижение на сурогатните маркери за еозинофилия (FeNO), което поставя пациентите в риск, при провеждане на лечение според нивата на FeNO.

Честотата на ГЕРБ в нашето проучване беше 30%. Честотата на ГЕРБ в кохорти с ТА от САЩ и Европа е средно 40% (172). Пациентите с ГЕРБ имаха значително по-висок брой пакетогодини в нашето проучване, което повдига въпроса за асоциацията на тютюнопушенето с коморбидности като ГЕРБ, които могат да окажат значимо влияние върху контрола на симптомите. Тази връзка при пациентите с БА може да бъде обект

на бъдещи изследвания, предвид високата честота на тютюнопушене в популацията на пациентите с БА (216).

В нашето проучване също установихме, че притеснително висок процент от пациентите с БА (33.75%) са тютюнопушачи или бивши пушачи с експозиция над 10 пакетогодини. Честотата на настоящите тютюнопушачи (23.75%) беше сравнима с цитираната в предходни проучвания (73, 445). Иванов и сътр. (183) установяват честота на тютюнопушачите от 30.7% в национално проучване проведено в България през 2015 г. с участие на 540 пациенти с БА.

При 11 тютюнопушачи (настоящи и бивши) установихме данни за персистираща бронхиална обструкция въпреки високата реверзибилност на ФЕО1. Не наблюдавахме различия в честотата на персистираща бронхиална обструкция между групите при сравнение според активност на тютюнопушене и продължителност на експозиция. Това най-вероятно се дължи на въздействието на допълнителни фактори в групата на непушачите (влияние на тежестта и персистиращо неконтролирано възпаление), които също могат да доведат до възникване на трайна бронхиална обструкция.

Доказахме, че при активните пушачи нивата на FeNO са значимо по-ниски, факт който е добре известен от предходни проучвания (23). Настоящите тютюнопушачи бяха предимно жени, на по-млада възраст от непушачите. Установихме, че по-висок процент от тях са селектирани, като такива със СТА, поради терапевтичната стъпка на която са или поради не добро придържане към терапията. Установихме тенденция за по-висока честота на не придържане към терапията при настоящите тютюнопушачи. На тази пациентска група трябва да се обърне специално внимание поради сериозен риск за възникване на късни последици и тежки екзацербации.

Не установихме различия в контрола, определен според GINA, тежестта и екзацербациите при пушачи и непушачи. Предполагаме, че това се дължи на хетерогенността на групите, както и на множество поведенчески, клинични и възпалителни фактори, които повлияват контрола, тежестта и екзацербациите.

При пациентите с експозиция над 10 години на цигарен дим установихме по-лош контрол оценен чрез ACQ, по-висока честота на ГЕРБ и късно начало на БА в сравнение с непушачите и тези с експозиция под 10 пакетогодини.

Подобни резултати докладват учените от проучването U-BIOPRED, в което са включени групи на ТА при непушачи (n=311), ТА при бивши и настоящи пушачи

(n=110), ЛБА и СТА при непушачи (n=88) и здрави контроли непушачи (n=101) (444). Кохортите от пациенти в U-BIOPRED имат по-тежка БА при сравнение с предходни проучвания (386) и при сравнение с настоящото, като средната честота на екзацербациите в U-BIOPRED е 2.5/годишно и значително по-висок процент пациенти са получавали СКС. Въпреки тези различия, физиологичните и клиничните характеристики на ТА при бивши и настоящи пушачи не се различават значимо от групата на ТА при непушачи с изключение на по-късна изява на БА и по-високата честота на ГЕРБ при тютюнопушачи, аналогично на нашите данни.

При допълнителен анализи на групите с експозиция на тютюнев дим, изследователите от U-BIOPRED доказаха разлики между настоящите и бившите пушачи в протеомиката на храчките, подчертавайки критичната роля на оксидативния стрес при настоящите пушачи и загуба на епителна бариерна защитна функция при бивши пушачи (417). Пушачите (бивши пушачи и настоящи пушачи) с ТА също проявяват признаци на по-голям системен оксидативен стрес (113).

Schleich и сътр. (374) докладват по-лош контрол и по-чести екзацербации при настоящи тютюнопушачи в сравнение с непушачи и бивши тютюнопушачи в белгийската кохорта пациенти с ТА (n=350). Аналогично, в нашето проучване при ТА (ATS/ERS 2014) установихме пропорционална корелационна зависимост между броя на екзацербациите и пакетогодините.

Ние наблюдавахме значимо по-висок процент кръвни еозинофили при бивши тютюнопушачи при сравнение с настоящите. Подобна реакция след преустановяване на тютюнопушенето описват и Jensen и сътр. при здрави индивиди (189). Експериментално е доказано, че цигарения дим е потенциален двигател на еозинофилното възпаление чрез не тип 2-медииран вроден имунен отговор (48). Silberbrand и сътр. откриват силна асоциация между бронхиалната еозинофилия и тютюнопушене ≥ 10 пакетогодини в кохорта от пациенти с ТА, но не съобщават за асоциация с кръвните еозинофили. Необходими са допълнителни изследвания при БА в тази насока.

6.2 Обсъждане на резултатите към задача 2

В нашето проучване честотата на неконтролирана БА определена чрез различни методи (GINA – 55%, ACT < 20 – 46.3%, ACQ7 > 1.50– 40%) е подобна на тази цитирана от други автори (Braido и сътр. – 38.5% (54); Price и сътр. – 45% (333); Demoly и сътр. - 54% (96)). Пълен контрол на БА установихме едва в 45% според GINA. В предходни документи на GINA белодробната функция участваше в оценката на настоящия клиничен контрол, но след ревизия през 2014 г. се използва, като фактор определящ риска от бъдещи екзацербации (351), затова не използвахме функционални показатели при определяне на текущия контрол според GINA.

Използвахме допълнителни методи, като ACT и ACQ, за да се уверим в правилната селекция на пациентите и да сравним тяхната способност за откриване на пациенти с неконтролирана БА. ACT и ACQ дадоха съпоставими едни с други резултати за оценка на контрола, като ACQ7 имаше по-точно съвпадение при определяне на лошо контролирана БА спрямо критериите на GINA. Пациентите с лош и частичен контрол на БА според GINA обединихме в група на неконтролирана БА, като в нашата популация на СТА и ТА установихме, че гранична стойност за ACT < 21 точки има оптимална специфичност и чувствителност при определяне на неконтролирана БА, а граничните стойности с оптимална специфичност и чувствителност съответно за ACQ5, 6 и 7, както следва: > 1.29, >1.00 и >1.43 точки. При сравнение с литературните данни установяваме някои различия в граничните стойности за ACT и ACQ, които може да са във връзка със селекцията на пациентите. В нашето проучване анализът обхваща по-тежка форма на БА, в сравнение с проучванията в общата популация на пациенти с БА, където честотата на ЛБА варира от 50-75% (107). Прагът за ACT установен в нашето проучване е по-висок от този цитиран в литературата (< 20 точки). Прагът за ACQ и най-вече за ACQ7 съвпада значително с цитираните в литературата данни (1.50 точки).

При така дефинираните гранични стойности в нашето проучване ACT теста има чувствителност 88.6% и специфичност 91.7%, а ACQ7 – чувствителност 70.5%, и специфичност – 97.2% при определяне на неконтролирана БА.

По-ниската чувствителност на ACQ7 при гранична стойност от 1.43 е разбираема и обяснима с описаната в литературата „сива зона“, като резултати между 0.75 и 1.50 определят група от пациенти, които са на границата на адекватен контрол на БА. По

литературни данни способността на метода да открива добре контролирана БА е най-оптимална при гранична стойност от 0.75.

Korn и сътр. през 2011 год. откриват, че АСТ (гранична стойност 19) и ACQ7 (гранична стойност 1.50) в реалната практика имат способност да прогнозират GINA-неконтролирана БА в 80.7% и 71.3%, респективно. АСТ и ACQ са показали чувствителност 94% и 88%, и специфичност 70% и 57%, съответно (221). Korn и сътр. предлагат резултат за ACQ5 ≥ 1.90 и АСТ ≤ 16, като гранични за неконтролирана БА в реалния живот при пациенти с СТА и ТА (221).

Нашите данни се различават от тези на Korn и сътр. в степента на чувствителност и специфичност и използваните гранични стойности. Тези различия обясняваме със следното: Korn и сътр. определят контрола на БА според GINA 2011, чрез комплексна оценка на симптомите и белодробната функция и изследват възможността на въпросниците да откриват лошо контролирана БА при сравнение с обединена група на добре и частично контролирана БА. Както обяснихме по-горе в текста нашата методология се различава, като предлагаме пациентите с частично контролирана БА, които са отговорили положително на един или два от въпросите на GINA да се причислят в групата на пациенти с недобър контрол. Поради тези причини установените от нас гранични стойности за АСТ са по-високи, а за ACQ по-ниски.

Пациентите с неконтролирана БА бяха по-възрастни, на по-висока стъпка в лечението, със съпътстващ ринит, по-чести екзацербации, влошена белодробна функция, повишени кръвни еозинофили и FeNO и по-висока честота на ТА.

Ние намерихме корелация на резултатите от тестовете за контрол и броя на екзацербациите при всички пациенти с БА, като в групата на неконтролираните пациенти само резултатът на ACQ корелираше с екзацербациите. Определихме, както ACQ5 и 7 ≥1.50, така и АСТ<20 за рискови фактори за настъпване на повече от 1 екзацербация на година. Тези резултати са в потвърждение на дългогодишни наблюдения и с препоръките на GINA за оценка на риска при БА (139). Meltzer и сътр. (269) установяват, че всяко повишение в резултата на ACQ7 с минималната значима разлика от 0.5 се свързва с 27% повишение на риска от екзацербации.

Честотата на екзацербациите в нашето проучване е както следва: 70% са с една и повече екзацербации, а 27.5% с 2 и повече екзацербации през последната една година. Ние отчитаме по-висок процент на пациенти с ≥ 1 екзацербации най-вероятно поради

селекцията на пациенти със СТА и ТА, които имат по-висока честота на обостряния. Аналогични са данните на Иванов и сътр. (183) за 56% ≥ 1 екзацербация през последната година и 24.6% с две и повече екзацербации. Те установяват, че важни фактори допринасящи за екзацербациите са високата употребата на КДБА, тютюнопушенето и коморбидностите (183).

В нашата популация на пациентите със СТА и ТА, 11 фактора се оказаха рискови за чести екзацербации: лош контрол, високи кръвни еозинофили и FeNO, тежка БА, назална полипоза, персистиращ ринит, високи серумни нива на IL-5, персистираща бронхиална обструкция, а в групата на пациентите с ТА установихме корелационна зависимост между пакетогодините и честотата на екзацербациите.

Основните рискови фактори описани в литературата до момента значително се препокриват с описаните от нас: неконтролираната БА (163), висока употреба на КДБА (183, 304), неадекватен прием на ИКС (268), нисък ФЕО1 (282, 299), висока реверзибилност (329), персистираща експозиция на вредности (183, 299), коморбидности (183, 420), повишението на FeNO особено при възрастни пациенти с алергична БА (472), както и еозинофилията в спутум и периферна кръв (146, 213, 471).

Не открихме в литературата данни за влиянието на серумните нива на IL-5, като рисков фактор за чести екзацербации. В детската популация с БА Puranik и сътр. (338) откриват, че нивата на IL-5 в издишан кондензиран въздух имат добра предиктивна стойност за честотата на екзацербации. Възможно е при отделните фенотипи на БА този показател да има различна различна сила при оценка на риска от екзацербации.

Средните стойности на функционалните характеристики при пациентите със СТА и ТА бяха в границите на нормалните показатели, но при сравнение между двете групи пациенти установихме, че ТА се отличава със статистически сигнификантно по-ниски стойности на ФВК, ФЕО1 и ФЕО/ФВК. Бронхиалната реверзибилност беше представена в почти еднаква степен в двете групи, но по-висока честота на персистираща бронхиална обструкция наблюдавахме в групата на ТА. При 31.3% от всички пациенти установихме пост ФЕО1/ФВК под долната граница на нормата, която според GLI е z score < -1.64. Характеристиките на тази група бяха висока честота на ТА и AERD, лош контрол, високи кръвни еозинофили и изразена продължителност при по-ранно начало на заболяването. При пациентите с ТА установихме, че

продължителността на БА оказва негативно въздействие на бронхиалната обструкция в умерена пропорционална зависимост.

Ние установихме корелационна зависимост на ФЕО1 с резултата от въпросниците за контрол при БА. Корелацията с ACQ7 беше логична поради включване на ФЕО1 в оценката на контрола. Установихме подобна, но по-слаба корелация при анализ на ACQ5, ACQ6 и ACT, които основно отразяват контрола на симптомите. Редица проучвания (139, 388, 408) докладват данни за слаба връзка между контрола на симптомите и белодробната функция при пациенти с БА, на базата на които този показател беше изведен от GINA, единствено като маркер за оценка на риска. Поради тази причина проведохме по-задълбочен анализ на нашите резултати. Така установихме, че корелационната зависимост между контрола и ФЕО1 се запазва единствено в групата от пациенти с начална нормална белодробна функция (без обструкция), но не остава да персистира при оценка на пациентите с начална персистираща бронхиална обструкция, независимо от това дали на фона на бронходилатация се постига или не се постига пълна обратимост. Нашите резултати са в подкрепа на данни цитирани от Aburuz и сътр (11). Пациентите с нормална базална белодробна функция имат по-добра перцепция и проява на симптоми при настъпване на понижение на функционалните показатели. При пациентите със съпътстваща базална обструкция такава асоциация не се наблюдава. Добрият субективно оценен от пациентите контрол не изключва наличието на значителна бронхиална обструкция.

Ние установихме асоциация между повишените нива на CRP и по-ниски функционални показатели (пост ФЕО1 и пост ФВК) при пациентите с пост ФЕО1/ФВК < LLN. Най-вероятно това се дължи на връзката на CRP със затлъстяването и съответно рестриктивната компонента поради нарушената механика на дишането.

Наблюдавахме умерена асоциация на нивата на FeNO с бронхиалната реверзибилност, отразена чрез промяна на ФЕО1 при провеждане на БДТ. Пациентите с по-висок отговор след БДТ имаха значимо по-високи нива на FeNO. В потвърждение на тази асоциация са данните от редица автори. Ciprandi и сътр.(83) откриват подобна асоциация при деца с БА и алергичен ринит, а Busse и сътр.(66) идентифицират повишени тип-2 маркери в подгрупа пациенти с висока бронхиална реверзибилност. Други изследователи (109) установяват повишена бронхиална реактивност в група пациенти с FeNO > 35ppb.

Установихме различие в процентното съотношение на ТА (трудна за лечение БА), определена според класификацията на GINA и ТА според препоръките на ATS/ERS. Тежестта на БА по GINA се базира основно на необходимата терапевтична стъпка за лечение (стъпка 4 и 5), според което 72.5% от пациентите в проучването са с ТА (трудна за лечение БА). Според критериите на ATS/ERS от 2014 год. ТА е 43.8%. Тези различия се дължат на по-конкретната дефиниция заложена в критериите от 2014 г. Според тези препоръки, за да се приеме БА за тежка е необходимо използване на висока доза ИКС, докато в стъпка 4 според препоръките на GINA попадат пациенти на средно висока доза ИКС в комбинация с ДДБА. Необходима е внимателна оценка на неконтролираните пациенти поради възможност за висока изява на симптоми при недостатъчно придържане към терапията, проблем който може да доведе до неправилна класификация на пациентите в група с ТА и такава рефрактерна на лечение (272).

ТА в нашето проучване показа следните характеристики – по-късна възраст, предимно ангажиране на женски пол, висока честота на неконтролирана БА, изявени симптоми, влошена белодробна функция, по-чести екзацербации, високи кръвни еозинофили и общ IgE, полисенсибилизация и по-висока честота на коморбидности.

	Димитрова и сътр. ТА N=35	U-BIOPRED (386) ТА/непушачи N=311	U-BIOPRED (386) ТА/бивши и настоящи пушачи N=110	SARP III (421)* N=313	UK регистър за рефрактерна БА (168)* N=382	BSAR (374) N=350
Възраст	48.46 ±2.12 *46 (40-58)*	51.01 ±0.8	54.51 ±1.08	49.7 ±12.8	44.9 ±13.7	55 ±0.8
Жени	20 (57.1%)	66%	51%	67.1%	63.1%	57%
ИТМ	28.57 ±1,15 *28 (24-33)*	29.11 ±0.36	29.59 ±0.6	33.5 ±8.5	28 (24-32)	26 (16-43)
Затлъстяване	13 (37.1%)	38.6%	40%	62.1%	-	47%
Пакетогодини	0 (0-11)	2 (1-4)	17.38 (10-26)	0.9 ±2.2	-	-
Настоящи пушачи	4 (11.4%)	-	38%	-	5.8%	40 (12%)
Бивши пушачи	12 (26.7%)	-	62%	-	29.8%	108 (31%)
Начало	35 (20-48)	20 (7-38)	38 (20-48)	20.1 ±16.5	17 (3-35)	-
Начало, <12/12-40/>40	20/42.2/37.8%	-	-	-	-	32/36/31%
КАП /+/	27 (77.1%)	78.3%	71.3%	75.2%	57.3%	70%
ГЕРБ	11 (31.4%)	46.7%	63.6%	-	41.4%	36%
Алергичен ринит	22 (62.9%)	59.2%	43.6%	-	-	49%
Неалергичен ринит	4 (11.4%)	14.8%	16.8%	-	-	
Назални полипи	12 (34.3%)	35.4%	33.7%	-	13.4%	19%
ACQ5 резултат	1.91 ±0.20 *2.00 (1.00-3.00)*	2.28 ±0.07	2.23 ± 0.12	1.9 ±1.1 ACQ6	-	2.57 ±0.09
ACQ7 резултат	2.00 ±0.17 *2.14 (1.10-2.86)*	2.67 ±0.08	2.62 ±0.12	-	-	-
ACT резултат	17 (14-21)	-	-	-	-	13 ±0.4
Неконтролирана БА	26 (74.3%)	-	-	76.7% ACT	-	77% ACQ
Екзацербации	2.00 ±0.37 1 (1-2)	2.48 ±0.13	2.55 ±0.26	2.3 ±2.8	4 (2-6)	2.03 ОКС
Ниска доза ОКС	9 (25.7%)	45.8%	44.7%	22.4%	41.7%	24%
b-Eos, cells/microL	470 (290-651)	200 (300)	220 (290)	228 (134-399)	300 (250-11000)	240 (0-3144)
b-Eos, %	4 (2-5)	2.94 (1-6)	2.88 (1-5)	3 (2-5.7)	-	3 (0-50)
b-Neu, 10/9L	5.04 (3.6-6.2)	4.73 (3.1)	4.97 (2.87)	-	-	-
FeNO, ppb	31 (22-62)	26.5 (16-47)	23.5 (12-42)	21 (13-37)	34.5 (16-65)	26 (4-250)
Общ IgE, IU/ml	181 (59-349)	119.5 (45-342)	126 (63-328)	163 (45-384)	130 (54-292)	207 (2-10000)
ФЕО1 % пред.	68.2 ±3.28	67.5 ±1.26	67.2 ±1.84	65.8 ±20.2	65.9 ±23.6	68 ±1.2
ФВК % пред.	82.1 ±2.66	87.2 ±1.12	89.7 ±1.74	79.1 ±17.4	81.9 ±19.8	89 ±1.1
ФЕО1/ФВК %	66 ±2	64 ±1	61 ±1	81.7 ±13.9	63.1 ±15.2	63 ±0.7
Реверзибилност ФЕО1, %	10.4 ±1.9	-	-	11.9 ±7.9	-	11 ±0.8
ПостФЕО1/ФВК < LLN	18 (51.4%)	-	-	41.8%	-	-

Резултатите са представени в брой (%), средна ± стандартна грешка (SE), * използва се стандартно отклонение (SD), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орален кортикостероид; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата;

Табл. 46 Характеристики на ТА.

Нашите констатации значително се препокриват с тези от други проучвания, публикувани от регистрите за ТА (табл.46).

Както коментирахме вече, изследователите в проучването U-BIOPRED (386) представят ТА в две подгрупи в зависимост от тютюнопушеното. Нашите данни

подкрепят данните в U-BIOPRED, че пациентите с ТА са по-възрастни, предимно жени с чести екзацербации, ниски функционални показатели и лош контрол. Но за разлика от U-BIOPRED ние не открихме значимо повишение на ИТМ в групата на ТА при сравнение със СТА, докато честотата на затлъстяване беше близка до цитираната в U-BIOPRED. Нашите данни са в подкрепа на резултатите в U-BIOPRED за асоциация на назалната полипоза с ТА независимо от тютюнопушенето и по-висока честота на ГЕРБ. Кръвните еозинофили в U-BIOPRED са значимо повишени във всички групи на БА в сравнение със ЗК.

Различията, които установихме между кохортата на U-BIOPRED и нашите пациенти с БА са в насока селекция на по-тежки пациенти с повече екзацербации и по-често употреба на СКС в кохортата на U-BIOPRED, като 16 и 17% от пациентите в U-BIOPRED са провеждали лечение с биологична терапия (Omalizumab), като част от пациентите са били на лечение с антихистамини, левкотриенови модификатори, макролиди и други антибиотици, което беше изключващ критерий в нашето проучване, поради възможно повлияване на фенотипните характеристики.

Пациентите с ТА в нашето проучване са с по-високи нива на FeNO и кръвни еозинофили в сравнение с кохортата на U-BIOPRED и установихме значимо по-високи кръвни еозинофили при ТА в сравнение със СТА при еднаква честота на положителни КАП в двете групи. В U-BIOPRED при сравнение между пациентите с ТА и лека/СТА не се открива значима разлика в кръвните еозинофили, но докладват по-висока честота на положителни КАП в групата на лека/СТА. В допълнение в U-BIOPRED е установено повишение на кръвните неутрофилите при ТА, като авторите свързват този резултат с по-високата употреба на СКС в проучването. Възможно е установените различия с нашите данни да се дължат на различията в провежданата терапия и включването на ЛБА в анализа на U-BIOPRED.

В съгласие с двата регистъра на британското торакално дружество (168) и белгийската кохорта на ТА (BSAR) (374), нашите пациенти са предимно жени, с чести коморбидности, доказателства за фиксирана бронхиална обструкция, чести екзацербации и лош контрол въпреки високата употреба на медикаменти.

Резултатите докладвани от Moore и сътр. през 2007 при кохортата от SARP (277), са в съответствие с коментираните характеристики до момента. Те не откриват зависимост на FeNO с тежестта на БА. Ние също не открихме различия в нивата на

FeNO при сравнение на ТА със СТА. Предишни доклади предполагат, че детерминантите на нивата на FeNO са сложни. Въпреки, че често отразяват еозинофилното възпаление на дихателните пътища, те могат да се повлияват от редица фактори. Moore и сътр. не откриват различия в нивата на общи IgE и кръвните еозинофили между различните по тежест групи, и докладват по-ниска честота на атопия при ТА в сравнение с по-леките форми на БА.

Teague и сътр.(421) през 2018 г. докладват данни от кохортата на ТА SARP 3, които отново потвърждават обсъдените вече характеристики на ТА. Те откриват значимо повишение на кръвните еозинофили при ТА в сравнение с по-леките форми и не наблюдават различия в нивата на общите IgE, което е в съответствие с нашите данни.

Ние намерихме значително по-високото ниво на серумен IL-8 при сравнение на ТА със СТА. Zhang и сътр. (474) докладват данни за повишени серумни нива на IL-8 при 246 неконтролирани пациенти с БА и неадекватна редукция в нива при лош клиничен КС отговор. Асоциирането на ТА с повишено ниво на IL-8 в храчките или БАЛ е съобщено по-рано при възрастни и деца (121, 188). Вероятно IL-8 играе важна роля при рефрактерната неутрофилна астма и е индикатор за неутрофилни фенотипове при пациенти с БА, но ние не открихме допълнителна корелация на IL-8 в групата на ТА с останалите възпалителни и имунологични характеристики.

6.3 Обсъждане на резултатите към задача 3

Базирайки се на концепцията за хетерогенност на БА в продължение на десетилетия клиницистите са идентифицирали и описвали различни клинични фенотипи на БА (169): Алергична БА с ранно начало, Еозинофилна БА с късно начало, Асоциирана със затлъстяване БА, AERD, Асоциирана с тютюнопушенето БА, Астма с хронична бронхиална обструкция, Често екзацербиращ фенотип на БА.

Ние установихме висока честотата на атопичен фенотип БА в нашето проучване (76.2%), който се характеризира с ранно начало и по-високи нива на общи IgE. Тези данни, доказва че това е най-добре разпознаваемият фенотип в клиничната практика.

Неатопичният фенотип БА от своя страна беше с по-късно начало, значително по-ниски нива на общи IgE и влошена белодробна функция. Тези данни са в съответствие с цитираните в литературата характеристики на двата фенотипа – атопична и неатопична БА (211). След субанализ на групата с неатопична БА ние потвърдихме съществуването

на фенотип неатопична, еозинофилна БА при по-възрастни пациенти, предимно жени с лош контрол, висок FeNO и значително нарушена белодробна функция, описан при почти всички фенотипно-ориентирани проучвания (63).

Открихме малка група пациенти с неатопична, нееозинофилна БА с доминиране на женският пол, с нормален ИТМ, по-висока честота на СТА и със запазена белодробна функция и контрол. Характеристиката на тази група е в дискрепанс с описан в други проучвания фенотип на нееозинофилна БА при жени със затлъстяване (22).

Последно описаният фенотип на неатопична, нееозинофилна БА, която е предимно СТА, съответства на представената от Fahy концепция за по-тежка изява на тип 2 БА и по-лека изява на не-тип 2 БА (117). Това не изключва съществуването на не-тип 2 ТА модифицирана от индивидуални фактори свързани с по-тежка изява на заболяването.

Нашите данни за повишени серумни нива на IL-13 при атопична и неатопична еозинофилна БА в сравнение с неатопична, нееозинофилна БА, подкрепят концепцията за общи Т2 имунорегулаторни пътища, независимо от атопичния статус. Вероятно поради тази причина 49.2% от атопична БА показаха комбинирано повишение на кръвните еозинофили ≥ 300 cells/microL, а при 23.1% от пациентите с еозинофилна БА установихме данни за повишение на общите IgE > 100 IU/ml.

В статистически фенотипни проучвания често се съобщава за клъстери с висока честота на атопична БА, но различните групи пациенти с атопия могат да бъдат хетерогенни по отношение на тежестта на симптомите, белодробната функция и тенденцията за екзацербации (372). В съответствие на това твърдение са нашите данни при атопични пациенти с БА, разделени според нивото на кръвни еозинофили. Пациентите с атопична и еозинофилна БА бяха по-възрастни с по-късно начало, повече симптоми, по-лош контрол, по-тежка БА, на по-висока доза ИКС и съпътстващо повишение на кръвните неутрофили и IL-6 при сравнение с атопична, нееозинофилна БА.

Очакван беше резултатът за повишени нива на общите IgE при атопични пациенти и най-вече при тези със съпътстващи прояви от ГДП – интермитентен или персистиращ ринит поради по-висок алергенен товар.

Пациентите с ТА бяха със значимо по-високи общи IgE в сравнение с тези със СТА в нашето проучване. Способността на общите IgE да разграничават пациентите с ТА е със сравнително ниска чувствителност (74%) и специфичност (63%) за оптимална гранична стойност от 111 UI/ml. Нивото на общите IgE в различните по тежест групи на БА е вариабилно и зависи от атопичния статус. Само частични резултати доказват по-високи нива при ТА в сравнение с ЛБА и СТА, като големите кохорти на ТА не отчитат значими различия в нивата му асоциирани с тежестта на БА (94, 277, 421). Допълнително не открихме асоциация на общите IgE с контрола на БА или честотата на екзацербациите. Липсваха ясни зависимости на общите IgE с останалите възпалителни и имунологични показатели, което ни дава основание да свържем този биомаркер единствено с идентификацията на алергичната БА.

При 15% установихме позитивни резултати за sIgE към Staphilococcus aureus ентеротоксин В, което съответства с литературните данни (от 14.9% до 79.1%) (402). В тази група доказахме значително по-високи нива на общ IgE, по-ниски нива на FeNO и кръвни еозинофили, и не открихме зависимости с контрола и тежестта на БА.

