



---

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ**

**Д-р Рада Маркова Маркова**

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИЗДИШАНИЯ АЗОТЕН ОКИС**  
**ПРИ ДЕЦА С БРОНХИАЛНА АСТМА**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

За присъждане на научна и образователна степен “Доктор”

Научен ръководител: Проф. д-р Пенка Переновска, д.м.

София, 2016 г.

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

<b>I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Въведение .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Азотен окис (NO) – биохимичен и анатомичен произход.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Измерване на издишания NO – методи и стандартизация .....</b>	<b>22</b>
3.1 Методи.....	22
3.2 Фактори, въздействащи на измерения NO, свързани с пациента (вътрешни, ендогенни фактори): .....	25
3.3 Техники на измерване на издишания азотен окис:.....	30
3.4 Референтни стойности на азотния окис .....	32
<b>4. Издишан азотен окис и астма .....</b>	<b>33</b>
4.1 Диагностично значение на издишания азотен окис при астма .....	34
4.2 Връзка с еозинофилното възпаление на дихателните пътища.....	35
<b>5. Терапевтично значение при астма .....</b>	<b>35</b>
5.1 Контрол на астмата .....	36
5.2 Обостряне на бронхиалната астма .....	38
5.3 FeNO като маркер на възпалението на малките дихателни пътища при астма.....	38
<b>6. Корелация между азотния окис и атопията.....</b>	<b>38</b>
<b>7. Азотен окис и клиничните симптоми при бронхиална астма.....</b>	<b>40</b>
<b>8. Издишан азотен окис при други респираторни заболявания .....</b>	<b>41</b>
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>46</b>
<b>1. Цел .....</b>	<b>46</b>
<b>2. Задачи .....</b>	<b>46</b>

<b>III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ .....</b>	<b>47</b>
<b>1. Материал.....</b>	<b>47</b>
1.1 Характеристика на групите и дизайн на изследването .....	47
<b>2. Методи .....</b>	<b>47</b>
2.1 Изследване на стойностите на азотния окис в издишания въздух ..	47
2.2 Функционално изследване на дишането .....	48
2.3 Рентгенография на бели дробове.....	48
2.4 Лабораторни изследвания .....	49
2.5 Серологично изследване за респираторни вируси и други патогени..	49
2.6 Храчка (назален секрет) за еозинофили .....	49
2.7 Антропометрични показатели .....	50
2.8 Анамнестични данни .....	50
2.9 Определяне на общи IgE .....	51
2.10 Статистически методи за обработка на данните .....	51
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>53</b>
<b>1. Разпределение по пол.....</b>	<b>53</b>
<b>2. Разпределение по възраст .....</b>	<b>55</b>
<b>3. Зависимост на FeNO с ръста, теглото на пациентите и с индекса на телесна маса (ИТМ, ВМІ) .....</b>	<b>60</b>
<b>4. Наличие на фамилност при пациентите с астма .....</b>	<b>61</b>
<b>5. Наличие на собствен атопичен терен.....</b>	<b>63</b>
<b>6. Давност на бронхиалната астма.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Разпределение на болните с астма по предходна профилактика ...</b>	<b>65</b>

8. Приложение на кортикостероид в рамките на 24 часа от измерването на FeNO.....	69
9. Разпределение по тежест на пристъпа .....	71
10. Наличие на алергични прояви от ГДП – алергичен риносинусит	73
11. Изследване на кръвната еозинофилия при децата с астма и нейната зависимост със стойностите на FeNO .....	74
12. Изследване на еозинофилите в храчка или назален секрет и тяхната зависимост със стойностите на FeNO .....	75
13. Общи IgE и FeNO .....	79
14. Проучване на нивата на FeNO .....	82
15. Етиология на астматичния пристъп .....	85
16. Зависимост между FeNO и показателите от ФИД: ФЕО1, ВЕД, МСЕД 25-75.....	89
17. Зависимост на FeNO от типа на астмоконтролиращото лечение	94
<b>V. ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>96</b>
<b>VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>111</b>
<b>VII. ИЗВОДИ.....</b>	<b>112</b>
<b>VIII. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>117</b>

### **Използвани съкращения на български език:**

<i>БПД</i>	<i>бронхо-пулмонална дисплазия</i>
<i>БПТ</i>	<i>бронхо-провокационен тест</i>
<i>БХР</i>	<i>бронхиална хиперреактвност</i>
<i>ВЕД</i>	<i>върхов експираторен дебит</i>
<i>ГДП</i>	<i>горни дихателни пътища</i>
<i>ГЕР</i>	<i>гастроезофагеален рефлукс</i>
<i>ИгЕ</i>	<i>имуноглобулини Е</i>
<i>ИТМ</i>	<i>индекс на телесна маса</i>
<i>КАП</i>	<i>кожно-алергични проби</i>
<i>КС, ИКС</i>	<i>кортикостероиди, инхалаторни кортикостероиди</i>
<i>ЛТА</i>	<i>левкотриенови антагонисти</i>
<i>МСЕД 25/75</i>	<i>максимален среден експираторен дебит 25/75%</i>
<i>ПКК</i>	<i>пълна кръвна картина</i>
<i>ПЦД</i>	<i>първична цилиарна дискинезия</i>
<i>СУЕ</i>	<i>скорост на утаяване на еритроцитите</i>
<i>ФЕО1</i>	<i>форсиран експираторен обем за 1 секунда</i>
<i>ФИД</i>	<i>функционално изследване на дишането</i>

### **Използвани съкращения на английски език:**

<i>Adenovirus</i>	<i>Аденовирус</i>
<i>ARDS</i>	<i>остър респираторен дисстрес синдром</i>
<i>ATS</i>	<i>Американска торакална асоциация</i>
<i>BMI – ИТМ</i>	<i>индекс на телесна маса</i>
<i>BPD</i>	<i>бронхо-пулмонална дисплазия</i>
<i>CalvNO</i>	<i>алвеоларна концентрация на азотен окис</i>
<i>CF</i>	<i>муковисцидоза, кистична фиброза</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Хламидия пневмония</i>
<i>COPD</i>	<i>Хронична обструктивна белодробна болест</i>
<i>EBC</i>	<i>exhaled breathe condensate – издишан въздушен кондензат</i>
<i>ELISA</i>	<i>ензим-свързан имуносорбентен тест</i>

<i>ERS</i>	<i>Европейско респираторно дружество</i>
<i>FeNO</i>	<i>фракция на издишания азотен окис</i>
<i>FEV1</i>	<i>форсиран експираторен обем за 1 секунда</i>
<i>IgE</i>	<i>имуноглобулин E</i>
<i>IgE total</i>	<i>общ имуноглобулин E</i>
<i>IgG</i>	<i>имуноглобулин G</i>
<i>IgM</i>	<i>имуноглобулин M</i>
<i>Influenzavirus</i>	<i>грипен вирус</i>
<i>LABA</i>	<i>дългодействащи бета-2 агонисти</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Микоплазма пневмоние</i>
<i>NO</i>	<i>азотен окис</i>
<i>OSAS</i>	<i>обструктивна сънна апнея</i>
<i>Parainfluenzavirus</i>	<i>Парагрипен вирус</i>
<i>ppb</i>	<i>“parts per billion” – мерна единица за азотния окис</i>
<i>RSV</i>	<i>Респираторно синцитиален вирус</i>
<i>SBOL</i>	<i>single breath on-line measurement – едноетапно измерване на азотния окис</i>
<i>TLC</i>	<i>тотален белодробен капацитет</i>

### **Списък с използваните фигури в дисертационния труд:**

*Фиг. 1 – Фенотипни варианти на астма според Martinez FD [82]*

*Фиг. 2 – Синтез на азотния окис*

*Фиг. 3 – Резултати от NO, Eo в храчка и ФЕО1*

*Фиг. 4 – Чувствителност и специфичност на ФЕО1 и NO при контрола на астмата*

*Фиг. 5 – Зависимост между нарастването на стойностите на NO и клиничните симптоми при обостряне на астмата*

*Фиг. 6 – Разпределение на всички деца, включени в изследването по групи*

*Фиг. 7 – Разпределение по пол на децата с астма и за общата извадка в изследването*

Фиг. 8 – Графично разпределение на астматиците по възраст

Фиг. 9 – Нарастване на азотния окис с възрастта

Фиг. 10 – Фамилна обремененост при пациентите с астма

Фиг. 11 – Разпределение на астматиците по критерий атопия

Фиг. 12 – Разпределение на децата с астма по давност на астмата

Фиг. 13 – Графично разпределение на болните с астма по предходна профилактика

Фиг. 14 – Разпределение на децата с астма според приложението на КС до 24 часа преди изследването

Фиг. 15 – Графичен анализ на промените във FeNO в зависимост от приложението на КС

Фиг. 16 – Графично разпределение на астматиците според наличието на алергичен риносинуит

Фиг. 17 – Графично разпределение в хистограми на левкоцитния брой и СУЕ

Фиг. 18 – Графично разпределение в хистограма на общи IgE

Фиг. 19 – Графично разпределение на средните стойности на FeNO за болни с астма, контролна група муковисцидоза, контролна група здрави и обща извадка

Фиг. 20 – Динамика на средните стойности на FeNO за тримесечен период на проследяване на децата с астма

Фиг. 21 – Графично изображение на данните за аденовирусна инфекция

Фиг. 22 – Графично изображение на данните за прекарана RSV инфекция

Фиг. 23 – Графично изображение на данните за парагрипна инфекция

Фиг. 24 – Графично изображение на промените във ФЕО1 при астматици – изходни и след тримесечно проследяване

Фиг. 25 – Графично изображение на промените във ВЕД при астматици – изходни и след три месеца

Фиг. 26 – Графично изображение на промените в МСЕД 25/75 при астматици

## **Списък с използваните таблици в дисертационния труд:**

*Табл. 1 – Външни фактори и тяхното въздействие върху стойностите на издишания азотен окис*

*Табл. 2 – Ефекти на различни фактори от страна на пациента върху FeNO*

*Табл. 3 – Ефекти на различни фактори от страна на пациента върху FeNO*

*Табл. 4 – Нормални стойности на FeNO и интерпретация на промените в стойностите му при нелекувани и лекувани пациенти*

*Табл. 5 – Издишан азотен окис при други респираторни заболявания*

*Табл. 6 – Статистически анализ на групите в изследването, разпределение по полов признак като абсолютен брой и в процентно отношение*

*Табл. 7 – Зависимост между стойностите на NO и пола*

*Табл. 8 – Средна възраст за общата извадка в изследването*

*Табл. 9 – Възрастово разпределение на включените пациенти*

*Табл. 10 – Статистическо разпределение на възрастовите групи с брой пациенти и средни стойности*

*Табл. 11 – Корелационен анализ за връзката между възрастта в години и стойностите на NO в ppb*

*Табл. 12 – Зависимост между антропометричните показатели: ръст, тегло и ИТМ и стойностите на FeNO*

*Табл. 13 – Статистическо разпределение на групите пациенти по критерий за фамилна обремененост*

*Табл. 14 – Корелационен анализ за установяване на зависимост между фамилната обремененост и стойностите на FeNO*

*Табл. 15 – Статистически анализ на стойностите на FeNO според наличието на атопия*

*Табл. 16 – Процентно разпределение на децата с астма по давност на астмата*

*Табл. 17 – Статистически анализ на болните с астма по предходно контролиращо лечение*

Табл. 18 – Анализ на разпределението на астматиците по медикаменти за контрол на бронхиалната астма след изписване

Табл. 19 – Анализ на промените в разпределението по групи медикаменти за контрол преди и след хоспитализация

Табл. 20 – Статистически анализ на промените в стойностите на FeNO и типа медикаментозен контрол на астмата

Табл. 21 – Статистически анализ на промените в стойностите на FeNO в зависимост от приложението на КС

Табл. 22 – Разпределение на болните с астма по тежест на пристъпа

Табл. 23 – Статистическа съпоставка на стойностите на FeNO в групите пациенти със средно-тежък и тежък пристъп, тест ANOVA за търсене на сигнификантни разлики в последните

Табл. 24 – Разпределение на пациентите с астма според ангажирането на ГДП

Табл. 25 – Средна стойност на кръвните еозинофили за децата с астма

Табл. 26 – Статистическа зависимост между кръвната еозинофилия и стойностите на FeNO

Табл. 27 – Статистическа зависимост между назалната еозинофилия и стойностите на FeNO

Табл. 28 – Статистическа зависимост между еозинофилите в храчка и стойностите на FeNO

Табл. 29 – Средна стойност на левкоцитния брой от ПКК на децата с астма

Табл. 30 – Общи IgE – минимални, максимални и средни стойности

Табл. 31 – Статистическа зависимост между FeNO и общи IgE

Табл. 32 – Нарастване на общите IgE с възрастта

Табл. 33 – Корелационна зависимост между общите IgE и кръвните еозинофили

Табл. 34 – Средни стойности и статистическо разпределение на FeNO по групи

Табл. 35 – Статистическа съпоставка на FeNO средни стойности за пациентите с астма и контролните групи

Табл. 36 и 37 – Разпределение на случаите с остра и прекарана RSV инфекция

Табл. 38 – IgG за *Chl.pneumoniae*

Табл. 39 – IgG за грипен вирус

Табл. 40 – IgG за *M.pneumoniae*

Табл. 41 – Промени във ФЕО1 при хоспитализация на пациентите с астма и след тримесечно проследяване

Табл. 42 – Промени във ВЕД при хоспитализация на пациентите с астма и след тримесечно проследяване

Табл. 43 – Промени в МСЕД 25/75 при хоспитализация на пациентите с астма и след тримесечно проследяване

Табл. 44 – Статистически корелационни зависимости между FeNO и показателите от ФИД

Табл. 45 – Стойности на FeNO при астматици според типа на контролиращия медикамент

Табл. 46 – Статистическа зависимост между стойностите на FeNO и вида на контролиращия медикамент за астма

Табл. 47 – Разпределение според стойностите на FeNO в три групи при пациентите с астма

Табл. 48 – Разпределение на FeNO в група деца с астма и здрава контролна група

# I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

## 1. Въведение

Бронхиалната астма е социално-значим проблем в световната медицинска практика. Тя е най-честото хронично заболяване в детската възраст. През последните 30-40 години заболеваемостта от астма нараства почти двойно в световен мащаб. Според данни на различни автори тя се движи от 0 до 30%, средно 6-15%. За България по данни на проф. Милева и сътрудници е 5.53% [5].

Терминът астма произхожда от древногръцки език и означава „тежко, затруднено дишане“, „задух“. До 70-те години на миналия век определението за астма се е базирало върху клиничните белези на заболяването, с акцент върху обратимостта на бронхиалната обструкция. През последните години астмата се разглежда като хронично възпалително заболяване на дихателните пътища с имунна патогенеза. Съгласно общоприетата дефиниция по GINA [57], астмата е *„хронично възпалително заболяване на дихателните пътища, при което играят роля много клетки, включително Th2 – лимфоцити, еозинофили и мастоцити, водещи при предразположените индивиди до симптоми свързани с различно изразена обратима бронхиална обструкция и повишена реактивност към различни специфични и неспецифични стимули“*.

През 80-те години на XX век, всяка проява на „свиркащо“ дишане в детска възраст, независимо от етиологичната нокса е била именувана като астма [86]. Тази концепция е претърпяла съществени промени с напредването на епидемиологичните и функционални изследвания, установяващи различия в етиологията, патофизиологията и патогенезата при отделните индивиди. Възприето е било разделянето на децата с рецидивираща респираторна симптоматика в три категории: бронхиолит, „свиркащ бронхит“ и астма [13,8]. Съгласно действащите в момента международни и национални

консенсуси за астма [57,7] три или повече епизода на бронхиална обструкция при деца под три годишна възраст се приемат за астма. Разделителната линия от три „пристъпа“ за поставяне на диагнозата се основава на многобройни публикации за по-голяма тежест, честота на нощната симптоматика и необходимост от болнично лечение при деца с три и повече бронхообструктивни епизода [57,7].

Последната ревизия на GINA от 2015 година дава ново определение за астмата, като определя бронхиалната астма като *„хетерогенно заболяване, което се характеризира с хронично възпаление на дихателните пътища с анамнеза за респираторни симптоми като „свиркане“, задух, недостиг на въздух и кашлица с вариабилно протичане по време и сила, съчетани с различно изразена лимитация на експираторния въздушен поток“* [56]. На базата на демографски, клинични и патофизиологични характеристики са обособени т.нар. астма – фенотипове.

Данните от епидемиологични проучвания сочат наличието на няколко фенотипни изяви на астма в детска възраст, отразяващи хетерогенна група от състояния, характеризирани се с рецидивиращи епизоди на обструкция на долните дихателни пътища.

През 1995 г. Martinez и сътрудници (Tucson Children's Respiratory Study) [81] в проучване проведено върху 1246 новородени, от които 826 проследени за период от 6 години, описват три фенотипа на „свиркащо дишане“ (фиг. 1):



Фиг. 1 – Фенотипни варианти на астма според Martinez FD [82]

- „Транзиторно ранно свирене“ – 41%, деца с прояви на „свиркащо дишане“ в кърмаческа възраст, асимптомни на 6 години
- „Персистиращо свирене“ – 28%, деца със „свиркащо дишане“ в кърмаческа възраст и персистираща симптоматика до 6-та година
- „Свиркане с късно начало“ – 31%, прояви на „свиркащо дишане“ след кърмаческа възраст

Проследяването на същата група деца и проведените на 11-та им година допълнителни изследвания на: метахолинова реактивност, ВЕД вариабилност и маркери за атопия (общи IgE и КАП) позволяват разграничаването (охарактеризирането) на трите фенотипа:

„Транзиторни ранни свиркачи“ – клиничните прояви са ограничени до първите три години от раждането. Децата от тази група са без фамилен анамнез за астма и собствен атопичен терен (отрицателни КАП и общи IgE в норма), с първоначално ниски функционални белодробни показатели, които достигат до нормата в рамките на няколко години, т.нар. „израстване“. Тези деца, проследени на 11-годишна възраст, са с отрицателен метахолинов тест.

Рискови фактори за „транзиторно свиркане“ са: недоносеност, чести респираторни инфекции при деца от многочленни семейства и такива посещаващи детски заведения, и/или с експозиция на тютюнев дим анте- и постнатално.

В подкрепа на тези данни са проучванията на Young [130] и Turner [125], проследяващи кърмачетата с променени белодробни функционални параметри. На 11-годишна възраст те имат незначителни отклонения в белодробните показатели, които не са асоциирани с анамнеза за атопия или фамилност за астма.