Броят на еозинофилите в периферната кръв е лесно приложим и универсално достъпен сурогатен биомаркер за еозинофилия на дихателните пътища, който е широко използван през последните години (206, 475). Мета-анализ (220) на 14 проучвания (2405 пациента) намира чувствителност 71% и специфичност 77% на кръвните еозинофили при идентифицирането на спутумна еозинофилия. Оптималната гранична стойност за определяне на еозинофилно възпаление в дихателните пътища чрез кръвните еозинофили най-вероятно попада в границите между 150 и 400 cells/microL(413).

Настоящото проучване доказа ролята на кръвните еозинофили като фактор свързан с по-тежка и неконтролирана БА. Абсолютния еозинофилин кръвен брой има умерена специфичност и чувствителност при определянето на тежка БА, неконтролирана БА и такава с персистираща бронхиална обструкция. Кръвни еозинофили ≥ 550 cells/microL са рисков фактор за настъпване на по-чести екзацербации. Използвахме различни гранични стойности от 100 до 550 cells/microL и установихме, че още при нива от 150 и 200 cells/microL се наблюдава по-висока честота на неконтролирана и ТА. Степента на еозинофилията доказано се асоциира с контрола, понижението на белодробната функция, тежестта на заболяването и екзацербациите в редица други проучвания (51, 158, 208, 209, 213, 276, 334, 470).

Установихме, че кръвните еозинофили бяха по-високи при пациенти на терапия с високи дози ИКС и прием на ОКС. Този резултат е в противоречие на добре известната чувствителност на еозинофилите към КС. Предположихме, че възможна причина за това повишение е непридържане към терапията, но след анализ на данните от въпросника за придържане установихме, че точно тази група поради изразени симптоми има най-добър къмплайънс към терапията. Това ни дава основание да предположим, че има наличие на резистентност към КС при част от пациентите.

Броят на кръвните еозинофили беше в правопропорционална зависимост с резултата от ACQ5 и 7 и обратна зависимост с АСТ, както в цялата кохорта на пациенти с БА, така и в групата с неконтролирана БА и ТА. Повишеният еозинофилен брой беше асоцииран с повишени серумни нива на IL-5 при ТА и с нивата на FeNO при неконтролирана БА. Известна е биологичната функция на IL-5 над матурацията, транспорта и активацията на еозинофилите и не е изненадваща асоциацията на серумните му нива с повишението на кръвните еозинофили (18, 145).

Еозинофилният фенотип БА става все по-добре дефиниран в клиничната практика (63) с най-често използвана гранична стойност от 300 cells/microL. Установихме, че тези пациенти са по-възрастни, с по-висок ИТМ, късно начало, по-висока честота на AERD и назални полипи, имат по-често неконтролирана и тежка БА. При еозинофилния фенотип установихме съвместно повишение в нивата на кръвните неутрофили, най-вероятно в следствие на по-високата употреба на КС в тази група. Белодробната функция беше понижена, а FeNO повишен в групата на еозинофилна БА. Ние установихме повишени серумни нива на IL-6 във връзка с по-голямата възраст в групата, повишения ИТМ и неутрофилен брой - фактори които обуславят метаболитна дисфункция и персистиращо системно възпаление в организма. Въпреки, че нивата на IL-5 бяха повишени при еозинофилна БА, резултатът не достигна статистическа значимост.

Повишените нива на FeNO се приемат в литературата, като сурогатен маркер за еозинофилна/тип 2 възпалителна реакция в дихателните пътища (220, 376, 443). Над 20 години се проучва връзката на FeNO с еозинофилното възпаление и се изучава ролята му, като биомаркер за фенотипизиране и средство за оценка на контрола и терапията. Значителен брой проучвания представят противоречиви данни за корелация (табл.5) на FeNO с еозинофилията в индуцирана храчка, в бронхоалвеоларен лаваж и/или в периферната кръв. Известно е, че FeNO е повишен при атопична БА, повишава се по

време на екзацербация, корелира с еозинофилите в индуциран спутум, с бронхиалната хиперреактивност и е повишен в късната фаза след алергична провокация и се повлиява от употребата на ИКС и фактори от околната среда.

През 2011 год. ATS (108) представи препоръки за употребата на FeNO < 25 ppb, като маркер за липсващо възпаление в дихателните пътища, докато FeNO > 50 ppb да се използва за индикатор за еозинофилно възпаление и очакван добър КС отговор. Литературните данни в последствие обаче доказват, че вариация от гранични стойности на FeNO от 10 – 40 ppb могат да предвидят еозинофилното възпаление в спутума. Korevaar и сътр. (220) установяват, че подобно на кръвните еозинофили, FeNO има умерена способност за идентифициране на локален еозинофилен фенотип, но кръвните еозинофили остават с по-висока специфичност и чувствителност. Подобни са резултатите на Wagener и сътр.(443).

Нашите данни са в съгласие с наблюдаваните позитивни умерени корелационни зависимости на FeNO с кръвните еозинофили. Установихме, че 39.5% от пациентите с FeNO ≥30 ppb са с b-Eos < 300 cells/microL, а други 40.5% от пациентите с FeNO<30 ppb са с b-Eos ≥ 300 cells/microL. Този дискрепанс е подобен на описания от Crespo и сътр (91) при анализ на FeNO и еозинофили в спутума при пациенти провеждащи лечение с ИКС.

Фенотипното характеризиране на пациенти провеждащи терапия, може да бъде сложно поради повлияване на биомаркерите от провежданото лечение. Ние предполагаме, че бихме могли по този начин да идентифицираме неповлияващите се маркери от настоящата терапия, които биха оформили отделни фенотипи на фона на лечение. Възможно е по-ниските нива на FeNO при пациентите с повишени кръвни еозинофили да се дължат на лечението с ИКС, което локално повлиява нивото на FeNO, или да са понижени вследствие подтиснато образуване или повишена консумация поради тютюнопушене, затлъстяване или под въздействие на други фактори свързани с повишен оксидантен стрес (109). Нашите данни също потвърдиха понижението на FeNO при настоящи тютюнопушачи.

Jones и сътр. (196) докладват, че FeNO е свързан с положителна прогностична стойност за загуба на контрол между 80 и 90%. Нашите резултати не потвърдиха способността на FeNO да открива неконтролирана БА, въпреки че при силно изразени крайности в контрола (много добър и много лош контрол), нива над 29 ppb имат 70.8%

чувствителност и 63.9% специфичност за идентифициране на лошо контролирана БА. Това най-вече се дължи на факта, че нивата на FeNO в общата група пациентите с БА отразяват подлежащите възпалителните механизми при конкретни фенотипи, докато допълнителни фактори могат да въздействат с различна сила върху контрола на БА при друга част от пациентите.

Нива на FeNO > 30 ppb имат добра чувствителност и специфичност за идентифициране на пациенти с чести екзацербации. Установихме позитивна корелация на FeNO с броя на екзацербациите при БА и ТА. Kupczyk и сътр. (228) съобщават подобни данни за резултати на FeNO > 45 ppb, като рисков фактор за екзацербации.

Интересни са данните, че FeNO е значимо повишен в групата на пациенти с висока употреба на КС, аналогично на нивата на кръвните еозинофили, което наблюдавахме при неатопична еозинофилна БА с високо придържане и персистираща бронхиална обструкция. Това вероятно е във връзка с коментираната резистентност на локалното възпаление при по-тежки форми на еозинофилна БА.

В допълнение, ние установихме същевременно значимо повишение на FeNO в групата на пациентите с преФЕО1/ФВК < LLN и изразена реверзибилност до нормализиране на съотношението след БДТ, тъй като в тази група бяха селектирани 44.4% пациенти с лошо придържане към терапията, предимно атопични. Ние предполагаме, че FeNO може да се използва за идентифициране на пациентите с лош къмплайънс в практиката.

Повишените нива на FeNO регистрирани при еднократно измерване трябва да се оценяват внимателно и в комплексност с други измервания и клинични корелации. Серийно измерване след подобряване на придържането с цел отчитане динамиката в нивата на FeNO е изключително полезно при отчитане на степента на повлияване на възпалението.

Използвахме граничните нива препоръчани от ATS (2011) (108) и получихме аналогични данни за асоциация с повишени кръвни еозинофили, неконтролирана БА и понижена белодробна функция с изразен БДТ отговор в групата с повишен FeNO > 50 ppb.

В групата на пациентите с ТА установихме асоциация на FeNO със серумните нива на IL-13, който е сред основните медиатори, индуциращи експресията на iNOS (36). Литературните данни от лечението с анти-IL-5 (Mepolizumab) (150, 310) не

потвърждават асоциация между намаляването на еозинофилите и измерените нивата на FeNO. Допълнителни подлежащи стимули за синтез на FeNO, осъществени по IL-4/IL-13 медиирани пътища могат да обяснят липсата на силна корелационна зависимост между FeNO и кръвните еозинофили. При анализ на данните от проучванията свързани с ефекта от биологичната терапия насочена към IL-4/IL-13 медиираните пътища се установява по-добро повлияване на нивата на FeNO (16, 26, 37, 87, 154).

Нивата на CRP при пациентите с БА в нашето проучвания очаквано показаха асоциация с ИТМ и IL-6. CRP беше повишен при по-възрастни пациенти с БА, аналогично на серумните нива на IL-6. CRP и IL-6 са два функционално свързани биомаркера. Производството на С-реактивен протеин в черния дроб се стимулира от IL-6. IL-6 и CRP се разглеждат, като възпалителни биомаркери и често в литературата се използват за оценка на наличието и тежестта на нискостепенно възпаление. При субанализ на СТА открихме корелация на CRP с ИТМ, IL-6 и кръвните неутрофили и на IL-6 съответно с CRP, кръвните неутрофили и възрастта. Подобни корелационни зависимости не наблюдавахме в групата на ТА, което ни кара да мислим че нивата на CRP и IL-6 имат допълнителни имунологични стимули, които повлияват резултата при ТА.

При ТА установихме силна асоциация между нивата на CRP и серумен периостин, които пропорционално съвместно нарастват в корелационна връзка. Не открихме в литературата данни за подобна асоциация между CRP и серумните нива на периостина. Ние предполагаме, че повишените нива на периостин при БА са свързани с нискостепенно възпаление в следствие на персистиращи увреждащи фактори в дихателните пътища, които от своя страна водят до асоциацията на периостин с понижените нива на белодробна функция.

6.4 Обсъждане на резултатите към задача 4

Всички изследвани серумни нива на IL и периостин бяха значимо по-високи при пациенти с БА при сравнение със ЗК. Тези резултати показват, че умерената и тежка БА е свързана с персистиращо възпалително състояние в резултат на активиране на адаптивния и вроден имунен отговор.

Използвахме метод описан от други автори (383, 396) за определяне на гранични стойности за ниски и високи нива на серологични маркери.

Пациентите с IL-5 > 4.60 pg/ml (висок IL-5) се отличават с висока честота на AERD, много висок брой кръвни еозинофили, лош контрол и чести екзацербации при често приложение на СКС. Тези резултати са в подкрепа на концепцията за тип 2 имунен отговор и доминиращ IL-5 медииран път за персистиращо, еозинофилно възпаление при клинична изява на ТА при AERD (301).

Анализът на серумните нива на IL-6 показа корелация с кръвните неутрофили, CRP, WBC и възрастта. Това потвърждава неговата функция, като проинфламаторен медиатор при състояние на системно възпаление в организма (255), като неговото повишение с напредване на възрастта може да предполага настъпване на имунорегулаторни дефекти на имунната клетъчна функция (142, 255). При неконтролирана БА нивата на IL-6 корелират положително с нивата на IL-8. Пациентите с IL-6 > 3.70 pg/ml (висок IL-6) се отличават с повишен CRP, кръвни левкоцити и серумен IL-8. Не открихме ясна асоциация между нивата на IL-6 и затлъстяването при пациентите със СТА и ТА. Peters и сътр. (317) класифицират пациентите по подобен на нас начин при гранична стойност за плазмени нива на IL-6 от 3.10 pg/ml. Те установяват повишена честота на затлъстяване в групата с висок IL-6, чести екзацербации и намалена функция.

От друга страна, пациентите в нашето проучване с еозинофилна БА (b-Eos ≥ 300 cells/microL) показаха статистически сигнификантно повишени серумни нива на IL-6 при сравнение с неeозинофилна БА, вероятно поради напредналата възраст на групата и по-високия брой кръвни неутрофили, обуславящи метаболитна дисфункция и персистиращо системно възпаление в организма.

Хетерогенно разпределение в нивата на IL-6 в нашата популация отразява многообразието във функцията на IL-6, като асоцииран маркер за системно възпаление и неутрофилна активация и възможна имунорегулаторна функция върху патологичните процеси при еозинофилна БА. В подкрепа на тези данни се явяват резултати от проучвания проведени в кохортата на ТА към U-BIOPRED. Известно е, че IL-6 осъществява своите въздействия, чрез рецепторно медиирана транс сигнализация. В U-BIOPRED е идентифицирана група пациенти с висока IL-6 медиирана транс сигнализация, чести екзацербатори с високи кръвни еозинофили и субмукозна инфилтрация от Т-клетки и макрофаги. Установено е, че спутумните нива на IL-6-рецептора и IL-6 корелират с маркери на ремоделиране, както и с IL-8 (190). Също в U-BIOPRED, група от непушачи с високи спутумни нива на IL-6R mRNA и IL-6

демонстрира по-високи неутрофили в спутума, независимо от състоянието на еозинофилно възпаление. В тази група е установена лоша белодробна функция и по-високи серумни нива IL-6 и CRP (435).

Пациентите в групата с висок IL-8 бяха с по-висока честота на ТА, с по-лош контрол според ACQ и по-нисък пост ФЕО1 в сравнение с групата на пациенти с нисък IL-8. Асоциацията с IL-6 е в подкрепа на литературни данни за съвместно участие на двата медиатора в не тип 2 имунен отговор при БА, но не установихме допълнителни асоциации на IL-8 с установените до момента фенотипни характеристики на пациентите в проучването. Всички сравнения в проучването до момента в насока търсене на асоциация на IL-8 с кръвните неутрофили, тютюнопушенето и затлъстяването на базата на утвърдените в литературата данни не показаха значимост в тази насока. Възможно е това да се дължи на по-ниския брой изследвани пациенти (n=70) и на изключването на пациенти с АСО предвид зададените критерии за участие.

Анализът на серумните нива на IL-13 показа корелации при ТА с FeNO. Този резултат е в съответствие с данните за индуциран от IL-13 синтез на FeNO в дихателните пътища на тип 2 БА. Тази връзка е доказана в клиничните проучвания за биологично лечение. Понижение на нивата на FeNO е в асоциация с анти IL-13 терапия, а не с анти IL-5 терапия. (16, 26, 37, 87, 150, 154, 310).

Ние установихме, че групата с висок IL-13 се характеризира със значимо по-високи нива на IL-5 и по-ниски за IL-17A при сравнение с групата с ниски нива на IL-13. Тези резултати подкрепят концепцията за тип 2 БА с едновременно повишение на ключови тип 2 IL, като IL-5 и IL-13 и не тип 2 БА с нисък тип 2 IL-13 и повишение на IL-17A.

Ние намерихме статистически значимо по-високи серумни нива на IL-13 при пациентите с фиксирана бронхиална обструкция в сравнение с тези с висока вариабилност. Тези данни са в подкрепа на докладвани резултати свързани с биологичната активност и въздействие на IL-13 в дихателните пътища. В литературата е описана критична роля на IL-13 в белодробното ремоделиране, метаплазия на слузните клетки, и свръхпродукция на мукус (465). Експериментален модел на Patricia и сътр. (127) изследва обратимостта на индуцирана от IL-13 белодробна фиброза. Те установяват значимо повишена депозиция на колаген в белите дробове и повишена

мукусна продукция след поддържане на висока IL-13 експресия. Тези промени остават да персистират след преустановяване на експресията.

Наскоро бяха докладвани данни (227)от безпристрастен генетичен клъстерен анализ в кохортата U-BIOPRED, на базата на който са идентифицирани 3 транскриптомно-асоциирани клъстери (TAC) или така наречени молекулярни фенотипи. TAC1 [22] се характеризира с експресия на рецепторите IL-33R, CCR3 и TSLPR и има най-високо обогатяване на генните сигнатури за IL-13/тип 2 възпаление и за ILC тип 2, и се съпътства с най-високата еозинофилия в спутума и FeNO. Пациентите в TAC1 са с ТА със зависимост от СКС, чести обостряния и тежка бронхиална обструкция, които са признаци на тежката еозинофилна БА.

В групата на пациентите с висок IL-17A, установихме сигнификантно по-ниски нива на IL-5 при сравнение с групата с нисък IL-17A. Инетерсно, че същата група показа повишени нива на FeNO. което най-вероятно е отражение на резултат който получихме при клъстерния анализ за асоциация на IL-17A с тип 2 резистента БА. В подкрепа на тази хипотеза за смесен ендотип е положителна корелация на IL-17A с със серумното ниво на периостин (спряган за тип 2 биомаркер при БА). Необходим е допълнителен комплексен анализ в тази насока, предвид съществуващите литературни данни за смесен еозинофилно/неутрофилен фенотип с изявена тежест на заболяването.

От друга страна при неконтролирана БА установихме зависимо понижение на ФЕО1 при повишени нива на периостин. Conway и сътр.(85) представят обобщен анализ на нивата на периостин при респираторни и други състояния в организма свързани с ремоделиране на тъканите. Очевидно е, че епителните увреждания са често срещано явление при респираторни заболявания, било то от алергени или вирусна/бактериална инфекция. В белите дробове експресията на периостин намалява след остро увреждане, но след това се увеличава значително с активирането на TGF-β и началото на възстановителните механизми. Sidhu и сътр.(391) установяват, че в среда от епителни клетки експресиращи периостин се осъществява TGF-β зависима секреция на колаген тип 1 от фибробластите. Смесването на периостина с колаген тип 1 води до ригидност на матрикса. Нивото на периостин е в корелация със задебелението на базалната мембрана в дихателните пътища (391).

Интересни са данните при друго белодробно заболяване, като идиопатичната белодробна фиброза, където периостина е силно експресиран в белите дробове и в

серума на пациенти, а системните му нива са обратно пропорционално свързани с белодробната функция (296). Предполага се, че периостинът действа като индуктор на хемокини във възпалителния отговор, който е ключов за процеса на белодробна фиброза (401).

Ние предполагаме, че повишените нива на периостин при БА са свързани с нискостепенно възпаление в следствие на персистиращи увреждащи фактори в дихателните пътища, които от своя страна водят до асоциацията на периостин с понижените нива на белодробна функция. За съжаление, неможахме да потвърдим ролята на периостина, като биомаркер за тип 2 БА. Тези наши резултати са в подкрепа на данни докладване от Agache и сътр. (14), и Wagener и сътр. (443).

Matsusaka и сътр. (261) идентифицират фенотип на пациенти с високи нива на серумен периостин, при възрастни пациенти, с по-висока честота на късно начало на БА, фиксирана обструкция, назална коморбидност и еозинофилия. Подобно на нашите данни, Mansur и сътр. (258) също не откриват корелационни връзки на периостина с FeNO или кръвните еозинофили, но съобщават за значима корелация с ФЕО1. Най-вероятно периостинът би играл значима роля при определяне на ремоделирането на дихателните пътища при БА.

Установихме слаба корелация между кръвните еозинофили, FeNO и тип 2 серумните цитокинови нива (IL-5 и IL-13), подобно на предходни литературни данни (91, 129, 364), докато други автори (Agache и сътр.) (14) докладват много силна (r> 0.90) корелация между тях. От друга страна IL-6 демонстрира асоциация както с не тип 2 характеристиките на БА, така и с еозинофилното възпаление. Наблюдавахме асоциация между IL-17A и FeNO.

Нашите резултати подкрепят утвърдената идея за съществуването на тип 2 и не тип 2 БА, но в допълнение установяваме интересни елементи на припокриване в имунологичните маркери между тези два ендотипа, което подлежи на допълнителен анализ.

6.5 Обсъждане на резултатите към задача 5

Независимо от успешното идентифициране на различни фенотипни особености в нашата кохорта пациенти с БА (астма с ранно начало, астма с късно начало, атопична БА, еозинофилна БА, БА при затлъстяване, чести екзацербатори, астма при тютюнопушачи, астма с хронична обструкция, AERD и др.), установихме значително

припокриване на възпалителните характеристики (нива на кръвни еозинофили, FeNO, общи IgE) сред различните фенотипни групи (21, 300, 430). За съжаление подходът за фенотипизиране, базиран на клиничините признаци може да не доведе до изясняване механизмите на БА. Това се потвърждава в проучването U-BIOPRED (238), след като анализи на проби от дихателните пътища и кръв не бяха в състояние да предоставят полезна информация за основните механизми на заболяването при предварително дефинираните клинични групи. Тези анализи доведоха до развитие на стратегии за фенотипизиране, базирани на възпалителните характеристики, чрез анализ на биомаркери свързани с определен спутумен цитологичен модел и последващо развитие на молекулярни и генетични подходи за фенотипизиране. В 50-70% от случаите са открити характеристики за имунен отговор от тип 2 (318, 385), на базата на изследвани биомаркери, като най-често използваните за дефиниране на Т2 БА са кръвните еозинофили и FeNO (468).

Използването на серумни интерлевкини (IL) за оценка на възпалението на дихателните пътища е ограничено, тъй като те са предимно локални медиатори, поради което изследване на индуциран спутум и БАЛ (инвазивни и отнемащи време процедури) са по-надеждни. От друга страна, предполагаме, че може да съществува системна възпалителна реакция, която да се открива в серумни проби при резистентна на лечение БА и може да е причина за поддържане на локалното възпаление, въпреки инхалаторната терапия. В този случай измерването на серумните интерлевкини в комбинация с други биомаркери може да бъде полезна стратегия при откриването и оценката на тежките терапевтично резистентни подгрупи на БА.

Редица автори докладват откриваеми нива на ILs в БАЛ (176), спутум (384) и също в серум (17, 161, 242). В литературата липсват данни за директни сравнения на нивата на IL в БАЛ/храчка и серума от една и съща популация БА, но две проучвания на Akiki и сътр. (17) и Liang и сътр. (242) потвърждават съществуването на отделни серумни IL-модели при пациенти с БА. Те предполагат, че измерването на IL в кръвта може да бъде полезно при оценката на ТА. Llano и сътр. (248) от друга страна използват серумните нива на IL-6, 8, 5, 13, 17, TNF-алфа и периостин за оценка на група пациенти с бронхообструктивни състояния (ХОББ, БА и АСО) и доказват смесен възпалителен модел при АСО, комбиниран между характеристиките на БА и ХОББ. Те установяват по-високи средни серумни нива на IL-5 при пациентите с БА, и на IL-8 при тези с ХОББ. Периостинът в тяхното проучване не е показал категорична способност за

дискриминиране между групите, докато IL-13 се е оказал основно свързващо звено в мрежовия анализ и при трите групи. Тези констатации са в съответствие с хетерогенния възпалителен фон на пациенти с хронични бронхообструктивни състояния, вероятно континуум между не тип 2 и тип 2 възпаление със значително припокриване в голяма част от случаите.

Ние предполагаме, че класифицирането на пациентите със СТА и ТА от реалната клинична практика, в зависимост от наличието или отсъствието на системен и локален тип 2 възпалителен отговор, може да ни даде информация за комплексния имунологичен профил на всяка група.

Класифицирахме пациентите според резултатите от изследваните тип 2 биомаркери – FeNO и b-Eos. Избрахме именно тях, тъй като в нашата кохорта те показаха значими възможности за отдиференциране на отделни групи пациенти, докато общите IgE и периостина не демонстрираха такива. Pavlidis и сътр.(307) също докладват данни при генетично детерминирани групи на тип 2 висока и тип 2 ниска БА, според които общите IgE и периостин не показват добра способност за отличаване на двете групи. Определихме 4 отделни групи, след като избрахме гранична стойност за кръвните еозинофили </≥ 300 cells/microL, а за FeNO </≥ 30 ppb на база на литературните данни (307). Граничната стойност от 300 cells/microL за кръвните еозинофили е широко приета за дефиниране на тип 2 еозинофилна БА (63, 334). Средното ниво на кръвните еозинофили в нашата популация също беше много близо до тази гранична стойност, което ни осигури равномерно разпределение на групите. В литературата са анализирани много различни гранични стойности за FeNO в зависимост от целта на изследването (диагностична способност при КС наивни пациенти, ръководене на терапията с ИКС, използване като биомаркер за еозинофилна астма и др.) и популациите (непушачи, пушачи, ЛБА или ТА и др.) (128, 129, 160, 276, 377). Граничните стойности за FeNO при откриване на еозинофилна астма варират в широки граници - от 19 ppb до 76 ppb (135, 433), но най-често се използват стойности от 20 до 35 ppb (109, 313). Ние използвхме гранична стойност за FeNO - 30 ppb, базирайки се на литературните данни (307). От друга страна нивата на FeNO ≥ 30 ppb показаха ясна зависимост с екзацербациите, както и е близо до средното ниво в нашата популация, което ни осигурява равномерно разпределение на пациентите в групите.

Базирайки се на използваните неинвазивни биомаркери, при 70.1% от пациентите със СТА и ТА открихме данни за висока Т2 БА. Само 28.8% бяха с ниска Т2 БА. Тези

данни са в съответствие с цитираната в литературата честота на Т2 БА. По-голямата част от пациентите с ТА в нашето проучване (82.9%) попадат в група с персистиращ възпалителен отговор от тип 2.

Пациентите в група 1 (↓FeNO/↓b-Eos) бяха най-млади, предимно жени с нормален ИТМ и около 70% са бивши или настоящи тютюнопушачи (настоящи - 47.8%). Само при 17.4% началото на заболяването е след 40 г., при останалите е било в по-ранна възраст. Доминираха пациенти с позитивни КАП (78.3%). Средните стойности от въпросниците за оценка на контрола бяха задоволителни, но въпреки това, според критериите на GINA при 43.5% заболяването остава недобре контролирано. Честотата на екзацербациите и ТА беше ниска. Едва 26.1% провеждаха лечение с висока доза ИКС. Нивата на общи IgE, FeNO, b-Eos, b-Neu, CRP бяха ниски, а белодробната функция сравнително запазена. Открихме повишени серумни нива на периостин и IL-17A в сравнение със ЗК. Не открихме статистически значими различия в нивата на периостин при сравнение на група 1 с останалите групи БА, докато серумните нива на IL-17A бяха значимо по-ниски в група 1 при сравнение с групи 3 и 4. От радарната графика се визуализира пик и статистическа тенденция за повишение на серумните нива на IL-8 и периостин в асоциация с по-висок процент на настоящи тютюнопушачи. Чувствителността на еозинофилното възпаление към КС е добре известна, така че обсъждаме възможността в група 1 да са включени пациенти с тип 2 БА, но отрицателни биомаркери поради добър отговор към ИКС. Възможно е фактори от околната среда или индивидуални характеристики да са довели до по-ниска експресия на биомаркерите за тип 2 БА, което също може да е оказало ефект върху анализираната група. Pavlidis и сътр.(307) също установяват наличие на генна сигнатура за тип 2 БА в група пациенти с ниски FeNO/b-Eos. Въпреки това, базирайки се на биомаркерната характеристика решихме да определим тази група като фенотип на Т2 ниска БА при атопични тютюнопушачи.

В предишни проучвания тютюнопушенето е свързано с по-ниско еозинофилно възпаление и по-нисък FeNO (23, 185, 427). От друга страна, някои проучвания показват, че пушенето може да поддържа еозинофилното възпаление, особено при възрастните пациенти (185, 283). Тези наблюдения са в съответствие с характеристиките на субектите, класифицирани в групи 2 и 4 (високи b-Eos), където пациентите са по-възрастни и част от тях са били изложени на тютюнев дим в миналото. Симптомите, обостренията и тежестта са по-ниски в група 1 в сравнение с

останалите и белодробната функция въпреки тютюнопушенето все още е запазена. По-младата възраст и по-малкото пакетогодини могат да обяснят несъответствието между експозицията и белодробната функция. Експозицията на тютюнев дим в група 1 и полисензитивността към инхалаторни алергени може да доведе до субселекция на пациентите в група на припокриване (ACO) в бъдеще. В радарната диаграма открихме, че IL-8 показва известна тенденция на нарастване спрямо останалите маркери в група 1. Това е в съответствие с по-рано докладваните данни за индукция на IL-8 от тютюневия дим (215) и повишаването му в плазмата на пациенти с ACO (177).

В група 2 (↓FeNO/↑b-Eos) b-Eos са високи, но локалното тип 2 възпаление (FeNO ниво) е потиснато и това е свързано с по-ниска честота на екзацербации. Възможно е, провежданата терапия да е повлияла този резултат, но въпреки това висок процент остават неконтролирани и с персистираща обструкция. Базирайки се на цитирани вече данни (218) предполагаме, че понижението на FeNO в тази група при персистиращо еозинофилно възпаление може да се дължи на по-високата честота на затлъстяване. Пациентите в група 2 бяха най-възрастни, доминираха жените, но съотношението между половете не бе така ясно изразено. Това е групата с най-висок ИТМ и 47.1% от участниците бяха със затлъстяване. Настоящите тютюнопушачи бяха нисък процент (23.5%). БА в тази група беше предимно с късно начало, като в 52.9% се е изявила след 40 год. възраст. Доминираха пациенти с позитивни КАП (76.5%). Контролът на симптомите беше недостатъчен и неконтролирана БА според критериите на GINA установихме при 41.2%. Честотата на екзацербациите беше ниска, но установихме висок процент (52.9%) на ТА, като 76.5% в групата провеждаха лечение от стъпка 4/5. Нивата на общи IgE и FeNO бяха ниски. Абсолютния брой на кръвните еозинофили беше най-висок в тази група, като се установи съвместно повишение на кръвните неутрофили и CRP. Белодробната функция беше понижена, като при 41.2% бронхиалната обструкция остана да персистира. Открихме повишени серумни нива на IL-5, IL-6, IL-13, IL-17A и периостин в сравнение на група 2 със ЗК. От радарната графика се визуализира пиково повишение свързано със статистическа значимост за IL-5 и IL-6, както и тенденция за по-висок IL-8, асоциирани с високи кръвни еозинофили и неутрофили, висок ИТМ, късна изява и по-напреднала възраст. Това ни даде основание да характеризираме тази група като фенотип на Т2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване. Haldar и сътр. (151) съобщават, че затлъстяването е свързано с повишени симптоми, намалено еозинофилно възпаление, женски пол, късно възникване

на БА и намален отговор на ИКС. Анализът на участващите в програмата за изследване на тежка астма (SARP) показва, че повишеният ИТМ е свързан със специфични клинични характеристики при ТА - женски пол, късно начало и нужда от СКС (280). Тези две проучвания подкрепиха концепцията, че фенотипът на БА е относително хомогенен при затлъстели пациенти с висока експресия на симптом, ниска атопия и еозинофилия, и относителна резистентност към КС (124, 315, 399, 412).

От друга страна Sutherland и сътр. (411) описват 2 различни клъстера на пациенти с БА и затлъстяване. Те наблюдават хетерогенност, както в проявата на симптоми, така и в нивата на възпалителните биомаркери при пациентите с висок ИТМ. Bates и сътр. докладват, че най-малко два различни фенотипа със затлъстяване могат да се проявят при БА (38). Фенотип на алергична БА, модулиран от затлъстяване с персистиращо системно възпаление и стимулация на тип 2 имунния отговор, и друг фенотип, свързан само със затлъстяването при неатопична БА с късно начало. По-нови концепции приемат, че вероятно има много различни фенотипи на БА при затлъстяване, най-вероятно всички идентифицирани до момента фенотипи при незатлъстели пациенти, но с допълнителни характеристики, настъпили вследствие механични и възпалителни въздействия от повишения ИТМ (105). Други изследователи представят доказателства за за съществуването и на три фенотипа асоциирани със затлъстяването: 1. Асоцииран с ранно начало, висок тип 2, изразена бронхиална хиперреактивност и тежки екзацербации; 2. Асоцииран с късно начало нисък тип 2, който се смята че възниква вследствие въздействие на затлъстяването върху белодробната физиология; 3. Асоцииран само със женския пол и неутрофилно възпаление в дихателните пътища. (105)

Ние смятаме, че в група 2 са включени пациенти с повишен от затлъстяването имунен отговор тип 2, което води до смесено повишение на двете кръвни клетъчни групи - еозинофили и неутрофили асоциирани със съответния интерлевкинов профил. Връзката между b-Eos и серумните нива на IL-5 в тази група е в съгласие с резултатите ни до момента и с тези на други автори (14, 132, 197), но се различава от резултатите на Akiki и сътр (17). Те докладват данни за цитокинов профил, съставен от IL-5, IL-13, IL-8 и други медиатори, който не се асоциира с високи b-Eos, а с b-Neu и затлъстяване. По-високите нива на IL-6, IL-8 и CRP в група 2 могат да обяснят набирането на неутрофили в смесеноклетъчно възпаления отговор, както и да се асоциират с

персистиращо системно възпаление и метаболитна дисфункция, свързана със затлъстяването в групата.

Интересно е, че пациентите в групи 3 и 4 са с персистиращо повишение на FeNO със/без повишение на b-Eos, въпреки по-високите дози на ИКС и честото приложение на СКС. Предполагаме, че в тези случаи се е развила резистентност към КС активност. Механизмите обуславящи тази резистентност най-вероятно се дължат на системното повишение на IL-17A и в двете групи, по-силно изразено в група 4.

Пациентите в група 3 (↑FeNO/↓b-Eos) бяха на средна възраст 49 години, преобладаваха жени с нормален ИТМ, непушачи, с предимно ранно начало на заболяването, но при 40% се наблюдава изява и след 40 годишна възраст. В тази група доминираха атопичните пациенти с положителени КАП (86.7%) (33.3% и 53.3% - моно- и полисенсибилизирани, респективно). Ние наблюдавахме неконтролирана БА при 33.3%, а ТА при 26.7%, но честотата на екзацербациите беше значително по-висока, като при 40% се наблюдаваха повече от 1 екзацербация през последната година, а 86.7% от пациентите бяха на стъпка 4/5 от терапията. Общите IgE, FeNO и CRP бяха повишени, докато кръвните еозинофили и неутрофили - ниски. Белодробната функция беше запазена. Открихме повишени серумни нива на IL-6, IL-13, IL-17A и периостин в сравнение със ЗК. При сравнение между групите установихме по-високи нива на IL-17A в група 3 при сравнение с група 1 и 2. От радарната графика се визуализира пиково повишение на IL-13, IL-17A и периостин, асоциирани с повишен FeNO и висока честота на екзацербации при запазена белодробна функция.

Това ни даде основание да характеризираме тази група като фенотип на Т2 висока БА с атопия и чести екзацербации

Тази група потвърждава ролята на високия FeNO като рисков фактор за екзацербации при пациенти на ИКС терапия (139, 321, 472) и предполага IL-13 медиирана продукция на NO при алергична БА (120, 303, 394). Повишените нива на IL-17A и IL-6 в сравнение със ЗК могат да бъдат свързани с наблюдаваните по-чести обостряния в тази група (317), и поставят въпроса за тяхното влияние при тип 2 ТА и КС резистентност.

Пациентите в група 4 (↑FeNO/↑b-Eos) бяха на средна възраст 46 години, предимно жени с нормален ИТМ. Доминираха непушачи или бивши тютюнопушачи с късно начало на БА, дялът на настоящите пушачи в групата беше 12%. КАП бяха

положителни в 68% от случаите. Контролът на симптомите беше лош и 88% бяха с неконтролирана БА според критериите на GINA. Честотата на екзацербациите и на ТА (64%) беше висока. Терапия стъпка 4/5 провеждаха 84% от участниците в тази група. Нивата на общи IgE, FeNO, кръвни еозинофили и неутрофили бяха повишени. CRP бе сравнително нисък. Белодробната функция беше намалена и 40% бяха с персистираща бронхиална обструкция, при висока вариабилност на ФЕО1 след БДТ. Открихме повишени серумни нива на IL-6, IL-13, IL-17A и периостин в сравнение на група 4 със ЗК. Серумните нива на IL-17A бяха значимо по-високи в група 4 в сравнение с група 1 и 2, а тези на IL-6 при сравнение с група 2. Серумните имунологични характеристики на група 4 значително се препокриваха с тези на група 3, но клиничната изява в група 4 беше по-тежка, при по-високи средни нива на IL-17A в група 4. От радарната графика се визуализира пиково повишение на IL-17A в асоциация с повишен FeNO, общи IgE, кръвни еозинофили, ниска функция, лош контрол и висока честота на екзацербации.

Това ни даде основание да характеризираме тази група като фенотип на T2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна на лечение БА.

Данните в нашето проучване за асоциация на тежестта с комбинираното повишение на b-Eos и FeNO е в съответствие с резултатите, докладвани от други автори (98, 129, 334, 401, 472). Повишените нива на IL-6, IL-13 и IL-17A в група 3 и 4 предполагат комбинирано активиране на имунната система при пациенти с рефрактерна на лечение тип 2 ТА и изискват по-нататъшно изследване за развитие на персонализиран подход. Нашето проучване подкрепя идеята за IL-17A усилване на тип 2 имунния отговор при БА.

Agache и сътр. разглеждат нивата на IL-17A в серума, като независим рисков фактор за развитието на тежка БА (13). Активността на Th17 води до повишена контрактилността и пролиферация на гладките мускули на дихателните пътища и се свързва по-често с КС резистентност и неутрофилна БА (74, 153, 224, 432). Agache и Akdis (12) представят идея за смесен тип2/Th17 ендотип. Те предполагат, че имунният отговор от тип 2 и IL-17 може да причини прекомерно увреждане на тъканите. Th2/Th17 клетки са идентифицирани (89) в БАЛ на пациенти с БА, КС резистентност и обструкция на дихателните пътища (182). Seys и сътр. (384) описват "IL-5, IL-17A, IL-25-висока" възпалителна картина на дихателните пътища при възрастни пациенти с неконтролирана БА, въпреки поддържащата терапия. Резултатите от Hasegawa и сътр. (161) също показват повишена регулация на IL-17A във връзка с цитокини от тип 2 в

серум на неконтролирани пациенти. Допълнителни анализи в U-BIOPRED (226) идентифицират два отделни модела свързани с висока експресия на тип 2 цитокини и липса на КС отговор: 1. Висока тъканна еозинофилия, FeNO и екзацербации и 2. Висока спутумна еозинофилия и ИТМ. Учените от U-BIOPRED (444) разработват също модел на Th1,Th2 и Th17 фенотип с релативна КС резистентност при рефрактерна БА.

На скоро докладвани данни в кохорта на 42 деца в България с БА и кистична фиброза, които са в съответствие с нашите данни за значимо повишение на тип 17 имунния отговор при децата с тежка, неконтролирана БА (440).

Хетерогенността на изследваната популация ни даде възможност да оценим способността на биомаркерите от тип 2 (b-Eos и FeNO) за идентифициране на по-тежки групи БА в реалната клинична практика. Установихме, че СТА и ТА показват различен серумен профил на интерлевкини. Идентифицирането на типа 2 / IL-17A, описано в нашето проучване, може да се използва за по-добра стратификация на пациентите при разработването на нови терапии.

Базирайки се на този подход за селекция на пациентите, открихме съществуването на различни фенотипи еозинофилна БА (със и без съпътстващ IL-17A имунен отговор) с различно ниво на контрол, тежест и екзацербации. Пациентите с еозинофилен/IL-17A фенотип са със значително по-тежко протичащо заболяване, като тези с комбинирано повишение на FeNO/b-Eos/IL-17A са с най-тежката форма на БА, а при комбинирано повишение на FeNO/IL-17A имат по-малко симптоми, но повишена честота на екзацербации. Пациентите с изолирана еозинофилна БА без повишение на IL-17A оформиха ясно група със затлъстяване и комбинирана активност на IL-5 с неутрофилно асоциирани медиатори, като IL-6 и IL-8. Интересни биха били данните при сравнение на групите спрямо отговора им към биологична (анти-IgE и анти-IL-5) терапия в бъдеще.

Нивото на серумен периостин беше значимо повишено във всички групи при сравнение със ЗК, но не установихме статистически значими различия между групите на висока тип 2 и ниска тип 2 БА. Отчетохме пикови нива в средните му стойности в група 3, където IL-13 също беше с пикови средни стойности, което може да демонстрира тенденция за асоциация между двата маркера. За съжаление не беше възможно измерването на серумен периостин и IL-8 при всички пациенити с БА, но

бъдещи наши проучвания ще ни дадата повече информация за допълнителни техни асоциации.

При 8 (42.1%) от настоящите тютюнопушачи установихме положителни биомаркери за тип 2 БА, подобно на проучването на Pavlidis и сътр. (307) 50% от настоящите тютюнопушачи също са класифицирани с тип 2 висока БА.

Morgensen и сътр. (276) провеждат проучване (NHANES) (n=1419), използвайки различни гранични стойности за FeNO и кръвните еозинофили със сходен дизайн на нашия анализ. В проучването са включени пациенти от различни възрастови групи (от 6 до 79 год.), с различна тежест на БА, като данните за диагноза и екзацербации са базирани на съобщена от пациентите информация и липсват данни за резултати от КАП. Техните резултати показват, че при едновременно повишение на биомаркерите има намалена белодробна функция и повече симптоми, а високите кръвни еозинофили са свързани с повишена честота на екзацербации. Те не установяват повишение в честотата на екзацербациите в асоциация с нивата на FeNO. Това различие с докладваните от нас резултати е възможно да се дължи на различия в селекцията на пациентите и характеристиките на двете популации.

6.6 Обсъждане на резултатите към задача 6

Чрез клъстерен анализ определихме разделението на пациентите в 3 групи с 5 подгрупи (клъстера) с отделни доминиращи характеристики във всяка група.

В първата група пациенти (n=20; 37.8%) установихме доминираща експозиция на цигарен дим на фона на основни астматични характеристики (високи кръвни еозинофили и атопия) и късно начало на БА. Тази група нарекохме - БА при тютюнопушене и късно начало с модел на комбинирана висока IL-6/IL-8/IL-13/IL-17A системна реакция при сравнение със ЗК и се състоеше от два клъстера – С1 и С2. Атопичната БА доминираше в С2. В С1 продължителността на БА беше по-голяма от тази в С2, което рефлектира на понижена белодробна функция и почти всички участници в С1 бяха с персистираща бронхиална обструкция, за разлика от тези в С2. По-висока честота на лошо контролирана БА и високи симптоми установихме в С2 при сравнение с С1, но честотата на екзацербациите беше еднаква. На базата на характеристиките на С1 за БА с голяма продължителност при възрастни пациенти и висока експозиция на тютюнев дим с персистираща бронхиална обструкция и висока вариабилност приехме, че този клъстер изпълнява характеристиките на БА-ХОББ

синдром на припокриване (АСО). В този клъстер установихме модел на висок IL-6/IL-13.

В групата БА при тютюнопушене и късно начало установихме значимо повишение на IL-13 при сравнение със ЗК, което е в съответствие с данни на Llano и сътр. [460], където IL-13 е основно свързващо звено в мрежов анализ на три бронхообструктивни състояния (БА, ХОББ и АСО). Пациентите в С2 споделят общи характеристики с С1, но БА в С2 е с по-кратка продължителност, повече симптоми при висока честота на атопия и лошо придържане. Пациентите в С2 имат предимно запазена белодробна функция, но ние предполагаме, че при персистиране на описаните характеристики на групата би последвал прогресивен спад на функционалните показатели и преминаване на тези пациенти в С1. Ние намерихме модел на висок IL-6/IL-8 системен имунен отговор в С2, което подкрепя резултатите ни към задача 5 за асоциация на IL-8 с фенотип асоцииран с тютюнопушенето.

Повишените нива на IL-6, както в клъстера на тютюнопушачите и при тези с еозинофилна БА, свързваме с по-възрастната популация, селектирана в тези групи, в асоциация с корелационната зависимост с възрастта на този маркер установена в цялата популация на пациенти с БА в нашето проучване. Възможно е IL-6 при по-възрастните пациенти в тези групи да отразява имунорегулаторни нарушения настъпили с напредване на възрастта и продължителността на БА (255). Предходни проучвания потвърждават, че стареенето води до повишени нива на циркулиращи цитокини като TNFa, IL-1 и IL-6, които са във връзка с негативни здравни резултати и по-висока смъртност. Причината за повишените нива на IL-6 при възрастни хора, е неясна. Вероятно са във връзка с последователно, нискостепенно активиране на възпалителните клетки с напредване на възрастта (339).

При идентифицираната втора група пациенти (n=18; 34%) установихме доминираща атопия при ранно начало на БА. Тази група нарекохме – атопична БА с модел на изолирано повишение на IL-17A при сравнение със ЗК и се състоеше от два клъстера – С3 и С4. Всички пациенти в С3 и С4 бяха с установена алергия към инхалаторни алергени чрез КАП и високи средни нива на общи IgE. Пациентите в С4 се отличаваха от тези в С3, предимно по ИТМ. В С3 бяха селектирани пациентите с атопична БА с ранно начало и нормален ИТМ, непушачи с добра белодробна функция. При сравнение на С3 с С2 (атопична БА при пушачи с нормална белодробна функция), установихме ясни различия. Пациентите в С2 бяха с по-висока експресия на симптоми

и повишена еозинофилна и неутрофилна реакция в периферна кръв, което отразява неблагоприятното въздействие на тютюнопушенето при атопични пациенти. Късното начало на БА при пушачи предполага възможно участие на тютюнопушенето като допълнителен рисков фактор за възникване на БА при атопични пациенти.

Ние набюдавахме по-висока честотата на екзацербации в групата на атопичните непушачи, най-вероятно поради по-ниска употреба на медикаменти (n=4; 40% на стъпка 3 по GINA) при ниска експресия на симптоми и нормална белодробна функция, при персистиращо възпаление. Това поставя болните в риск от по-чести екзацербации, което налага разработване на допълнителни стратегии за оценка на контрола при тези болни и предотвратяване на бъдещия риск.

Ние наблюдавахме модел на висок IL-17A системен отговор в С3, което е в подкрепа на данните ни представени към задача 5, за IL-17A медиирано усилване на възпалителния отговор при Т2 ТА с чести екзацербации.

Пациентите в С4 бяха предимно мъже с атопична БА, затлъстяване, повече симптоми при сравнение с С3 и по-ниска белодробна функция, на фона на нисък FeNO, а високи кръвни еозинофили, поради което тази група наподобява описаната група 2 от анализа в задача 5 и най-вероятно представя субселекция на пациенти от нея. Тези данни отново подкрепят съществуването на фенотип БА със затлъстяване и атопия при мъже с комбиниран еозинофилно/неутрофилен системен възпалителен модел и високи нива на CRP.

В третата група (клъстер С5) (n=15; 28.3%) установихме доминираща еозинофилия и късно начало на БА. Атопията беше по-слабо изразена, честотата на коморбидностите беше различна, като доминираха затлъстяване и AERD. Въпреки, че придържането към терапията беше високо, се наблюдаваха висока перифирна еозинофилия и високи нива на FeNO, съпътствани от лош контрол и чести екзацербации при висока употреба на КС. Този клъстер се представи с модел на повишение на IL-5, IL-6, IL-13 и IL-17A, като системна реакция при сравнение със ЗК. В клъстер 5 бяха измерени най-високите серумни нива на IL-17A, подобно на резултатите ни в група 4 от задача 5.

Както в предходния анализ, така и тук откриваме базисно повишение на серумните нива на IL-17A при всички фенотипи на ТА при сравнение със ЗК, но пиковите повишения на този серумен маркер в едни от най-тежките фенотипи ни кара

да приемем неговото съвместно участие при развитието или модифицирането на Т2 ТА. Група 4 и С5 показват значимо припокриване, което ни кара да приемем, че сме дефинирали фенотип в реалната практика на резистентна висока Т2/IL-17А ТА.

Анализирахме корелационните зависимости в клъстерите и установихме, че в С1 (АСО) повишението на CRP е свързано с по-ниска бронхиална реверзибилност и по-висок ИТМ, докато нивата на FeNO намаляват правопропорционално на повишението на кръвните неутрофили, които индиректно отразяват не-Т2 имунният отговор при БА и тютюнопушене. В С2 (БА при атопични пушачи с лошо придържане) повишението на FeNO се асоциира с по-висок бронходилататорен отговор. В С3 (атопична БА с ранно начало при непушачи) установихме намаление на FeNO при нарастване броя на пакетогодините и увеличение на екзацербациите в асоциация с повишение на серумните нива на IL-17A. В С4 (атопична БА със затлъстяване) повишението на ИТМ правопропорционално е свързано с намален контрол, оценен чрез АСТ. В С5 (еозинофилна БА с късно начало) установихме силни асоциации на кръвните еозинофили с IL-5 и ACQ (5,6,7), а от друга страна на IL-5 с ACQ (5,6,7) и екзацербациите, като по-високият ACQ е свързан с по-чести екзацербации през последната година.

Ние сравнихме нашите данни с резултатите на други изследователи и анализирахме приликите и различията в резултатите.

Така установихме различия в дизайна на нашето проучване при сравнение с проучването ADEPT (252). ADEPT е лонгитудинално проучване, в което участват непушачи с ЛБА, СТА и ТА, като пациенти със скорошна екзацербация, значително неконтролирани или силно рефрактерни на лечение и на ОКС са били изключени поради опасения за сигурността при провеждане на ФБС.

Проучването допринася за изясняване стабилността на фенотипите и биомаркерите във времето. Авторите установяват силна вариабилност на инфламаторния фенотип установен чрез спутумна цитология, както и повлияване на характеристиките вследствие външни въздействия и вирусни инфекции.

В ADEPT са анализирани 4 клъстера, които остават стабилни във времето. ADEPT също идентифицира клъстер със смесено възпаление и ТА, но предвид посочените различия, както и различията в методите и използваните вариабилни при анализа,

сравнението на клъстерите от ADEPT с тези в нашето проучване е затруднено. ADEPT също идентифицира клъстер със смесено възпаление и ТА.

В проучването U-BIOPRED (238) се очертава ясна граница между ТА и трудна за лечение БА. Тежестта на БА е определена според приетите критерии след строга оценка на придържане и допълнителни въздействащи фактори, подобно на нашия подход. В кохортата на U-BIOPRED са включени пушачи, бивши пушачи и непушачи с ТА и чрез омник подход са идентифицирани 4 клъстери:

Клъстер 1, с добре контролирана СТА и ТА, нормална функция, ниска спутумна еозинофилия, висока пропорция на атопични пациенти и много малка употреба на ОКС съответства на описания от нас С3.

Клъстер 2, който се припокрива с нашия С1 включва ТА с късно начало при пушачи с ниска пропорция на атопични пациенти с лош контрол, тежка обструкция и най-висока спутумна и кръвна еозинофилия.

В клъстер 3 са селектирани непушачи с ТА и хронична обструкция на въздушния поток с по-висока пропорция на атопична БА. Тези характеристики частично се припокрива с нашия С5.

Клъстер 4 включва затлъстели жени с чести екзацербации, позитивен атопичен статус и лошо качество на живот, въпреки нормалната белодробна функция. Този клъстер не намери припокриване с някой от нашите.

В SARP1/2 (280) са определени 5 клъстера при пациенти с ЛБА, СТА и ТА на базата на 34 вариабилни (11 след дискриминационен анализ) за фенотипизиране. Използваните характеристики в клъстерния анализ включват: възраст, начало и продължителност на БА, ИТМ, пол, раса, пре- и пост ФЕО1, ФВК, ФЕО1/ФВК, обратимост, атопия, симптоми, екзацербации, съпътстващи заболявания и лечение. Различията с нашето проучване са основно в изключването от участие на пушачи и анализа на спутумни и БАЛ проби в SARP.

Клъстер 2 и клъстер 4 (атопична БА) на SARP1/2 се припокриват частично с характеристиките на С3 и С4 в нашето проучване, въпреки различията в дизайна и методологията. В тези клъстери се установява по-висока честота на СТА, но непосрещната нужта от намаляване броя на екзацербациите.

Клъстер 3 и клъстер 5 от SARP1/2 съответстват на С5 от нашия анализ - ТА, ниска функция, екзацербации, смесен възпалителен тип, по-малко атопични. В клъстер 3 на SARP са селектирани пациенти с по-леко нарушение на белодробната функция и по-висок ИТМ. Възможно е в нашия С5 да е включена (40% са със затлъстяване в С5) субгрупа от тези пациенти, но поради еозинофилията и тежкото протичане да са селектирани в един общ клъстер.

SARP3 (98, 421) е проучване, което е проведено след SARP1/2, като кохортата се различава значително по честотата на ТА (60% ТА). Използваните 11 вариабилни от SARP1/2 отново доказват добра репродуктивност на 5-те клъстери, като в кръстери 3, 4 и 5 на SARP3 отново са селектирани по-тежките форми на БА. Разкриват се основни аспекти във фенотипизирането. Изследователите доказват, че традиционната БА с ранно начало и атопия съществува във всякаква по тежест БА и има реална възможност за поддържане на нормална белодробна функция, въпреки по-дългата продължителност. Тези данни са в съответствие с характеристиките на С3 в нашият анализ. Съществува клъстер (С5 SARP3) с късно начало, фиксирана обструкция, повече коморбидности и висок риск от екзацербации, съответващ на нашият С5. Идентифицирана е малка група с късно начало и затлъстяване, но с нормална функция (С3 SARP3). Такава група не беше идентифицирана в нашето проучване, но идентифицирахме атопична БА със затлъстяване при мъже с ранно начало.

Въпреки, че клиничните клъстерни фенотипи са сформирани на базата на данните, които успяваме да придобием в реалната клинична практика, липсват доказателства, че този начин на фенотипизиране е подходящ за разпознаване на подлежащите механизми, които определят развитието и персистирането на БА. Поради тази причина изследователите провеждат допълнителен анализ, базиран на биомаркери (FeNO, инфламаторни клетки от кръв, БАЛ и спутум) в кохортата от пациенти на SARP (279). Те откриват, че еозинофилното възпаление в кръв и спутум е представено във всички клъстери и не е специфично само за алергичната БА. Подкрепят идеята за не Т2 имунни реакции, въздействащи върху тежестта на БА самостоятелно или в комбинация с Т2 високи механизми.

Чрез лесно достъпни за практиката методи (неинвазивна оценка на издишан въздух и кръвни маркери) ние също потвърдихме наличието на смесен Т2 и не-Т2 имунен отговор при ТА. Смесеният възпалителен фенотип при тютюнопушене (С1, С2) и затлъстяване (С4) бяха очаквани, но наблюдавахме съпътстващо повишение на IL-

17A (маркер предимно за не Т2 БА) в С3 и С5, където биомаркерите за Т2 БА бяха най-силно силно изявени. Механизмите по-които IL-17A се намесва в имунния отговор са неясни, но нашите данни показват асоциация с по-тежка изява на БА при повишение на серумните му нива.

Точно идентифициране на пациенти с висок Т2 е с изключително приложно значение поради възможността за провеждане на биологично таргетно лечение. Въпреки положителните корелации зависимости между достъпните Т2 биомаркери (еозинофили в кръвта, FeNO и серумен IgE), прилагайки ги самостоятелно или комбинация за предсказване на еозинофилен спутумен фенотип 25% от пациентите в SARP1/2 може да се класифицират погрешно (164). В търсене на по-сензитивен биомаркер за Т2 БА, авторите на SARP3 дефинират "тип 2 генетична среда (T2GM)", чрез измерване на генната експресия на типичния Т2 висок профил (IL-4, IL-5 и IL-13) в спутума (316). Те откриват, че при 55% от пациентите Т2 възпалението не бива подтиснато при системно приложение на КС и остават с “висок“ T2GM модел – резистентна Т2 БА. В проучването на Peters и сътр.(316) при 45% от пациентите с ТА не е доказано Т2 възпаление на базата на T2GM. При пациентите с доминираща не Т2 (или Т2 ниска) БА ползата от Т2 биологичната терапия е минимална.

Чрез базиран на биомаркери анализ ние установихме, че около 70% от пациентите са с Т2 висок фенотип, но чрез клъстерния анализ открихме допълнителни сложни взаимовръзки между клиничните и възпалителни Т2 и не-Т2 характеристики. Проследяване на клъстерите с ТА биха ни осигурили важна информация за отговора към биологичната терапия.

С. Лазова (4) използва подобен на нашият метод за клъстерен анализ в своя дисертационен труд и установява съществуването на 5 клъстера при деца с БА в България, като в клъстер 3 установяват доминиране на деца с ТА.