**„Неатопична, вирус – индуцирана астма“** – деца, които продължават да „свиркат“ след 3-та си година (около 40% от „свиркачите“ принадлежат към този фенотип). Проявите на бронхиална обструкция са резултат на променен тонус на дихателните пътища най-често след прекарана RSV инфекция в първите години от живота. „Неатопичното свиркане“ след третата година и в ранна училищна възраст е асоциирано с вариабилност във ВЕД и негативен метахолинов тест.

**“IgE – асоциирано свиркане / Атопична астма“** – прояви на бронхиална обструкция („свиркащо дишане“), персистиращи след кърмаческа и ранна детска възраст при деца с фамилна анамнеза за астма и/или други алергични заболявания. Налице е повишена метахолинова реактивност, ВЕД вариабилност и маркери за атопия. Тези деца, които са с нормална белодробна функция при раждането, показват бързо и необратимо влошаване на белодробните показатели особено през първите пет години от живота и с прогресиращ ход до 18 годишна възраст.

Други астма-фенотипове са: астмата с късно начало, астмата с фиксиран въздушен поток, астма при затлъстяване и други [56].

Изявата на астматичния фенотип е следствие от действието на два фактора – генетична предиспозиция и факторите на околната среда. Резултатът от тяхното взаимодействие определя дали ще се развие астма и на кой етап тя ще се манифестира. Доказано е, че астмата и атопичните болести

са комплексни генетични заболявания, които не се вписват в основните Менделови модели на унаследяване. За тях е характерно полигенно унаследяване и генетична хетерогенност. Количествената оценка за ролята на наследствеността за астмата показва нарастване на риска при засягане на двамата родители [9,74,75].

Фамилната анамнеза за астма и атопия по майчина линия е водещ рисков фактор за развитие на астма. Това силно майчино влияние е само по отношение на ранните прояви на „свиркащо дишане“. При деца на 10-13 г. възраст и двамата родители са с равностойно генетично значение за изявата на астма и атопия [74].

Факторите на околната среда имат модифициращо действие спрямо генетичните фактори. Silverman и Wilson демонстрират въздействието на рисковите фактори през различните периоди от развитието на детето [108]. В ранната детска възраст водещо значение имат експозицията към тютюневия дим, морфологията на дихателните пътища, вирусните инфекции. В по-късна възраст значение имат атопията и проявите на бронхиална хиперреактивност. Тютюнопушенето – пасивно и/или активно се асоциира с по-голяма честота на респираторни заболявания, включително и астма. Децата на майки-пушачки по време на бременността имат четирикратно по-висок риск от „свиркащо дишане“, спрямо родените от непушачки, но това е валидно само за първите пет години от живота [72].

Основната част от пристъпите на бронхиална астма в детска възраст са вирус-индуцирани. Механизмите, които биха могли да обяснят тази зависимост са: продукцията на вирус-специфични ИгЕ антитела, индукция на цитокинова синтеза, увеличена възпалителна активност на левкоцитите, бета-адренергична блокада или увреда на бронхиалния епител [40]. Въпреки това ролята на вирусните инфекции в патогенезата на астмата остава неясна.

Разработени са три основни хипотези [83]:

1. Вирусният инфекциозен агент в ролята на етиологичен фактор променя развитието на имунния отговор или променя тонуса на дихателните пътища.
2. Вирусните инфекции провокират бронхиална обструкция при лица с подлежащи структурни или функционални нарушения на бронхиалното дърво.
3. Характерът на имунния отговор, който се развива към различни вируси, асоциирани с астма, зависи от генетичната predisпозиция на индивида, факторите на околната среда и от момента на експозиция във връзка със степента на белодробно развитие и съзряване на имунната система.

През последното десетилетие се въведоха нови високочувствителни методи за доказване на вирусна инфекция чрез полимеразо-верижна реакция (PCR) на назофарингеални секрети. Такава се установява при до 92.2% от децата с екзацербация на бронхиална астма [14]. Най-често се откриват човешки риновирус (HRV), RSV, аденовирус, грип, парагрип, човешки метапневмовирус и др. **HRV** се открива в 2/3 от случаите, което поставя риновирусите в центъра на проучванията за астма. HRV са група вируси от Picornaviridae, РНК – вируси, над 100 серотипа в 3 групи – А, В, С. Смята се, че тип С риновируси се асоциират с тежки астматични пристъпи [22].

**RSV** е най-честият етиологичен агент, провокиращ „свиркащо дишане“ в кърмаческа и ранна детска възраст. Връзката между RSV инфекции, прекарани през първите години от живота и развитието на астма е отдавна анализирана от изследователите [80, 115]. Децата, прекарвали RSV инфекция, са с повишен риск от последващо развитие на ИгЕ отговор към хранителни и инхалаторни алергени [104]. Вирусните инфекции остават водещ провокиращ фактор и за възрастта над 3 години. Тук на преден план излизат човешкия метапневмовирус (HMPV), коронавируси, над 100 серотипа риновируси

(предимно HRV тип C). Последните се налагат като основна причина за екзацербация на астмата при деца над 2 годишна възраст [62]. Kotaniem – Serjanen [70] установяват по-висока честота на атопичен дерматит сред децата с риновирусни инфекции и **четирикратно по-висок риск от астма спрямо тези след прекаран RSV бронхиолит.**

Има две конкурентни теории за връзката между факторите на околната среда и епидемиологията на астмата и атопията:

- **Хигиенна хипотеза:** постулирана през 1989 г. от Strachan DP. et al [118], която демонстрира обратна зависимост между броя на децата в семейството и изявата на алергичния ринит. Съгласно тази хипотеза околната среда оказва своето влияние чрез потискане на Th1 – клетъчен тип имунен отговор [117]. Представени са данни подкрепящи ролята на прекараните в ранно детство инфекциозни заболявания за превенция на алергичните болести [128]. Доказана е повишена честота на алергични заболявания сред деца, живеещи в страни с характерен „индустриален“ стил на живот. След десетгодишно проучване през 2000 година Strachan DP et al. потвърждава, че инфекциите имат протективен ефект спрямо алергичните заболявания, свързан с участието им в развитието на чревната микрофлора, което обяснява различията в микросредата на тънките черва при атопици и неатопици [34].
- **Ранна алергенна експозиция:** т.нар. „имунотолерантна хипотеза“ приема, че ранната експозиция на високи концентрации алергени намалява риска от алергия, потенцирайки регулаторния капацитет на имунната система [100].

Бронхиалната астма остава предизвикателство по отношение на патогенетичните механизми, фенотипната изява, методите на диагностика и контрол на заболяването. В началото на 21-ви век търсенето на нови методи и подходи при диагнозата и контрола на заболяването са основен приоритет в развитието на респираторната наука и практика.

Стандартният подход при мониториране на пациентите с астма включва: анамнеза, щателен физикален преглед, документиране на симптомите на заболяването (дневни и нощни) – задух, кашлица, „свирене“ от гърдите, недостиг на въздух, ограничен физически капацитет и др., отчитане на необходимостта от използване на краткодействащи бронходилататори. Обективни методи на оценка на заболяването са: измерване на върхов експираторен дебит – ВЕД (ВЕД-метрия или пикфлоуметрия) и функционалното изследване на дишането (спирометрия).

Според класификацията, предложена от Pizzichini E. et al. през 2005 г. методите, използвани за оценка на възпалението при бронхиална астма се разделят на:

- Директни методи – инвазивни и високоинформативни. Това са бронхиалната биопсия и бронхо-алвеоларния лаваж (БАЛ)
- Относително директни методи – по-малко инвазивни. Към тях се отнасят индуцираната хращка, измерването на FeNO, изследването на издишан въздушен кондензат (exhaled breath condensate, ЕВС), измерване на температурата на издишания въздух
- Индиректни методи – неинвазивни – изследване на кръв и урина за биомаркери  
(Pizzichini E. et al., 2005) [98,99]

## **2. Азотен окис (NO) – биохимичен и анатомичен произход**

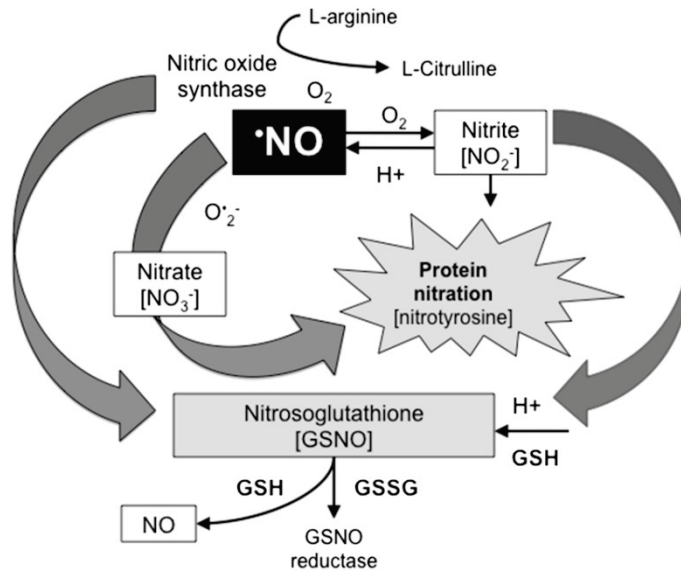
**Исторически данни:** В исторически план преди около 20 години се е считало, че азотният окис (NO) е молекула, която е замърсител за околната среда. Ролята му в човешката биология не е била ясна.

В началото на 90-те години (1991 г.) физиологът **Lars Gustafsson** допуска, че след като NO се образува в белите дробове, би трябвало да е възможно да се установи и в издишания въздух. Съвместно с колеги успява

да докаже следи от NO в издишания въздух при експериментални животни и здрави хора [60]. Скоро след това – през 1993 г. Alving, Weitzberg и Lundberg доказват, че NO е повишен при пациенти с астма [24]. Публикацията през 1993 г. в European Respiratory Journal “Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics“ поставя нова ера в научните изследвания по отношение на азотния окис и други биологично активни молекули.

През 1992 г. NO е обявен за молекула на годината. Той е припознат след дългогодишни научни изследвания като фактор, който се освобождава от ендотела с релаксиращ ефект, идентифициран като NO (endothelium – derived relaxing factor: EDRF). Съобщението е публикувано от Culotta E. в списание „Science“ през 1992 г. [42]. Откритието печели Нобелова награда през 1998 г. NO се оказва важна регулаторна молекула, която се среща в много тъкани и органи. NO участва като посредник в редица биологични процеси като регулация на периферния кръвен поток, тромбоцитна функция, процеси на невротрансмисия, хормоносинтеза и имунни реакции.

**Синтез на азотния окис:** Ендогенният NO се получава от аминокиселината L-аргинин чрез ензима азотен окис синтаза (NOS). Ензимът съществува в т.нар. **конститутивна** и **индуктивна изоформи** (cNOS, iNOS). Конститутивната форма се открива в ендотелните клетки (eNOS) и се нарича **ендотелна** форма и в нервната тъкан (nNOS) – **невронална** изоформа. Тези две изоформи се освобождават при увеличаване на интрацелуларните нива на калциеви йони. И трите форми на ензима NOS (eNOS, nNOS, iNOS) се откриват в дихателните пътища. Само експресията на iNOS изоформата корелира с нивото на издишания NO. Тази изоформа е независима от калциевите йони, а се индуцира от възпалителни цитокини (медиатори). В частност iNOS се експресира от епителните клетки на дихателните пътища [59]. Същата изоформа може да се открие и в алвеоларните макрофаги, еозинофили и други клетки на възпалението.



Фиг. 2 – Синтез на азотния окис

NO, образуван от cNOS може да доведе до cGMP-зависима релаксация на дихателната гладка мускулатура, докато NO, освободен чрез iNOS може да има проинфламаторен ефект [101].

Експресията на iNOS може да се предизвика чрез разнообразни стимули: възпалителни цитокини, чрез участието на транскрипционен фактор STAT-1, нуклеарен фактор капа Б (NF-каппа В) и интерферон гама (INF-gama). Има данни, че тези транскрипционни фактори симултанно се увеличават в дихателния епител на астматици [87,67].

iNOS има важна роля в белодробното възпаление. Пероралното лечение със селективен iNOS инхибитор показва намаление на издишания NO с 80-90% както при пациентите с астма, така и при здравите контроли.

Освен NOS-катализиран път на образуване на NO, има и не-ензимно зависим път на образуване на NO от нитрити. Последното за първи път е доказано през 1994 г. от две независими групи при изследване на стомашна лигавица и слюнка. В устната кухина факултативните анаеробни бактерии редуцират нитратите от храната до нитрити с помощта на нитрат-редуктаза, последните също се подлагат на редукиционен процес. Следователно за нивата на NO в

организма имат значение нитратната диета, както и приема на зеленолистни зеленчуци (марули и спанак и др.) [33,132].

Възпалението на дихателните пътища при астматици се характеризира с повишен брой на активирани еозинофили, мастоцити и Т-лимфоцити в бронхиалната мукоза и лумен. Възпалителните медиатори, отделени от тези клетки водят до епителна увреда, оток, мукусна секреция и спазъм на гладката мускулатура. При пациентите с бронхиална астма се наблюдава **ранен и късен възпалителен отговор**. Ранният отговор е транзиторен и се демонстрира с увеличаването броя на неутрофилите. Късният отговор е продължителен и асоцииран с повишение на еозинофилните левкоцити и Т-лимфоцитите. Счита се, че и в двете фази на алергичното възпаление се повишават нивата на NO, но по-изразено в късната фаза. Възможно е повлияване на нивата на NO от процесите на ремоделиране на дихателните пътища. Установен е генният локус на NOS – той е локализиран върху дългото рамо на **хромозома 12** в региона 12q13-q24.2. Тези данни предполагат различни стойности на NO, свързани с генетичната вариабилност на NOS гена.

**Нивата на NO** в носа и назофаринкса са много по-високи, отколкото тези в издишания въздух през устата (параназални синуси – 1000-30 000 ppb, носно дишане 15-40 ppb, дишане през устата 5-15 ppb). Това предполага съществена роля на горните дихателни пътища в образуването на NO при здравите хора [24,76,55].

През последните 20 години се проучва важната роля на NO като маркер на **еозинофилното възпаление** при бронхиална астма. Въпреки противоречивите данни при част от клиничните проучвания в детска възраст, наличните изследвания до момента определят важна роля на метода в комплексната диагноза и проследяване на ефекта от лечението на пациентите с бронхиална астма както в стационарни, така и в амбулаторни условия.

Разбира се, както и останалите параклинични и инструментални методи значението на последния метод се коментира съобразно съвременните изисквания за работа с апаратурата за измерване на NO на Европейското респираторно дружество (ERS) и на Американската Торакална асоциация (ATS) [27].

Стандартните методи за диагноза и мониториране на бронхиалната астма традиционно се фокусират върху симптомите на заболяването и феноменът на бронхоконстрикция. Измерването на нивото на NO в издишвания въздух се оказва по-информативно от голяма част от конвенционалните тестове, използвани в международните протоколи за диагноза на астмата. В някои изследвания се допуска значимост и информативност сравнима с биопсията на бронхиална лигавица или бронхо-алвеоларния лаваж (БАЛ), които са традиционния „златен“ стандарт за детерминиране на възпалението на дихателните пътища.

### **3. Измерване на издишания NO – методи и стандартизация**

#### **3.1 Методи**

Измерването на издишания NO (FeNO) може да се осъществи по няколко метода: **хемилуминесцентен метод, електрохимичен и чрез лазерна спектроскопия** [105].

Пръв в исторически план и най-широко използван метод за измерване на издишания NO е **хемилуминесценцията** след взаимодействие с озон, с последващо окисляване на NO, емитиране на фотони, които кореспондират на количеството на издишания NO. Методът е много чувствителен и позволява измерване до 1 частица на милиард (1 part per billion – ppb) [60]. Хемилуминесцентният метод остава „златен“ стандарт при измерването на FeNO (фракционирания издишан азотен окис). Големият интерес за измерването на FeNO с портативни апарати в болнични, амбулаторни и

домашни условия доведе до развитието на устройства, базирани на електрохимични сензори. Тези FeNO анализатори показват много добро съвпадение с хемилуминесцентната методика и тяхната употреба непрекъснато расте [23,85].

**Лазерно-базираната методика** за измерване на FeNO се използва основно за научни цели и няма понастоящем практическо приложение [84].

Тъй като NO се образува постоянно в дихателните пътища концентрацията му варира в зависимост от потока на издишания въздух. Следователно когато се измерва концентрацията на NO, трябва да се отбележи величината на въздушния поток. След публикуване на ръководството на ATS през 1999 г. повечето автори използват препоръчания 50 ml/s въздушен поток. През 2005 г. излиза съвместен консенсус на ERS/ATS по отношение на методите и стандартизацията при измерване на NO: „ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide” [27]. Могат да се използват по-високи или по-ниски нива на въздушния поток, но винаги трябва да се съпоставят при тълкуване на резултатите.

Стойностите на NO в издишания въздух могат да бъдат повлияни от редица **външни фактори**, поради което стандартизацията на методиката е от голямо значение.

<b>Фактор</b>	<b>Ефект</b>
Техника на вдишване	Необходимо е вдишване до TLC, при по-малък обем на вдишания въздух – по-ниски стойности на FeNO [18]
Задържане на въздуха	След дълбоко вдишване е необходимо да започне веднага издишване, задържане на дъха е причина за завишаване на стойностите на NO [27]
Ниво на издишания въздушен поток	Колкото е по-силен въздушния поток при издишване, толкова по-ниски са стойностите на NO. Съвременните препоръки са за въздушен поток от 50 ml/s SBOL [27]
Време на издишване	При късо експираторно време се установяват ниски нива на FeNO, поради недостигане на плато, като изискванията са за бсек при деца и 10 сек при възрастни. При децата между 6 и 10 сек метод не е установена статистическа разлика [69]
Орално налягане	Целта е оралното налягане да бъде над 5 cm H <sub>2</sub> O за да се изключи назална контаминация [68]. Повечето устройства постигат налягане между 5-20 cm H <sub>2</sub> O стълб [27]
Ниво на NO във външната среда	Апаратите трябва да работят при стабилни и непроменени външни условия
Концентрация на калибрационния газ	Има незначителни разлики при използване на калибриране с NO газ с различна концентрация, което обяснява защо различните анализатори дават стойности с малка разлика [35]

*Табл. 1 – Външни фактори и тяхното въздействие върху стойностите на издишания азотен окис*

### 3.2 Фактори, въздействащи на измерения NO, свързани с пациента (вътрешни, ендогенни фактори):

- Пол:

Резултатите по отношение на пола и NO в литературата са разнопосочни. Има проучвания, които не намират разлика в стойностите на NO при двата пола [90]. Други установяват по-ниски стойности на NO при женския пол. Това може да се обясни със занижената ендогенна продукция на NO при жените, по-ниското ниво на плазмените нитрати при тях [63], както и по-малката площ на въздухоносните пътища при женския пол в сравнение с телесната повърхност, водещо до намален дифузионен капацитет за NO.