6.7 Обсъждане на резултатите към задача 7

На базата на препоръките за определяне на Т2 ТА и не Т2 ТА на GINA 2019 установихме, че всички пациенти с ТА в нашето проучване попадат в групата на Т2 ТА (b-Eos ≥ 150 cells/microL и/или FeNO ≥ 20 ppb и/или алергична БА и/или нужда от СКС) спрямо един или повече от критериите. Избрът на гранични стойности на Т2 биомаркерите в GINA е базиран на най-ниската стойност асоциирана в проучванията с отговор към биологична терапия.

Държим да отбележим, че все още няма категорично утвърдени гранични стойности за биомаркерите в практиката, които да са общоприети за дефиниране на Т2 БА.

Критериите за започване на анти IgE терапия са утвърдени вследствие на дългогодишната употреба на лечението, като до 2018 год. в България анти IgE терапията беше единственото биологично лечение одобрено за лечение на пациентите с ТА.

През последните години проучвания с анти-IL5/IL5R и анти IL4R (анти IL-4/IL13) демонстрираха данни за значима клинична полза с намаляване честотата на екзацербациите при пациенти с повишен абсолютен брой на кръвните еозинофили. В повечето проучвания бе приета гранична стойност за кръвните еозинофили $\geq$ 300 cells/microL. В последствие при провеждане на субанализ на дните изследователите установиха, че клинично значима разлика в честотата на екзацербациите започва да се наблюдава още при гранична стойност от $\geq$ 150 cells/microL и прогресивно тази полза нараства с увеличението на кръвните еозинофили измерени преди включване на терапията. В България през 2018 г. беше одобрена анти IL-5 терапията и бяха приети критерии за започването ѝ, като граничната стойност на кръвните еозинофили, съответстваше на заложените международни препоръки от $\geq$ 300 cells/microL. Анти IL4R (Анти IL4/IL13) и другите биологични терапии насочени срещу IL-13, TSLP и др. все още не са одобрени за лечение на пациенти с ТА в България. През 2018 г. в САЩ, а през 2019 г. и в Европа беше одобрено използването на анти IL4R биологична терапия при еозинофилен фенотип ТА.

Значителното препокриване на терапевтичнити възможности повдига въпроса за биомаркери, определящи и насочващи избора на най-подходящата биологична терапия. Такива предиктивни биомаркери според GINA 2019 за анти-IgE терапия са ранно начало на заболяването, изразена алергенна хиперсензитивност, високи нива на FeNO и b-Eos, докато за анти-IL5 са късната изява на БА, назална полипоза, по-чести екзацербации и високи еозинофили. За анти-IL4R (анти-IL4/IL13) предиктивни биомаркери са високите нива на FeNO и кръвни еозинофили. Става ясно, че дори при предиктивните биомаркери за терапивтичен отговор има значителна степен на препокриване. Има непосрещната нужда от определяне на гранични стойности за биомаркерите на които да се базира избора на терапия. Бъдещи проучвания и наблюдения ще внесат повече яснота в терапевтичното поведение.

Базирайки се на наши и литературни данни изготвихме алгоритъм за поведение при подозрение за ТА и избор на биологична терапия.

Определихме индивидуализиран подход към дефинираните от нас фенотипи чрез биомаркерно базиран и клъстерен подход.

VII. Заключение

Бронхиалната астма е хетерогенно заболяване според своята клинична изява и подлежаща имунопатология. Дялът на пациентите с недобре контролирана БА остава значителен поради множество фактори и въздействия, въпреки наличните терапевтични възможности.

Пациентите с ТА остават с незадоволителен контрол при използване на наличните терапевтични стратегии, основаващи се на приложението на КС, а приложението на таргетно биологично лечение изисква индивидуализиран подход.

Чрез придобиване на познания за подлежащите молекулярни пътища на активация на имунната система нараства възможността за определяне на успешно лечение в правилната доза и продължителност.

Комплексната имунна активация при ТА е отражение на вродени фактори, модифицирани от въздействия на околната среда, което прави патогенезата на БА изключително сложна. В нашето проучване доказахме съществуването на утвърдени през годините клинични фенотипи на атопична БА, еозинофилна БА, БА с ранно или късно начало, БА при тютюнопушене, БА и затлъстяване, AERD, БА с фиксирана бронхиална обструкция, БА и чести екзацербации и др. Потвърдихме в голяма част техните индивидуални асоциации с контрол, тежест и екзацербации. Клиничната класификация, обаче се оказва недостатъчна за разкриване на подлежащите имунопатологични пътища. Използвахме два отделни подхода (базиран на биомаркери, клъстерен анализ) за класификация на пациентите и открихме значими различия в системния профил оценен на базата на биомаркери и серумни медиатори в отделните групи пациенти.

Фенотипните прояви в нашето проучване се припокриват значително с идентифицирани в големите кохорти фенотипи, въпреки различията в изследваните популации и дизайна на проучванията. Отчитаме, като лимитиращ фактор на нашето

проучване липсата на лонгитудинална фаза за проследяване стабилността на идентифицираните характеристики.

Въпреки това нашите данни допринасят за разбирането на подлежащите възпалителни механизми, както и за анализ на факторите в реалната клинична практика, свързани с повишен риск от екзацербации и лош контрол при пациентите с ТА и неконтролирана СТА.

Установихме два клъстера (С2 и С3) на пациенти във висок риск от екзацербации поради тютюнопушене, непридържане или недостатъчна терапия при ниска изява на симптоми. Ясно отдиференцирахме клъстер на пациенти със затлъстяване, атопична БА и еозинофилно възпаление, което не може да бъде мониторирано прицизно чрез измерване нивата на FeNO. Необходими са допълнителни проучвания за определяне на гранични стойност за FeNO при тази фенотипни изява.

Определихме два клъстера (С1 и С5), проявяващи се с изразена бронхиална обструкция и високи симптоми. С1 дефинирахме, като фенотип с висока реверзибилност при тютюнопушачи (АСО). Дългата продължителност на БА в комбинация с експозиция на тютюнев дим в този клъстер ясно дава отражение на контрола и тежестта на БА. Предполагаме, че С2 (БА при тютюнопушене с лошо придържане при запазена функция) е възможно във времето да прогресира до развитие на С1. С5 се явява най-тежкият клъстер в нашето проучване с висока симптоматика, екзацербации и нарушена функция при висока еозинофилия. В този клъстер можем да говорим за идентифицирането на молекулярен фенотип БА свързан с комбинирана Т2/IL-17А имунна реакция.

Използвахме литературните данни, нашия опит и получените резултати за изготвяне на алгоритъм за поведение при оценка на пациентите с ТА и насоки за индивидуализирано лечение.

VIII. Изводи

1. Бронхиалната астма е хетерогенно заболяване, при което се наблюдават 4 клинични фенотипа, 4 фенотипа чрез биомаркерна класификация и 5 клъстера чрез непреднамерен клъстерен анализ.

2. Идентифицират се 4 клинични фенотипа: атопична, неeозинофилна БА с ранно начало и високи общи IgE; атопична, еозинофилна БА с късно начало, лош контрол и високи IgE; неатопична еозинофилна БА с късно начало, лош контрол и персистираща бронхиална обструкция; неатопична, неeозинофилна предимно СТА с добър контрол и запазена белодробна функция.

3. На базата на биомаркерна класификация се обособяват 4 фенотипа СТА и ТА: Т2 ниска БА при атопични тютюнопушачи, Т2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване, Т2 висока БА с атопия и чести екзацербации, Т2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна на лечение БА.

4. Чрез клъстерен анализ се идентифицират 3 клъстерни групи на ТА и неконтролирана СТА: БА при тютюнопушачи, атопична БА и еозинофилна БА.

5. БА при тютюнопушачи се състои от 2 отделни клъстера: С1 – БА с ниска белодробна функция и висока реверзибилност, дълга продължителност и доминиращ IL-6/IL-13 серумен модел; С2 – БА със запазена функция, повече симптоми при атопия и лошо придържане и доминиращ IL-6/IL-8 серумен модел.

6. В атопичната БА се забелязват 2 отделни клъстера: С3 - Атопична БА с ранно начало, чести екзацербации и доминиращ IgE/IL-17A серумен модел; С4 - БА със затлъстяване при атопични мъже с доминиращ IgE/CRP/b-Neu системен модел.

7. В клъстер 5 на еозинофилна БА доминира IL-5/IL-6/IL-13/IL-17A серумен модел, като повишението на IL-17A е най-отчетливо и отразява активираният смесен системен имунен отговор в тази група. Характеристиките на клъстер 5 и група 4 от биомаркерния анализ се припокриват значително и отразяват най-тежката проява на БА в нашето проучване, което предполага, наличие на смесен фенотип на резистентна Т2/IL-17A ТА.

8. Рискови фактори за чести екзацербации при БА са лош контрол, високи кръвни еозинофили и FeNO, тежка БА, назална полипоза и персистиращ ринит, ниски белодробни функционални показатели и високи нива на IL-5.

9. Високите кръвни еозинофили доказано се асоциират с намален контрол, понижение на белодробната функция, ТА, по-чести екзацербации и серумни нива на IL-5, докато с FeNO показаха умерена зависимост.

10. FeNO се асоциира с висока бронхиална реверзибилност при пациенти с неконтролирана БА и лошо придържане, което отразява неговата допълваща информационна сила при оценка на тези пациенти и доказахме асоциацията му със серумните нива на IL-13, което го прави потенциален, доминиращ биомаркер при избор на биологична анти-IL-13 терапия.

11. Серумните нива на IL-6 са в асоциация с възрастта, CRP, IL-8 и кръвните неутрофили, което потвърждава ролята му, като маркер на нискостепенното системно възпаление.

12. Серумните нива на периостин се асоциират с понижени функционални характеристики, но нямат директна връзка с Т2 характеристики на БА.

IX. Приноси

С оригинален характер:

1. За пръв път в България се провежда клъстерен анализ на базата на комплексна оценка на клинико-възпалителни и имунологични характеристики с цел фенотипизиране и индивидуален подход при СТА и ТА в реалната клинична практика.

2. Идентифицирахме Т2 тежък, рефрактерен на лечение фенотип с повишени серумни нива на IL-17A.

3. Доказахме, че серумните нива на IL-5 са рисков фактор за чести екзацербации и идентифицирахме фенотип на AERD, свързан с отчетливо повишение на серумните нива на IL-5.

4. Установихме, че при затлъстяване FeNO може да бъде неадекватен биомаркер за еозинофилно възпаление, което налага неговата внимателна употреба при тази група пациенти с БА при взимане на терапевтични решения.

5. Доказахме асоциация на високите серумни нива на периостин с понижени показатели на белодробната функция и липса на директна връзка с Т2 БА.

С потвърдителен характер:

1. ТА при възрастни се характеризира с доминиране на женския пол, висока изява на симптоми и коморбидности, ниска белодробна функция, чести екзацербации, високи кръвни еозинофили и общи IgE.

2. БА с Т2 характеристики е с по-тежко протичане.

3. Коморбидностите имат пряко въздействие върху контрола на БА и съчетанието между тях води до значителна изява на симптоми.

4. Установихме притеснително висока честота на тютюнопушене при пациенти с БА в съответствие с докладваните данни от международни и национални проучвания. Комбинацията от непридържане към терапията при настоящите тютюнопушачи поставя тази пациентска група в сериозен риск за възникване на късни последици.

5. БА остава неконтролирана при висок процент от пациентите със СТА и ТА, като ACQ показа по-добро съвпадение с критериите на GINA при определяне на лошо контролирана БА.

6. Доказахме, че използваните въпросници за оценка на контрола имат добра специфичност и чувствителност за употреба в клиничната практика.

7. Доказахме ролята на кръвните еозинофили, като фактор за по-тежко протичаща БА и чести екзацербации.

8. Доказахме ролята на FeNO, като предиктор за чести екзацербации.

С приложен характер:

1. Подобри се придържането и се оптимизира терапията на групите с неконтролирана БА.
2. Потвърди се практическото значение на изследваните биомаркери.
3. Определиха се гранични стойности за серумните медиатори на базата на изследвани ЗК.
4. Изработи се алгоритъм за поведение и персонализиран подход при лечение на ТА.
5. Болните с ТА бяха оценени, класифицирани и насочени за биологично лечение според индивидуалните им характеристики.

X. Книгопис

1. Генкова Н. Роля на нивата на азотен окис в издишан въздух за диагностиката на някой белодробни заболявания във възрастта 5-18 години. Дисертационен труд, Пловдив. 2016;
2. Димов Д. Проучване ролята на генетични фактори в развитието на ХОББ и бронхиална астма. Дисертационен труд, София. 2013;
3. Иванов Я. Бронхиална астма. Проблеми на диспансерното обслужване и лечение. Фармако-икономически анализ. Дисертационен труд, София. 1999;
4. Лазова С. Клинично значение на функционалното изследване на дишането и атопичния статус при деца с астма. Дисертационен труд, София. 2017;
5. Маркова Р. Изследване на издишания азотен окис при деца с бронхиална астма. Дисертационен труд, София. 2016;
6. Стоева Т. Клинико-функционална характеристика, неинвазивни маркери на белодробното възпаление и контрол при деца с бронхиална астма. Дисертационен труд, Варна. 2017;
7. Цочева И. Клинични, имунологични и генетични особености на бронхиалната астма в детската възраст. Дисертационен труд, София. 2006;
8. Юрукова В. Ролята на азотния окис в респираторната патофизиология. Пневмология и фтизиатрия. 2000;1:42–46.
9. Юрукова В. Клинико-имунологични аспекти на леката бронхиална астма. Дисертационен труд, София. 2002;
10. Юрукова В., Роси Д. Измерване на азотен окис при атопични деца с лека астма. Пневмология и фтизиатрия. 2001; 3:14–17.
11. Aburuz S, McElnay J, Gamble J, Millership J, Heaney L. Relationship Between Lung Function and Asthma Symptoms in Patients with Difficult to Control Asthma. Journal of Asthma. 2005; 42(10):859–864.
12. Agache I, Akdis C. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. Allergology International. 2016; 65(3):243–52.
13. Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. Respiratory Medicine. 2010; 104(8):1131–1137.
14. Agache I, Strasser D, Klenk A, Agache C, Farine H, Ciobanu C, et al. Serum IL-5 and IL-13 consistently serve as the best predictors for the blood eosinophilia phenotype in adult asthmatics. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2016; 71(8):1192–202.
15. Agrawal A, Mabalirajan U, Ahmad T, Ghosh B. Emerging Interface between Metabolic Syndrome and Asthma. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2011; 44(3):270–275.
16. Agrawal S, Townley R. Role of periostin, FENO, IL-13, lebrikzumab, other IL-13 antagonist and dual IL-4/IL-13 antagonist in asthma. Expert Opinion on Biological Therapy. 2014; 14(2):165–181.
17. Akiki Z, Rava M, Diaz Gil O, Pin I, le Moual N, Siroux V, et al. Serum cytokine profiles as predictors of asthma control in adults from the EGEA study. Respiratory medicine. 2017; 125:57–64.
18. Aleman F, Lim H, Nair P. Eosinophilic Endotype of Asthma. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2016; 36(3):559–68.
19. Allegra L, Cremonesi G, Girbino G, Ingrassia E, Marsico S, Nicolini G, et al. PRISMA (PRospectIve Study on asthMA control) Study Group Real-life prospective study on asthma control in Italy: Cross-sectional phase results. Respiratory Medicine. 2012; 106(2):205–214.
20. Alwakil I, Kabeer A, Ashraf M, Kabil T, Abdelmonem A. Serum Interleukin-6 and Interleukin-8 in bronchial asthma. AAMJ. 2011; 9(3):385–396.
21. Amaral R, Fonseca J, Jacinto T, Pereira A, Malinovschi A, Janson C, et al. Having concomitant asthma phenotypes is common and independently relates to poor lung function in NHANES 2007–2012. Clinical and Translational Allergy. 2018; 8:13.
22. Amelink M, de Nijs S, de Groot J, van Tilburg P, van Spiegel P, Krouwels F, et al. Three phenotypes of adult-onset asthma. Allergy. 2013; 68(5):674–680.
23. American Thoracic Society, European Respiratory Society ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2005; 171(8):912–930.
24. Anderson G. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. The Lancet. 2008; 372(9643):1107–1119.
25. Annesi-Maesano I, Oryszczyn M, Raherison C, Kopferschmitt C, Pauli G, Taytard A, et al. Increased prevalence of asthma and allied diseases among active adolescent tobacco smokers after controlling for passive smoking exposure. A cause for concern? Clinical and Experimental Allergy. 2004; 34(7):1017–23.
26. Antoniu S. Lebrikizumab for the treatment of asthma. Expert Opinion on Investigational Drugs. 2016; 25(10):1239–1249.
27. Antus B, Horvath I, Barta I. Assessment of exhaled nitric oxide by a new hand-held device. Respiratory

Medicine. 2010; 9(104):1377–80.
28. Arima K, Ohta S, Takagi A, Shiraishi H, Masuoka M, Ontsuka K, et al. Periostin contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis common to atopic dermatitis. Allergology International. 2015; 64(1):41–48.
29. Arron J, Choy D, Scheerens H, Matthews J. Noninvasive biomarkers that predict treatment benefit from biologic therapies in asthma. Annals of the American Thoracic Society. 2013; 10:S206-13.
30. Auger L, Mailhot-Larouche S, Tremblay F, Poirier M, Farah C, Bossé Y. The contractile lability of smooth muscle in asthmatic airway hyperresponsiveness. Expert Review of Respiratory Medicine. 2016; 10(1):19–27.
31. Badorrek P, Müller M, Koch W, Hohlfeld J, Krug N. Specificity and reproducibility of nasal biomarkers in patients with allergic rhinitis after allergen challenge chamber exposure. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2017; 118(3):290–297.
32. Bagnasco D, Ferrando M, Varricchi G, Passalacqua G, Canonica G. A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma. International Archives of Allergy and Immunology. 2016; 170(2):122–131.
33. Baines K, Simpson J, Wood L, Scott R, Gibson P. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011; 127(1):153-160.
34. Baraldi E, Zanconato S. The labyrinth of asthma phenotypes and exhaled NO. Thorax. 2001; 56(5):333–335.
35. Barlow J, Peel S, Fox J, Panova V, Hardman C, Camelo A, et al. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13–producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013; 132(4):933–941.
36. Barnes P, Belvisi M. Nitric oxide and lung disease. Thorax. 1993; 48(10):1034–43.
37. Barranco P, Phillips-Angles E, Dominguez-Ortega J, Quirce S. Dupilumab in the management of moderate-to-severe asthma: the data so far. Therapeutics and clinical risk management. 2017; 13:1139–1149.
38. Bates J, Poynter M, Frodella C, Peters U, Dixon A, Suratt B. Pathophysiology to Phenotype in the Asthma of Obesity. Annals of the American Thoracic Society. 2017; 14:395–398.
39. Bel E. Severe asthma. Breathe. 2006; 3(2):128–139.
40. Bel E, Sousa A, Fleming L, Bush A, Chung K, Versnel J, et al. Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). Thorax. 2011; 66(10):910–917.
41. Bel E, Wenzel S, Thompson P, Prazma C, Keene O, Yancey S, et al. SIRIUS Investigators Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Mepolizumab in Eosinophilic Asthma. New England Journal of Medicine. 2014; 371(13):1189–1197.
42. Bellamy D, Harris T. Poor perceptions and expectations of asthma control: Results of the International Control of Asthma Symptoms (ICAS) survey of patients and general practitioners. Primary Care Respiratory Journal. 2005; 14:252–258.
43. Berry M, Hargadon B, Morgan A, Shelley M, Richter J, Shaw D, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. European Respiratory Journal. 2005; 25(6):986–991.
44. Berry M, Parker D, Neale N, Woodman L, Morgan A, Monk P, et al. Sputum and bronchial submucosal IL-13 expression in asthma and eosinophilic bronchitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004; 114(5):1106–1109.
45. Biomarker Working Group FDA-NIH. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016.
46. Bjermer L, Lemiere C, Maspero J, Weiss S, Zangrilli J, Germinaro M. Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma With Elevated Blood Eosinophil Levels. Chest. 2016; 150(4):789–798.
47. Bjornson C, Mitchell I. Gender differences in asthma in childhood and adolescence. The journal of gender-specific medicine : JGSM : the official journal of the Partnership for Women's Health at Columbia. 3(8):57–61.
48. Botelho F, Llop-Guevara A, Trimble N, Nikota J, Bauer C, Lambert K, et al. Cigarette Smoke Differentially Affects Eosinophilia and Remodeling in a Model of House Dust Mite Asthma. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2011; 45(4):753–760.
49. Boulet L, Lemière C, Archambault F, Carrier G, Descary M, Deschesnes F. Smoking and asthma: Clinical and radiologic features, lung function, and airway inflammation. Chest. 2006; 129(3):661–668.
50. Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N, Aria Workshop Group. World Health Organization Allergic rhinitis and its impact on asthma. The Journal of allergy and clinical immunology. 2001; 5 Suppl (108):S147-334.
51. Bousquet J, Chanez P, Lacoste J, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic Inflammation in Asthma. New England Journal of Medicine. 1990; 323:1033–1039.
52. Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz A, Aït-Khaled N, Baena-Cagnani C, Bleecker E, et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010; 126(5):926–38.
53. Bousquet J, Rabe K, Humbert M, Chung K, Berger W, Fox H, et al. Predicting and evaluating response to

omalizumab in patients with severe allergic asthma. Respiratory Medicine. 2007; 101(7):1483–1492.
54. Braido F, Brusselle G, Guastalla D, Ingrassia E, Nicolini G, Price D, et al. Determinants and impact of suboptimal asthma control in Europe: The International Cross-sectional and Longitudinal Assessment on Asthma Control (LIAISON) study. Respiratory Research. 2016; 17(1):51.
55. Brightling C, She D, Ranade K, Piper E. Efficacy and safety of tralokinumab, an anti-IL-13 monoclonal antibody, in a Phase 2b study of uncontrolled severe asthma. American journal of respiratory and critical care medicine. 2014; 189:A6770.
56. Brinkman P, Wagener A, Hekking P, Bansal A, Maitland-van der Zee A, Wang Y, et al. Identification and prospective stability of electronic nose (eNose)–derived inflammatory phenotypes in patients with severe asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2019; 143(5):1811-1820.
57. Bruijnzeel P, Uddin M, Koenderman L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? Journal of Leukocyte Biology. 2015; 98:549–556.
58. Brumpton B, Camargo C, Romundstad P, Langhammer A, Chen Y, Mai X. Metabolic syndrome and incidence of asthma in adults: the HUNT study. European Respiratory Journal. 2013; 42(6):1495–1502.
59. Brusselle G, Maes T, Bracke K. Eosinophils in the Spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. Nature Medicine. 2013; 19(8):977–979.
60. Brusselle G, VanderStichele C, Jordens P, Deman R, Slabbynck H, Ringoet V, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. Thorax. 2013; 68(4):322–329.
61. Bruton A, Lee A, Yardley L, Raftery J, Arden-Close E, Kirby S, et al. Physiotherapy breathing retraining for asthma: a randomised controlled trial. The Lancet Respiratory Medicine. 2018; 6(1):19–28.
62. Buchheit K, Cahill K, Katz H, Murphy K, Feng C, Lee-Sarwar K, et al. Thymic stromal lymphopoietin controls prostaglandin D 2 generation in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2016; 137(5):1566-1576.
63. Buhl R, Humbert M, Bjermer L, Chanez P, Heaney L, Pavord I, et al. Severe eosinophilic asthma: A roadmap to consensus. European Respiratory Journal. 2017; 49(5):1700634.
64. Bullens D, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings P, Dupont L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? Respiratory Research. 2006; 7(1):135.
65. Burrows B, Martinez F, Halonen M, Barbee R, Cline M. Association of Asthma with Serum IgE Levels and Skin-Test Reactivity to Allergens. New England Journal of Medicine. 1989; 320(5):271–277.
66. Busse W, Holgate S, Wenzel S, Klekotka P, Chon Y, Feng J, et al. Biomarker Profiles in Asthma With High vs Low Airway Reversibility and Poor Disease Control. Chest. 2015; 148(6):1489–1496.
67. Busse W, Morgan W, Gergen P, Mitchell H, Gern J, Liu A, et al. Randomized Trial of Omalizumab (Anti-IgE) for Asthma in Inner-City Children. New England Journal of Medicine. 2011; 364(11):1005–1015.
68. Calixto M, Lintomen L, Schenka A, Saad M, Zanesco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. British Journal of Pharmacology. 2010; 159(3):617–625.
69. Caminati M, Le Pham D, Bagnasco D, Canonica G. Type 2 immunity in asthma. The World Allergy Organization journal. 2018; 11(1):13.
70. Campo P, Rodríguez F, Sánchez-García S, Barranco P, Quirce S, Pérez-Francés C, et al. Phenotypes and endotypes of uncontrolled severe asthma: New Treatments. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. 2013; 23(2):76–88.
71. Casale T, Chipps B, Rosén K, Trzaskoma B, Haselkorn T, Omachi T, et al. Response to omalizumab using patient enrichment criteria from trials of novel biologics in asthma. Allergy. 2018; 73(2):490–497.
72. Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet L, Xie F, Young J, et al. Reslizumab for Poorly Controlled, Eosinophilic Asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2011; 184(10):1125–1132.
73. Cerveri I, Cazzoletti L, Corsico A, Marcon A, Niniano R, Grosso A, et al. The impact of cigarette smoking on asthma: a population-based international cohort study. International archives of allergy and immunology. 2012; 158(2):175–83.
74. Chang Y, Al-Alwan L, Risse P, Halayko A, Martin J, Baglole C, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. The FASEB Journal. 2012; 26(12):5152–60.
75. Chapman K, Boulet L, Rea R, Franssen E. Suboptimal asthma control: prevalence, detection and consequences in general practice. The European respiratory journal. 2008; 31(2):320–5.
76. Chaudhuri R, Livingston E, McMahon A, Thomson L, Borland W, Thomson N. Cigarette Smoking Impairs the Therapeutic Response to Oral Corticosteroids in Chronic Asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2003; 168(11):1308–1311.
77. Chiappori A, De Ferrari L, Folli C, Mauri P, Riccio A, Canonica G. Biomarkers and severe asthma: A critical appraisal. Clinical and Molecular Allergy. 2015; 13:20.
78. Chibana K, Trudeau J, Mustovitch A, Hu H, Zhao J, Balzar S, et al. IL-13 induced increases in nitrite levels are primarily driven by increases in inducible nitric oxide synthase as compared with effects on arginases in human primary bronchial epithelial cells. Clinical and Experimental Allergy. 2008; 38(6):936–46.
79. Chipps B, Newbold P, Hirsch I, Trudo F, Goldman M. Benralizumab efficacy by atopy status and serum

immunoglobulin E for patients with severe, uncontrolled asthma. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2018; 120(5):504-511.
80. Chu D, Al-Garawi A, Llop-Guevara A., Pillai R, Radford K, Shen P, et al. Therapeutic potential of anti-IL-6 therapies for granulocytic airway inflammation in asthma. Allergy, Asthma and Clinical Immunology. 2015; 1(11):14.
81. Chung K. Clinical management of severe therapy-resistant asthma. Expert Review of Respiratory Medicine. 2017; 11(5):1–8.
82. Chung K, Wenzel S, Brozek J, Bush A, Castro M, Sterk P, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. European Respiratory Journal. 2014; 43(2):343–73.
83. Ciprandi G, Tosca M, Capasso M. High Exhaled Nitric Oxide Levels May Predict Bronchial Reversibility in Allergic Children with Asthma or Rhinitis. Journal of Asthma. 2013; 50(1):33–38.
84. Contoli M, Baraldo S, Marku B, Casolari P, Marwick J, Turato G, et al. Fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: 5-year follow-up. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010; 125(4):830–7.
85. Conway S, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, et al. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. Cellular and Molecular Life Sciences. 2014; 71(7):1279–1288.
86. Corren J. Role of interleukin-13 in asthma. Current Allergy and Asthma Reports. 2013; 13(5):415–20.
87. Corren J, Lemanske R, Hanania N, Korenblat P, Parsey M, Arron J, et al. Lebrikizumab Treatment in Adults with Asthma. New England Journal of Medicine. 2011; 365(12):1088–1098.
88. Corren J, Weinstein S, Janka L, Zangrilli J, Garin M. Phase 3 Study of Reslizumab in Patients With Poorly Controlled Asthma. Chest. 2016; 150(4):799–810.
89. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, et al. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. The Journal of allergy and clinical immunology. 2010; 125(1):222–30.
90. Coumou H, Bel E. Improving the diagnosis of eosinophilic asthma. Expert Review of Respiratory Medicine. 2016; 10(10):1093–103.
91. Crespo A, Giner J, Torrejón M, Belda A, Mateus E, Granel C, et al. Clinical and inflammatory features of asthma with dissociation between fractional exhaled nitric oxide and eosinophils in induced sputum. Journal of Asthma. 2016; 53(5):549–64.
92. Cristescu S, Mandon J, Harren F, Meriläinen P, Högman M. Methods of NO detection in exhaled breath. Journal of Breath Research. 2013; 7(1):017104.
93. Cundall M, Sun Y, Miranda C, Trudeau J, Barnes S, Wenzel S. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2003; 113(6):1064–1071.
94. Davila I, Valero A, Entrenas L, Valveny N, Herráez L, SIGE Study Group. Relationship between serum total IgE and disease severity in patients with allergic asthma in Spain. Journal of investigational allergology & clinical immunology. 2015; 25(2):120–7.
95. Deckers J, Branco Madeira F, Hammad H. Innate immune cells in asthma. Trends in Immunology. 2013; 34(11):540–547.
96. Demoly P, Annunziata K, Gubba E, Adamek L. Repeated cross-sectional survey of patient-reported asthma control in Europe in the past 5 years. European Respiratory Review. 2012; 21(123):66–74.
97. Demoly P, Paggiaro P, Plaza V, Bolge S, Kannan H, Sohier B, et al. Prevalence of asthma control among adults in France, Germany, Italy, Spain and the UK. European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society. 2009; 18(112):105–12.
98. Denlinger L, Phillips B, Ramratnam S, Ross K, Bhakta N, Cardet J, et al. Inflammatory and comorbid features of patients with severe asthma and frequent exacerbations. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2017; 195(3):302–313.
99. Dent G, Hadjicharalambous C, Yoshikawa T, Handy R, Powell J, Anderson I, et al. Contribution of Eotaxin-1 to Eosinophil Chemotactic Activity of Moderate and Severe Asthmatic Sputum. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2004; 169(10):1110–1117.
100. Derrick E. The significance of the age of onset of asthma. The Medical journal of Australia. 1971; 1(25):1317–9.
101. Diaz-Sanchez D, Rumold R, Gong H. Challenge with environmental tobacco smoke exacerbates allergic airway disease in human beings. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2006; 118(2):441–446.
102. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. Clinical Immunology. 2009; 130(1):27-33.
103. Dimov P, Marinov B, Ilchev I, Taralov Z, Kostianev S. Evaluation of Acute Exogenous Hypoxia Impact on the Fraction of Exhaled Nitric Oxide in Healthy Males. Folia Medica. 2016; 57(3-4):230–234.
104. Dixon A, Clerisme-Beaty E, Sugar E, Cohen R, Lang J, Brown E, et al. Effects of Obstructive Sleep Apnea and Gastroesophageal Reflux Disease on Asthma Control in Obesity. Journal of Asthma. 2011; 48(7):707–713.
105. Dixon A, Holguin F. Metabolic dysfunction and severe asthma. In: Chung K, Israel E, Peter G. editors.