Вариациите на NO по време на менструалния цикъл са много малки и без клинична значимост. Бременността не показва промяна в нивата на издишания NO.

- Височина:

Установена е положителна зависимост между височината и стойностите на NO, както при възрастни, така и при деца. Промяната на височината (ръстга) от 120 на 180 см е свързано с двойно увеличаване на NO в издишания въздух [79], вероятно поради нарастване на респираторната повърхност и ендогенен синтез на NO при по-високи пациенти.

- Възраст:

Проучванията в детска възраст показват нарастване на NO с увеличаване на възрастта [79]. Голямата част от изследванията в тази област подкрепят тези данни. В проучване на Avital et al. от 2003 г, публикувано в „Pediatric Pulmonology” се установява, че при пациенти със сходна тежест на астмата FeNO е възрастово-зависим показател и е налице право пропорционална връзка между нарастването на нивата на азотен окис и възрастта в години.

Avital предлага формулата:

$$eNO = 0.37 \times \text{възраст (години)} + 8.87$$

за изчисление на промените в изследвания показател с възрастта. В същото проучване не се установява значима полова разлика в стойностите на азотния окис [28]. Подобни резултати получава Franklin et al., който изследва приблизително същия брой здрави деца на възраст 7-13 години и установява значимо нарастване на FeNO с възрастта [51]. Противоположни са резултатите на Baraldi et al. при 159 здрави деца на възраст 6-15 години от бялата раса – не се установяват разлики в стойностите на азотния окис според възрастта и пола на децата [30].

- Тегло:

В няколко по-малки проучвания е установена положителна връзка между теглото, BMI и NO, което не се потвърждава от други по-големи изследвания. Има данни, че при астматици със затлъстяване се наблюдава различен проинфламаторен отговор. Наднорменото тегло е свързано с по-ниски стойности на FeNO при астматици [31].

- Алергична сенсibilизация:

Има корелация между нивата на IgE и NO, като зависимостта е между 15-60%. Тази голяма вариация в стойностите би могла да се дължи на факта, че нарастването на FeNO може да бъде свързано не само с атопията, но и с нивото на алергенната експозиция, което води до голяма хетерогенност при изследването у сензитивни пациенти.

- Белодробна функция и размер на дихателните пътища:

Функционалното изследване на дишането е стандартен метод за оценка на бронхиалната астма, като се отчита дефицита на метода по отношение на оценката на бронхиалното възпаление. Повечето клинични проучвания не установяват или установяват слаба корелация между FEV1 и останалите показатели от ФИД и FeNO [110], което предполага по-бърза промяна на

нивата на азотен окис при алергенна експозиция от промените във ФИД. Някои автори считат, че промените в малките дихателни пътища са в по-тясна зависимост от FeNO при пациентите с астма [32]. Следователно показателите от ФИД и FeNO отчитат различни аспекти на астмата и между тях не се установява или се отчита слаба корелационна връзка [116].

Бронхоконстрикцията, индуцирана чрез БПТ, е свързана с намаляване на FeNO както при здрави доброволци, така и при астматици. Нивата на FeNO се нормализират след стимулирана бронходилатация при астматици, с предходен БПТ. Buchvald and Bisgaard доказват, че продължителното приложение на дълго-действащия бета-2 агонист Салметерол води до повишение на FeNO и подобрена белодробна функция. (FEV1)[37].

В проучване на Artlich и сътр. е направено паралелно изследване при деца с екзацербация на бронхиална астма и здрави контроли. Установени са завишени стойности на азотния окис при децата с астма както при тези без КС лечение, така и при тези с инхалаторни КС, но с клинична симптоматика в сравнение със здравите контроли [26]. Същият автор в друго изследване установява негативна корелация между азотния окис и ФЕО1:  $p=0.018$ , факт, който в предходни изследвания не е потвърден, но в цитираното изследване е с клинично значение [25].

Няколко проучвания разглеждат проблема за връзката между издишания азотен окис и тежестта на астмата. Ten Hachen et al. [121] не установяват зависимост между нивата на NO и тежестта на астмата преценена чрез: ФЕО1, БПТ, кръвна еозинофилия, ИгЕ тотал. Абсолютно противоположни резултати получават Kharitonov и сътр. [65], които установяват намаление на нощните симптоми и на БХР при понижаване на нивата на азотен окис без съпътстващи промени в нивата на ФЕО 1 [66]. Следователно показателите от ФИД не демонстрират еднопосочни промени в цитираните проучвания, както и при преглед в литературните източници.

В табл. 2 са показани данни за ефекта на различни фактори от страна на пациента върху FeNO според няколко различни проучвания:

Фактор	Travers [122]	Malinovschi [78]	Olin [90]	Dressel [47]	Taylor [120]
Мъжки пол %	21 (7-39)	15 (1-31)	8 (6-23)	17 (7-29)	25*
Височина (на 10 см нарастване) %	14 (1-41)	10 (3-18)	62 (45-86)	11 (5-17)	несигнификантно
Настоящо тютюнопушене	-36 (-45 -25)	-40 (-47 -32)	-56 (-63 -50)	-39 (-42 -32)	-55*
Предходно тютюнопушене	-13 (-22—3)	-9 (-18-1)	несигнификантно	неизследвано	неизследвано
ИгЕ %	15(0-32)	27(15-40)	62(45-86)	50(37-63)	41*
Астма %	17(5-32)	46(26-69)	41(5-86)	Не е изследвано отделно	26%*

*\*показва статистически значим ефект*

Табл. 2 – Ефекти на различни фактори от страна на пациента върху FeNO

- Активното тютюнопушене: води до редуциране на NO с 40-60% (вж. горната таблица)
- Предходното тютюнопушене е без ефект върху стойностите на азотния окис Olin [90], според Travers [122] – 10% понижение на NO
- Спирометрични техники: препоръките за изследването на NO включват избягване на предходна спирометрия [27]. Повечето проведени изследвания показват понижение на NO с повече от 10% 5-15 минути след проведена спирометрия [53]

- Физическа активност: Същите проучвания показват понижаване на стойностите на NO с до 10% при измерване веднага след физическа активност [53] и нормализиране 30 минути след физическия стрес.

Поради това препоръките за измерване на NO изискват покой при измерването за поне 1 час [27].

- Богатата на нитрати диета повишава стойностите на NO, като този ефект може да се наблюдава повече от 15 часа. Практическо решение е изплакването на устата с хлорхексидин [89].
- Денонощни колебания в стойностите на NO: Kharitonov и сътр. [64] не установяват статистически значими разлики в стойностите на NO в денонощието при здрави и болни с астма деца и възрастни.

Ефекти на различни фактори – свързани с пациентите върху стойностите на NO:

Фактори увеличаващи NO	Фактори с неясен ефект върху NO	Фактори намаляващи NO
Мъжки пол	Менструален цикъл	Настоящо тютюнопушене
Ръст	Тегло /BMI	Предходно тютюнопушене
ИгЕ	Физическо натоварване, спирометрични техники	БПТ
Високо-нитратна диета	Денонощни колебания	
Възрастта при децата	Години при възрастни	

Табл. 3 – Ефекти на различни фактори, свързани с пациентите върху стойностите на NO

## **Алвеоларен NO – маркер на възпалението на малките дихателни пътища**

През последните 10 години голям интерес представлява мониторирането на алвеоларния NO като показател на възпалението на малките дихателни пътища при пациенти с астма. Hamid et al. и Haley et al. доказват, че при астматици възпалението ангажира целия дихателен тракт. Неинвазивен метод за оценка на това възпаление е изследването на алвеоларната концентрация на NO (CalvNO). Този показател е завишен при пациенти с нощна астма. Подобно на издишания азотен окис, нивото на алвеоларния се влияе от приложението на орални и инхалаторни кортикостероиди. Методът все още не е стандартизиран и няма широко практическо приложение. Използва се предимно за научни цели.

### 3.3 Техники на измерване на издишания азотен окис:

- **On-line измерване** (нивото на NO се регистрира по време на изследването)

Нивото на издишания NO обикновено се определя при едноетапно издишване. Препоръчаната техника включва: вдишване на NO-свободен въздух чрез приставка (филтър) за устата до тоталния белодробен капацитет (TLC), последвано от пълно издишване на поетия въздух в апарата при постоянен въздушен поток. По време на издишването се генерира високо налягане в устната кухина (между 5-20 cm H<sub>2</sub>O стълб), което предполага затваряне на небцето и ограничаване на въздушния поток от носа и околоносните кухини, които са с високи концентрации на NO. Това е т.нар. едноетапен метод на измерване (single-breath on-line measurement – SBOL)

Основен технически принцип е постигането на постоянен поток на издишване от 50 ml/s за 6-10 секунди и издишване от тотален белодробен капацитет. Изключването на носния поток става чрез достигане на високо

налягане в устната кухина, чрез което се затваря небцето. Апаратите за изследване са снабдени със звукови и светлинни сигнали за обратна връзка и контрол. Има безспорните предимства за on-line регистрация на NO. Проблем на методиката е трудността при техническо изпълнение: Baraldi и сътр. установяват, че 50% от децата на възраст 4-8 години не изпълняват адекватно метода, Jobsis и сътр. докладват 30% неуспех. Основният проблем е в поддържането на постоянен поток на издишвания въздух. За децата, които сътрудничат при изследването е метод на избор.

Друг начин за on-line регистрация е по време на спонтанно дишане - особено предизвикателство за възрастовата група 2-5 години. Посредством непрекъснато контролиране на резистентността на издишвания въздух се постига поток от 50 ml/s. Методът изисква пасивно взаимодействие, като детето трябва да диша бавно и регулярно през устен накрайник.

- **Off-line методи** с вариабилен или константен поток (стойностите на издишания NO се получават в следствие)

Детето издишва чрез устен накрайник в NO-инертен балон срещу налягане от 5 см H<sub>2</sub>O стълб, което препятства назалната контаминация. Размерът на балона трябва да е точно или повече от предполагаемия витален капацитет. Резултатите корелират, но не са идентични с on-line измерването. Концентрацията на NO е стабилна за няколко часа. Предимства на метода са, че е прост и подходящ и за деца на възраст 2-3 години, не изисква активно регулиране на въздушния поток, измерванията могат да се правят дистанционно (в училище, в къщи и т.н.).



стойности над 35 ppb има най-голяма вероятност да се касае за алергична астма. Тази група деца са най-подходящи за лечение с ИКС [49].

Основни фактори увеличаващи стойностите на FeNO са: вирусни инфекции на дихателните пътища, алергичен ринит, пневмонии, богата на нитрати храна, физическото усилие, назалната полипоза, прийоми със задържане на дъха преди изследването, назална контаминация, високи нива на азотен окис в околната среда, консумация на алкохол и други. При заболявания като муковисцидоза и цилиарна дискинезия, при тютюнопушене, при спирометрични техники, използване на кофеин, индукция на хрчка и други, NO намалява като стойност. Денонощните колебания в нивата на NO се считат незначителни според повечето автори.

#### **4. Издишан азотен окис и астма**

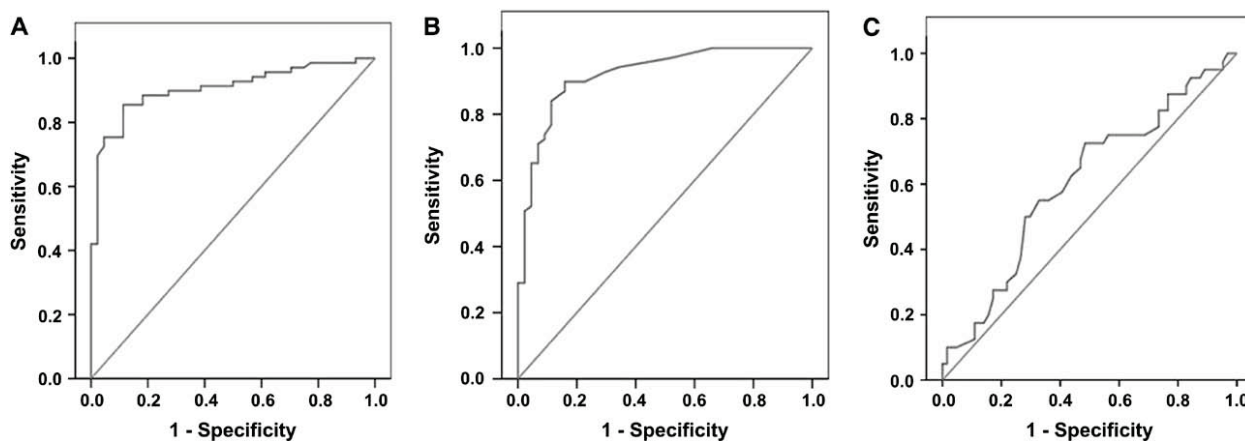
Успешният контрол на астмата изисква точна диагноза и ефективен контрол на заболяването: липса на симптоми и екзацербации, добра белодробна функция, социална адаптация, минимални странични ефекти от провежданата терапия. Въпреки съвременните достижения в диагностичен и терапевтичен план има пациенти, които са без диагноза както и такива с труден терапевтичен контрол. Дори при пациенти с ИКС и добър клиничен контрол, се доказва възпаление на дихателните пътища, бронхиална хиперреактивност, възможни екзацербации и склонност към ремоделиране на бронхиалната стена [36].

Развитието на практически ориентирани и достоверни неинвазивни методи дава възможност да се оцени по-точно възпалението на дихателните пътища за по-точна диагноза и идентификация на рисковите за екзацербация групи.

#### 4.1 Диагностично значение на издишания азотен окис при астма

Издишаният въздух при здрави хора съдържа между 5-25 ppb NO (5-20 ppb при деца), а при астматици – нивата са два до четири пъти по-високи. Smith и сътр. установяват в 88% чувствителност на метода за диагноза на астма при кортикостероид – нетретирани пациенти [113]. Същото проучване установява силна положителна корелация между FeNO и еозинофилите в храрка, както и значителна отрицателна корелация между FeNO и бронхиалната хиперреактивност. Методът има важно диагностично значение при диагностициране на алергичния ринит и добре корелира с редуцията на възпалението при използване на локални ГКС.

В проучване от 2009 г., публикувано в “Journal of Pediatrics”, Shivan и сътр. изследват 150 деца: 69 без предходно приложение на КС с астма, 44 без астма и 37 с астма, с приложение на контролиращи КС медикаменти. Позитивната и негативна предсказваща стойност на FeNO при стойност 19 ppb е съответно 89% и 86%.



Фиг. 3 – Резултати от ROC криви за азотния окис, еозинофилите в храрка, и ФЕО1 при пациентите с астма от проучването на Shivan и сътр.

## 4.2 Връзка с еозинофилното възпаление на дихателните пътища

Детската популация е широко изследвана по отношение на FeNO, тъй като методът позволява по неинвазивен път да се оцени еозинофилното възпаление, което е от важно значение за детската възраст [95,124]. Payne et al. изследват зависимостта между FeNO и еозинофилното възпаление чрез ендобронхиална биопсия при 31 деца с трудна за контрол астма и при 7 контроли преди и след 2-седмичен курс с орален преднизолон [93]. Установена е статистически значима зависимост между FeNO и еозинофилията, която е най-изразена при децата с персистиращи клинични симптоми след КС лечение. Подобни резултати са намерени при FeNO и еозинофилите в БАЛ или индуцирана хрчка при деца с астма [129,96].

Връзката между FeNO и еозинофилното възпаление става много противоречива по последни проучвания, които не само, че не установяват подобна корелация, но има данни, които показват, че използването на Мepolizumab (anti-IL-5 антитяло) при пациенти с рефрактерна на терапия астма води до намаляване на клиничните симптоми и на еозинофилите в хрчката на пациентите, но не и на FeNO – аргумент против директната биологична асоциация между FeNO и еозинофилите [123,61].

## 5. Терапевтично значение при астма

FeNO може да бъде използван като количествен маркер за определяне на възпалението при астма (неспецифичен инфламометър), с високи стойности при пациенти с нелекувана астма. Документирано е завишаване на стойностите на FeNO при астма още преди изявата на клинични симптоми, както и благоприятното понижаване на нивата му при прилагане на орални, инхалаторни кортикостероиди (КС) и левкотриенови антагонисти и без динамика от приложението на кратко и дългодействащи бронходилататори. Този показател дава индиректна информация за **стероидната ефективност** и

за **възпалението** на дихателните пътища. При задържане на високи нива на FeNO на фона на КС лечение могат да се отдиференцират т.нар. non-responders. Има ясна дозова зависимост между инхалаторното КС лечение и понижението в нивата на FeNO. Високите изходни нива на FeNO предполагат КС-чувствителност. Чрез мониториране на динамиката на стойностите на NO може да се титрира най-ниската ефективна КС доза, както и да се предвиди вероятността от загуба на контрол.

В две големи проучвания се използват стойностите на FeNO за титриране на дозата на ИКС при пациенти с астма. Smith и сътр. използват FeNO стойности за намаляване на дозата на ИКС до т.нар. „оптимална доза“ – доза за постигане на FeNO > 15 ppb при възрастни пациенти, но под която се губи контрол над заболяването [111].

Rijnenburg и сътр. правят съпоставка между FeNO-базиран алгоритъм и симптом-базиран алгоритъм и титрират КС доза при 85 деца [97].

Известно е въздействието на КС върху FeNO: независимо от начина на приложение – инхалаторни, орални или парентерални, те водят до драматично понижение на стойностите на FeNO [106]. Известна е възможността на FeNO да предсказва отговор към КС лечение: по-високите стойности на FeNO предполагат по-добър отговор към ИКС по отношение на белодробната функция и намалението на бронхиалната хиперреактивност [112]. Ефект върху стойностите на FeNO имат и левкотриеновите антагонисти, което се доказва в работата на Fritscher и сътрудници [52].