Severe asthma. ERS Monograph. 2019; 195–210.
106. Dougherty R, Fahy J. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2009; 39(2):193–202.
107. Dusser D, Montani D, Chanez P, de Blic J, Delacourt C, Deschildre A, et al. Mild asthma: an expert review on epidemiology, clinical characteristics and treatment recommendations. Allergy. 2007; 62(6):591–604.
108. Dweik R, Boggs P, Erzurum S, Irvin C, Leigh M, Lundberg J, et al. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2011; 184(5):602–615.
109. Dweik R, Sorkness R, Wenzel S, Hammel J, Curran-Everett D, Comhair S, et al. Use of exhaled nitric oxide measurement to identify a reactive, at-risk phenotype among patients with asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2010; 181(10):1033–41.
110. Ebmeier S, Thayabaran D, Braithwaite I, Bénamara C, Weatherall M, Beasley R. Trends in international asthma mortality: analysis of data from the WHO Mortality Database from 46 countries (1993–2012). The Lancet. 2017; 390(10098):935–945.
111. Ehrs P, Nokela M, Ställberg B, Hjemdahl P, Wikström Jonsson E. Brief Questionnaires for Patient-Reported Outcomes in Asthma. Chest. 2006; 129(4):925–932.
112. Eisner M, Iribarren C. The influence of cigarette smoking on adult asthma outcomes. Nicotine and Tobacco Research. 2007; 9(1):53–56.
113. Emma R, Bansal A, Kolmert J, Wheelock C, Dahlen S, Loza M, et al. Enhanced oxidative stress in smoking and ex-smoking severe asthma in the U-BIOPRED cohort. PLOS ONE. 2018; 13(9):0203874.
114. ERS White Book. Chapter 12. Adult asthma. 2013.
115. Essilfie A, Horvat J, Kim R, Mayall J, Pinkerton J, Beckett E, et al. Macrolide therapy suppresses key features of experimental steroid-sensitive and steroid-insensitive asthma. Thorax. 2015; 70(5):458–467.
116. Fahrenholz J. Natural History and Clinical Features of Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 2003; 24(2):113–124.
117. Fahy J. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. Nature reviews. Immunology. 2015; 15(1):57–65.
118. Fahy J, Kim K, Liu J, Boushey H. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. The Journal of allergy and clinical immunology. 1995; 95(4):843–52.
119. Fajt M, Gelhaus S, Freeman B, Uvalle C, Trudeau J, Holguin F, Wenzel S. Prostaglandin D_2 pathway upregulation: relation to asthma severity, control, and TH2 inflammation. The Journal of allergy and clinical immunology. 2013; 131(6):1504–12.
120. Fajt M, Wenzel S. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2015; 135(2):299–310.
121. Fitzpatrick A, Higgins M, Holguin F, Brown L, Teague W. The molecular phenotype of severe asthma in children. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010; 125(4):851-857.
122. Fletcher M, Hiles D. Continuing discrepancy between patient perception of asthma control and real-world symptoms: A quantitative online survey of 1,083 adults with asthma from the UK. Primary Care Respiratory Journal. 2013; 22(4):431–8.
123. Flodin U, Jönsson P, Ziegler J, Axelson O. An epidemiologic study of bronchial asthma and smoking. Epidemiology. 1995; 6(5):503–505.
124. Forno E, Lescher R, Strunk R, Weiss S, Fuhlbrigge A, Celedón J, Childhood Asthma Management Program Research Group. Decreased response to inhaled steroids in overweight and obese asthmatic children. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011; 127(3):741–749.
125. Fowler S, Tavernier G, Niven R. High blood eosinophil counts predict sputum eosinophilia in patients with severe asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2015; 135(3):822–4.
126. Froidure A, Mouthuy J, Durham S, Chanez P, Sibille Y, Pilette C. Asthma phenotypes and IgE responses. European Respiratory Journal. 2016; 1(47):304–319.
127. Fulkerson P, Fischetti C, Hassman L, Nikolaidis N, Rothenberg M. Persistent effects induced by IL-13 in the lung. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2006; 35(3):337–46.
128. Gao J, Chen Z, Jie X, Ye R, Wu F. Both fractional exhaled nitric oxide and sputum eosinophil were associated with uncontrolled asthma. Journal of Asthma and Allergy. 2018; 11:73–79.
129. Gao J, Wu F. Association between fractional exhaled nitric oxide, sputum induction and peripheral blood eosinophil in uncontrolled asthma. Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology. 2018; 14:21.
130. Gevaert P, Calus L, Van Zele T, Blomme K, De Ruyck N, Bauters W, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013; 131(1):110-116.
131. Ghaffari J, Rafiei A, Ajami A, Mahdavi M, Hoshiar B. Serum interleukins 6 and 8 in mild and severe asthmatic patients, is it difference? Caspian journal of internal medicine. 2011; 2(2):226–8.

132. Ghebre M, Bafadhel M, Desai D, Cohen S, Newbold P, Rapley L, et al. Biological clustering supports both "Dutch" and "British" hypotheses of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2015; 135(1):63-72.
133. Gibson P, McDonald V, Marks G. Asthma in older adults. The Lancet. 2010; 376 (9743):803–813.
134. Gibson P, Simpson J, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. Chest. 2001; 119(5):1329–36.
135. Gibson P, Wang F, He X, Brightling C. Noninvasive assessment of inflammation in severe asthma. 2011; 208–217.
136. Gibson P, Yang I, Upham J, Reynolds P, Hodge S, James A, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet. 2017; 390(10095):659–668.
137. Glenda E. Significant Increase of IL-8 Sputum Levels in Treatment Resistant Severe Asthma Compared with Difficult to Treat Severe Asthma Patients. Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy. 2014; 5(2):218.
138. Global Asthma Network. The Global Asthma Report 2018. Auckland, New Zealand. 2018;
139. Global Initiative for Asthma 2018 GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2018;
140. Global Initiative for Asthma 2019 GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2019;
141. Gomez-Llorente M, Romero R, Chueca N, Martinez-Cañavate A, Gomez-Llorente C. Obesity and Asthma: A Missing Link. International Journal of Molecular Sciences. 2017; 18(7):1490.
142. Gomez C, Karavitis J, Palmer J, Faunce D, Ramirez L, Nomellini V, et al. Interleukin-6 contributes to age-related alteration of cytokine production by macrophages. Mediators of inflammation. 2010; 2010:475139.
143. Gounni A, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi P, Hamid Q. Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2001; 15(6):940–9.
144. Green R, Brightling C, Woltmann G, Parker D, Wardlaw A, Pavord I. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. Thorax. 2002; 57(10):875–9.
145. Greenfeder S, Umland S, Cuss F, Chapman R, Egan R. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. Respiratory research. 2001; 2(2):71–9.
146. Groot J, Amelink M, de Nijs S, Plaat R, Reitsma B, Storm H, et al. Risk Factors for Frequent Severe Exacerbations in Late-Onset Eosinophilic Asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2015; 192(7):899–902.
147. Groot J, Storm H, Amelink M, de Nijs S, Eichhorn E, Reitsma B, et al. Clinical profile of patients with adult-onset eosinophilic asthma. ERJ open research. 2016; 2(2):00100-2015.
148. Guo F. Continuous Nitric Oxide Synthesis by Inducible Nitric Oxide Synthase in Normal Human Airway Epithelium in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995; 92(17):7809–7813.
149. Guo F, Uetani K, Haque S, Williams B, Dweik R, Thunnissen F, et al. Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. The Journal of clinical investigation. 1997; 100(4):829–38.
150. Haldar P, Brightling C, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. New England Journal of Medicine. 2009; 360(10):973–84.
151. Haldar P, Pavord I, Shaw D, Berry M, Thomas M, Brightling C, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2008; 178(3):218–224.
152. Hanania N, Alpan O, Hamilos D, Condemi J, Reyes-Rivera I, Zhu J, et al. Omalizumab in Severe Allergic Asthma Inadequately Controlled With Standard Therapy. Annals of Internal Medicine. 2011; 154(9):573.
153. Hanania N, Diamant Z. The road to precision medicine in asthma. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2018; 24(1):1–3.
154. Hanania N, Noonan M, Corren J, Korenblat P, Zheng Y, Fischer S, et al. Lebrikizumab in moderate-to-severe asthma: pooled data from two randomised placebo-controlled studies. Thorax. 2015; 70(8):748–56.
155. Hanania N, Noonan M, Corren J, Korenblat P, Zheng Y, Putnam W, et al. Efficacy and Safety of Lebrikizumab in Severe Uncontrolled Asthma: Results from the Lute and Verse Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trials. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 133(2):Supp.AB402.
156. Hanania N, Wenzel S, Rosén K, Hsieh H, Mosesova S, Choy D, et al. Exploring the Effects of Omalizumab in Allergic Asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2013; 187(8):804–811.
157. Hancox R, Gray A, Poulton R, Sears M. The effect of cigarette smoking on lung function in young adults with asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2016; 194(3):276–84.
158. Hancox R, Pavord I, Sears M. Associations between blood eosinophils and decline in lung function among adults with and without asthma. European Respiratory Journal. 2018; 51(4):1702536.
159. Hansbro P, Kaiko G, Foster P. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? British Journal of Pharmacology. 2011; 163(1):81–95.

160. Harnan S, Tappenden P, Essat M, Gomersall T, Minton J, Wong R, et al. Measurement of exhaled nitric oxide concentration in asthma: A systematic review and economic evaluation of NIOX MINO, NIOX VERO and Nobreath. Health Technology Assessment. 2015; 19(82):1–330.
161. Hasegawa T, Uga H, Mori A, Kurata H. Increased serum IL-17A and Th2 cytokine levels in patients with severe uncontrolled asthma. European cytokine network. 2017; 28(1):8–18.
162. Haselkorn T, Chen H, Miller D, Fish J, Peters S, Weiss S, et al. Asthma control and activity limitations: insights from the Real-world Evaluation of Asthma Control and Treatment (REACT) Study. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2010; 104(6):471–477.
163. Haselkorn T, Fish J, Zeiger R, Szefler S, Miller D, Chipps B, et al. Consistently very poorly controlled asthma, as defined by the impairment domain of the Expert Panel Report 3 guidelines, increases risk for future severe asthma exacerbations in The Epidemiology and Natural History of Asthma: Outcomes and Treatment Regime. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2009; 124(5):895-902.
164. Hastie A, Moore W, Li H, Rector B, Ortega V, Pascual R, et al. Biomarker surrogates do not accurately predict sputum eosinophil and neutrophil percentages in asthmatic subjects. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013; 132(1):72-80.
165. Hastie A, Moore W, Meyers D, Vestal P, Li H, Peters S, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010; 125(5):1028–1036.
166. Haughney J, Barnes G, Partridge M, Cleland J. The Living & Breathing Study: A study of patients' views of asthma and its treatment. Primary Care Respiratory Journal. 2004; 13:28–35.
167. Hazenberg M, Spits H. Human innate lymphoid cells. Blood. 2014; 124(5):700–709.
168. Heaney L, Brightling C, Menzies-Gow A, Stevenson M, Niven R, British Thoracic Society Difficult Asthma Network. Refractory asthma in the UK: cross-sectional findings from a UK multicentre registry. Thorax. 2010; 65(9):787–794.
169. Hekking P, Bel E. Developing and Emerging Clinical Asthma Phenotypes. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2014; 2(6):671–680.
170. Hekking P, Wener R, Amelink M, Zwinderman A, Bouvy M, Bel E. The prevalence of severe refractory asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2015; 135(4):896–902.
171. Herland K, Akselsen J, Skjønsberg O, Bjermer L. How representative are clinical study patients with asthma or COPD for a larger "real life" population of patients with obstructive lung disease? Respiratory Medicine. 2005; 99(1):11–19.
172. Hew M, Heaney L. The contribution of comorbidities, psychosocial factors and adherence to the presentation of severe asthma. In: Chung K, Israel E, Peter G. editors. Severe asthma. ERS Monograph. 2019; 30–47.
173. Hilvering B, Pavord I. What goes up must come down: Biomarkers and novel biologicals in severe asthma. Clinical and Experimental Allergy. 2015; 45(7):1162–9.
174. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: Ten years later. International Reviews of Immunology. 1998; 16(3-4):249–84.
175. Horváth I, Barnes P, Loukides S, Sterk P, Högman M, Olin A, et al. An european respiratory society technical standard: Exhaled biomarkers in lung disease. European Respiratory Journal. 2017; 49(4):1600965.
176. Hosoki K, Ying S, Corrigan C, Qi H, Kurosky A, Jennings K, et al. Analysis of a Panel of 48 Cytokines in BAL Fluids Specifically Identifies IL-8 Levels as the Only Cytokine that Distinguishes Controlled Asthma from Uncontrolled Asthma, and Correlates Inversely with FEV1. PLOS ONE. 2015; 10(5):0126035.
177. Huang A, Lu L, Liu W, Huang M. Plasma Inflammatory Cytokine IL-4, IL-8, IL-10, and TNF-α Levels Correlate with Pulmonary Function in Patients with Asthma-Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Overlap Syndrome. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research. 2016; 22:2800–8.
178. Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hébert J, Bousquet J, et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. Allergy. 2005; 60(3): 309–316.
179. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan C, Robinson D, Durham S, et al. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: More similarities than differences. Immunology Today. 1999; 20(11): 528–533.
180. Ilmarinen P, Tuomisto L, Niemelä O, Danielsson J, Haanpää J, Kankaanranta T, et al. Comorbidities and elevated IL-6 associate with negative outcome in adult-onset asthma. European Respiratory Journal. 2016; 48(4): 1052–1062.
181. Ilmarinen P, Tuomisto L, Niemelä O, Tommola M, Haanpää J, Kankaanranta H. Cluster Analysis on Longitudinal Data of Patients with Adult-Onset Asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2017; 5(4): 967-978.
182. Irvin C, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska M, et al. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma.

Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 134(5): 1175–1186.
183. Ivanov Y, Pavlov P, Glogovska P, Popova T, Torossian A, Kostadinov D, et al. Characterization of asthma exacerbations in outpatients – National survey. European Respiratory Society, 2015; PA4584.
184. Izuhara K, Conway S, Moore B, Matsumoto H, Holweg C, Matthews J, et al. Roles of periostin in respiratory disorders. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2016; 193(9): 949–56.
185. Jacinto T, Malinovschi A, Janson C, Fonseca J, Alving K. Differential effect of cigarette smoke exposure on exhaled nitric oxide and blood eosinophils in healthy and asthmatic individuals. Journal of Breath Research. 2017; 11(3): 036006.
186. Jarvis D, Luczynska C, Chinn S, Burney P. The association of age, gender and smoking with total IgE and specific IgE. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 1995; 25(11): 1083–91.
187. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov S, Chung K, Barnes P. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. Thorax. 1998; 53(2): 91–5.
188. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung K, Barnes P. Neutrophilic Inflammation in Severe Persistent Asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1999; 160(5): 1532–1539.
189. Jensen E, Pedersen B, Narvestadt E, Dahl R. Blood eosinophil and monocyte counts are related to smoking and lung function. Respiratory medicine. 1998; 92(1): 63–9.
190. Jevnikar Z, Östling J, Ax E, Calvén J, Thörn K, Israelsson E, et al. Epithelial IL-6 trans-signaling defines a new asthma phenotype with increased airway inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2019; 143(2): 577–590.
191. Jia C, Zhang H, Lv Y, Liang R, Jiang Y, Powell H, et al. The Asthma Control Test and Asthma Control Questionnaire for assessing asthma control: Systematic review and meta-analysis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013; 131(3): 695–703.
192. Jia G, Erickson R, Choy D, Mosesova S, Wu L, Solberg O, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2012; 130(3): 647–654.
193. Jiang X, Yang X, Lv Z, Zhuang P. Elevated serum levels of TNF-α, IL-8, and ECP can be involved in the development and progression of bronchial asthma. Journal of Asthma. 2018; 55(2): 111–118.
194. Johansson S, Hourihane J, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2001; 56(9): 813–24.
195. Johnson K, FitzGerald J, Tavakoli H, Chen W, Sadatsafavi M. Stability of Asthma Symptom Control in a Longitudinal Study of Mild-Moderate Asthmatics. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2017; 5(6): 1663-1670.
196. Jones S, Kittelson J, Cowan J, Flanner E, Hancox R, McLachnan C, Taylor R. The Predictive Value of Exhaled Nitric Oxide Measurements in Assessing Changes in Asthma Control. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2001; 164(5): 738–743.
197. Joseph J, Benedict S, Safa W, Joseph M. Serum interleukin-5 levels are elevated in mild and moderate persistent asthma irrespective of regular inhaled glucocorticoid therapy. BMC pulmonary medicine. 2004; 4:2.
198. Juniper E, Bousquet J, Abetz L, Bateman E, GOAL Committee. Identifying 'well-controlled' and 'not well-controlled' asthma using the Asthma Control Questionnaire. Respiratory Medicine. 2006; 100(4): 616–621.
199. Juniper E, O'Byrne P, Guyatt G, Ferrie P, King D. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. The European respiratory journal. 1999; 14(4): 902–7.
200. Juniper E, Svensson K, Mörk A, Ståhl E. Measurement properties and interpretation of three shortened versions of the asthma control questionnaire. Respiratory Medicine. 2005; 99(5): 553–558.
201. Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, et al. Asthma Phenotypes in Japanese Adults - Their Associations with the CCL5 ADRB2 Genotypes. Allergology International. 2013; 32(1): 113–121.
202. Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013; 132(2): 305–12.
203. Kanemitsu Y, Matsumoto H, Mishima M. Factors contributing to an accelerated decline in pulmonary function in asthma. Allergology International. 2014; 63(2): 181–8.
204. Kasteleyn M, Bonten T, de Mutsert R, Thijs W, Hiemstra P, le Cessie S, et al. Pulmonary function, exhaled nitric oxide and symptoms in asthma patients with obesity: a cross-sectional study. Respiratory Research. 2017; 18(1): 205.
205. Kato T, Takeda Y, Nakada T, Sendo F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. Natural immunity. 1995; 14(4): 198–208.
206. Katz L, Gleich G, Hartley B, Yancey S, Ortega H. Blood eosinophil count is a useful biomarker to identify patients with severe eosinophilic asthma. Annals of the American Thoracic Society. 2014; 11(4): 531–6.
207. Kennedy J, Stoner A, Borish L. Aspirin-exacerbated respiratory disease: Prevalence, diagnosis, treatment,

and considerations for the future. American journal of rhinology & allergy. 2016; 30(6): 407–413.
208. Kerkhof M, Tran T, van den Berge M, Brusselle G, Gopalan G, Jones R, et al. Association between blood eosinophil count and risk of readmission for patients with asthma: Historical cohort study. PLOS ONE. 2018; 13(7):0201143.
209. Kerkhof M, Tran T, Soriano J, Golam S, Gibson D, Hillyer E, et al. Healthcare resource use and costs of severe, uncontrolled eosinophilic asthma in the UK general population. Thorax. 2018; 73(2): 116–124.
210. Kim M, Izuhara K, Ohta S, Ono J, Yoon M, Ban G, et al. Association of serum periostin with aspirin-exacerbated respiratory disease. Annals of Allergy, Asthma and Immunology. 2014; 113(3): 314–20.
211. Kim T, Bel E. Clinical phenotypes: adults. In: Chung K, Israel E, Peter G. editors. Severe asthma. ERS Monograph. 2019; 48–63.
212. Kim T, Jang A, Kwon H, Park J, Chang Y, Cho S, et al. Identification of asthma clusters in two independent Korean adult asthma cohorts. European Respiratory Journal. 2013; 41(6): 1308–1314.
213. King C, Price D, Wilson A, Chisholm A, Rigazio A, Burden A., Thomas M. Predicting frequent asthma exacerbations using blood eosinophil count and other patient data routinely available in clinical practice. Journal of Asthma and Allergy. 2016; 9:1.
214. Kita H, Kaneko M, Bartemes K, Weiler D, Schimming A, Reed C, et al. Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy? Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). 1999; 162(11):6901–11.
215. Ko H, Lee H, Lin A, Liu M, Liu C, Lee T, et al. Regulation of Cigarette Smoke Induction of IL-8 in Macrophages by AMP-activated Protein Kinase Signaling. Journal of Cellular Physiology. 2015; 230(8):1781–1793.
216. Kohata Y, Fujiwara Y, Watanabe T, Kobayashi M, Takemoto Y, Kamata N, et al. Long-Term Benefits of Smoking Cessation on Gastroesophageal Reflux Disease and Health-Related Quality of Life. PloS one. 2016; 11(2):0147860.
217. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Reviews Immunology. 2013; 13(3):159–175.
218. Komakula S, Khatri S, Mermis J, Savill S, Haque S, Rojas M, et al. Body mass index is associated with reduced exhaled nitric oxide and higher exhaled 8-isoprostanes in asthmatics. Respiratory Research. 2007; 8(1):32.
219. Konno S, Taniguchi N, Makita H, Nakamaru Y, Shimizu K, Shijubo N, et al. Distinct Phenotypes of Cigarette Smokers Identified by Cluster Analysis of Patients with Severe Asthma. Annals of the American Thoracic Society. 2015; 12(12):1771–1780.
220. Korevaar D, Westerhof G, Wang J, Cohen J, Spijker R, Sterk P, et al. Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Respiratory Medicine. 2015; 3(4): 290–300.
221. Korn S, Both J, Jung M, Hübner M, Taube C, Buhl R. Prospective evaluation of current asthma control using ACQ and ACT compared with GINA criteria. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2011; 107(6): 474-479.
222. Kraft S, Kinet J. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. Nature Reviews Immunology. 2007; 7(5): 365–378.
223. Krishnan V, Diette G, Rand C, Bilderback A, Merriman B, Hansel N, et al. Mortality in Patients Hospitalized for Asthma Exacerbations in the United States. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2006; 174(6): 633–638.
224. Kudo M, Melton A, Chen C, Engler M, Huang K, Ren X, et al. IL-17A produced by αβ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. Nature Medicine. 2012; 18(4): 547–54.
225. Kunkel S, Standiford T, Kasahara K, Strieter R. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. Experimental lung research. 17(1):17–23.
226. Kuo C, Pavlidis S, Loza M, Baribaud F, Rowe A, Pandis I, et al. A Transcriptome-driven Analysis of Epithelial Brushings and Bronchial Biopsies to Define Asthma Phenotypes in U-BIOPRED. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2017; 195(4): 443–455.
227. Kuo C, Pavlidis S, Loza M, Baribaud F, Rowe A, Pandis I, et al. T-helper cell type 2 (Th2) and non-Th2 molecular phenotypes of asthma using sputum transcriptomics in U-BIOPRED. European Respiratory Journal. 2017; 49(2): 1602135.
228. Kupczyk M, Brinke A, Sterk P, Bel E, Papi A, Chanez P, et al. Frequent exacerbators - a distinct phenotype of severe asthma. Clinical & Experimental Allergy. 2014; 44(2): 212–221.
229. Laan M, Lötvall J, Chung K, Lindén A. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. British journal of pharmacology. 2001; 133(1): 200–6.
230. LABS Writing Group for the LABS Consortium, Belle S, Chapman W, Courcoulas A, Flum D, Gagner M, Inabnet W, et al. Relationship of body mass index with demographic and clinical characteristics in the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS). Surgery for Obesity and Related Diseases. 2008; 4(4): 474–480.

231. Lambrecht B, Hammad H. The immunology of asthma. Nature Immunology. 2015; 16 (1): 45–56.
232. LaPorte S, Juo Z, Vaclavikova J, Colf L, Qi X, Heller N, et al. Molecular and Structural Basis of Cytokine Receptor Pleiotropy in the Interleukin-4/13 System. Cell. 2008; 132(2): 259–72.
233. Lavoie-Charland É, Bérubé J, Laviolette M, Boulet L, Bossé Y. Multivariate Asthma Phenotypes in Adults: The Quebec City Case-Control Asthma Cohort. Open Journal of Respiratory Diseases. 2013; 3(4): 133–142.
234. Lazarus S, Chinchilli V, Rollings N, Boushey H, Cherniack R, Craig T, et al. Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2007; 175(8): 783–90.
235. Lee H, Stretton T. Asthma in the elderly. British medical journal. 1972; 4(5832):93–5.
236. Lee J, Jung C, Park H. An update on the management of aspirin-exacerbated respiratory disease. Expert Review of Respiratory Medicine. 2018; 12(2): 137–143.
237. Lee R, Stevenson D. Aspirin-exacerbated respiratory disease: Evaluation and management. Allergy, Asthma and Immunology Research. 2011; 3(1): 3–10.
238. Lefaudeux D, Meulder B, Loza M, Peffer N, Rowe A, Baribaud F, et al. U-BIOPRED clinical adult asthma clusters linked to a subset of sputum omics. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2017; 139(6): 1797–1807.
239. Levy M, Andrews R, Buckingham R, Evans H, Francis C, Houston R, et al. Confidential Enquiry report. London: Royal College of Physicians (RCP). Why asthma still kills. The National Review of Asthma Deaths (NRAD). 2014;
240. Li W, Gao P, Zhi Y, Xu W, Wu Y, Yin J, et al. Periostin: Its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target. Respiratory Research. 2015; 16: 57.
241. Liang B, Yi Q, Feng Y. Association of gastroesophageal reflux disease with asthma control. Diseases of the Esophagus. 2013; 26(8): 794–798.
242. Liang Z, Liu L, Zhao H, Xia Y, Zhang W, Ye Y, et al. A Systemic Inflammatory Endotype of Asthma With More Severe Disease Identified by Unbiased Clustering of the Serum Cytokine Profile. Medicine. 2016; 95(25): 3774.
243. Licona-Limón P, Kim L, Palm N, Flavell R. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. Nature Immunology. 2013; 14(6): 536–542.
244. Lim S, Jatakanon A, Meah S, Oates T, Chung K, Barnes P. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. Thorax. 2000; 55(3): 184–8.
245. Lin J, Yin K, Su N, Huang M, Qiu C, Liu C, et al. Chinese expert consensus on clinical use of non-invasive airway inflammation assessment in bronchial asthma. Journal of Thoracic Disease. 2015; 7(11): 2061–78.
246. Lindén A, Dahlén B. Interleukin-17 cytokine signalling in patients with asthma. European Respiratory Journal. 2014; 44(5): 1319–31.
247. Liu T, Kanaoka Y, Barrett N, Feng C, Garofalo D, Lai J, et al. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease Involves a Cysteinyl Leukotriene-Driven IL-33-Mediated Mast Cell Activation Pathway. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). 2015; 195(8): 3537–45.
248. Llano L, Cosío B, Iglesias A, Las Cuevas N, Soler-Cataluña J, Izquierdo J, et al. Mixed Th2 and non-Th2 inflammatory pattern in the asthma-COPD overlap: a network approach. International journal of chronic obstructive pulmonary disease. 2018; 13: 591–601.
249. Lotvall J, Akdis C, Bacharier L, Bjermer L, Casale T, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011; 127(2): 355–60.
250. Loureiro C, Sa-Couto P, Todo-Bom A, Bousquet J. Cluster analysis in phenotyping a Portuguese population. Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition). 2015; 21(6): 299–306.
251. Loza M, Adcock I, Auffray C, Chung K, Djukanovic R, Sterk P, et al. Longitudinally Stable, Clinically Defined Clusters of Patients with Asthma Independently Identified in the ADEPT and U-BIOPRED Asthma Studies. Annals of the American Thoracic Society. 2016; 13 Suppl 1: S102-3.
252. Loza M, Djukanovic R, Chung K, Horowitz D, Ma K, Branigan P, et al. Validated and longitudinally stable asthma phenotypes based on cluster analysis of the ADEPT study. Respiratory Research. 2016; 17(1): 165.
253. Lugogo N, Green C, Agada N, Zhang S, Meghdadpour S, Zhou R, et al. Obesity's effect on asthma extends to diagnostic criteria. The Journal of allergy and clinical immunology. 2018; 141(3): 1096–1104.
254. Maes T, Joos G, Brusselle G. Targeting interleukin-4 in asthma: Lost in translation? American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2012; 47(3): 261–70.
255. Maggio M, Guralnik J, Longo D, Ferrucci L. Interleukin-6 in Aging and Chronic Disease: A Magnificent Pathway. The Journals of Gerontology: Series A. 2006; 61(6): 575–584.
256. Malerba M, Ragnoli B, Radaeli A, Tantucci C. Usefulness of Exhaled Nitric Oxide and Sputum Eosinophils in the Long-term Control of Eosinophilic Asthma. Chest. 2008; 134(4): 733–739.
257. Manni M, Trudeau J, Scheller E, Mandalapu S, Elloso M, Kolls J, et al. The complex relationship between inflammation and lung function in severe asthma. Mucosal Immunology. 2014; 7(5): 1186–98.
258. Mansur A, Srivastava S, Sahal A. Disconnect of type 2 biomarkers in severe asthma; dominated by FeNO

as a predictor of exacerbations and periostin as predictor of reduced lung function. Respiratory Medicine. 2018; 143: 31–38.
259. Mastronarde J. Is There a Relationship Between GERD and Asthma? Gastroenterology & hepatology. 2012; 8(6): 401–3.
260. Matsumoto H. Serum Periostin: A Novel Biomarker for Asthma Management. Allergology International. 2014; 63(2): 153–60.
261. Matsusaka M, Kabata H, Fukunaga K, Suzuki Y, Masaki K, Mochimaru T, et al. Phenotype of asthma related with high serum periostin levels. Allergology International. 2015; 64(2): 175–180.
262. Mattes J, Storm van's Gravesande K, Reining U, Alving K, Ihorst G, Henschen M, et al. NO in exhaled air is correlated with markers of eosinophilic airway inflammation in corticosteroid-dependent childhood asthma. The European respiratory journal. 1999; 13(6): 1391–5.
263. Matucci A, Vultaggio A, Maggi E, Kasujee I. Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question? Respiratory research. 2018; 19(1): 113.
264. Maurer D, Fiebiger S, Ebner C, Reininger B, Fischer G, Wichlas S, et al. Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). 1996; 157(2): 607–16.
265. McBrien C, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. Frontiers in Medicine. 2017; 4: 93.
266. McDonald V, Hiles S, Godbout K, Harvey E, Marks G, Hew M, et al. Treatable traits can be identified in a severe asthma registry and predict future exacerbations. Respirology. 2019; 24(1): 37–47.
267. McGrath K, Icitovic N, Boushey H, Lazarus S, Sutherland E, Chinchilli V, et al. A Large Subgroup of Mild-to-Moderate Asthma Is Persistently Noneosinophilic. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2012; 185(6): 612–619.
268. Melani A, Bonavia M, Cilenti V, Cinti C, Lodi M, Martucci P, Serra M, et al. Inhaler mishandling remains common in real life and is associated with reduced disease control. Respiratory Medicine. 2011; 105(6): 930–938.
269. Meltzer E, Busse W, Wenzel S, Belozeroff V, Weng H, Feng J, et al. Use Of Asthma Control Questionnaire (ACQ) Score To Predict Future Risk Of Asthma Exacerbation. 2010; A6858–A6858.
270. Miedinger D, Neukomm E, Chhajed P, Schnyder A, Naef M, Ackermann M, et al. The use of the Asthma Control Test in general practice and its correlation with asthma control according to the GINA guidelines. Current Medical Research and Opinion. 2011; 27(12): 2301–2308.
271. Mileva G, Popov T, Staneva M, Dimitrov V, Mateev V, Slavov S. Prevalence and characteristics of allergic disorders in Bulgaria. Allergy & Asthma. 2000; 1:1–31, in Bulgarian.
272. Miller M, Johnson C, Miller D, Deniz Y, Bleecker E, Wenzel S, TENOR Study Group. Severity assessment in asthma: An evolving concept. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2005; 116(5): 990–995.
273. Miller M, Lee J, Miller D, Wenzel S, TENOR Study Group. Recent asthma exacerbations: A key predictor of future exacerbations. Respiratory Medicine. 2007; 101(3): 481–489.
274. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel S. Distinguishing severe asthma phenotypes: Role of age at onset and eosinophilic inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004; 113(1): 101–8.
275. Modena B, Tedrow J, Milosevic J, Bleecker E, Meyers D, Wu W, et al. Gene expression in relation to exhaled nitric oxide identifies novel asthma phenotypes with unique biomolecular pathways. American journal of respiratory and critical care medicine. 2014; 190(12): 1363–72.
276. Mogensen I, Alving K, Jacinto T, Fonseca J, Janson C, Malinovschi A. Simultaneously elevated FeNO and blood eosinophils relate to asthma morbidity in asthmatics from NHANES 2007-12. Clinical and Experimental Allergy. 2018; 48(8): 935–943.
277. Moore W, Bleecker E, Curran-Everett D, Erzurum S, Ameredes B, Bacharier L, et al. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2007; 119(2): 405–413.
278. Moore W, Fitzpatrick A, Li X, Hastie A, Li H, Meyers D, et al. Clinical heterogeneity in the severe asthma research program. Annals of the American Thoracic Society. 2013; 10 Suppl:S118-24.
279. Moore W, Hastie A, Li X, Li H, Busse W, Jarjour N, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 133(6): 1557-1563.e5.
280. Moore W, Meyers D, Wenzel S, Teague W, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2010; 181(4): 315–181.
281. Morjaria J, Babu K, Vijayanand P, Chauhan A, Davies D, Holgate S. Sputum IL-6 concentrations in severe asthma and its relationship with FEV1. Thorax. 2011; 66(6): 537.
282. Muniz I, Ponte E, Lima V, Cruz A. Irreversible airway obstruction in asthma: A risk factor for severe exacerbations in spite of proper treatment. Journal of Asthma. 2016; 53(8): 801–807.

283. Nagasaki T, Matsumoto H, Nakaji H, Niimi A, Ito I, Oguma T, et al. Smoking attenuates the age-related decrease in IgE levels and maintains eosinophilic inflammation. Clinical & Experimental Allergy. 2012; 43(6): 608–15.
284. Nair P, Dasgupta A, Brightling C, Chung K. How to Diagnose and Phenotype Asthma. Clinics in Chest Medicine. 2012; 33(3): 445–457.
285. Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga C, et al. IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. Journal of Investigative Dermatology. 2014; 134(8):2122-2130.
286. Nathan R, Thompson P, Price D, Fabbri L, Salvi S, González-Díaz S, et al. Taking Aim at Asthma Around the World: Global Results of the Asthma Insight and Management Survey in the Asia-Pacific Region, Latin America, Europe, Canada, and the United States. J Allergy Clin Immunol Pract. 2015; 5 (3): 734–42.
287. Nathan R, Sorkness C, Kosinski M, Schatz M, Li J, Marcus P, et al. Development of the asthma control test: A survey for assessing asthma control. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004; 113(1): 59–65.
288. Nembrini C, Marsland B, Kopf M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2009; 123(5):986-94
289. Neveu W, Allard J, Raymond D, Bourassa L, Burns S, Bunn J, et al. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. Respiratory Research. 2010; 11:28.
290. Newby C, Heaney L, Menzies-Gow A, Niven R, Mansur A, Bucknall C, et al. Statistical cluster analysis of the british thoracic society severe refractory asthma registry: Clinical outcomes and phenotype stability. PLoS ONE. 2014; 9(7):102987.
291. Nijs S, Venekamp L, Bel E. Adult-onset asthma: is it really different? European Respiratory Review. 2013; 22(127):44–52.
292. Nussbaum J, Dyken S, Moltke J, Cheng L, Mohapatra A, Molofsky A, et al. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. Nature. 2013; 502(7470):245-8.
293. O'Byrne P, Reddel H, Eriksson G, Ostlund O, Peterson S, Sears M, et al. Measuring asthma control: a comparison of three classification systems. European Respiratory Journal. 2010; 36(2): 269–276.
294. Obata H, Dittrick M, Chan H, Chan-Yeung M. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma. European Respiratory Journal. 1999; 13(3):489-495.
295. Oh C, Geba G, Molfino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. European Respiratory Review. 2010; 19(115): 46-54.
296. Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Kawayama T, Fujimoto K, et al. Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. European Respiratory Journal. 2011; 37(5): 1119–1127.
297. Oltmanns U, Chung K, Walters M, John M, Mitchell J. Cigarette smoke induces IL-8, but inhibits eotaxin and RANTES release from airway smooth muscle. Respiratory research. 2005; 6(1): 74.
298. Ortega H, Liu M, Pavord I, Brusselle G, FitzGerald J, Chetta A, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. New England Journal of Medicine. 2014; 371(12): 1198–1207.
299. Osborne M, Pedula K, O'Hollaren M, Ettinger K, Stibolt T, Buist A, et al. Assessing Future Need for Acute Care in Adult Asthmatics. Chest. 2007; 132(4): 1151–1161.
300. Papaioannou A, Diamant Z, Bakakos P, Loukides S. Towards precision medicine in severe asthma: Treatment algorithms based on treatable traits. Respiratory Medicine. 2018; 142:15–22.
301. Parker A, Ayars A, Altman M, Henderson W. Lipid Mediators in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2016; 36(4): 749–763.
302. Partridge M, dal Negro R, Olivieri D. Understanding patients with asthma and COPD: Insights from a European study. Primary Care Respiratory Journal. 2011; 20(3): 315-23.
303. Parulekar A, Kao C, Diamant Z, Hanania N. Targeting the interleukin-4 and interleukin-13 pathways in severe asthma. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2018; 24(1): 50–55.
304. Patel M, Pilcher J, Reddel H, Pritchard A, Corin A, Helm C, et al. Metrics of salbutamol use as predictors of future adverse outcomes in asthma. Clinical & Experimental Allergy. 2013; 43(10):1144-51.
305. Patrawalla P, Kazeros A, Rogers L, Shao Y, Liu M, Fernandez-Beros M, et al. Application of the asthma phenotype algorithm from the Severe Asthma Research Program to an urban population. PloS one. 2012; 7(9): 44540.
306. Paula Couto T, Falsarella N, Mattos C, Mattos L. Total IgE plasma levels vary according to gender and age in Brazilian patients with allergic rhinitis. Clinics. 2014; 69(11):740–4.
307. Pavlidis S, Takahashi K, Ng Kee Kwong F, Xie J, Hoda U, Sun K, et al. "T2-high" in severe asthma related to blood eosinophil, exhaled nitric oxide and serum periostin. European Respiratory Journal. 2019; 53(1):1800938.
308. Pavord I, Brightling C, Woltmann G, Wardlaw A. Non-eosinophilic cor ticosteroid unresponsive asthma. The Lancet. 1999; 353(9171): 2213–2214.

309. Pavord I, Bush A. Anti-IgE for Asthma in Inner-City Children. New England Journal of Medicine. 2011; 364(26):2556–2558.
310. Pavord I, Korn S, Howarth P, Bleecker E, Buhl R, Keene O, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): A multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet. 2012; 380(9842):651-9.
311. Payne D, Adcock I, Wilson N, Oates T, Scallan M, Bush A. Relationship between Exhaled Nitric Oxide and Mucosal Eosinophilic Inflammation in Children with Difficult Asthma, after Treatment with Oral Prednisolone. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2001; 164(8):1376–1381.
312. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. Blood. 2010; 115(2):335–343.
313. Pérez-de-Llano L, Carballada F, Castro Añón O, Pizarro M, Golpe R, Baloira A, et al. Exhaled nitric oxide predicts control in patients with difficult-to-treat asthma. European Respiratory Journal. 2010; 35(6):1221–7.
314. Periyalil H, Wood L, Wright T, Karihaloo C, Starkey M, Miu A, et al. Obese asthmatics are characterized by altered adipose tissue macrophage activation. Clinical & Experimental Allergy. 2018; 48(6):641–649.
315. Peters-Golden M, Swern A, Bird S, Hustad C, Grant E, Edelman J. Influence of body mass index on the response to asthma controller agents. European Respiratory Journal. 2006; 27(3):495–503.
316. Peters M, Kerr S, Dunican E, Woodruff P, Fajt M, Levy B, et al. Refractory airway type 2 inflammation in a large subgroup of asthmatic patients treated with inhaled corticosteroids. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2019; 143(1):104-113.
317. Peters M, McGrath K, Hawkins G, Hastie A, Levy B, Israel E, et al. Plasma interleukin-6 concentrations, metabolic dysfunction, and asthma severity: a cross-sectional analysis of two cohorts. The Lancet. Respiratory medicine. 2016; 4(7):574–584.
318. Peters M, Mekonnen Z, Yuan S, Bhakta N, Woodruff P, Fahy J. Measures of gene expression in sputum cells can identify T H2-high and TH2-low subtypes of asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 133(2):388–94.
319. Peters S, Ferguson G, Deniz Y, Reisner C. Uncontrolled asthma: A review of the prevalence, disease burden and options for treatment. Respiratory Medicine. 2006; 100(7):1139-1151.
320. Petsky H, Kew K, Chang A. Exhaled nitric oxide levels to guide treatment for children with asthma. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2016; 11:CD011439.
321. Petsky H, Kew K, Turner C, Chang A. Exhaled nitric oxide levels to guide treatment for adults with asthma. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2016; 9:CD011440.
322. Piacentini G, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S, et al. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. European Respiratory Journal. 1999; 13(6):1386-90.
323. Piipari R, Jaakkola J, Jaakkola N, Jaakkola M. Smoking and asthma in adults. European Respiratory Journal. 2004; 24:734-739.
324. Pijnenburg M, Jongste J. Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review. Clinical & Experimental Allergy. 2007; 38(2):246–259.
325. Polosa R, Knoke J, Russo C, Piccillo G, Caponnetto P, Sarvà M, et al. Cigarette smoking is associated with a greater risk of incident asthma in allergic rhinitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2008; 121(6):1428-34.
326. Polosa R, Maria G, Salvi S. Allergic susceptibility associated with diesel exhaust particle exposure: Clear as mud. Archives of Environmental Health. 2002; 57(3):188-193.
327. Polosa R, Russo C, Caponnetto P, Bertino G, Sarvà M, Antic T, et al. Greater severity of new onset asthma in allergic subjects who smoke: A 10-year longitudinal study. Respiratory Research. 2011; 12:16.
328. Polosa R, Thomson N. Smoking and asthma: dangerous liaisons. European Respiratory Journal. 2013; 41(3):716–726.
329. Pongracic J, Krouse R, Babineau D, Zoratti E, Cohen R, Wood R, et al. Distinguishing characteristics of difficult-to-control asthma in inner-city children and adolescents. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2016; 138(4):1030–1041.
330. Ponichtera H, Shainheit M, Liu B, Raychowdhury R, Larkin B, Russo J, et al. CD209a Expression on Dendritic Cells Is Critical for the Development of Pathogenic Th17 Cell Responses in Murine Schistosomiasis. The Journal of Immunology. 2014; 192(10):4655-65.
331. Ponte E, Franco R, Nascimento H, Souza-Machado A, Cunha S, Barreto M, et al. Lack of control of severe asthma is associated with co-existence of moderate-to-severe rhinitis. Allergy. 2008; 63(5):564–569.
332. Poynter M, Irvin C. Interleukin-6 as a biomarker for asthma: hype or is there something else? The European respiratory journal. 2016; 48(4): 979–981.
333. Price D, Fletcher M, Molen T. Asthma control and management in 8,000 European patients: the REcognise Asthma and LInk to Symptoms and Experience (REALISE) survey. npj Primary Care Respiratory Medicine. 2014; 24(1):14009.
334. Price D, Rigazio A, Campbell J, Bleecker E, Corrigan C, Thomas M, et al. Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: a UK cohort study. The Lancet Respiratory Medicine. 2015;

3(11):849–858.
335. Prieto J, Lensmar C, Roquet A, Ploeg I, Giglioti D, Eklund A, et al. Increased interleukin-13 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells of atopic patients with mild asthma after repeated low-dose allergen provocations. Respiratory Medicine. 2000; 94(8):806–814.
336. Prosperi M, Marinho S, Simpson A, Custovic A, Buchan I. Predicting phenotypes of asthma and eczema with machine learning. BMC Medical Genomics. 2014; 7 Suppl 1:S7.
337. Prosperi M, Belgrave D, Buchan I, Simpson A, Custovic A. Challenges in interpreting allergen microarrays in relation to clinical symptoms: A machine learning approach. Pediatric Allergy and Immunology. 2014; 25(1):71-9.
338. Puranik S, Forno E, Bush A, Celedón J. Predicting Severe Asthma Exacerbations in Children. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2017; 195(7):854–859.
339. Puzianowska-Kuźnicka M, Owczarz M, Wieczorowska-Tobis K, Nadrowski P, Chudek J, Slusarczyk P, et al. Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: the PolSenior study. Immunity & ageing : I & A. 2016; 13:21.
340. Rabe K, Adachi M, Lai C, Soriano J, Vermeire P, Weiss K, et al. Worldwide severity and control of asthma in children and adults: The global asthma insights and reality surveys. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004; 114(1):40-47.
341. Rabe K, Vermeire P, Soriano J, Maier W. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. The European respiratory journal. 2000; 16(5):802–7.
342. Rackemann F. Intrinsic asthma. Journal of Allergy. 1940; 11(2):147-162.
343. Radhakrishna N, Tay T, Hore-Lacy F, Hoy R, Dabscheck E, Hew M. Profile of difficult to treat asthma patients referred for systematic assessment. Respiratory Medicine. 2016; 117:166–173.
344. Raedler D, Ballenberger N, Klucker E, Böck A, Otto R, Prazeres da Costa O, et al. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2015; 135(1):81–91.
345. Rajakulasingam K, Durham S, O'Brien F, Humbert M, Barata L, Reece L, et al. Enhanced expression of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) alpha chain in human allergen-induced rhinitis with co-localization to mast cells, macrophages, eosinophils, and dendritic cells. The Journal of allergy and clinical immunology. 1997; 100(1):78–86.
346. Rajan J, Wineinger N, Stevenson D, White A. Prevalence of aspirin-exacerbated respiratory disease among asthmatic patients: A meta-analysis of the literature. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2015; 135(3): 676-681.
347. Ramezanpour M, Moraitis S, Smith J, Wormald P, Vreugde S. Th17 Cytokines Disrupt the Airway Mucosal Barrier in Chronic Rhinosinusitis. Mediators of Inflammation. 2016; 2016:1–7.
348. Raundhal M, Morse C, Khare A, Oriss T, Milosevic J, Trudeau J, et al. High IFN-γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. Journal of Clinical Investigation. 2015; 125(8):3037–3050.
349. Ray A, Kolls J. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. Trends in Immunology. 2017; 38(12):942–954.
350. Ray A, Raundhal M, Oriss T, Ray P, Wenzel S. Current concepts of severe asthma. Journal of Clinical Investigation. 2016; 126(7):2394–2403.
351. Reddel H, Bateman E, Becker A, Boulet L, Cruz A, Drazen J, et al. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. The European respiratory journal. 2015; 46(3):622–39.
352. Reddel H, Taylor D, Bateman E, Boulet L, Boushey H, Busse W, et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Control and Exacerbations. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2009; 180(1):59–99.
353. Redhu N, Gounni A. The high affinity IgE receptor (FcεRI) expression and function in airway smooth muscle. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 2013; 26(1):86–94.
354. Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. Trends in Immunology. 2012; 33(11):571–577.
355. Rincon M, Irvin C. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. International Journal of Biological Sciences. 2012; 8(9):1281–90.
356. Robinson D, Damia R, Zeibecoglou K, Molet S, North J, Yamada T, et al. CD34+/Interleukin-5R α Messenger RNA+ Cells in the Bronchial Mucosa in Asthma: Potential Airway Eosinophil Progenitors. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 1999; 20(1):9–13.
357. Roche N, Reddel H, Agusti A, Bateman E, Krishnan J, Martin R, et al. Integrating real-life studies in the global therapeutic research framework. The Lancet Respiratory Medicine. 2013; 1(10):29-30.
358. Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D. Allergic vs nonallergic asthma: What makes the difference? Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002; 57(7):607-613.
359. Ronmark E, Andersson C, Nyström L, Forsberg B, Järvholm B, Lundbäck B. Obesity increases the risk of incident asthma among adults. European Respiratory Journal. 2005; 25(2):282–288.

360. Rosenberg H, Dyer K, Foster P. Eosinophils: Changing perspectives in health and disease. Nature Reviews Immunology. 2013; 13(1):9-22.
361. Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Berube J, Olivenstein R, et al. IL-17 Promotes p38 MAPK-Dependent Endothelial Activation Enhancing Neutrophil Recruitment to Sites of Inflammation. The Journal of Immunology. 2010; 184(8):4531-7.
362. Saffar A, Ashdown H, Gounni A. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. Current drug targets. 2011; 12(4):556–62.
363. Saha S, Berry M, Parker D, Siddiqui S, Morgan A, May R, et al. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2008; 121(3):685-91.
364. Sahal A, James K, Mitchell V, Das J, Mansur A. Correlation of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) and peripheral blood eosinophils (PBE) in refractory asthma. European Respiratory Journal. 2014; Suppl 58 (44): P1032.
365. Sakagami T, Hasegawa T, Koya T, Furukawa T, Kawakami H, Kimura Y, et al. Cluster analysis identifies characteristic phenotypes of asthma with accelerated lung function decline. Journal of Asthma. 2014; 51(2):113–118.
366. Samter M, Beers R. Intolerance to aspirin. Clinical studies and consideration of its pathogenesis. Annals of internal medicine. 1968; 68(5):975–83.
367. Sandrini A, Taylor R, Thomas P, Yates D. Fractional exhaled nitric oxide in asthma: an update. Respirology. 2010; 15(1):57–70.
368. Sastre J, Olaguibel J, Vega J, Pozo V, Picado C, Lopez Viña A. Cut-off points for defining asthma control in three versions of the Asthma Control Questionnaire. Journal of Asthma. 2010; 47(8):865–870.
369. Scadding G, Walker S. Poor asthma control? — then look up the nose. The importance of co-morbid rhinitis in patients with asthma. Primary Care Respiratory Journal. 2012; 21(2):222–228.
370. Schatz M, Hsu J, Zeiger R, Chen W, Dorenbaum A, Chipps B, et al. Phenotypes determined by cluster analysis in severe or difficult-to-treat asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 133(6):1549-56.
371. Schatz M, Meckley L, Kim M, Stockwell B, Castro M. Asthma Exacerbation Rates in Adults Are Unchanged Over a 5-Year Period Despite High-Intensity Therapy. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2014; 2(5):570-574.
372. Schatz M, Rosenwasser L. The Allergic Asthma Phenotype. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2014; 2(6):645–648.
373. Schatz M, Sorkness C, Li J, Marcus P, Murray J, Nathan R, et al. Asthma Control Test: reliability, validity, and responsiveness in patients not previously followed by asthma specialists. The Journal of allergy and clinical immunology. 2006; 117(3):549–56.
374. Schleich F, Brusselle G, Louis R, Vandenplas O, Michils A, Pilette C, et al. Heterogeneity of phenotypes in severe asthmatics. The Belgian Severe Asthma Registry (BSAR). Respiratory Medicine. 2014; 108(12):1723–1732.
375. Schleich F, Chevremont A, Paulus V, Henket M, Manise M, Seidel L, et al. Importance of concomitant local and systemic eosinophilia in uncontrolled asthma. European Respiratory Journal. 2014; 44(1):97–108.
376. Schleich F, Seidel L, Sele J, Manise M, Quaedvlieg V, Michils A, et al. Exhaled nitric oxide thresholds associated with a sputum eosinophil count ≥ 3% in a cohort of unselected patients with asthma. Thorax. 2010; 65(12):1039–1044.
377. Schneider A, Wagenpfeil G, Jörres R, Wagenpfeil S. Influence of the practice setting on diagnostic prediction rules using FENO measurement in combination with clinical signs and symptoms of asthma. BMJ open. 2015; 5(11):009676.
378. Schofield J, Burg D, Nicholas B, Strazzeri F, Brandsma J, Staykova D, et al. Stratification of asthma phenotypes by airway proteomic signatures. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2019; 144(1):70–82.
379. Sears M, Burrows B, Flannery E, Herbison G, Hewitt C, Holdaway M. Relation between Airway Responsiveness and Serum IgE in Children with Asthma and in Apparently Normal Children. New England Journal of Medicine. 1991; 325(15):1067–1071.
380. See K, Christiani D. Normal Values and Thresholds for the Clinical Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels in the US General Population. Chest. 2013; 143(1):107–116.
381. Sehmi R, Lim H, Mukherjee M, Huang C, Radford K, Newbold P, et al. Benralizumab attenuates airway eosinophilia in prednisone-dependent asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2018; 141(4):1529-1532.
382. Sehmi R, Smith S, Kjarsgaard M, Radford K, Boulet L, Lemiere C, et al. Role of local eosinophilopoietic processes in the development of airway eosinophilia in prednisone-dependent severe asthma. Clinical & Experimental Allergy. 2016; 46(6):793–802.
383. Selvarajah S, Todd I, Tighe P, John M, Bolton C, Harrison T, et al. Multiple Circulating Cytokines Are Coelevated in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Mediators of Inflammation. 2016; 2016:1–9.
384. Seys S, Grabowski M, Adriaensen W, Decraene A, Dilissen E, Vanoirbeek J, et al. Sputum cytokine

mapping reveals an 'IL-5, IL-17A, IL-25-high' pattern associated with poorly controlled asthma. Clinical & Experimental Allergy. 2013; 43(9):1009–1017.
385. Seys S, Scheers H, Brande P, Marijsse G, Dilissen E, Bergh A, et al. Cluster analysis of sputum cytokine-high profiles reveals diversity in T(h)2-high asthma patients. Respiratory Research. 2017; 18(1):39.
386. Shaw D, Sousa A, Fowler S, Fleming L, Roberts G, Corfield J, et al. Clinical and inflammatory characteristics of the European U-BIOPRED adult severe asthma cohort. European Respiratory Journal. 2015; 46(5):1308–1321.
387. Shimoda T, Obase Y, Kishikawa R, Iwanaga T. Influence of cigarette smoking on airway inflammation and inhaled corticosteroid treatment in patients with asthma. Allergy and Asthma Proceedings. 2016; 37(4):50–58.
388. Shirai T, Furuhashi K, Suda T, Chida K. Relationship of the Asthma Control Test with pulmonary function and exhaled nitric oxide. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2008; 101(6):608–613.
389. Shoda T, Futamura K, Kobayashi F, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Cell type-dependent effects of corticosteroid on periostin production by primary human tissue cells. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013; 68(11):1467-70.
390. Shrimanker R, Pavord I. Interleukin-5 Inhibitors for Severe Asthma: Rationale and Future Outlook. BioDrugs. 2017; 31(2):93–103.
391. Sidhu S, Yuan S, Innes A, Kerr S, Woodruff P, Hou L, et al. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF- activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010; 107(32):14170–14175.
392. Siew L, Wu S, Ying S, Corrigan C. Cigarette smoking increases bronchial mucosal IL-17A expression in asthmatics, which acts in concert with environmental aeroallergens to engender neutrophilic inflammation. Clinical & Experimental Allergy. 2017; 47(6):740–750.
393. Sihra B, Kon O, Grant J, Kay A. Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. The Journal of allergy and clinical immunology. 1997; 99(5):699–706.
394. Silkoff P, Laviolette M, Singh D, FitzGerald J, Kelsen S, Backer V, et al. Identification of airway mucosal type 2 inflammation by using clinical biomarkers in asthmatic patients. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2017; 140(3):710–719.
395. Silvestri M, Spallarossa D, Frangova Yourukova V, Battistini E, Fregonese B, Rossi G. Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood eosinophilia in atopic children with mild-intermittent asthma. The European respiratory journal. 1999; 13(2):321–6.
396. Simpson J, Scott R, Boyle M, Gibson P. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. Respirology. 2006; 11(1):54–61.
397. Sippel J, Holden W, Tilles S, O'Hollaren M, Cook J, Thukkani N, et al. Exhaled nitric oxide levels correlate with measures of disease control in asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2000; 106(4):645–650.
398. Siroux V, Basagaña X, Boudier A, Pin I, Garcia-Aymerich J, Vesin A, et al. Identifying adult asthma phenotypes using a clustering approach. The European respiratory journal. 2011; 38(2):310–7.
399. Sivapalan P, Diamant Z, Ulrik C. Obesity and asthma. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2015; 21(1): 80–85.
400. Smith S, Chen R, Kjarsgaard M, Huang C, Oliveria J, O'Byrne P, et al. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2016; 137(1):75–86.
401. Soma T, Iemura H, Naito E, Miyauchi S, Uchida Y, Nakagome K, et al. Implication of fraction of exhaled nitric oxide and blood eosinophil count in severe asthma. Allergology International. 2018; 67:3–11.
402. Song W, Jo E, Lee J, Kang H, Cho S, Min K, et al. Staphylococcal enterotoxin specific IgE and asthma: a systematic review and meta-analysis. Asia Pacific allergy. 2013; 3(2):120–6.
403. Soriano J, Abajobir A, Abate K, Abera S, Agrawal A, Ahmed M, et al. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. The Lancet Respiratory Medicine. 2017; 5(9):691–706.
404. Spears M, Cameron E, Chaudhuri R, Thomson N. Challenges of treating asthma in people who smoke. Expert Review of Clinical Immunology. 2010; 6(2):257-268.
405. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Santo J, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. Nature Reviews Immunology. 2013; 13(2):145–149.
406. Spits H, Cupedo T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. Annual Review of Immunology. 2012; 30(1):647–675.
407. Strunk R, Szefler S, Phillips B, Zeiger R, Chinchilli V, Larsen G, et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2003; 112(5):883–892.
408. Sullivan P, Ghushchyan V, Marvel J, Barrett Y, Fuhlbrigge A. Association Between Pulmonary Function and Asthma Symptoms. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2019; 7(7):2319–2325.