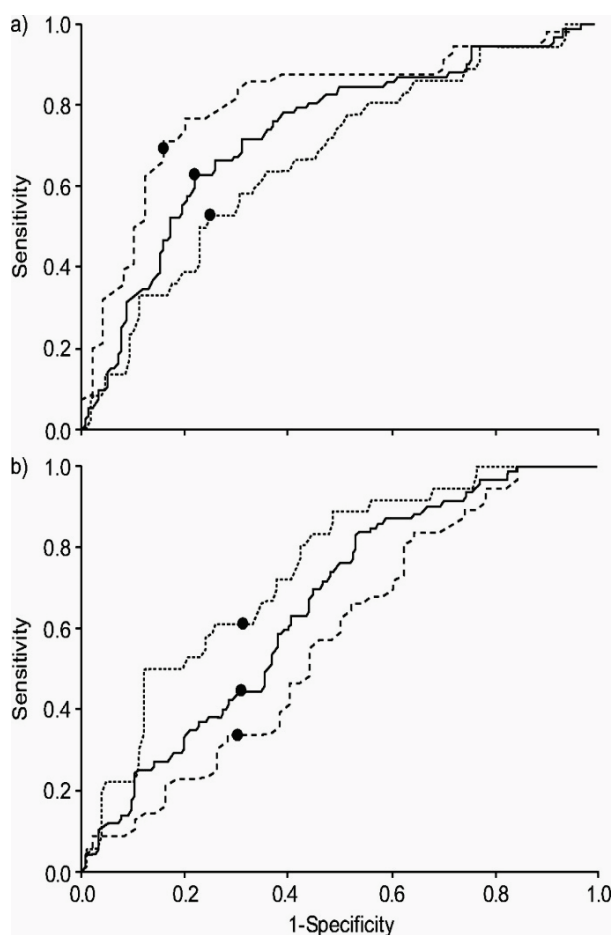
## 5.1 Контрол на астмата

FeNO мониторинга се използва да се определи дали пациенти с астма в ремисия, имат данни за персистиращо възпаление на дихателните пътища.

В най-голямото проучване, известно понастоящем за използване на FeNO при контрол на астмата са изследвани 546 пациента на възраст 12-20 години с диагноза: персистираща астма. На случаен принцип те са

разпределени в две групи: терапия, базирана на клинични симптоми или терапия, модифицирана според стойностите на FeNO. При стойности на FeNO > 20 ppb се завишава инхалаторната доза. По време на 46-седмичния период на лечение средният брой на симптоматични дни не се различава в двете групи. Липсва разлика в обострянето на астмата в двете групи. Пациентите мониториращи с FeNO получават сигнификантно по-високи дози на ИКС (с разлика 119 mcg дневно) отколкото контролната група [119].

В проучване на Michils сътр., публикувано в ERJ 2008 е установено, че FeNO е с по-голяма значимост за контрол на заболяването отколкото проследяването на FEV<sub>1</sub> [50].



Фиг. 4 – Чувствителност и специфичност на ФЕО1 и NO при контрола на астмата

## 5.2 Обостряне на бронхиалната астма

Използването на FeNO като предиктор на обостряне при астма е широко дискутирано. Методът, в съчетание с установяването на бронхиална хиперреактивност и на еозинофилия в храчка, би могъл да има по-голямо значение. Не всички автори установяват статистически значимо повишение на FeNO при влошен контрол на астмата [73].

## 5.3 FeNO като маркер на възпалението на малките дихателни пътища при астма

Възможностите за изследване на клетъчното възпаление в най-малките дихателни пътища е доста ограничено в клиничен аспект. Както трансбронхиалната биопсия, така и *post mortem* изследванията установяват възпаление на малките дихателни пътища при пациенти с астма. Чрез различни експериментални модели се цели получаване на NO от най-дисталните бронхиоли, като това се постига с модулиране на въздушния поток – при по-голям въздушен поток се постига wash-out от бронхиолите, при по-слаб въздушен поток издишаният въздух е с по-проксимален произход – от по-големите бронхи.

Основна цел на лечението на бронхиалната астма е предотвратяването на екзацербациите на астмата при използване на най-ниска доза на ИКС. FeNO е добър маркер на еозинофилното възпаление, който доказано предсказва обострянето на астмата. По отношение на ролята му в терапията на бронхиалната астма има две важни пояснения: неговите стойности би следвало да се отчитат съобразно възраст, пол и ръст, както и ролята на други модифициращи фактори – напр. атопията. Голямо значение има индивидуалното проследяване на FeNO.

## 6. Корелация между азотния окис и атопията

Атопията може да се дефинира като персонална и/или фамилна склонност за развитие на сенсibiliзация и производство на ИгЕ антитела в отговор на обичайна експозиция на алергени, най-често протеини, която се проявява обикновено в детска или юношеска възраст. Като последица, такива индивиди могат да развият типични симптоми на екзема, риноконюнктивит или астма. Термините "атопия" и "атопичен" следва да се използват за обозначаване на генетичната предиспозиция за синтезиране на ИгЕ-антитела към често срещани се в околната среда алергени, на които всички са изложени, но мнозинството хора не реагират с дълготраен ИгЕ антителен отговор. Атопията е клинична дефиниция за изразен ИгЕ антителен отговор.

Не е задължително атопиците да развият астма, както се наблюдават и астматици без атопия.

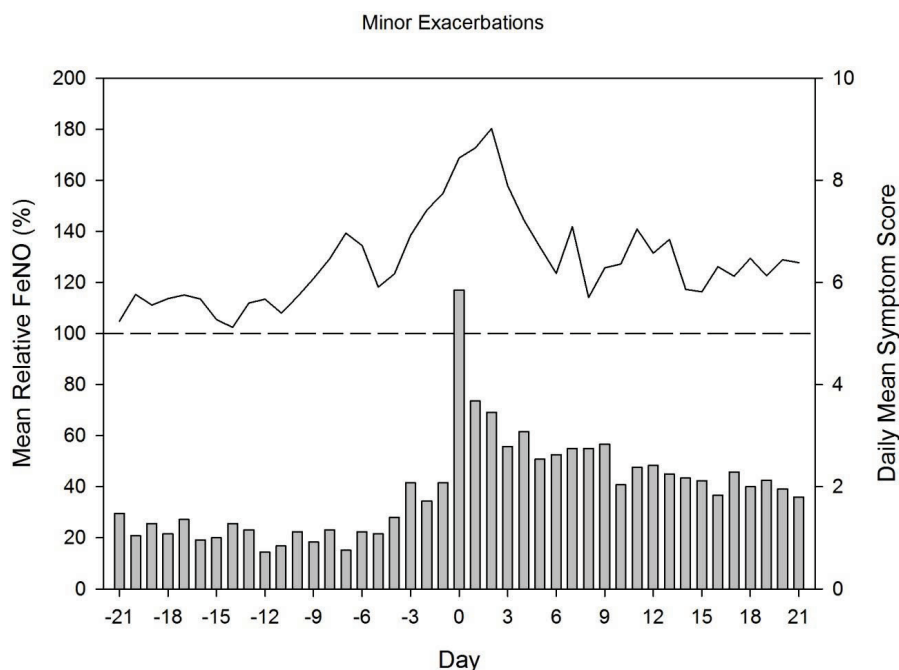
Няколко проучвания показват, че пациенти с атопична астма имат по-високи нива на издишан NO в сравнение с други пациенти с астма. Дори има изводи, че няма разлика в нивата на издишания NO при пациенти с неатопична астма и здрави контроли. При други проучвания се установява корелация между нивата на издишан NO и кожната чувствителност към домашен прах при skin-prick тестовете. Проучване при 450 деца показва, че чувствителността към „indoor“ алергени се асоциира с по-високи нива на издишан NO спрямо несенсибилизираните деца. Нивата на FeNO корелират сигнификантно с бронхиалната чувствителност към хистамин, независимо от това дали децата имат симптоми или не. Така някои автори считат, че повишените нива на FeNO са белег по-скоро на атопия, отколкото на астма. Повишението на FeNO се асоциира с подлежащи механизми на специфичен имунен отговор и бронхиална хиперреактивност и не задължително с респираторни симптоми. Налага се извода, че само атопиците, изложени на съответни алергени имат повишени нива на NO в издишания въздух. Атопици, които не са подложени на действието на съответни алергени и

които нямат симптоми на астма или алергичен ринит имат нормални нива на издишания NO [25].

Децата с атопия и бронхиална астма имат по-високи нива на FeNO [127].

## 7. Азотен окис и клиничните симптоми при бронхиална астма

FeNO се счита като маркер за добър контрол на симптомите при децата с бронхиална астма. Нивата му корелират с клиничната симптоматика, макар че NO се повишава още преди изявата на симптомите. В по-долу цитираното проучване на Van der Valk и сътр. (в списание “Allergy“) от 2012 г. е видно, че нивата на NO се завишават още преди появата на клинична симптоматика [126, 127].



Фиг. 5 – Зависимост между нарастването на стойностите на азотния окис и клиничните симптоми при обостряне на астмата по Van der Valk

Налице е голям интерес за използването на FeNO за диференциране на различните фенотипове бронхиална астма. Методът е от значение за изследване на онази група деца в предучилищна възраст с хронична кашлица,

част от които страдат от еозинофилно възпаление на дихателните пътища („кашличен” вариант на астма) и могат да се повлияят добре от инхалаторна КС терапия.

Измерването на нивото на NO в издишания въздух е лесен, бърз, неинвазивен и високоинформативен метод, с доказана стойност в комплексния подход за диагнозата и мониторирането на бронхиалната астма в детска възраст.

## 8. Издишан азотен окис при други респираторни заболявания

Освен съществената роля на FeNO при бронхиална астма, се доказва неговата роля като биомаркер и при редица други респираторни заболявания. На табл. 5 е представен практически подход на използването на FeNO при някои заболявания:

<b>Завишен FeNO</b>	<b>Вариабилен FeNO</b>	<b>Понижен FeNO</b>
Астма	COPD	Кистична фиброза
Алергичен ринит	Бронхиектазии	Цилиарна дискинезия
Настинка	БПД	Белодробна хипертония
Отхвърляне на трансплант	Фиброзиращ алвеолит	СПИН
Хепатопулмонарен синдром	Саркоидоза	ARDS
Чернодробна цироза	Системна склероза	Височинна болест
Замърсяване на околната среда	Затлъстяване	Сърпо-клетъчна анемия
OSAS		Мускулна дистрофия на Дюшен

Табл. 5 – Издишан азотен окис при други респираторни заболявания

FeNO се повишава при вирусни инфекции на горните и долни дихателни пътища (вируси като RV, IV, RSV могат да активират индуцируемата iNOS).

При муковисцидоза (кистична фиброза) нивата на FeNO са ниски или нормални, независимо от генерализираното възпаление на дихателните пътища. Има няколко възможни обяснения за това наблюдение гъстият секрет в дихателните пътища може да доведе до влошаване на разпространението на NO в газообразна фаза и/или липсата на субстрат (L-аргинин) за производството му с/без намалена активност на iNOS в дихателните пътища на пациенти с муковисцидоза. Потенциална причина за ниското ниво на FeNO е доказване *in vivo* и *in vitro*, че *Ps. Aeruginosa* консумира NO, което вероятно се дължи на присъствие на NO редуктаза в структурата му. И накрая повишено потребление на NO – усилен метаболизъм при възпалителни окислителни процеси (супероксид и/или миелопероксидаза (MPO) реакция) допринасят за намаляване на издишания NO при пациенти с муковисцидоза [46].

При цилиарна дискинезия FeNO нивата са много ниски, като с по-голяма клинична значимост са силно понижените нива на назален NO (nNO) с диагностична чувствителност и специфичност до 89-100% в сравнение със здрави контроли. Ниски стойности на nNO могат да бъдат установени и при бронхиектазии, синусити, назална полипоза. Причина за това са ниската епителна продукция на iNOS, както и включването на NO в стимулирането на цилиарните движения [77].

В научната литература съобщенията за проучване на нивото на азотен оксид в издишания въздух при деца с остри бактериални пневмонии, придобити в обществото при деца, са оскъдни. Тъй като FeNO е част от възпалителния отговор, неговите нива се очаква да нараснат при остра белодробна инфекция и от там и извода, че може да се използва като маркер за бактериално възпаление и неговото повлияване. За разлика от вирусните инфекции, бактериалните инфекции на дихателните пътища, не предизвикват

повишаване на нивото на FeNO. Нито една от хипотезите за това не обяснява този парадокс, което подчертава необходимостта от по-нататъшни проучвания за ролята на FeNO при деца с остри бактериални пневмонии. При проведеното проучване на Н. Генкова и сътр. се установява, че средна стойност на FeNO е в рамките на нормата, но в по-високи нива в сравнение със здравите контроли [2].

От направените изследвания на Националния Институт за Здраве и Грижа (NICE 2014) се препоръчва изследване на издишан азотен окис в диагностичния план на бронхиална астма при деца и възрастни, както и при проследяването на бронхиалната астма при пациенти с клинична симптоматика независимо от профилактиката с ИКС.

От направения преглед на литературата може да се направи извод, че измерването на азотният окис заема важно значение в диагнозата и контрола на лечението при бронхиалната астма, както при деца, така и при възрастни. Ролята му не бива да се абсолютизира, а да се преценява в комплексния диагностичен и терапевтичен подход.

В България са провеждани изследвания на азотния окис при деца с астма в научни публикации на Т. Стоева [11,10] и на В. Юркова (дисертационен труд), които също установяват повишени стойности на този показател при деца с астма. Т. Стоева и колектив определят типа на възпаление на дихателните пътища посредством фракцията на издишания азотен окис. Ретроспективно анализират респираторната симптоматика и изследват белодробната функция чрез форсирания експираторен обем за 1 секунда (ФЕО1) при деца на 7-годишна възраст, хоспитализирани поне веднъж по повод на остър бронхиолит в първите две години от живота си между 2004 и 2005 г. и сравнени със здрави. Същият колектив (автор Т. Стоева) изследва връзката между FeNO и бронходилататорния отговор (БДО) при деца под 7 г. с атопична и неатопична бронхиална астма [11,10]. В. Юркова в своя дисертационен труд [18] обръща съществено внимание на

леката бронхиална астма, която обхваща 2/3 от всички случаи с астма. Последната често се диагностицира късно и не се лекува адекватно. Доказването на възпалителен процес даже при най-леките епизодични форми на бронхиална астма променя рязко поведението към тези болни. Сред изследваните деца с астма авторът установява сигнификантно по-високо ниво на издишания азотен окис в сравнение с контролната група ( $19.4 \pm 3.3$  ppb), както и същественото понижение на последния след лечение с инхалаторен кортикостероид. Установява се корелация между еозинофилния брой и FeNO при пациентите с астма [109], но не и между FeNO и показателите от ФИД: ФЕО1, ВЕД, МСЕД 25-75%. [19,17].

Н. Генкова в своя дисертационен труд също доказва повишените нива на азотен окис при деца с астма ( $32.84 \pm 10.45$  ppb), като отчита различие в нивата на FeNO в зависимост от това дали се касае за алергична или неалергична астма [3]. Установява сигнификантно понижение на FeNO при постигнат терапевтичен контрол. Н. Генкова обсъжда еднопосочна промяна и на други показатели, свързани с алергичното възпаление, а именно IgE и кръвната еозинофилия [4]. В нейните резултати при деца с астма FeNO и показателите от ФИД – ФВК и ФЕО1 търпят разнопосочни промени. Същият автор при разглеждане на FeNO при други респираторни заболявания отчита различни нива на FeNO при пациенти с муковисцидоза според колонизацията с *Pseudomonas aeruginosa*, а именно – значимо по-ниски стойности при колонизираните пациенти. При разглеждане на FeNO според типа на генетичния дефект отчита най-високи FeNO стойности при болни с муковисцидоза, хетерозиготи по dF508:  $16.50 \pm 3.30$  ppb, които са сигнификантно по-високи от тези при хомозиготи по тази мутация или носители на други редки мутации. Същият автор не отчита разлика в стойностите на FeNO при болни с муковисцидоза и здрави контроли. Н. Генкова изследва закономерност между нивата на FeNO и екзацербациите на болните с муковисцидоза или на типа на провежданото инхалаторно лечение, не установява зависимост [54]. Н. Генкова отчита голямото значение на

метода на измерване на FeNO за диагноза на алергичната астма и за постигане на контрол на заболяването [2].

Въпреки не малкото публикувани данни, свързани с азотния окис, остават много неразрешени въпроси, като например връзката на азотния окис с други възпалителни маркери, диагностичната му стойност при различните фенотипове на бронхиалната астма, интерпретирането на голямата вариабилност на този показател и др. Това предполага необходимост от бъдещи разработки и научни изследвания.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Ето защо си поставихме за цел:

### 1. Цел

**Настоящият труд има за цел: Да се извършат собствени наблюдения и измервания на NO при деца с астма и да се установи значението на метода в комплексната диагноза и контрол на астмата в детската възраст.**

За изпълнението на поставената цел си поставихме следните задачи:

### 2. Задачи

- ❖ Да се направят собствени измервания на NO за деца с бронхиална астма на възраст 5-18 години.
- ❖ Да се направи алгоритъм за интерпретация на стойностите и да се оцени мястото на метода за диагнозата и контрола на детската астма.
- ❖ Да се проучат стойностите на NO при обостряне на астмата и в състояние на клинично-функционална ремисия на заболяването.
- ❖ Да се установи ефекта от лечението със системни или инхалаторни кортикостероиди върху стойностите на NO в издишания въздух.
- ❖ Да се направи паралелна оценка между метода за изследване нивото на издишания азотен окис и други неинвазивни методи за диагностика и контрол на астмата.
- ❖ Да се изследва зависимостта между стойностите на NO при деца с бронхиална астма и показателите: възраст, пол, ръст, тегло и BMI.

### **III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

#### **1. Материал**

В настоящата работа за двугодишен период от октомври 2010 г. до декември 2012 година са изследвани 143 деца с бронхиална астма, хоспитализирани в Клиниката по Педиатрия на УМБАЛ „Александровска“ поради екзацербация на основното заболяване. Децата са проследени в тримесечен интервал в състояние на клиничко-функционална ремисия на заболяването.

##### **1.1 Характеристика на групите и дизайн на изследването**

В клиничното наблюдение и изследване са включени две контролни групи: 12 здрави контроли и 16 деца с кистична фиброза (муковисцидоза) – болни контроли. Преди включване в изследването децата и техните родители подписаха писмено информирано съгласие.

#### **2. Методи**

##### **2.1 Изследване на стойностите на азотния окис в издишания въздух**

Методът е стандартизиран, технически лесно изпълним и безопасен при клиничните проучвания при деца.

Методиката за измерване на FeNO е чрез едноетапно on-line измерване (т.нар. single breath on-line measurement), която е най-използвана за определяне на NO при по-големи деца с възможност за активна кооперация. Апаратът за измерване на FeNO “Nioxmino” е на шведската фирма Aerocrine, преносим, сертифициран за употреба в страните от Европейския съюз със следните технически характеристики: размери 240/130/100 мм, тегло 800 г, ниво на шум под 35 dB при разстояние 1 м, възможност за 1500 измервания,

температурни условия за съхранение +16 до +30 градуса, влажност 20-60%. Диапазон на измерване на NO от 5 до 300 ppb и точност на измерване < 5 ppb при стойности до 50 ppb и < 10 ppb при стойности над 50 ppb. Потокът от 50 ml/s е гарантиран чрез звуков, зрителен и светлинен сигнал и се поддържа за период от 6-10 секунди (при двата режима на работа на апарата).