409. Sullivan S, Rasouliyan L, Russo P, Kamath T, Chipps B, TENOR Study Group. Extent, patterns, and burden of uncontrolled disease in severe or difficult-to-treat asthma. Allergy. 2007; 62(2):126–33.
410. Suruki R, Daugherty J, Boudiaf N, Albers F. The frequency of asthma exacerbations and healthcare utilization in patients with asthma from the UK and USA. BMC Pulmonary Medicine. 2017; 17(1):74.
411. Sutherland E, Goleva E, King T, Lehman E, Stevens A, Jackson L, et al. Cluster Analysis of Obesity and Asthma Phenotypes. PLoS ONE. 2012; 7(5):36631.
412. Sutherland E, Lehman E, Teodorescu M, Wechsler M, National Heart, Lung and B.I.A.C.R.N. Body mass index and phenotype in subjects with mild-to-moderate persistent asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2009; 123(6):1328–1334.
413. Svenningsen S, Fowler S, Nair P. Clinical biomarkers and noninvasive assessment of severe asthma. In: Chung K, Israel E, Peter G. editors. Severe asthma. ERS Monograph. 2019; 93–112.
414. Sweeney J, Patterson C, Menzies-Gow A, Niven R, Mansur A, Bucknall C, et al. Comorbidity in severe asthma requiring systemic corticosteroid therapy: cross-sectional data from the Optimum Patient Care Research Database and the British Thoracic Difficult Asthma Registry. Thorax. 2016; 71(4):339–346.
415. Tacheva T, Dimov D, Aleksandrova E, Bialecka M, Gulubova M, Vlaykova T. MMP12 -82 A>G Promoter Polymorphism in Bronchial Asthma in a Population of Central Bulgaria. Laboratory Medicine. 2018; 49(3):211–218.
416. Tajiri T, Matsumoto H, Gon Y, Ito R, Hashimoto S, Izuhara K, et al. Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. Allergy. 2016; 71(10):1472–1479.
417. Takahashi K, Pavlidis S, Ng Kee Kwong F, Hoda U, Rossios C, Sun K, et al. Sputum proteomics and airway cell transcripts of current and ex-smokers with severe asthma in U-BIOPRED: an exploratory analysis. European Respiratory Journal. 2018; 51(5):1702173.
418. Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, et al. Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2006; 118(1):98-104.
419. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. Biochemical Journal. 1993; 294:271-8.
420. Tay T, Radhakrishna N, Hore-Lacy F, Smith C, Hoy R, Dabscheck E, et al. Comorbidities in difficult asthma are independent risk factors for frequent exacerbations, poor control and diminished quality of life. Respirology. 2016; 21(8):1384–1390.
421. Teague W, Phillips B, Fahy J, Wenzel S, Fitzpatrick A, Moore W, et al. Baseline Features of the Severe Asthma Research Program (SARP III) Cohort: Differences with Age. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2018; 6(2):545–554.
422. The ENFUMOSA Study. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Respiratory Journal. 2003; 22(3):470–477.
423. Thomas C, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. Trends in Immunology. 2013; 34(7):317–328.
424. Thomas M, Kay S, Pike J, Williams A, Rosenzweig J, Hillyer E, et al. The Asthma Control TestTM (ACT) as a predictor of GINA guideline-defined asthma control: analysis of a multinational cross-sectional survey. Primary Care Respiratory Journal. 2009; 18(1):41–49.
425. Thomson N, Spears M. The role of cigarette smoking on persistent airflow obstruction in asthma. Annals of Respiratory Medicine. 2011;
426. Thomson N, Chaudhuri R. Asthma in smokers: Challenges and opportunities. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2009; 15(1):39-45.
427. Thomson N, Chaudhuri R, Heaney L, Bucknall C, Niven R, Brightling C, et al. Clinical outcomes and inflammatory biomarkers in current smokers and exsmokers with severe asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013; 131(4):1008–1016.
428. Tomassen P, Jarvis D, Newson R, Ree R, Forsberg B, Howarth P, et al. Staphylococcus aureus enterotoxin-specific IgE is associated with asthma in the general population: a GA2LEN study. Allergy. 2013; 68(10):1289–1297.
429. Torén K, Hermansson B. Incidence rate of adult-onset asthma in relation to age, sex, atopy and smoking: A Swedish population-based study of 15 813 adults. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 1999; 3(3):192-7.
430. Tran T, Zeiger R, Peters S, Colice G, Newbold P, Goldman M, et al. Overlap of atopic, eosinophilic, and TH2-high asthma phenotypes in a general population with current asthma. Annals of Allergy, Asthma and Immunology. 2016; 116(1):37–42.
431. Trejo Bittar H, Yousem S, Wenzel S. Pathobiology of Severe Asthma. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2015; 10(1):511–545.
432. Trevor J, Deshane J. Refractory asthma: Mechanisms, targets, and therapy. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 69(7):817–27.

433. Tseliou E, Bessa V, Hillas G, Delimpoura V, Papadaki G, Roussos C, et al. Exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH in severe refractory asthma. Chest. 2010; 138(1):107–13.
434. Tsvetkova-Vicheva V, Gecheva S, Komsa-Penkova R, Velkova A, Lukanov T. IL-17 producing T cells correlate with polysensitization but not with bronchial hyperresponsiveness in patients with allergic rhinitis. Clinical and Translational Allergy. 2014; 4(1):3.
435. Turan N, Edwards M, Bates S, Shaw D, Chung K, Loza M, et al. IL-6 pathway upregulation in subgroup of severe asthma is associated with neutrophilia and poor lung function. Clinical & Experimental Allergy. 2018; 48(4):475–478.
436. Vandenplas O, Dramaix M, Joos G, Louis R, Michils A, Verleden G, et al. The impact of concomitant rhinitis on asthma-related quality of life and asthma control. Allergy. 2010; 65(10):1290–1297.
437. Varricchi G, Bagnasco D, Borriello F, Heffler E, Canonica G. Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: evidence and unmet needs. Current opinion in allergy and clinical immunology. 2016; 16(2):186–200.
438. Vatrella A, Fabozzi I, Calabrese C, Maselli R, Pelaia G. Dupilumab: a novel treatment for asthma. Journal of Asthma and Allergy. 2014; 7:123-130.
439. Veen I, Brinke A, Sterk P, Sont J, Gauw S, Rabe K, et al. Exhaled nitric oxide predicts lung function decline in difficult-to-treat asthma. European Respiratory Journal. 2008; 32(2):344-9.
440. Velikova T, Lazova S, Perenovska P, Tumangelova-Yuzeir K, Miteva D, Velikov P, et al. Th17 cells in Bulgarian children with chronic obstructive lung diseases. Allergologia et Immunopathologia. 2019; 47(3):227–233.
441. Virchow J, Kroegel C, Walker C, Matthys H. Inflammatory determinants of asthma severity: mediator and cellular changes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe asthma. The Journal of allergy and clinical immunology. 1996; 98:S27-33.
442. Vu A, Baba T, Chen X, Le T, Kinoshita H, Xie Y, et al. Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2–Toll-like receptor 6 pathway. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010; 126(5):985-993.
443. Wagener A, Nijs S, Lutter R, Sousa A, Weersink E, Bel E, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO)and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. Thorax. 2015; 70(2):115–20.
444. Wagers S, Adcock I. The lessons from U-BIOPRED. In: Chung K, Israel E, Peter G. editors. Severe asthma. ERS Monograph. 2019; 152–166.
445. Wakefield M, Ruffin R, Campbell D, Roberts L, Wilson D. Smoking-related beliefs and behaviour among adults with asthma in a representative population sample. Australian and New Zealand Journal of Medicine. 1995; 25(1):12-7.
446. Walker C, Bauer W, Braun R, Menz G, Braun P, Schwarz F, et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994; 150(4):1038-48.
447. Wang L, Liang R, Zhou T, Zheng J, Liang B, Zhang H, et al. Identification and validation of asthma phenotypes in Chinese population using cluster analysis. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2017; 119(4):324–332.
448. Wang X, Zhang N, Bo M, Holtappels G, Zheng M, Lou H, et al. Diversity of T H cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2016; 138(5):1344–1353.
449. Warke T, Fitch P, Brown V, Taylor R, Lyons J, Ennis M, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. Thorax. 2002; 57(5):383–7.
450. Watts A, Cripps A, West N, Cox A. Modulation of Allergic Inflammation in the Nasal Mucosa of Allergic Rhinitis Sufferers With Topical Pharmaceutical Agents. Frontiers in Pharmacology. 2019; 10:294.
451. Weatherall M, Travers J, Shirtcliffe P, Marsh S, Williams M, Nowitz M, et al. Distinct clinical phenotypes of airways disease defined by cluster analysis. The European respiratory journal. 2009; 34(4):812–8.
452. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, et al. Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels. New England Journal of Medicine. 2013; 368(26):2455–2466.
453. Wenzel S. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. Lancet. 2006; 368(9537):804-13.
454. Wenzel S. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. Nature Medicine. 2012; 18(5):716–725.
455. Wenzel S. Emergence of biomolecular pathways to define novel asthma phenotypes: Type-2 immunity and beyond. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2016; 55(1):1-4.
456. Wenzel S, Schwartz L, Langmack E, Halliday J, Trudeau J, Gibbs R, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1999; 160(3):1001-8.
457. Wenzel S, Trudeau J, Barnes S, Zhou X, Cundall M, Westcott J, et al. TGF-beta and IL-13 synergistically increase eotaxin-1 production in human airway fibroblasts. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). 2002; 169(8):4613–9.

458. Widal F, Abrami P, Lermoyez J. Anaphylaxie et idiosyncrasie. Allergy proceedings : the official journal of regional and state allergy societies. 1992; 14(5):373–6.
459. Wong C, Chua C, Liam C, Goh K. Gastro-oesophageal reflux disease in «difficult-to-control» asthma: prevalence and response to treatment with acid suppressive therapy. Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 2006; 23(9):1321–1327.
460. Wood L, Baines K, Fu J, Scott H, Gibson P. The Neutrophilic Inflammatory Phenotype Is Associated With Systemic Inflammation in Asthma. Chest. 2012; 142(1):86–93.
461. Woodruff P, Boushey H, Dolganov G, Barker C, Yang Y, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007; 104(40):15858-63.
462. Woodruff P, Modrek B, Choy D, Jia G, Abbas A, Ellwanger A, et al. T-helper Type 2–driven Inflammation Defines Major Subphenotypes of Asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2009; 180(5):388–395.
463. Wu L, Zarrin A. The production and regulation of IgE by the immune system. Nature Reviews Immunology. 2014; 14(4):247–259.
464. Wu W, Bleecker E, Moore W, Busse W, Castro M, Chung K, et al. Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 133(5):1280–1288.
465. Wynn T. IL-13 Effector Functions. Annual Review of Immunology. 2003; 21(1):425–456.
466. Yamaguchi Y, Ono J, Masuoka M, Ohta S, Izuhara K, Ikezawa Z, et al. Serum periostin levels are correlated with progressive skin sclerosis in patients with systemic sclerosis. British Journal of Dermatology. 2013; 168(4):717-25.
467. Yanagibashi T, Satoh M, Nagai Y, Koike M, Takatsu K. Allergic diseases: From bench to clinic - Contribution of the discovery of interleukin-5. Cytokine. 2017; 98:59–70.
468. Yancey S, Keene O, Albers F, Ortega H, Bates S, Bleecker E, et al. Biomarkers for severe eosinophilic asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2017; 140(6):1509–1518.
469. Yu S, Kim H, Chang Y, Dekruyff R, Umetsu D. Innate lymphoid cells and asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 133(4):943-50.
470. Zeiger R, Schatz M, Dalal A, Chen W, Sadikova E, Suruki R, et al. Blood Eosinophil Count and Outcomes in Severe Uncontrolled Asthma: A Prospective Study. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2017; 5(1):144-153.
471. Zeiger R, Schatz M, Li Q, Chen W, Khatry D, Gossage D, et al. High Blood Eosinophil Count Is a Risk Factor for Future Asthma Exacerbations in Adult Persistent Asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2014; 2(6):741-750.
472. Zeiger R, Schatz M, Zhang F, Crawford W, Kaplan M, Roth R, et al. Elevated exhaled nitric oxide is a clinical indicator of future uncontrolled asthma in asthmatic patients on inhaled corticosteroids. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011; 128(2):412–414.
473. Zein J, Dweik R, Comhair S, Bleecker E, Moore W, Peters S, et al. Asthma Is More Severe in Older Adults. PLOS ONE. 2015; 10(7):0133490.
474. Zhang J, Bai C. Elevated Serum Interleukin-8 Level as a Preferable Biomarker for Identifying Uncontrolled Asthma and Glucocorticosteroid Responsiveness. Tanaffos. 2017; 16(4):260–269.
475. Zhang X, Simpson J, Powell H, Yang I, Upham J, Reynolds P, et al. Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. Clinical & Experimental Allergy. 2014; 44(9):1137–1145.
476. Zhao N, Liu H, Sun Y, Li Y. Role of interleukin-6 polymorphisms in the development of allergic rhinitis. Genetics and Molecular Research. 2016; 15(1):gmr6987.

XI. Публикации и участия в научни форуми по темата на дисертацията

11.1 Публикации

1. Д. Димитрова, В. Юрукова. Съвременно лечение на бронхиална астма. Пулмология и педиатрия. Медик арт 2015, 2: 7-12.

2. D. Dimitrova, V. Youroukova. Severe asthma: definition, immunological characterization and molecular-targeted therapy. Thoracic Medicine 2015; 7(2): 8-25.

3. Д. Димитрова, В. Юрукова. Серумен периостин. Нов биомаркер за рефрактерно Th2/еозинофилно възпаление и ремоделиране на дихателните пътища при бронхиална астма. Medical Magazine 2015, 20: 18-22.

4. Д. Димитрова. Бронхиалната астма в клиничната практика: препоръки и предизвикателства. Топмедика 2016, 2: 9-13.

5. V. Youroukova, D. Dimitrova, Y. Slavova, A. Valerieva, S. Lesichkova. Eosinophilic phenotype - the dominant inflammatory type of uncontrolled moderate and severe bronchial asthma. Thoracic Medicine, 2016; 8(3):8-21.

6. В. Юрукова, Д.Димитрова. Постигане на добър контрол на симптомите и редукция на риска при бронхиална астма. GP News 2017, брой 1, 38-42.

7. V. Youroukova, D. Dimitrova, A. Valerieva, S. Lesichkova, Ts. Velikova, E. Ivanova-Todorova, K. Tumangelova. Phenotypes determined by cluster analysis in moderate to severe bronchial asthma. Folia Medica, 2017 Jun 1;59(2):165-173. DOI: 10.1515/folmed-2017-0031.

8. Д. Димитрова, В.Юрукова. Бронхиалната астма – „step down“ или „step up“. Топмедика 2017, 2: 26-29.

9. D. Dimitrova, V. Youroukova, K. Tumangelova-Yuzeir, E. Ivanova-Todorova, Ts. Velikova. Serum periostin levels in patients with moderate to severe persistent bronchial asthma. C.R.Acad.Bulg.Sci.2019; 72 (7): 966-972. DOI: 10.7546/CRABS.2019.07.15. *IF (2018) 0.321.*

10. D. Dimitrova, V. Youroukova, K. Tumangelova-Yuzeir, E. Ivanova-Todorova, Ts. Velikova. Serum levels of IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 and IL-17A in pre-defined groups of adult patients with moderate and severe bronchial asthma. Respir Med. 2019 Jun 26; 154:144-154. DOI: 10.1016/j.rmed.2019.06.024. *IF (2019) 3.237.*

11.2 Участия в международни форуми и резюмета публикувани в списания

1. D. Dimitrova, V. Youroukova, Y. Slavova, D. Marinova, Ts. Velikova, K. Tumangelova. Serum periostin as a biomarker for diagnosis and management of patients with moderate and severe persistent asthma. Poster presentation 032. 3rd European Update Congress in Pneumology, PneumoUpdate Europe 2016, Prague, Czech Republic, 24-25 June 2016, Best poster award.
2. Vania Youroukova, Denitsa Dimitrova, Yanina Slavova, Spaska Lesichkova. Cluster Analysis Of Patients With Moderate To Severe Uncontrolled Bronchial Asthma. International Severe Asthma Forum 2016 (ISAF 2016), 17 - 19 November 2016, Manchester, UK. Clin Transl Allergy 2017, 7(Suppl 2):14
3. Denitsa Dimitrova, Vania Youroukova, Tsvetelina Velikova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Anna Valerieva. Serum Periostin Levels As A Biomarker For Impaired Lung Function In Adult Patients With Moderate To Severe Asthma. Poster award. International Severe Asthma Forum 2016 (ISAF 2016), 17 - 19 November 2016, Manchester, UK. Clin Transl Allergy 2017, 7(Suppl 2):14
4. Youroukova V., Dimitrova D., Valerieva A., Velikova T., Tumangelova-Yuzeir K. Serum IL-6, IL-17A and periostin levels in different clusters of adult patients with moderate to severe asthma. Poster Discussion Session (PDS). EAACI International Congress 2017, 17-21 June 2017, Helsinki, Finland. Allergy. Volume 72, Issue S103, 10.1111/all.13251
5. Dimitrova D., Youroukova V., Velikova T., Tumangelova-Yuzeir K. Periostin and IL-17A: serum levels in adult patients with moderate to severe bronchial asthma. Poster Discussion Session (PDS). EAACI International Congress 2017, 17-21 June 2017, Helsinki, Finland. Allergy. Volume 72, Issue S103, 10.1111/all.13251
6. D. Dimitrova, V. Youroukova, T. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir, S. Lesichkova. Serum levels of IL-6 in adult patients with moderate to severe asthma. Thematic poster presentation. ERS International Congress 2017, 09-13. September 2017, Milan, Italy. European Respiratory Journal 2017 50: PA1166; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA1166
7. D. Dimitrova, V. Youroukova, T. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir. Predictors of severe exacerbations in patients with moderate and severe asthma. Accepted for poster discussion presentation at the ERS International Congress 15-19 September 2018 Paris, France. European Respiratory Journal 2018 52: PA5500; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA5500

8. D. Dimitrova, V. Youroukova, T. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir. Serum levels of IL-5, IL-6 and IL-8 in moderate and severe asthma clusters. Accepted for poster discussion presentation at the ERS International Congress 15-19 September 2018 Paris, France. Awarded the ERS Young Scientist Sponsorship. European Respiratory Journal 2018 52: PA5060; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA5060

11.3 Участия в български форуми

1. Д. Димитрова, В. Юрукова, Я. Славова, М. Преславова, Ц. Великова, К. Тумангелова. Маркери на възпалението при неконтролирана умерено тежка и тежка персистираща бронхиална астма. ОР 24. 6ти конгрес на БДББ, 9-12 Юни 2016, Златни пясъци. Торакална медицина 2016, VIII (прил 1): 34-34
2. Д.Димитрова, В.Юрукова, Ц.Великова, К.Тумангелова-Юзеир. Периостин и IL-17A: Серумни нива при възрастни пациенти със средно-тежка и тежка бронхиална астма. Лятна научна среща на БДББ, 22-24.06.2018 Боровец, България
3. Д. Димитрова, В. Юрукова. Високи нива на азотен окис в издишан въздух –рисков фактор за чести екзацербации при умерено тежка и тежка персистираща бронхиална астма. ОР 4.3. 7ми конгрес на БДББ, 18-21 октомври 2018, Златни пясъци (България)
4. Д. Димитрова, В. Юрукова, Ц.Великова, К.Тумангелова-Юзеир. Серумни нива на IL-5,IL-6,IL-8,IL-13 и IL-17A при предварително дефинирани Th2-субгрупи на пациенти с умерено тежка и тежка бронхиална астма. ОР 4.3. 7ми конгрес на БДББ, 18-21 октомври 2018, Златни пясъци (България)

11.4 Проекти свързани с темата на дисертацията

1. Участие в ГРАНТ, 2015 г. Финансираща организация: Съвет по медицинска наука, Медицински университет – София. Номер на проекта:№ 308/15.01.2015, договор №75/2015. Тема: Фенотипизиране на бронхиална астма. Ръководител на проекта: доц. Ваня Юрукова д.м.

XII. Приложения

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ

КББ - МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МБАЛББ „Света София“ ЕАД
ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ

Име:……Възраст……..
Наименование на научното изследване: „Фенотипизиране на бронхиална астма“
Лице за контакти: д-р Деница Димитрова; МБАЛББ „Света София“ ЕАД бул. “Акад. Иван Гешов“№19 гр. София; 1431, телефон за връзка: +359894652928

Моля, прочетете внимателно съдържанието на този формуляр, преди да решите да вземете участие в научното изследване.

Този формуляр ще Ви информира относно целта на изследването, потенциалните ползи и рискове от провеждането му и участието Ви в него. Задайте на екипа, провеждащ изследването толкова въпроси, колкото е необходимо, за да дадете своето съгласие за участие в изследването. Може да задавате въпроси относно изследването по всяко време;

Вашето съгласие или отказ да участвате няма да повлияе на редовните медицински грижи, които ще получите;

Нарастват данните и доказателствата, че астмата е хетерогенно заболяване. Хода на болестта и повлияването от утвърдените до момента терапевтични схеми могат да бъдат напълно различни при отделните индивиди. Целта на настоящето изследване е да се установят механизмите и връзките между изследваните показатели, да се анализира значимостта на проучваните маркери и приложимостта им в клиничната практика. Това ще доведе до възможности за по-добро познаване на болестния процес, осигуряване на по-добър контрол и развитие на индивидуализиран подход при лечение на заболяването.

За да бъдете включени в изследването, трябва да отговаряте на определени критерии, които ще Ви бъдат разяснени от екипа провеждащ изследването. Ще бъде направен преглед на Вашата медицинска документация и здравословното Ви състояние. Ще бъде поискано да предоставите лична информация. Лекарят отговорен за провеждането на изследването ще отговори на всички Ваши въпроси свързани с изследването.

ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Ако решите да участвате в научното изследване, ще се наложи да осъществите 1 визита в базовата организация провеждаща изследването: МБАЛББ „Света София“ ЕАД, за извършване на медицински преглед, функционална оценка на дишането и вземане на биологични материали за изследване. Изследователският екип ще Ви информира за резултатите от изследванията при повторна визита, когато са обработени данните.

ПРОЦЕДУРИ:

Предлаганите Ви изследвания ще бъдат извършени от квалифициран медицински персонал.
След като подпишете този формуляр, Вие давате съгласие да Ви бъдат извършвани следните процедури:

- Ще бъдете попитани за Вашата медицинска история, за началото на заболяването, симптоми, алергии, вредни фактори, фамилна обремененост, придружаващи заболявания, проведени диагностични процедури и терапия, прием на медикаменти. Ще бъдете помолени да предоставите Вашата медицинска документация. Ще бъде извършен физикален преглед на Вашето тяло.
- Ще бъде проведено функционално изследване на дишането (спирометрия). Тестът е безболезнен. Извършва се след преустановяване инхалирането на кратко действащи бета-2 агонист от 6-8 часа преди извършване на спирометрията и на дълго действащи бета-2 агонисти 24 часа преди изследването. Ще Ви бъде обяснена и демонстрирана предварително техниката на изпълнение. Провежда се в седнало положение. След максимално дълбоко вдишване, ще

бъдете помолени да издишате въздуха възможно по-бързо и по-силно в мундщук свързан към апаратурата. Усилието да продължи до издишване на всичкия възможен въздух. Ще се проведат минимум 3 подобни опита. При необходимост ще се извърши бронходилататорен тест. Той се състои в повтаряне на описаното по-горе изследване 15 мин след инхалация на Salbutamol 400 mcg.

- Ще се използва игла за взимане на кръвни проби (20 мл). Вашата кръв ще бъде използвана за стандартни и имунологични изследвания.

ПОТЕНЦИАЛНИ ПОЛЗИ:

При съгласие за участие, ще получите възможност за по-задълбочено изследване на Вашето заболяване, което ще осигури информация и възможности за бъдещо оптимизиране на диагностиката и лечението на бронхиалната астма.