При проведените до момента клинични проучвания с апарата не са установени нежелани ефекти от изследването. Използвани са филтри за индивидуална употреба, които гарантират стерилност. Измерването на азотния окис е извършено след 5 минутен покой, преди всички други изследвания, на гладно. Обхванати са всичките 143 деца с астма (проследени в 3 мес. период), здравите контроли и болните с кистична фиброза – общ брой на изследвани пациенти 171.

## 2.2 Функционално изследване на дишането

При 143 деца с астма се проведе и функционално изследване на дишането (ФИД, спирометрия) при хоспитализацията им в състояние на пристъп и след 3 месеца при проследяване в клиниката. Изследването е проведено чрез апарата: **Master screen pneumo 4.34**.

За целите на настоящата работа се използваха следните показатели при статистическата обработка от ФИД: форсиран експираторен обем за 1 секунда (ФЕО1), върхов експираторен дебит (ВЕД), максимален среден експираторен дебит 25/75% (МСЕД 25/75). ФИД се осъществи след изследването на издишания азотен окис.

## 2.3 Рентгенография на бели дробове

Проведена при децата с астма за изключване на подлежащ възпалителен процес на белодробния паренхим, както и за образно изследване на структурите в гръдния кош.

## 2.4 Лабораторни изследвания

- пълна кръвна картина (ПКК) – изследването е осъществено при стандартни условия чрез автоматичен хематологичен анализатор **Micros ABX** с 22 параметъра. Изследвани са: общ левкоцитен брой, СУЕ.
- кръвна еозинофилия – определена чрез цитологично диференциране на натривка, оцветена с хематоксилин – еозин (изследвана от дисертанта).
- С-реактивен протеин – определен чрез полуколичествен анализ: за целите на изследването всички деца, включени в проучването са с негативни стойности на С-реактивен протеин.

## 2.5 Серологично изследване за респираторни вируси и други патогени

При 126 деца с астма се изследваха серологично ИгМ и ИгГ антитела по метода ELISA за следните причинители: RSV, Adenovirus, Influenzavirus, Parainfluenzavirus, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae. Изследването се осъществи във Вирусологична лаборатория, ВВМА.

## 2.6 Храчка (назален секрет) за еозинофили

При 19 от 143 астматици се получи спонтанно отделена храчка, което позволи нейното микроскопиране и анализ. При останалите 124 деца се изследва назален секрет за еозинофили, взет със стерилен тампон от среден носен ход, нанесен върху предметно стъкло, с последващо оцветяване с хематоксилин – еозин и цитологично диференциране със светлинен микроскоп, осъществено в Клинична лаборатория на СБАЛББ „Св. София“ – София от доц. М. Маркова.

## 2.7 Антропометрични показатели

рѳст, тегло, индекс на телесна маса (ВМІ), както и пол и възраст бяха определени при всичките 143 деца с астма, при здравите и болни контроли в изследването: общо при 171 деца

## 2.8 Анамнестични данни

- давност на астмата: децата с астма се обособиха в три групи: с давност на бронхиалната астма до 6 месеца, от 6 месеца до 5 години и над 5 години
- фамилна обремененост: дефинира се като фамилност за астма и алергии по майчина, бащина линия и по първа линия (братя и сестри)
- собствен атопичен терен: наличие на атопичен дерматит, алергия към белтъка на кравето мляко (АБКМ) или други хранителни алергени, данни за алергичен ринит, конюнктивит, други форми на алергия
- информация за предхождащ фебрилитет, вирусна или бактериална инфекция
- предходна профилактика и контрол на астмата

Децата с астма се разделиха на следните групи:

- Без провеждано контролиращо лечение
- Провеждащи терапия с левкотриенови антагонисти
- Провеждащи лечение с инхалаторни кортикостероиди (ICS, ИКС)
- Провеждащи комбинирана терапия (ICS + LABA)
- Терапия ИКС +ЛТА

Контролиращото лечение се документира преди хоспитализацията и след 3 месечен интервал на проследяване.

- приложение на перорален или парентерален кортикостероид преди изследването: при 23 деца с астма имаше приложен орален, мускулен или венозен кортикостероид

## 2.9 Определяне на общи IgE

Метод на изследване: изследване на серум по метода **ELISA на General Biological Corp.** – при 91 деца от групата на астматиците. Норма до 100 IU/mL, с минимална концентрация на определяне по метода 5 IU/mL.

## 2.10 Статистически методи за обработка на данните

Статистическата обработка е направена със SPSS 13.0.

Извършен е **описателен анализ** с помощта на групировки по един или няколко признака, обобщаващи показатели – относителен дял, средна аритметична, медиана, мода.

Проведен е също и **диагностичен анализ** за оценка на наличието на статистически значими ефекти чрез проверка на статистически хипотези относно наличие на определена връзка в променливи, измервани по-слаби скали. Този анализ е извършен с помощта на хи-квадрат метода. Изчислявани са „точни“ емпирични показатели на Фишер (Fisher exact test) за взимане на решение за тествания ефект.

**Динамичен анализ** е използван, за да се оценят определени зависимости между променливи, които са измервани по силни скали. Тук са използвани корелационни коефициенти на Пирсън, както и рангова корелация на Спирман.

Извършен е анализ на разликата в средни величини, като статистическата значимост на проявените разлики са тествани с помощта на модели за тестване на средна разлика (ANOVA). Резултатите от тези модели са засичани с приложени непараметрични аналози, като целта е да се елиминира евентуално влияние от неспазване на изискванията на ANOVA моделите и в същото време да се използва максимално силен, параметричен статистически метод.

Динамичната промяна във времето е изследвана с помощта на анализ на средните разлики при наличие на повтарящи се измервания (Repeated Measures ANOVA).

За оценка на нивото на значимост на определени емпирични характеристики се използват базираните на предположения относно разпределението на тестваните признаци нива.

Като гранична стойност за равнището на значимост се приема  $p < 0.05$ , освен ако не е изрично отбелязана друга стойност. Съответните оценки за значимостта на определена емпирична характеристика на гореописаните тестове се сравнява с тази гранична стойност /от 0.05./ Ако тя е по-малка от 0.05, тестваният ефект се приема за статистически значим, ако е по-голяма от 0.05, тестваният ефект се приема за статистически незначим.

## IV. РЕЗУЛТАТИ

### 1. Разпределение по пол

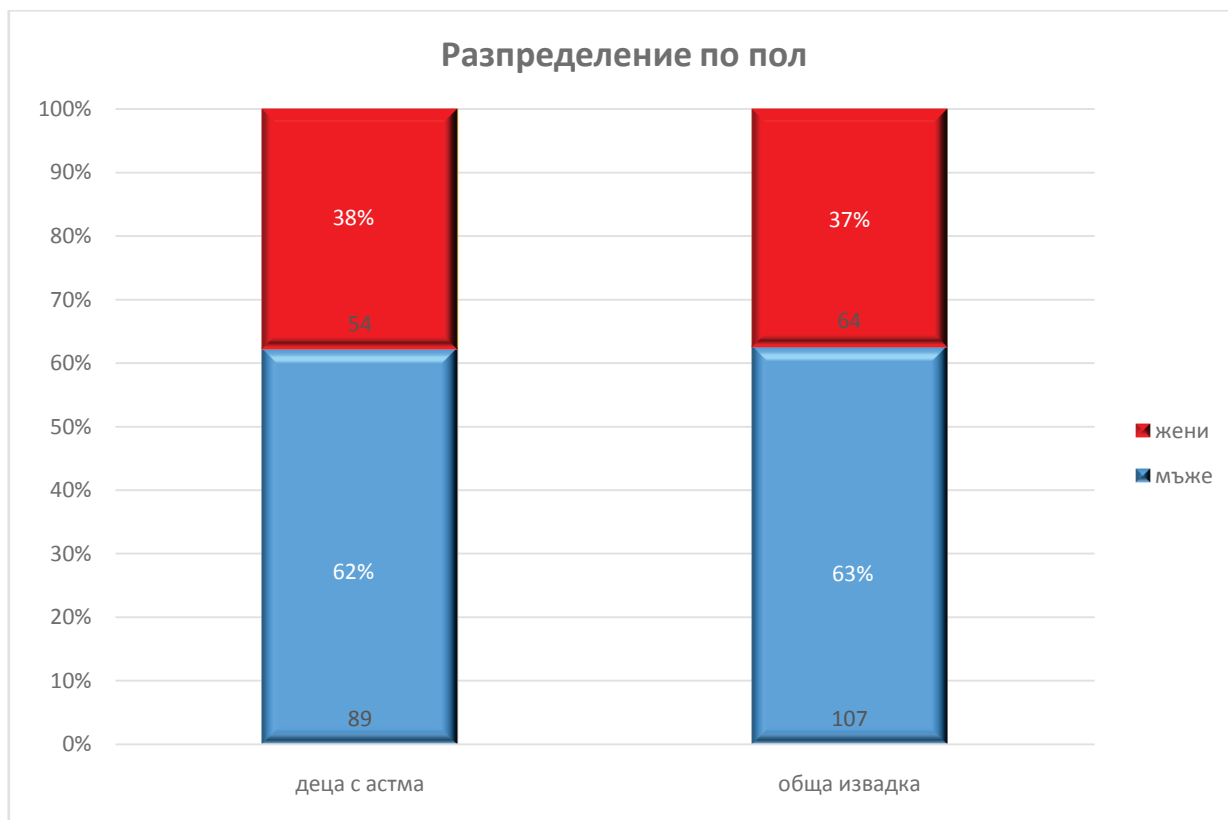
Анализирани са резултатите от наблюдението и изследването на 171 деца, разпределени както следва: 143 деца с бронхиална астма, 12 здрави контроли, 16 болни контроли с муковисцидоза.

Децата са разделени в три групи: болни с астма, здрави контроли и болни с муковисцидоза. За съответните групи, както и за цялата изследвана популация е направено разпределение по пол.



Фиг. 6 – Разпределение на включените в изследването пациенти и контроли

За групата на децата с астма разпределението по пол е съответно:  $n=89$  деца – мъжки пол,  $n=54$  деца – женски пол, което в процентно разпределение е съответно 62.2% на 37.8%. За общата извадка от 171 деца, 62.6% ( $n=107$ ) са от мъжки пол, срещу 37.4% ( $n=64$ ) от женски пол. Установява се доминиране на мъжкия пол при децата с астма, както и в общата група.



Фиг. 7 – Разпределение по пол за децата с астма и за общата извадка в изследването

**Група пациенти \*      Полова Кростабулация**

Група пациенти	Болни	Брой	Пол		Тотал
			.00 м	1.00 ж	
1.00 болни	Брой	89	54	143	
		% Група пациенти	62.2%	37.8%	100.0%
		% Пол	83.2%	84.4%	83.6%
		% Тотал	52.0%	31.6%	83.6%
2.00 контрола здрави	Брой	9	3	12	
		% Група пациенти	75.0%	25.0%	100.0%
		% Пол	8.4%	4.7%	7.0%
		% Тотал	5.3%	1.8%	7.0%
3.00 контрола болни	Брой	9	7	16	
		% Група пациенти	56.3%	43.8%	100.0%
		% Пол	8.4%	10.9%	9.4%
		% Тотал	5.3%	4.1%	9.4%
Тотал	Брой	107	64	171	
		% Група пациенти	62.6%	37.4%	100.0%
		% Пол	100.0%	100.0%	100.0%
		% Тотал	62.6%	37.4%	100.0%

Табл. 6 – Статистически анализ на групите в изследването, разпределение по полов признак като абсолютен брой и в процентно отношение

Потърси се зависимост между пола и стойностите на азотния окис. Подобна полова зависимост на стойностите на азотния окис не се установи (табл. 6 и 7).

#### Определящи параметри

q13 FeNO ppb

	Брой пациенти	Средно отклонение	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	95% доверителен интервал за средна величина		Минимум	Максимум
					Долна граница	Горна граница		
.00 м	107	28.0374	31.04377	3.00111	22.0874	33.9874	4.00	204.00
1.00 ж	64	24.8438	24.88017	3.11002	18.6289	31.0586	4.00	143.00
Total	171	26.8421	28.85672	2.20673	22.4860	31.1982	4.00	204.00

#### ANOVA

q13 FeNO ppb

	Сума от квадрати	Разлика	Среден квадрат	F	Sig.
Стандартно отклонение	408.449	1	408.449	.489	.485
Вътрегрупово	141152.3	169	835.221		
ОБЩО	141560.7	170			

Табл. 7 – Зависимост между стойностите на азотния окис и пола

## 2. Разпределение по възраст

Всички пациенти с астма и децата в контролните групи са разпределени по възраст. За групата на болните деца с бронхиална астма разпределението е в следните 4 групи:

- 5-8 г – 32.9% от астматиците
- 9-12 г – 42% от астматиците
- 13-16 г – 21%
- > 17 г – 4.2%.

Включените участници са на възраст от 5 до 29 години. Възрастовите групи се обособиха с цел да се направи анализ на зависимостта между възрастта и издишания азотен окис и/или други показатели в съответните възрастови интервали в групата на астматиците.

### Статистика

Възраст (год.)		
Брой пациенти	Липсващи стойности	171 0
Средни стойности		10.5146
Стандартна грешка на средните стойности		.29703
Медиана		10.0000
Мода		6.00
Стандартно отклонение		3.88414
Минимум		5.00
Максимум		29.00

Табл. 8 – Средна възраст за общата извадка в изследването

Средната възраст за общата извадка на изследването е **10.51** години. На следващата таблица е показано възрастовото разпределение на включените пациенти.

### Възраст (год.)

	Четота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност 5.00	8	4.7	4.7	4.7
6.00	21	12.3	12.3	17.0
7.00	16	9.4	9.4	26.3
8.00	14	8.2	8.2	34.5
9.00	15	8.8	8.8	43.3
10.00	15	8.8	8.8	52.0
11.00	19	11.1	11.1	63.2
12.00	19	11.1	11.1	74.3
13.00	11	6.4	6.4	80.7
14.00	6	3.5	3.5	84.2
15.00	9	5.3	5.3	89.5
16.00	8	4.7	4.7	94.2
17.00	4	2.3	2.3	96.5
18.00	2	1.2	1.2	97.7
19.00	1	.6	.6	98.2
21.00	1	.6	.6	98.8
23.00	1	.6	.6	99.4
29.00	1	.6	.6	100.0
Total	171	100.0	100.0	

Табл. 9 – Възрастово разпределение на включените пациенти

На фиг. 8 е представено графично разпределението по възрастови групи. Най-голям брой пациенти има в групата **9-12** години (42%), следва 5-8 години (32.9%), 13-16 години (21%), над 17 години (4.2%).



Фиг. 8 – Графично разпределение на астматиците по възраст

На табл. 10 са представени данните за средните стойности и стандартните отклонения на издишания азотен окис според възрастта. Установи се нарастване на средните стойности на FeNO с възрастта: от **19.72 ppb** за групата 5-8 г. на **27.93 ppb** за групата 9-12 г., **40.46 ppb** за групата 13-16 г., и **94.16 ppb** за пациентите над 17 г.

Определящи параметри

q13 FeNO ppb

	Брой пациенти	Средно отклонение	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	95% доверителен интервал за средна величина		Минимум	Максимум
					Долна граница	Горна граница		
1.00 5-8 г.	47	19.7234	11.69486	1.70587	16.2897	23.1571	5.00	51.00
2.00 9-12 г.	60	27.9333	23.73003	3.06353	21.8032	34.0634	4.00	143.00
3.00 13-16 г.	30	40.4667	33.25319	6.07117	28.0497	52.8836	4.00	125.00
4.00 17+ г.	6	94.1667	69.19947	28.25057	21.5463	166.7871	29.00	204.00
Тотал	143	30.6434	30.10274	2.51732	25.6671	35.6196	4.00	204.00

Таб. 10 – Статистическо разпределение на възрастовите групи с брой пациенти и средни стойности на азотния окис

По-нататъшният анализ на резултатите по Tamhane установи статистически значима разлика в нивата на FeNO между първа група (5-8 г.) и трета група по възраст (13-16 г.). Подобни резултати получават и други автори при деца с астма [3].

Общите данни показват генерално нарастване на стойностите на FeNO с възрастта. Тестваната хипотеза за връзката между възрастта и FeNO се потвърждава.

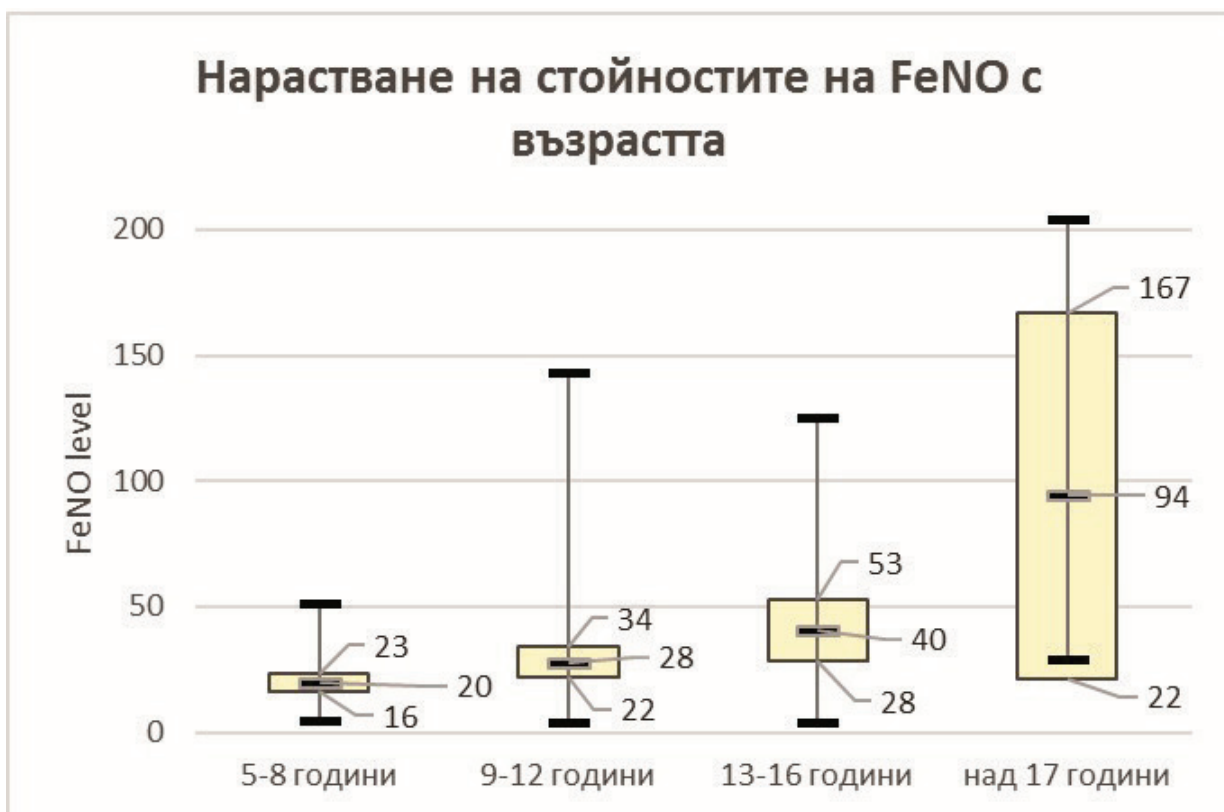
### Определящи параметри

		Възраст (год.)	q13 FeNO ppb
Възраст (год.)	Корелация на Пиърсън	1	.443**
	Sig. (2-tailed)		.000
	Брой пациенти	143	143
q13 FeNO ppb	Корелация на Пиърсън	.443**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	Брой пациенти	143	143

\*\* Корелацията е значима при 0.01 (2-tailed)

*Табл. 11 – Корелационен анализ за връзката между възрастта в години и стойностите на азотния окис в ppb*

Чрез проведения корелационен анализ се установява умерена по сила корелационна зависимост с корелационен коефициент  $r = 0.443$ .



Фиг. 9 – Нарастване на азотния окис с възрастта

### 3. Зависимост на FeNO с ръста, теглото на пациентите и с индекса на телесна маса (ИТМ, BMI)

Интерес представлява проследяването на връзката между издишания азотен окис и антропометричните показатели – ръст, тегло, ИТМ (BMI).

На табл. 12 са представени резултатите от корелационния анализ за установяване на зависимост между изследваните антропометрични данни и стойностите на азотния окис.

Установи се умерена по сила корелационна зависимост между ръста, теглото и азотния окис, съответно  $r=0.44$  за ръста и  $r=0.36$  за теглото. По отношение на ИТМ се установи слаба корелационна зависимост с азотния окис:  $r = 0.193$ .

### Определящи параметри

		q13 FeNO ppb	Ръст (см.)	Тегло (кг.)	BMI BMI
q13 FeNO ppb	Корелация на Пирсън	1	.441**	.364**	.193*
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.021
	Брой пациенти	143	143	143	143
Ръст (см.)	Корелация на Пирсън	.441**	1	.904**	.621**
	Sig. (2-tailed)	.000		.000	.000
	Брой пациенти	143	143	143	143
Тегло (кг.)	Корелация на Пирсън	.364**	.904**	1	.873**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		.000
	Брой пациенти	143	143	143	143
BMI BMI	Корелация на Пирсън	.193*	.621**	.873**	1
	Sig. (2-tailed)	.021	.000	.000	
	Брой пациенти	143	143	143	143

\*\* Корелацията е значима при 0.01 (2-tailed)

\* Корелацията е значима при 0.05 (2-tailed)

Таб.12 – Зависимост между антропометричните показатели: ръст, тегло и ИТМ и стойностите на FeNO

#### 4. Наличие на фамилност при пациентите с астма

При **66.4%** от изследваните от нас пациенти с бронхиална астма се установи наличие на фамилна обремененост /при 95 от 143 пациенти/. Следователно – по-голямата част от астматиците имат фамилна обремененост за алергични заболявания /фиг. 10/.



Фиг. 10 – Фамилна обремененост при пациентите с бронхиална астма

Група пациенти \* Фамилна кростабулация

		Фамилност		Тотал
		.00 не	1.00 да	
Група пациенти	1.00 болни	48	95	143
	% Група пациенти	33.6%	66.4%	100.0%
	%Фамилност	63.2%	100.0%	83.6%
	% Тотал	28.1%	55.6%	83.6%
	2.00 контрола здрави	12	0	12
	% Група пациенти	100.0%	.0%	100.0%
	%Фамилност	15.8%	.0%	7.0%
	% Тотал	7.0%	.0%	7.0%
	3.00 контрола болни	16	0	16
	% Група пациенти	100.0%	.0%	100.0%
	%Фамилност	21.1%	.0%	9.4%
	% Тотал	9.4%	.0%	9.4%
Тотал	76	95	171	
% Група пациенти	44.4%	55.6%	100.0%	
%Фамилност	100.0%	100.0%	100.0%	
% Тотал	44.4%	55.6%	100.0%	

Табл.13 – Статистическо разпределение по критерий за фамилна обремененост по групи пациенти

Потърси се зависимост между наличието на фамилност за бронхиална астма и стойностите на FeNO. Чрез провеждане на статистически анализ чрез теста ANOVA подобна връзка не се установи.

**ANOVA**

q13 FeNO ppb

	Сума от квадрати	Разлика	Среден квадрат	F	Sig.
Между групите	431.645	1	431.645	.517	.473
В групите	141129.1	169	835.083		
Тотал	141560.7	170			

Табл. 14 – Корелационен анализ за установяване на зависимост между фамилната обремененост и стойностите на FeNO

## 5. Наличие на собствен атопичен терен

В групата на астматиците, при 91 деца /**63.6%**/ се установи наличие на атопичен терен /фиг. 11/.



Фиг. 11 – Разпределение на астматиците по критерий атопия

Наличието на атопичен терен обуславя по-високи стойности на издишан азотен окис (табл. 15).

Определящи параметри

q13 FeNO ppb

	Брой пациенти	Средно отклонение	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	95% доверителен интервал за средна величина		Минимум	Максимум
					Долна граница	Горна граница		
.00 не	78	19.6026	21.66770	2.45338	14.7173	24.4879	4.00	125.00
1.00 да	93	32.9140	32.61990	3.38253	26.1960	39.6320	4.00	204.00
Тотал	171	26.8421	28.85672	2.20673	22.4860	31.1982	4.00	204.00

Табл. 15 – Статистически анализ на стойностите на FeNO според наличието на атопия

На табл. 15 е отразено, че средните стойности на издишания азотен окис при групата на деца – атопици е **32.91 ppb**, докато при тези без атопичен терен – **19.60 ppb**.

## ANOVA

q13 FeNO ppb

	Сума от квадрати	Разлика	Среден квадрат	F	Sig.
Между групите	7516.746	1	7516.746	9.477	.002
В групите	134044.0	169	793.160		
Тотал	141560.7	170			

Чрез теста ANOVA се доказва наличие на достоверна разлика между двете групи деца с астма.

Следователно, нашите резултати показват, че наличието на фамилна обремененост не е свързано с повишени стойности на азотен окис, но атопичният терен корелира с повишени стойности на изследвания показател.

### 6. Давност на бронхиалната астма

Давността на бронхиалната астма се определя като времеви интервал от поставяне на диагнозата „бронхиална астма“ до момента на включване на пациента в изследването. По този показател обособихме три групи пациенти (табл.16 и фиг.12):

- давност до **6 месеца**: 25 деца (17.5% от общата извадка)
- давност **6мес. – 5 години**: 46 деца (32.2% от общата извадка)
- давност **над 5 години**: 72 деца (50.3% от общата извадка)



Фиг. 12 – Разпределение на децата с астма по давност на астмата

В проведеното клинично изследване преобладават децата с по-голяма давност на бронхиалната астма – над 5 годишна давност са 50.3% от децата с астма.

**q2 Давност на БА**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 до 6 мес.	25	17.5	17.5	17.5
1.00 6 мес. - 5 год.	46	32.2	32.2	49.7
2.00 > 5 год.	72	50.3	50.3	100.0
Тотал	143	100.0	100.0	

Табл. 16 – Процентно съотношение на децата с астма по давност на астмата

**7. Разпределение на болните с астма по предходна профилактика**

При хоспитализация на пациентите с астма в Детска клиника, УМБАЛ „Александровска“ поради екзацербация на основното заболяване се установи следното разпределение по използваните медикаменти за контрол:

Групи медикаментии за контрол:

Група 0 – липса на предходно контролиращо лечение

Група 1 – левкотриенови антагонисти (ЛТА)

Група 2 – инхалаторни кортикостероиди (ИКС, ICS)

Група 3 – комбиниран инхалаторен препарат: инхалаторен кортикостероид и дългодействащ бета 2-миметик (ICS + LABA)

Група 4 – левкотриенов анатагонист + инхалаторен кортикостероид (ЛТА+ИКС)

**q2 Давност на БА**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 до 6 мес.	25	17.5	17.5	17.5
1.00 6 мес. - 5 год.	46	32.2	32.2	49.7
2.00 > 5 год.	72	50.3	50.3	100.0
Тотал	143	100.0	100.0	

*Табл. 17 – Статистически анализ на болните с астма по предходно контролиращо лечение*

Преобладават децата без предходно контролиращо лечение: **40.6%** (група 0). Малки са дяловете на група 1 – **11.9%**, и на група 2 – **26.6 %**. Най-малка е група 3 – **2.7%**. От общата извадка група 4 е **14 %**.



*Фиг. 13 – Графично разпределение на болните с астма по предходно контролиращо лечение*

В края на хоспитализацията се направи анализ на промените в контролиращото лечение при изписване на пациентите, който показва нарастване на относителния дял на ЛТА (група 1), намаляване на групата ЛТА+ИКС (група 4), значителен спад в дела на нелекуваните деца.

### q3 Предходна профилактика

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 без	58	40.6	40.6	40.6
1.00 АЛТ	17	11.9	11.9	52.4
2.00 ИКС	38	26.6	26.6	79.0
3.00 Комбиниран препарат	10	7.0	7.0	86.0
4.00 АЛТ+ИКС	20	14.0	14.0	100.0
Тотал	143	100.0	100.0	

*Табл. 18 – Анализ на разпределението на астматиците според препоръчаните медикаменти за контрол на бронхиалната астма след провеждане на изследването и след хоспитализацията*

Изследвани групи	Предходна профилактика		Профилактика		p
	Брой	Валиден процент	Брой	Валиден процент	
Без	58	40.6%	15	10.6%	0.0000
АЛТ	17	11.9%	51	35.9%	0.0000
ИКС	38	26.6%	50	35.2%	0.1453
Комбиниран препарат	10	7.0%	15	10.6%	0.2842
АЛТ+ИКС	20	14.0%	11	7.7%	0.0000

Табл. 19 – Анализ на промените в разпределението по групи медикаменти за контрол преди и след хоспитализация

Промяната за ИКС (група 2) и комбиниран препарат (група 3) не се доказва като статистически значима.

Потърси се зависимост между стойностите на издишания азотен окис и типа на контролиращото лечение. **Най-високи са стойностите на азотния окис в групата на децата получаващи ИКС, но не се наблюдава статистически значима разлика между наблюдаваните групи (табл. 20).**

#### Определящи параметри

q13 FeNO ppb

	Брой пациенти	Среда	Стандартно отклонение	Стандарт на грешка	95% доверителен интервал за средна величина		Минимум	Максимум
					Долна граница	Горна граница		
.00 без	58	25.7414	20.84072	2.73652	20.2616	31.2212	4.00	92.00
1.00 АЛТ	17	25.2941	29.02534	7.03968	10.3707	40.2176	5.00	125.00
2.00 ИКС	38	38.8421	34.40579	5.58136	27.5332	50.1510	4.00	148.00
3.00 Комбиниран препарат	10	27.0000	27.56810	8.71780	7.2790	46.7210	6.00	98.00
4.00 АЛТ+ИКС	20	35.6500	42.75546	9.56041	15.6398	55.6602	5.00	204.00
Тотал	143	30.6434	30.10274	2.51732	25.6671	35.6196	4.00	204.00

#### ANOVA

q13 FeNO ppb

	Сума от квадрати	Разлика	Среден квадрат	F	Sig.
Между групите	5068.558	4	1267.140	1.415	.232
В групите	123608.3	138	895.712		
Тотал	128676.8	142			

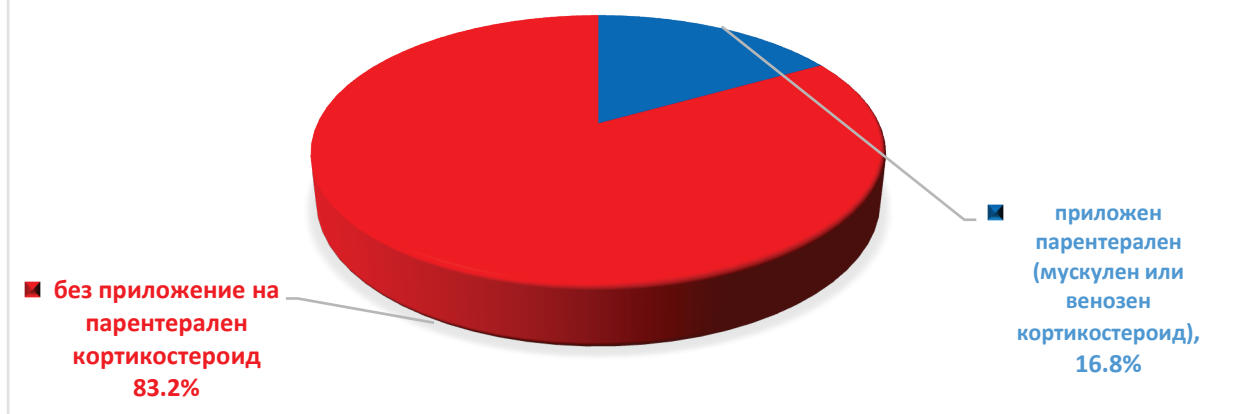
Табл. 20 – Статистически анализ на промените в стойностите на азотния окис и типа медикаментозен контрол на астмата

## 8. Приложение на кортикостероид в рамките на 24 часа от измерването на FeNO

Кортикостероидите инхибират експресията на iNOS в епителноклетъчни култури [45]. Всички начини на приложение на КС – парентерален, орален и инхалаторен, редуцират азотния окис в издишания въздух. Това предопределя ролята му като маркер на възпалението на дихателните пътища и ефекта от контролиращите препарати върху това възпаление. В проучване на В. Юркова и Дж. Роси [17] се установява сигнификатно намаление на стойностите на азотния окис след лечение с инхалаторни КС без съществени промени във функционалните параметри. Това определя предимствата на метода пред ФИД за определяне на тежестта на възпалителния процес. Авторите не установяват ефект от бета-миметиците и доказват дозо-зависим ефект на понижаване на азотния окис от инхалаторните кортикостероиди [131]. Издишаният азотен окис намалява след приложение на орални КС само при астматици, без да се променя при здрави субекти [19].

В нашето изследване при 24 (**16.8%** от астматиците) от 143 деца с астма и хоспитализация по повод на астматичен пристъп, е приложен парентерален (мускулен или венозен кортикостероид) – фиг. 14. При анализ на резултатите се установява, че приложението на кортикостероид значимо понижава нивата на азотния окис. Средните нива на FeNO в групата без приложен КС са **33.05 ppb**, при приложен кортикостероид в рамките на 24 часа преди измерването при 24 деца те са **18.7 ppb**, т.е. значимо по-ниски (табл. 21).

**ПРИЛОЖЕНИЕ НА METHYLPREDNISOLON ( URBASON ) В  
РАМКИТЕ НА 24 ЧАСА ОТ ИЗМЕРВАНЕТО НА FENO**



Фиг. 14 – Разпределение на децата с астма според приложението на КС до 24 часа преди изследването

Определящи параметри

q13 FeNO ppb

	Брой пациенти	Средно отклонение	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	95% доверителен интервал за средна величина		Минимум	Максимум
					Долна граница	Горна граница		
.00 не	119	33.0504	31.48442	2.88617	27.3350	38.7658	4.00	204.00
1.00 да	24	18.7083	18.17662	3.71029	11.0330	26.3836	4.00	92.00
Тотал	143	30.6434	30.10274	2.51732	25.6671	35.6196	4.00	204.00

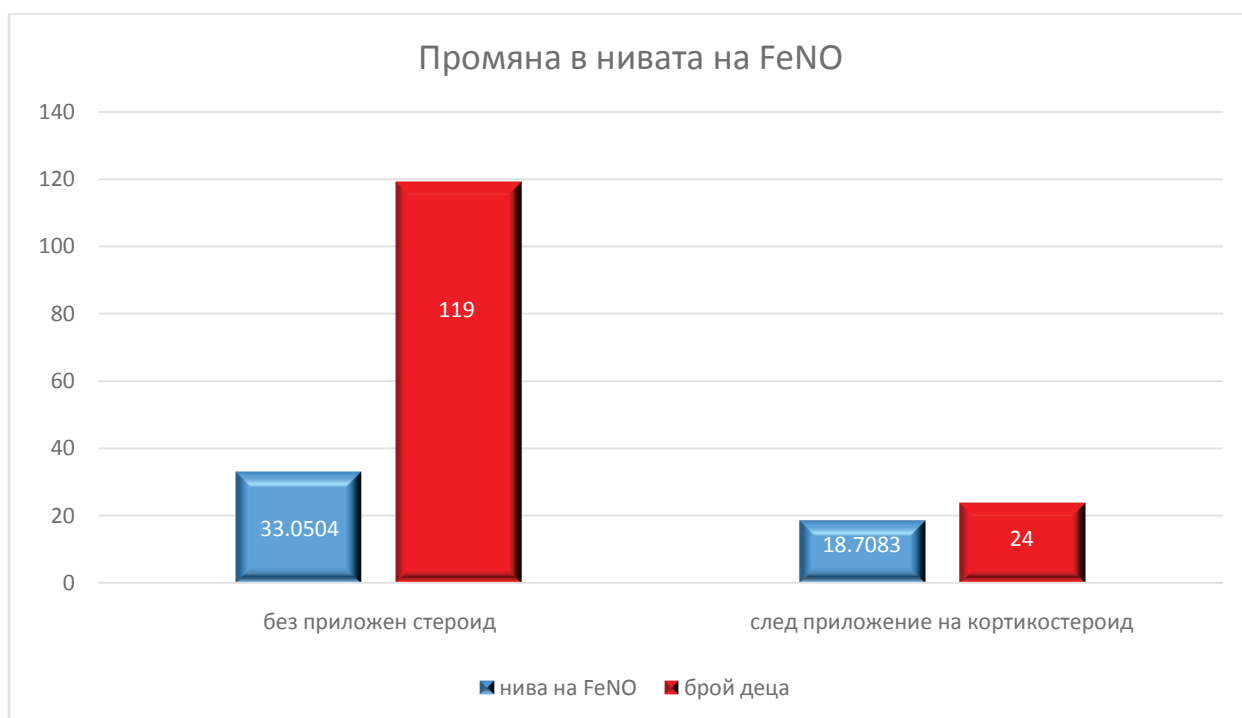
**ANOVA**

q13 FeNO ppb

	Сума от квадрати	Разлика	Среден квадрат	F	Sig.
Между групите	4108.155	1	4108.155	4.650	.033
В групите	124568.7	141	883.466		
Тотал	128676.8	142			

Табл. 21 – Статистически анализ на промените в NO в зависимост от приложението на КС

Посоченият анализ на резултатите показва, че приложението на парентерален КС значимо променя (понижава) нивата на азотния окис, което съответства на литературните данни по този проблем [106,112,73].