ПОТЕНЦИАЛНИ РИСКОВЕ:

Рисковете свързани с вземане на кръв са болка, кървене, замайване, подуване и посиняване, рядко инфекция на мястото от където е взета кръвта. При необходимост ще Ви бъдат осигурени адекватни медицински грижи;

РАЗХОДИ

Докато участвате в изследването ще продължите да плащате за редовните медицински грижи за Вас (здравни вноски, потребителски такси), които не са част от това изследване. Няма да поемате никакви допълнителни разходи като участник в него. Няма да получавате заплащане за участието си в изследването.

ПОВЕРИТЕЛНОСТ

Изследователският екип ще събира и използва документация, която съдържа лична информация за Вас и Вашето здраве. Тази документация може да Ви идентифицира и нейната поверителност ще бъде пазена, доколкото е възможно. Като подпишете този формуляр, Вие се съгласявате да използваме тази информация за това изследване. Имате право да видите и получите копие с резултатите от изследванията.

Вашето участие в това изследване е доброволно. Можете да изберете да не участвате или да се оттеглите от изследването по всяко едно време. Ако желаете да преустановите участието си в изследването, информирайте изследователския екип.

Ще получите оригинален екземпляр от този формуляр.

СЪГЛАСИЕ

Прочетох и разбрах този документ за информирано съгласие. Целта и процедурите на това изследване ми бяха разяснени подробно. Беше ми дадено достатъчно време да прегледам информацията и да задам въпроси относно изследването. На всички мои въпроси относно участието ми в изследването беше отговорено изчерпателно.

Доброволно се съгласявам да участвам в това научно изследване. Не се отказвам от моите законови права като подписвам този формуляр за съгласие. Ще получа подписан и датиран оригинален екземпляр от този формуляр за съгласие.

Име Презиме

Фамилия

_____ _____

Подпис на участника Дата

Име на лицето, разясняващо формуляра за информирано съгласие

_____ _____

Подпис на лицето разясняващо формуляра Дата

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

АНКЕТНА КАРТА

Анкетна карта № **ДАТА:** **РД:**

Име: .....

Възраст: ..... год.; Пол: ……; Телесно тегло ..... кг.; Ръст ..... см.;

1. На каква възраст бяхте при първата изява на бронхиална астма?
2. Какви оплаквания имахте при диагностицирането на Вашата бронхиална астма?
   Пристъпи на свиркащо дишане
   Пристъпи на затруднено дишане
   Стягане в гърдите
   Пристъпна кашлица
   Други (опишете ги……)
3. Симптомите свързани ли са с физическо усилие?
4. Кога се проявяват предимно симптомите?
   През деня
   През нощта
   През цялото денонощие
5. Ако симптомите са през нощта, будеха ли Ви от сън?
6. Тези оплаквания появяват ли се в определен сезон на годината?
   пролет
   лято
   есен
   зима
   целогодишни са
7. Симптомите се появяват или засилват при :
   физическо усилие, вирусна инфекция (простуда), контакт с козина на животни, контакт с дим (цигарен, от горене на дърва и въглища), контакт с цъфтящи дървета, треви и цветя, бурени, промени в температурата, при емоции (смях, плач)
8. Имали ли сте досега симптоми на астма при прием на аспирин или други НСПВС?
9. Съпътстващи заболявания:
   Ринит – постоянен, интермитентен
   Носна полипоза
   Други алергични прояви – уртикария, алергия към храни;
   Хроничен гастрит; ГЕРБ;
   Диабет
   Заболявания на щитовидната жлеза
   Автоимунни заболявания
   Остър или хроничен хепатит, цироза
   Имунна недостатъчност – HIV инфекция или др.
   Интерстициална белодробна болест или друго значимо белодробно заболяване освен бронхиалната астма
   Злоупотреба с алкохол и наркотични вещества
   Сърдечна недостатъчност, Артериална хипертония
   Имате ли други не упоменати по-горе болести?
   (посочете какви ....)
10. Имате ли роднини, болни от алергични заболявания?
    (посочете какви…….)

11. Имате ли установена алергия към домашен прах, полени, храни, лекарства или др.?
(посочете какви……)

12. Имате ли домашни любимци?
(посочете какви…….)

13. Вредности на работното място?
(посочете какви…….)

14. Тютюнопушене
(пакетогодини……)
□ Настоящ
□ Бивш
□ Пасивен
□ Непушач

15. Какво лечение за бронхиална астма провеждате в момента и от кога?
Инхалатори ……
Таблетки ……
Инжекции ……..

16. Колко често в седмицата пропускате инхалация от редовно назначените Ви ?

17. Коя инхалация от редовната терапия по-често пропускате?
Сутрин
Вечер

18. Каква е най-честата причина, поради която прекъсвате редовната си инхалаторна терапия?
Нямам симптоми и забравям
Имам симптоми, но забравям
Имам симптоми, но предпочитам да използвам бързо действащ инхалатор (Вентолин)
Чувствам, че тази инхалаторна терапия не ми помага
Страхувам се от странични лекарствени реакции
Инхалаторът е сложен за използване
Нямам достатъчно информация за състоянието си
Други причини

19. През последните 4 седмици имахте ли дневни симптоми на астма (епизоди на свиркащо дишане, затруднено дишане, стягане в гърдите, кашлица)?
Всеки ден
Да, по-често от 2 пъти седмично, но не всеки ден
Да, 2 пъти седмично или по-рядко
Не

20. През последните 4 седмици събуждали ли сте се поради симптоми на астма?

21. През последните 4 седмици, колко често използвахте Вашия инхалатор при нужда за облекчаване на симптомите на бронхиална астма?
Всеки ден
По-често от 2 пъти седмично, но не всеки ден
Два пъти седмично или по-рядко
Не съм използвал инхалатор при нужда

22. Ограничена ли е Вашата физическа активност поради симптомите на бронхиална астма?

23. Брой екзацербации през последната година, налагащи прием на орални кортикостероиди.

24. Брой екзацербации, изискващи хоспитализация или посещение на спешен център.

25. Лечение в интензивно отделение или интубация по повод екзацербация на бронхиалната астма.

Благодарим Ви за съдействието!

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ВЪПРОСНИЦИ ЗА ОЦЕНКА КОНТРОЛА НА БА

№1

ТЕСТ ЗА КОНТРОЛ НА АСТМАТА
Asthma Control Test (ACT)

Имена и възраст на пациента:

……

1. **През изминалите 4 седмици, каква част от времето Ви Вашата астма Ви пречеше да извършвате ежедневните си дейности (на работа, в къщи или на училище) в сравнение с нормален ден без прояви на астма?**
   ① Цялото време
   ② По-голямата част от времето
   ③ Част от времето
   ④ Малка част от времето
   ⑤ Никакво време

2. **През изминалите 4 седмици, колко пъти имахте задух?**
   ① Повече от веднъж дневно
   ② Веднъж на ден
   ③ 3 до 6 пъти седмично
   ④ Веднъж или два пъти седмично
   ⑤ Нито един

3. **През изминалите 4 седмици, колко пъти симптомите на астма (хрипове, кашлица, задух, стягане или болки в гърдите) Ви будиха нощем или по-рано от обикновено сутрин?**
   ① 4 или повече нощи седмично
   ② 2 до 3 нощи седмично
   ③ Веднъж седмично
   ④ 1 или 2 пъти
   ⑤ Нито един

4. **През изминалите 4 седмици, колко пъти използвахте бързо действащ инхалатор или небулизатор (Салбутамол, ВентолинТМ, ЕкозалТМ, Буто-АсмаТМ, СаламолТМ, АтровентТМ, БеротекТМ)?**
   ① 3 или повече пъти дневно
   ② 1 или 2 пъти дневно
   ③ 2 или 3 пъти седмично
   ④ Веднъж седмично или по-рядко
   ⑤ Нито един

5. **Как бихте оценили контрола върху астмата си през изминалите 4 седмици?**
   ① Неконтролирана
   ② Слабо контролирана
   ③ Донякъде контролирана
   ④ Добре контролирана
   ⑤ Напълно контролирана

РЕЗУЛТАТ:

Дата: ……..

№2

ВЪПРОСНИК ЗА КОНТРОЛ НА АСТМАТА

Asthma Control Questionnaire (ACQ)

ВЪПРОСНИК - КОНТРОЛИРАНЕ НА АСТМАТА© ПАЦИЕНТ : _____
(BULGARIAN VERSION FOR BULGARIA)

ДАТА : _____

Моля, отговорете на въпроси 1 до 6.

Оградете с кръгче цифрата съответстваща на отговора, който най-добре описва как сте се чувствали през последните 7 дни.

1. Средно, колко често през последните 7 дни **се събуждахте** нощем **поради Вашата астма**?
   - 0 Нито веднъж
   - 1 Почти нито веднъж
   - 2 Малко пъти
   - 3 Няколко пъти
   - 4 Много пъти
   - 5 Твърде много пъти
   - 6 Не можех да спя поради астмата

2. Средно, колко тежка през последните 7 дни беше **астматична симптоматика,** когато се **събуждахте** сутрин?
   - 0 Нямах симптоми
   - 1 Много слаби симптоми
   - 2 Слаби симптоми
   - 3 Умерени симптоми
   - 4 Доста тежки симптоми
   - 5 Тежки симптоми
   - 6 Много тежки симптоми

3. Като цяло, през последните 7 дни колко **ограничени бяхте в дейностите си** поради астмата Ви?
   - 0 Въобще не бях ограничен
   - 1 Много слабо ограничен
   - 2 Слабо ограничен
   - 3 Умерено ограничен
   - 4 Много ограничен
   - 5 Крайно ограничен
   - 6 Напълно ограничен

4. Като цяло, през последните 7 дни почувствахте ли **недостиг на въздух** поради астмата си?
   - 0 Не
   - 1 Много малко
   - 2 Малко
   - 3 Умерено
   - 4 Доста
   - 5 Много
   - 6 Твърде много

Modified on 08 December 2008
ACQ - Bulgaria/Bulgarian - Version of 08 Dec 08 - Mapi Research Institute.
ID4975 / ACQ_AU6.0_bul-BG.doc

5. Като цяло, колко време през последните 7 дни **имахте хрипове** в гърдите?

0 Нямах
1 Почти нямах
2 Малка част
3 Известна част
4 Доста голяма част
5 По-голяма част
6 През цялото време

6. Средно, през последните 7 дни колко **впръсквания/инхалации на бронходилататор, който има бързо действие,** (например Ventolin/ Bricanyl) сте ползвали всеки ден?
(Ако не сте сигурни как да отговорите на този въпрос, помолете за помощ)

0 Нито веднъж
1 1 - 2 впръсквания/инхалации през повечето дни
2 3 - 4 впръсквания/инхалации през повечето дни
3 5 - 8 впръсквания/инхалации през повечето дни
4 9 - 12 впръсквания/инхалации през повечето дни
5 13 - 16 впръсквания/инхалации през повечето дни
6 Повече от 16 впръсквания/инхалации през повечето дни

За попълване от лекуващия персонал

7. $ФЕО_1$ измерено преди използване на бронходилататор: .....

Предвидена стойност на $ФЕО_1$: .....

Измерена актуална стойност на $ФЕО_1$ като % от предвидената: .....
(Попълнете върху пунктираната линия стойностите, сравнете със съседната колонка и отбележете къде попада $ФЕО_1$ % в съседната колона)

0 > 95% от предвиденото
1 95 - 90%
2 89 - 80%
3 79 - 70%
4 69 - 60%
5 59 - 50%
6 < 50% от предвиденото

Modified on 08 December 2008
ACQ - Bulgaria/Bulgarian - Version of 08 Dec 08 - Mapi Research Institute.
ID4975 / ACQ_AU6.0_bul-BG.doc

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

	Начало	**Пакетогодини**	**ИТМ**	**Екзацербации**
Mann-Whitney U	643.500	708.500	488.000	497.000
Wilcoxon W	1049.500	1114.500	1866.000	903.000
Z	-0.853	-0.208	-0.050	-2.465
Asymp. Sig.	0.394	0.836	**0.015**	**0.014**
	АСТ резултат	**FeNO, ppb**		**Eo, cells/microL**
Mann-Whitney U	664.000	711.500		652.000
Wilcoxon W	2042.000	1117.500		2030.000
Z	-0.651	-0.167		-0.767
Asymp. Sig.	0.515	0.868		0.443
	IL-5, pg/ml	**IL-17A, pg/ml**	**IL-6, pg/ml**	**IL-13, pg/ml**
Mann-Whitney U	636.500	671.000	630,500	698.000
Wilcoxon W	2014.500	1077.000	1036,500	2076.000
Z	-0.923	-0.575	-,984	-0.304
Asymp. Sig.	0.356	0.565	0.325	0.761
	IgE, IU/ml	**CRP, mg/L**	**IL-8, pg/ml**	**Периостин, ng/ml**
Mann-Whitney U	528.000	713.500	547.500	208.000
Wilcoxon W	1906.000	2091.500	1628.500	344.000
Z	-2.017	-0.146	-0.056	0.000
Asymp. Sig.	**0.044**	0.884	0.955	1.000

Табл. Приложение 4 Статистически анализ на изследваните показатели при сравнение по пол на групата с БА

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИТЕ С БА СПОРЕД ИТМ

	ИТМ < 30 N=57; 71.2%	ИТМ ≥ 30 N=23; 28.8%	P стойност
Възраст, години	42 (32-59)	41 (38-54)	-
Жени/мъже	41/16 (71.9/28.1%)	11/12 (47.8/52.2%)	0.041
Тютюнопушене, не/бивш/настоящ	27/16/14 (47.4/28.1/24.6%)	11/7/5 (47.8/30.4/21.7%)	-
Пакетогодини	3.5 (0-10)	3.5 (0-15)	-
Начало	34 (19-49)	36 (24-48)	-
Продължителност, год.	9 (3-20)	8 (5-17)	-
Лошо придържане	17 (29.8%)	4 (17.4%)	-
Ринит, не/да	13/44 (22.8/77.2%)	6/17 (26.1/73.9%)	-
ГЕРБ	17 (29.8%)	7 (30.4%)	-
КАП /+/	43 (75.4%)	18 (78.3%)	-
ACQ5 резултат	1.00 (0-2.10)	1.20 (0.20-2.20)	-
ACQ7 резултат	1.00 (0.36-2.14)	1.00 (0.29-2.29)	-
АСТ резултат	21 (17-25)	21 (15-23)	-
Неконтролирана БА (GINA)	31 (54.4%)	13 (56.5%)	-
Екзацербации за 1 год.	1 (0.5-2)	1 (0-2)	-
Екзацербации, >1 за год.	16 (28.1%)	6 (26.1%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	22 (38.6%)	13 (56.5%)	-
Терапия стъпка 4/5 (GINA)	39 (68.4%)	19 (82.6%)	-
Висока доза ИКС	27 (47.4%)	13 (56.5%)	-
Ниска доза ОКС	6 (10.5%)	4 (17%.)	-
Общ IgE, IU/ml	104 (42-249)	206 (39-427)	-
Общ IgE >100 IU/ml	30 (52.6%)	14 (60.9%)	-
FeNO, ppb	30 (18-50)	29 (21-42)	-
FeNO ≥ 30 ppb	29 (50.9%)	11 (47.8%)	-
FeNO > 50 ppb	14 (24.6%)	5 (21.7%)	-
b-Eos, cells/microL	294 (177-468)	416 (267-548)	-
b-Eos ≥ 300 cells/microL	27 (47.4%)	15 (65.2%)	-
b-Neu, 10^9L	4.42 (3.50-5.60)	5.54 (3.53-6.55)	-
CRP, mg/L	2.00 (0.69-4.32)	2.81 (1.13-7.50)	-
Пре ФВК, Z score	-0.87 (-1.88; 0.01)	-1.13 (-2.13; -0.22)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.49 (-2.81; -0.43)	-1.14 (-2.84; -0.48)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.47 (-2.30; -0.21)	-1.13 (-2.40; 0.35)	-
Пост ФВК, Z score	-0.53 (-1.36; 0.15)	-1.09 (-1.45; -0.13)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.12 (-2.13; -0.14)	-1.16 (-2.70; -0.16)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.96 (-1.91; 0.20)	-0.82 (-1.74; 0.31)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	19 (33.3%)	6 (26.1%)	-
Промяна на ФЕО1, %	7 (0.5-16)	2 (0-7)	-
IL-5, pg/ml	2.20 (1.75-3.20)	2.25 (1.80-3.45)	-
IL-6, pg/ml	1.40 (0.69-2.18)	1.50 (0.94-2.46)	-
IL-8, pg/ml *	1.65 (0-4.70)	1.60 (0-7.30)	-
IL-13, pg/ml	1.07 (0.18-4.63)	1.08 (0.97-1.25)	-
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.46-19.10)	5.87 (0.55-31.40)	-
Периостин, ng/ml **	1.88 (1.18-2.08)	1.73 (1.08-2.18)	-

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U тест. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; * IL-8 беше измерен при n=53 без затлъстяване и n=17 със затлъстяване; **Периостин беше измерен при n=34 без затлъстяване и n=8 със затлъстяване;

Табл. Приложение 5 Характеристики на пациентите според ИТМ

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

ДАННИ ЗА ЕКСПОЗИЦИЯТА НА ЦИГАРЕН ДИМ И ФУНКЦИОНАЛНИ ПАРАМЕТРИ ПРИ БА

		Запазена обратимост	Персистираща обструкция	
Пакетогодини, категории	< 10	11	4	15
		20,0%	16,0%	18,8%
	≥10	20	7	27
		36,4%	28,0%	33,8%
	0	24	14	38
		43,6%	56,0%	47,5%
Total		55	25	80
		100,0%	100,0%	100,0%

Chi-square Test

	Value	df	Asymp. Sig.
Pearson Chi-Square	1,056	2	,590
Likelihood Ratio	1,057	2	,590
Linear-by-Linear Association	,784	1	,376
N of Valid Cases	80		

		Запазена обратимост	Персистираща обструкция	
Тютюнопушене	Непушачи	24	14	38
		43,6%	56,0%	47,5%
	Пушачи	16	3	19
		29,1%	12,0%	23,8%
	Бивши пушачи	15	8	23
		27,3%	32,0%	28,8%
Total		55	25	80
		100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2,801	2	,247
Likelihood Ratio	3,063	2	,216
Linear-by-Linear Association	,136	1	,712
N of Valid Cases	80		

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА НИВАТА НА КРЪВНИ ЕОЗИНОФИЛИ, FENO И ОБЩИ IGE

		b-Eos, cells/microL		FeNO, ppb		IgE, IU/ml	
		Me (IQR)	p-value	Me (IQR)	p-value	Me (IQR)	
Пол	Жени, n=52	307 (188-500)	NS	30 (19-50)	NS	107 (34-211)	p<0.05
	Мъже, n=28	330 (244-514)		30 (20-43)		212 (57-428)	
Възраст, категории	< 30, n=11	236 (168-462)	NS	28 (17-44)	NS	85 (69-277)	NS
	30-39, n=20	244 (188-399)		22 (12-38)		165 (45-366)	
	40-49, n=20	447 (228-562)		39 (28-56)		158 (36-365)	
	50-59, n=14	435 (324-600)[1]		31 (21-60)		160 (61-318)	
	≥ 60, n=15	295 (244-462)		29 (18-48)		61 (19-133)	
Начало	< 20, n=22	244 (183-464)	NS	29 (20-46)	NS	181 (52-400)	NS
	20-40, n=29	320 (189-511)		29 (17-59)		111 (34-300)	
	> 40, n=29	390 (280-519)		30 (19-50)		114 (34-254)	
Тютюнопушене	Непушачи, n=38	328 (200-511)	NS	31 (22-54)	p<0.05	96 (39-277)	NS
	Пушачи, n=19	238 (124-425)		20 (10-29)		133 (51-206)	
	Бивши, n=23	385 (228-516)		31 (19-60)		127 (32-214)	
Пакетогодини	< 10	252 (207-416)	NS	27 (20-46)	NS	171 (85-390)	NS
	≥ 10	381 (204-516)		22 (11-42)		127 (32-214)	
	0	328 (200-511)		31 (22-54)		96 (39-277)	
ИТМ	≥25, n=47	410 (252-548)	p<0.05	30 (21-54)	NS	154 (39-356)	NS
	<25, n=33	238 (146-405)		29 (18-46)		111 (47-221)	
КАП	Негативни, n=19	385 (238-522)	NS	30 (18-83)	NS	32 (7-61)	p<0.05
	Моно, n=19	276 (183-462)		30 (16-42)		214 (111-280)	
	Поли, n=42	308 (207-504)		29 (19-46)		173 (75-390)	
AERD	Не, n=70	295 (200-468)	p<0.05	30 (18-47)	NS	107 (39-245)	NS
	Да, n=10	819 (416-960)		27 (22-65)		231 (57-500)	
ИКС доза	Ниска, n=12	166 (94-261)	p<0.05	17 (11-29)	p<0.05	152 (65-337)	p<0.05
	Средна, n=28	270 (196-406)		27 (16-45)		60 (27-170)	
	Висока, n=40	465 (278-562)		35 (23-64)		178 (61-348)	
ОКС	Без, n=70	307 (200-468)	p<0.05	28 (17-43)	p<0.05	113 (42-280)	NS
	Със, n=10	645 (294-1106)		51 (31-75)		159 (57-805)	
Съпътстващ ринит	Не, n=19	336 (212-496)	NS	21 (10-54)	NS	48 (29-178)	p<0.05
	Интермитентен алергичен, n=26	247 (171-400)		29 (20-42)		143 (69-364)	
	Персистиращ алергичен, n=23	416 (192-576)[2]		31 (22-48)		277 (127-500)	
	Неалергичен, n=12	451 (221-797)[3]		49 (20-86)		48 (11-73)	
Тежест (GINA 2017)	Средно-тежка, n=22	245 (124-400)	p<0.05	21 (16-43)	p<0.05	90 (48-277)	NS
	Тежка, n=58	383 (235-518)		31 (22-60)		134 (42-299)	
Тежест (ATS/ERS 2014)	Средно-тежка,n=45	244 (147-398)	p<0.05	28 (16-47)	NS	85 (35-253)	p<0.05
	Тежка, n=35	470 (290-651)		31 (22-62)		181 (57-390)	
Контрол GINA	Пълен, n=36	240 (149-408)	p<0.05	26 (18-41)	NS	92 (35-337)	NS
	Частичен, n=20	305 (224-462)		32 (13-56)		130 (43-261)	
	Лош, n=24	473 (370-767)		37[4] (23-73)		134 (61-214)	
Контрол GINA	Да, n=36	240 (149-408)	p<0.05	26 (18-41)	NS	92 (34-313)	NS
	Не, n=44	413 (272-517)		35 (20-66)		130 (59-233)	
ACQ7	≤1.5, n=48	251 (166-416)	p<0.05	28 (19-43)	NS	92 (34-313)	NS
	>1.5, n=32	473 (324-697)		34 (18-70)		134 (61-214)	
ACT	≥20, n=43	260 (171-416)	p<0.05	28 (18-44)	NS	95 (39-318)	NS
	<20, n=37	425 (267-518)		32 (20-65)		127 (61-245)	
Екзацербации	≤1 n=58	319 (212-470)	NS	25 (16-42)	p<0.05	99 (39-280)	NS
	>1 n=22	377 (183-846)		44 (30-68)		164 (57-318)	

IgE, IU/ml	<100, n=36	280 (182-482)	NS	26 (17-42)	NS		
	≥100, n=44	370 (232-514)		32 (22-56)			
FeNO, ppb	≤50, n=61	276 (200-468)	p<0.05			114 (39-280)	NS
	>50, n=19	462 (385-792)				126 (61-318)	
b-Eos, cells/microL	<250, n=28			22 (15-35)	p<0.05	88 (24-221)	NS
	≥250, n=52			33 (22-64)		138 (57-303)	
Пост ФЕО1/ФВК	≥LLN, n=55	290 (183-468)	p<0.05	28 (16-43)	NS	142 (48-299)	NS
	<LLN, n=25	425 (267-576)		31 (23-65)		85 (39-221)	
Пост ФЕО1	≥LLN, n=51	290 (200-468)	NS	30 (17-46)	NS	126 (43-318)	NS
	<LLN, n=29	390 (236-516)		27 (21-62)		103 (42-221)	
Пре ФЕО1/ФВК	≥LLN, n=47	290 (192-468)	NS	27 (16-41)	p<0.05	114 (48-280)	NS
	<LLN, n=33	410 (260-548)		35 (22-68)		126 (39-307)	
Пре ФЕО1	≥LLN, n=42	270 (192-468)	NS	27 (16-42)	NS	107 (43-299)	NS
	<LLN, n=38	395 (236-516)		31 (22-62)		143 (42-221)	
Бронхиална обструкция	Запазена обратимост, n=55	290 (183-468)	p<0.05	28 (16-43)	NS	142 (48-299)	NS
	Персистираща обструкция, n=25	425 (267-576)		31 (23-65)		85 (39-221)	

[1]p<0.05 при сравнение с <30 г. и 30-39 год. [2]p<0.05 при сравнение с интермитентин ринит [3]p<0.05 при сравнение с интермитентен ринит. [4]p<0.05 при сравнение с пълен контрол

Табл. Приложение 7 Абсолютен брой на кръвните еозинофили, FeNO и IgE при БА

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

СЕРУМНИ МАРКЕРИ ПРИ СРАВНЕНИЕ ПО ПОЛ НА ЗДРАВИТЕ КОНТРОЛИ

	Serum IL-5, pg/ml	Serum IL-8, pg/ml	Serum periostin, ng/ml	Serum IL-6, pg/ml	Serum IL-17A, pg/ml	Serum IL-13, pg/ml	Серумен общ IgE, IU/ml
Mann-Whitney U	75,500	85,500	10,000	58,000	84,000	55,500	68,500
Wilcoxon W	328,500	121,500	76,000	311,000	120,000	308,500	104,500
Z	-,587	-,120	-1,570	-1,417	-,188	-1,565	-,917
Asymp.Sig.	,557	,904	,117	,157	,851	,118	,359
Exact Sig.	,565	,909	,138	,170	,872	,129	,368

ПРИЛОЖЕНИЕ 9

			Пре ФЕО1, Z score	Пост ФЕО1, Z score
Spearman's rho	Пре ФЕО1, Z score	Корелационен коефициент	1.000	0.948**
		P	.	0.000
		N	46	46
	Пост ФЕО1, Z score	Корелационен коефициент	0.948**	1.000
		P	0.000	.
		N	46	46
	ACQ5 резултат	Корелационен коефициент	-0.346*	-0.260
		P	0.018	0.081
		N	46	46
	ACQ6 резултат	Корелационен коефициент	-0.351*	-0.259
		P	0.017	0.082
		N	46	46
	ACT резултат	Корелационен коефициент	0.332*	0.286
		P	0.024	0.054
		N	46	46

**. P<0.01
*. P<0.05

Табл. Приложение 9А Корелации при пациентите с пре ФЕО1/ФВК > LLN

			Пре ФЕО1, Z score	Пост ФЕО1, Z score
Spearman's rho	Пре ФЕО1, Z score	Корелационен коефициент	1.000	0.946**
		P	.	,000
		N	9	9
	Пост ФЕО1, Z score	Корелационен коефициент	0.946**	1.000
		P	0.000	.
		N	9	9
	ACQ5 резултат	Корелационен коефициент	0.133	0.025
		P	0.732	0.949
		N	9	9
	ACQ6 резултат	Корелационен коефициент	0.133	0.025
		P	0.732	0.949
		N	9	9
	ACT резултат	Корелационен коефициент	0.238	0.350
		P	0.537	0.355
		N	9	9
**. P<0.01 *. P<0.05				

Табл. Приложение 9Б Корелации при пациентите с ФЕО1/ФВК нормализиране след БДТ

			Пре ФЕО1, Z score	Пост ФЕО1, Z score
Spearman's rho	Пре ФЕО1, Z score	Корелационен коефициент	1.000	0.702**
		P	.	0.000
		N	25	25
	Пост ФЕО1, Z score	Корелационен коефициент	0.702**	1.000
		P	0.000	.
		N	25	25
	ACQ5 резултат	Корелационен коефициент	0.077	-0.268
		P	0.716	0.195
		N	25	25
	ACQ6 резултат	Корелационен коефициент	0.072	-0.284
		P	0.731	0.169
		N	25	25
	ACT резултат	Корелационен коефициент	0.006	0.105
		P	0.977	0.616
		N	25	25
**. P<0.01 *. P<0.05				

Табл. Приложение 9В Корелации при пациентите с пост ФЕО1/ФВК < LLN след БДТ