*Фиг. 15 – Графичен анализ на промените във FeNO съобразно приложението на КС*

## **9. Разпределение по тежест на пристъпа**

По клинични критерии (диспнея, дихателна и сърдечна честота, белодробна физикална находка) и пулсоксиметрични показатели (сатурация на кислорода при вдишване на атмосферен въздух) се определи тежестта на пристъпа при децата с астма. При **85.3%** от астматиците екзацербацията на астмата се квалифицира като средно-тежка (n=122 деца) с кислородна сатурация 91-94% при вдишване на атмосферен въздух. При **14.7%** от групата на астматиците (n=21) се установи тежък пристъп със сатурация на кислорода под 90%, клинични данни за вентилаторна недостатъчност и експираторна тахидиспнея (табл. 22).

**q5 Физикален статус**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 средно тежък пристъп (SaO2 91-95%)	122	85.3	85.3	85.3
1.00 тежък пристъп (Sao2<90%)	21	14.7	14.7	100.0
Тотал	143	100.0	100.0	

Табл. 22 – Разпределение на болните деца с астма по тежест на пристъпа

Независимо от тежестта на пристъпа не се регистрира проблем в техническото изпълнение на теста за издишан азотен окис. Не се установи статистически значима разлика в средните нива на FeNO в двете групи, т.е. **тежестта на пристъпа не определя различие в средните стойности на FeNO: 30.99 ppb (средно-тежък пристъп) и 28.61 ppb при тежък пристъп (табл. 23).**

Определящи параметри

q13 FeNO ppb

	Брой пациенти	Средно отклонение	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	95% доверителен интервал за средна величина		Минимум	Максимум
					Долна граница	Горна граница		
.00 средно тежък пристъп (SaO2 91-95%)	122	30.9918	31.54807	2.85623	25.3371	36.6465	4.00	204.00
1.00 тежък пристъп (Sao2<90%)	21	28.6190	20.18285	4.40426	19.4319	37.8062	4.00	91.00
Тотал	143	30.6434	30.10274	2.51732	25.6671	35.6196	4.00	204.00

Табл. 23 – Статистическа съпоставка на стойностите на азотен окис в групите пациенти със средно-тежък и тежък пристъп, тест ANOVA за търсене на сигнификатна разлика в последните:

**ANOVA**

q13 FeNO ppb

	Сума от квадрати	Разлика	Среден квадрат	F	Sig.
Между групите	7516.746	1	7516.746	9.477	.002
В групите	134044.0	169	793.160		
Тотал	141560.7	170			

Тестът ANOVA не установява статистически значима разлика.

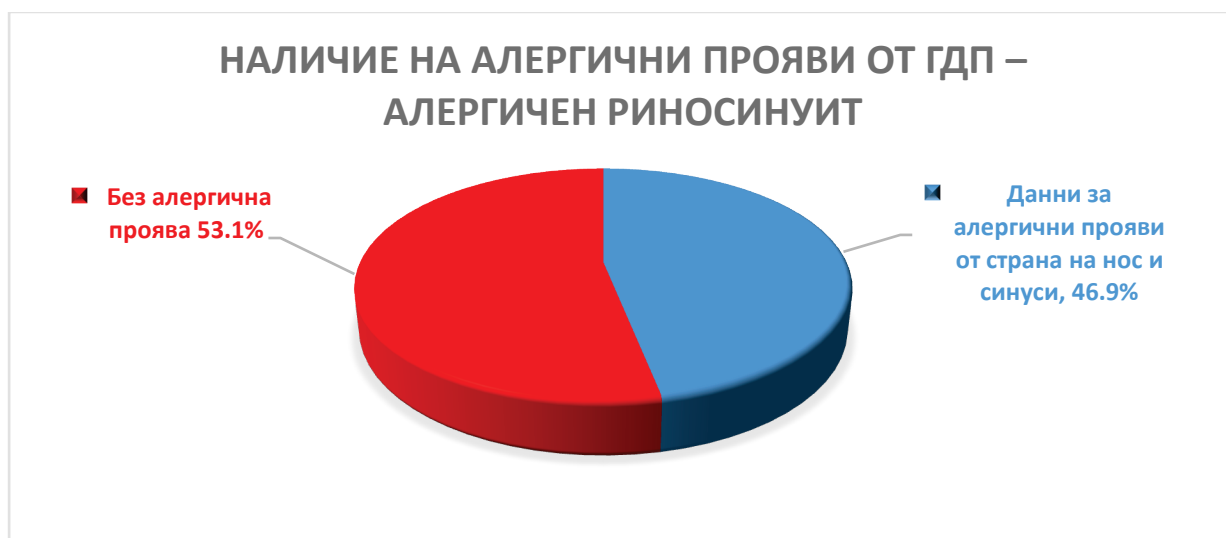
## 10. Наличие на алергични прояви от ГДП – алергичен риносинуит

Концепцията за „единен дихателен път“ постулира съчетано засягане на горните и долни дихателни пътища при децата с астма [12]. При изследваните деца с астма се проведе ото-рино-ларингологична (УНГ) консултация, и по показания – рентгенография на синуси. Данни за интермитиращи или перистиращи симптоми от страна на горните дихателни пътища се установиха при 67 деца по тип на алергичен риносинуит, което представлява **46.9%** от групата на астматиците (табл. 24 и фиг. 16).

**q6 Алергичен риносинуит**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност 00 не	76	53.1	53.1	53.1
1.00 да	67	46.9	46.9	100.0
Тотал	143	100.0	100.0	

Табл. 24 – Разпределение на пациентите с астма според ангажирането на горни дихателни пътища



Фиг. 16 – Графично разпределение на астматиците според наличието на алергичен риносинуит

От получените резултати е видно, че почти  $\frac{1}{2}$  от болните с астма имат засягане на горните дихателни пътища.

## 11. Изследване на кръвната еозинофилия при децата с астма и нейната зависимост със стойностите на FeNO

За първи път през 1876 г. Paul Ehrlich описва еозинофилните левкоцити и установява високият им афинитет към еозин, откъдето идва името им. Докато в периферната кръв нормалният еозинофилен брой е 1-4% (до 400-450 кл/куб.мм), в тъканите нараства от 100 до 300 пъти, което дава основание да се приеме, че еозинофилът е повече тъканна клетка [20,21]. Еозинофилите са гранулоцити, произхождащи от CD 34 + миелоиден прекурсор с относително кратък живот в костния мозък – 3-6 дни, 6-12 часа в циркулацията и 2-5 дни в съединителната тъкан [1]. През последните десетилетия широко се възприе ключовата роля на еозинофилите в патогенезата на бронхиалната астма, което дава отражение и в описанието на астмата като „хроничен еозинофилен десквамативен бронхит“ [92].

Кръвната еозинофилия се определи чрез натривка, оцветяване с хематоксилин-еозин и последващо цитологично диференциране на препарата със светлинен микроскоп. Кръвната еозинофилия е неспецифичен маркер на алергично възпаление. В групата на децата с бронхиална астма средната стойност на кръвните еозинофили е **3.52%**, като се установи голяма вариабилност на този показател (стандартно отклонение 3.89) – табл. 25.

Дискриптивна статистика

	Брой пациенти	Минимум	Максимум	Средни стойности	Стандартно отклонение
q7 Кръвна еозинофилия в %	143	.00	20.00	3.5175	3.89267
кръвна еозинофилия – брой пациенти	143				

Табл. 25 – Средна стойност на кръвните еозинофили за децата с астма

Прилагането на корелационен анализ за изследване на наличието на връзка между кръвната еозинофилия и FeNO показва наличие на такава. Установената зависимост е положителна и умерена по сила с корелационен

коэффициент на Pearson  $r=0.277$ , т.е. можем да твърдим, че при **нарастване на еозинофилията в кръвта се повишават и стойностите на FeNO** (табл. 26). Установената зависимост между двата показателя е важна, тъй като двата показателя са свързани с алергичното възпаление на дихателните пътища. Подобни резултати посочват и други автори [3].

		q13 FeNO ppb	q7 Кръвна еозинофилия в %
q13 FeNO ppb	Корелация по Пирсън Sig. (2-tailed)	1	.277**
	Брой пациенти	143	143
q7 Кръвна еозинофилия в %	Корелация по Пирсън Sig. (2-tailed)	.277**	1
	Брой пациенти	143	143

\*\* Корелацията е значима при 0.01 (2-tailed)

Табл. 26 – Статистическа зависимост между кръвните еозинофили и стойностите на издишан азотен окис

## 12. Изследване на еозинофилите в храчка или назален секрет и тяхната зависимост със стойностите на FeNO

При децата с бронхиална астма се изследва назален секрет за еозинофили, получен чрез натривка от средния носен ход, последващо оцветяване с хематоксилин-еозин и микроскопиране със светлинен микроскоп. При тези, които отделиха спонтанно храчка се направи цитологичен анализ на храчка за еозинофили.

Болшинството деца не успяха да отделят храчка, поради което се изследва назален секрет за еозинофили.

Средната стойност на назалните еозинофили е **4.26%** с индекс на стандартно отклонение 3.49%. Потърси се **зависимост между назалната**

**еозинофилия и издишания азотен окис.** Корелационният анализ показва **наличие на положителна и умерена по сила корелационна връзка** между изследваните променливи с коефициент  $r=0.441$  (табл. 27).

Корелации

			q8 Назална еозинофилия в %, еозинофили в храчка	q13 FeNO ppb
Коефициент на Спиърман	q8 Назална еозинофилия в %, еозинофили в храчка	Коефициент на корелация Sig. (2-tailed)	1.000	.441**
		Брой пациенти	124	124
	q13 FeNO ppb	Коефициент на корелация Sig. (2-tailed)	.441**	1.000
		Брой пациенти	124	124

\*\* Корелацията е значима при 0.01 (2-tailed)

Табл. 27 – Статистическа зависимост между назалната еозинофилия и стойностите на FeNO

Подобна зависимост **не** се установи при изследване на еозинофилите в храчка, вероятно поради малкия брой пациенти в тази група (19 бр.) и относително високото разсейване на стойностите.

Корелации

			q8 Назална еозинофилия в %, еозинофили в храчка	q13 FeNO ppb
Коефициент на Спиърман	q8 Назална еозинофилия в %, еозинофили в храчка	Коефициент на корелация Sig. (2-tailed)	1.000	.409
		Брой пациенти	19	19
	q13 FeNO ppb	Коефициент на корелация Sig. (2-tailed)	.409	1.000
		Брой пациенти	19	19

Табл. 28 – Статистическа зависимост между еозинофилията в храчка и стойностите на FeNO

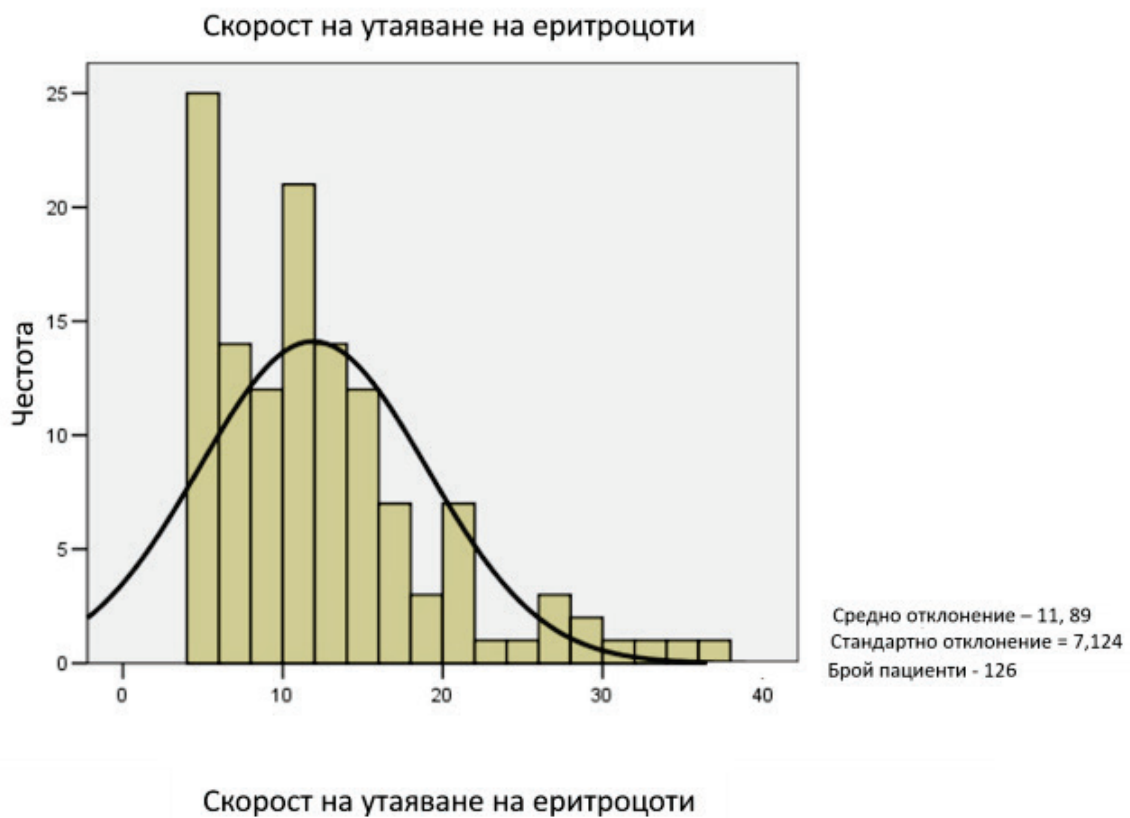
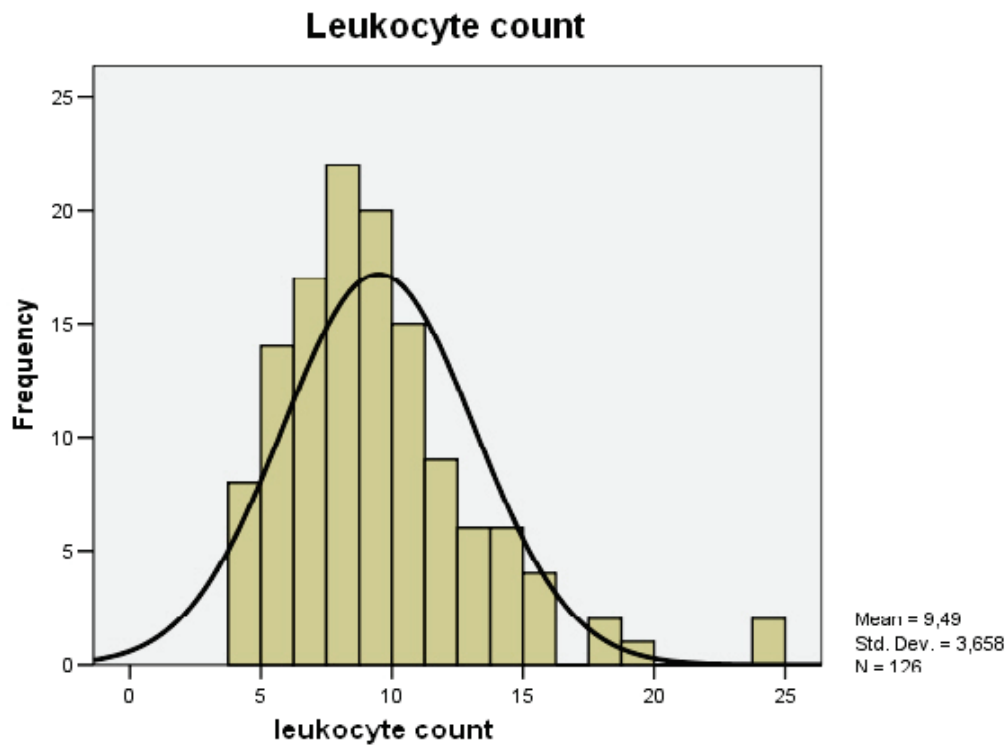
При децата с астма се изследваха лабораторни показатели: пълна кръвна картина (ПКК) с левкоцитен брой, скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ) и С-реактивен протеин (CRP). При всички деца, включени в изследването С-реактивния протеин е в нормални граници. Средният левкоцитен брой е  $9.22 \times 10^9$ , средната СУЕ е 11.89 мм (по Panchenko). Лабораторните показатели са в норма.

Определящи статистически параметри

	N	Минимум	Максимум	Средни стойности	Стандартно отклонение
q9 Общ левкоцитен брой	143	4.10	24.40	9.2231	3.55975
кръвна еозинофилия - брой пациенти	143				

Табл. 29 – Средна стойност на левкоцитите от ПКК на децата с астма

Разпределението на левкоцитния брой и СУЕ има следния вид в хистограмите по-долу:



Фиг. 17 – Графично разпределение в хистограми на левкоцитен брой и СУЕ

### 13. Общи IgE и FeNO

Повече от един век е минал от първото предположение, че разтворими фактори в плазмата или серума могат да бъдат отговорни за изявата на алергично възпаление и в частност астма, и над 30 години от идентифицирането на IgE като ключов медиатор в тип I алергични реакции. Производството на IgE започва от 11 г.с. и достига своя максимум между 6-та и 16-та година от живота [38]. IgE е с много кратък полуживот и концентрация в циркулацията, много по-ниска от тази на другите имуноглобулини, но с висока биологична активност [88]. Функцията на IgE е добре известна – взаимодействие на алергена с две съседни молекули IgE, свързани чрез FcRI с мембраната на мастоцита/базофила, което води до дегранулация на клетката и разгръщане на алергична реакция – незабавно отделяне на хистамин и цитокини [16, 15].

Общият IgE е често използван показател при изследване на алергичните заболявания и бронхиалната астма.

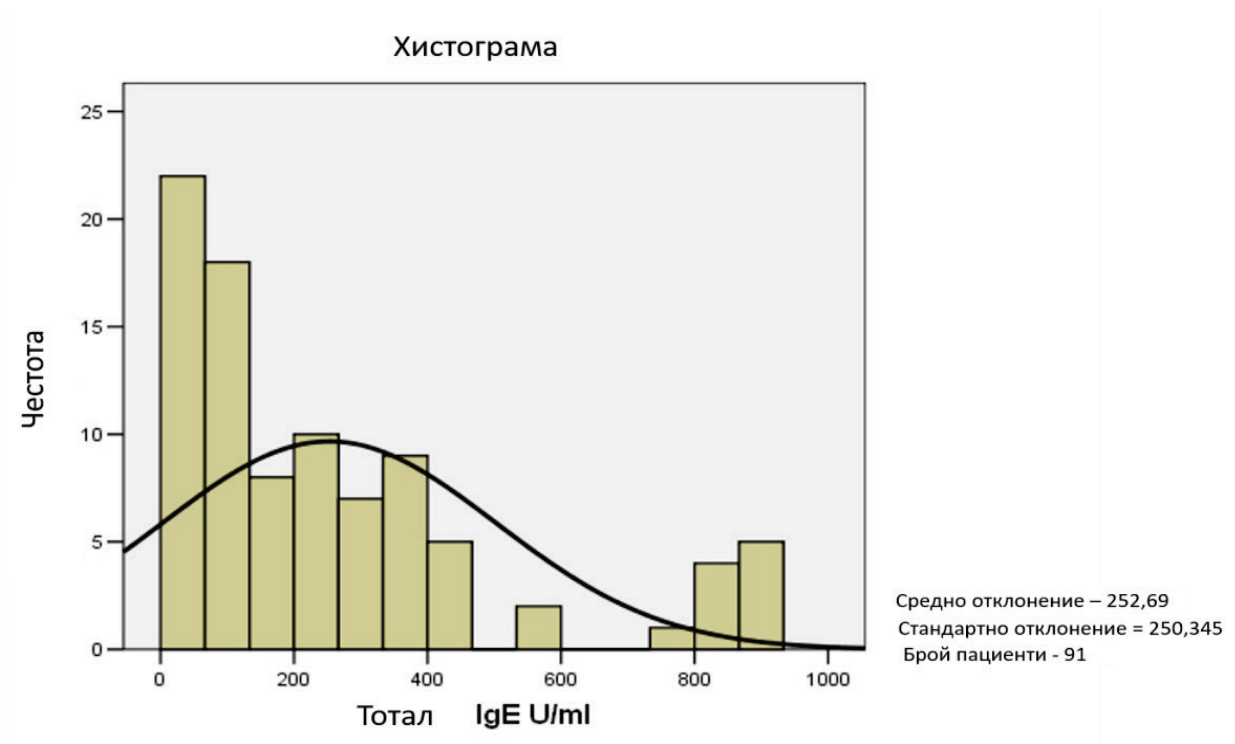
При 91 болни от групата на астматиците бяха изследвани общи IgE (с нормална стойност до 100 IU/ml). При проведеното изследване се установи минимална стойност на IgE 5 IU/ml, максимална стойност – 900 IU/mL, средна стойност **252.69 IU/mL** и голямо стандартно отклонение 250.345 IU/mL.

Дискриптивна статистика

	Брой пациенти	Минимум	Максимум	Средни стойности	Стандартно отклонение
q12 Общи IgE U/ml	91	5.000	900.000	252.69231	250.344549
кръвна еозинофилия - брой пациенти	91				

Табл. 30 – Общи IgE – минимални, максимални и средни стойности

Стойностите показват неправилно разпределение и изместване на кривата на разпределение наляво.



Фиг. 18 – Графично разпределение в хистограма на общите IgE

Не се установи корелационна зависимост между стойностите на общите IgE и тези на FeNO – корелационният коефициент на Pearson е 0.068, което прави статистически незначима корелация, т.е. няма данни за увеличени стойности на азотен окис при астматици с високи общи IgE (табл. 31).

**Корелации**

	q13 FeNO ppb	q12 Общи IgE U/ml
q13 FeNO ppb	1	.068
Корелация по Пирсън		.520
Sig. (2-tailed)		
Брой пациенти	143	91
q12 Общи IgE U/ml	.068	1
Корелация по Пирсън	.520	
Sig. (2-tailed)		
Брой пациенти	91	91

Табл. 31 – Статистическа зависимост между FeNO и общите IgE

От друга страна се установи слабо **нарастване на общите IgE с възрастта**: изчислен е по-скоро слаб корелационен коефициент от 0.23, който е статистически значим и положителен, т.е. с нарастване на възрастта се потвърждава и слабо нарастване на IgE (табл. 32).

Корелации

			Възраст (год.)	q12 Общи IgE U/ml
Коефициент на Спийърман	Възраст (год.)	Коефициент на корелация	1.000	.230*
		Sig. (2-tailed)	.	.028
		Брой пациенти	171	91
	q12 Общи IgE U/ml	Коефициент на корелация	.230*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.028	.
		Брой пациенти	91	91

\* Корелацията е знаима при 0.05 (2-tailed)

Табл. 32 – Нарастване на общите IgE с възрастта

Като маркери на алергичното възпаление на дихателните пътища IgE и кръвните еозинофили се очаква да търпят синергични изменения. Потърси се корелация между двете променливи. При направения анализ корелационната връзка е много слаба и статистически незначима (табл. 33).

Корелации

			q12 Общи IgE U/ml	q7 Кръвна еозинофилия в %
Коефициент на Спийърман	q12 Общи IgE U/ml	Коефициент на корелация	1.000	.091
		Sig. (2-tailed)	.	.392
		Брой пациенти	91	91
	q7 Кръвна еозинофилия в %	Коефициент на корелация	.091	1.000
		Sig. (2-tailed)	.392	.
		Брой пациенти	91	143

Табл. 33 – Корелационна зависимост между общите IgE и кръвните еозинофили

## 14. Проучване на нивата на FeNO

Това е основният показател в представената работа. Целта е да се проучат нивата на FeNO в групата на децата с астма и в двете контролни групи. Получените стойности на азотен окис при астматиците да се проследят в тримесечен период при клинична ремисия.

Определящи параметри

q13 FeNO ppb

	Брой пациенти	Средно отклонение	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	95% доверителен интервал за средна величина		Минимум	Максимум
					Долна граница	Горна граница		
1.00 болни	143	30.6434	30.10274	2.51732	25.6671	35.6196	4.00	204.00
2.00 контрола здрави	12	8.3333	2.70801	.78174	6.6127	10.0539	5.00	13.00
3.00 контрола болни	16	6.7500	3.33667	.83417	4.9720	8.5280	4.00	15.00
Тотал	171	26.8421	28.85672	2.20673	22.4860	31.1982	4.00	204.00

Табл. 34 – Средни стойности и статистическо разпределение на FeNO по групи

При изследваните 171 деца се установяват средни стойности на FeNO от **26.84 ppb**, като при групата деца с астма те са **30.64 ppb**. Стойностите на издишания азотен окис за болните с бронхиална астма са статистически значимо по-високи в сравнение с тези при здравите и болните контролни групи. Подобна разлика не се открива при сравняването на двете контролни групи: **зdravi контроли** средна стойност **8.33 ppb**, болни с муковисцидоза **6.75 ppb**. Не установяваме статистически значими различия между двете контролни групи – здрави контроли и болни с кистична фиброза по отношение на тествания параметър. По литературни данни нивата на издишан азотен окис са значимо по-ниски при деца с муковисцидоза в сравнение със здрави, дори биха могли да се използват като диагностичен тест [46, 77]. Нашите резултати не показаха подобна зависимост (табл. 35 и фиг. 19)

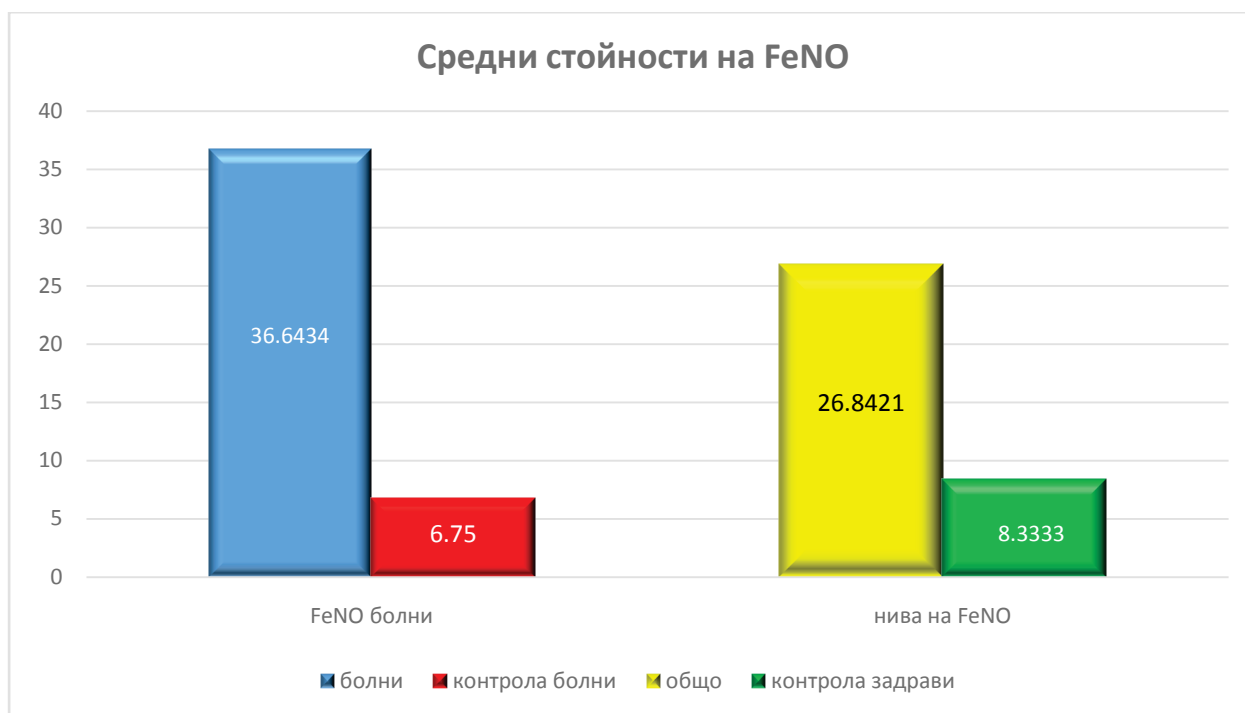
Множествени сравнения

Dependent Variable: q13 FeNO ppb

	(I) Група пациенти	(J) Група пациенти	Средна разлика (I-J)	Стандартна грешка	Sig.	95% доверителен интервал	
						Долна граница	Горна граница
LSD	1.00 болни	2.00 контрола здрави	22.31002*	8.32569	.008	5.8736	38.7465
		3.00 контрола болни	23.89336*	7.30270	.001	9.4765	38.3102
	2.00 контрола здрави	1.00 болни	-22.31002*	8.32569	.008	-38.7465	-5.8736
		3.00 контрола болни	1.58333	10.57892	.881	-19.3014	22.4681
	3.00 контрола болни	1.00 болни	-23.89336*	7.30270	.001	-38.3102	-9.4765
		2.00 контрола здрави	-1.58333	10.57892	.881	-22.4681	19.3014
Tamhane	1.00 болни	2.00 контрола здрави	22.31002*	2.63591	.000	15.9463	28.6738
		3.00 контрола болни	23.89336*	2.65193	.000	17.4930	30.2937
	2.00 контрола здрави	1.00 болни	-22.31002*	2.63591	.000	-28.6738	-15.9463
		3.00 контрола болни	1.58333	1.14322	.444	-1.3352	4.5019
	3.00 контрола болни	1.00 болни	-23.89336*	2.65193	.000	-30.2937	-17.4930
		2.00 контрола здрави	-1.58333	1.14322	.444	-4.5019	1.3352

\* Множественото сравнение е значимо на .05 ниво

Табл. 35 – Статистическа съпоставка на FeNO средни стойности за пациентите с астма и контролните групи

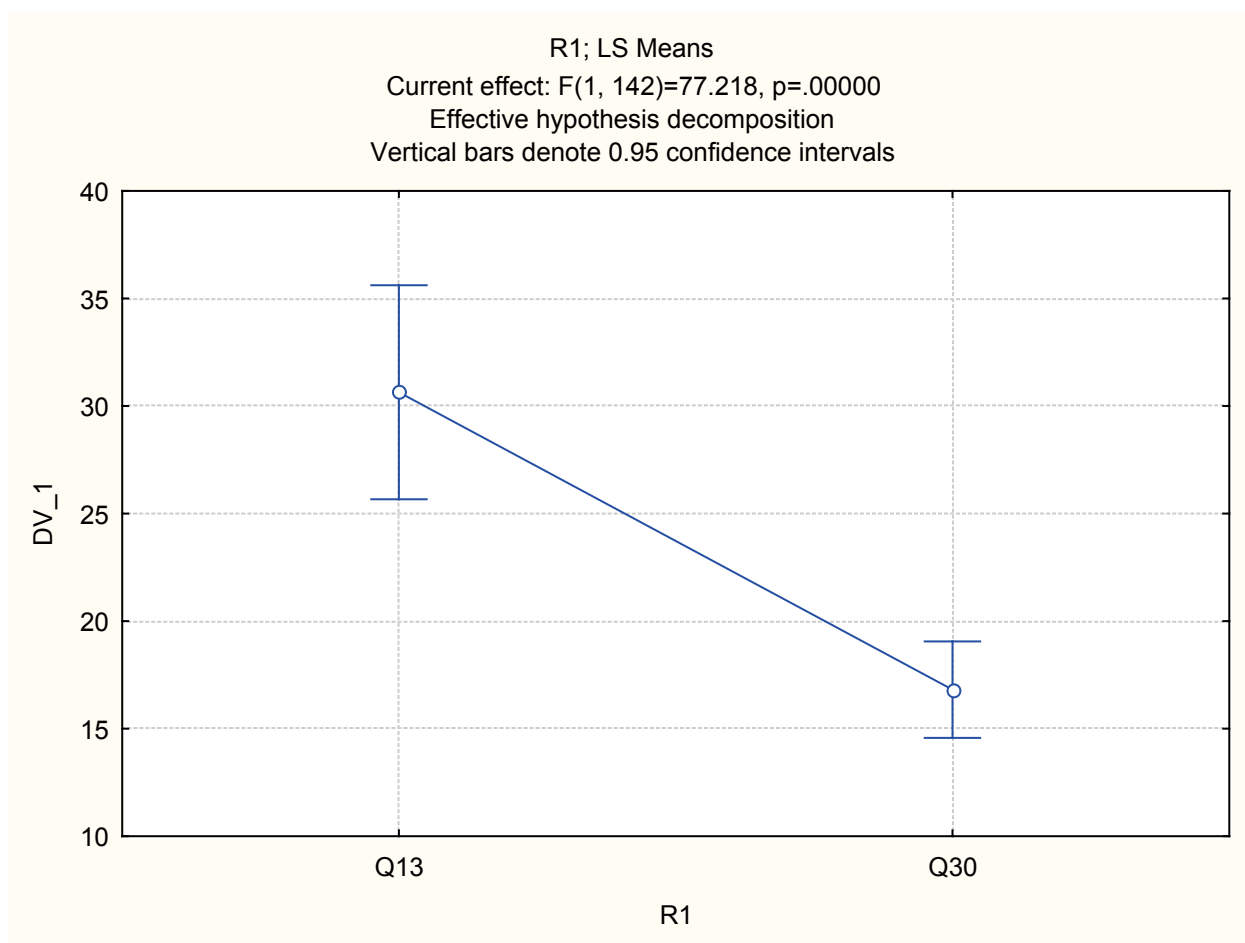


Фиг. 19 – Графично разпределение на средните стойности на FeNO за болни с астма, контролна група с муковисцидоза, контролна група здрави и обща извадка

При анализ на данните за астматиците и тяхното проследяване в тримесечен интервал се установява статистически значимо намаляване на средните стойности на азотния окис. За статистическия анализ е използван Repeated Measure ANOVA тест.

При 143 деца с астма от първоначални средни стойности на азотен окис от **30.64 ppb** се регистрира понижение на **16.82 ppb**, което е статистически значимо намаляване на тествания параметър.

Измерване	Средна аритметична	Стандартна грешка	95% Доверителен интервал		Брой
			Долна граница	Горна граница	
Изходно	30.64	2.52	25.67	35.62	143
Проследяване ( 3 м)	16.82	1.13	14.58	19.06	143
p	0.000				



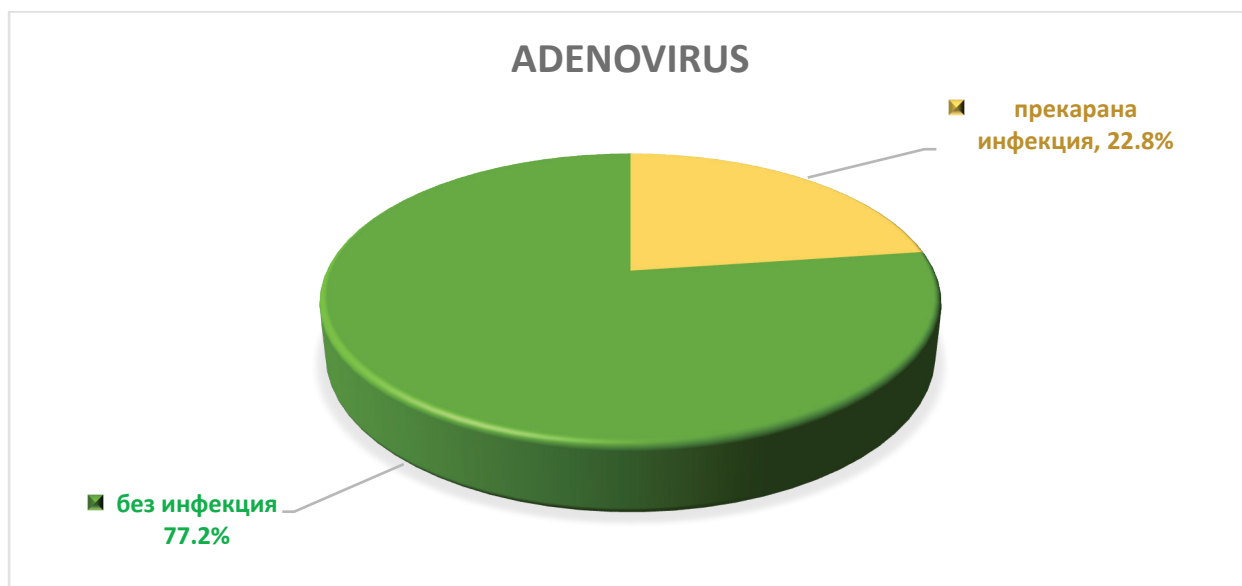
Фиг. 20 – Значимо понижение на средните нива на FeNO за 3 месечния период на проследяване на децата с астма

Нивата на азотен окис за болните от астма деца статистически намаляват за периода на проследяване в клинична ремисия, сравнено с изходните данни.

### 15. Етиология на астматичния пристъп

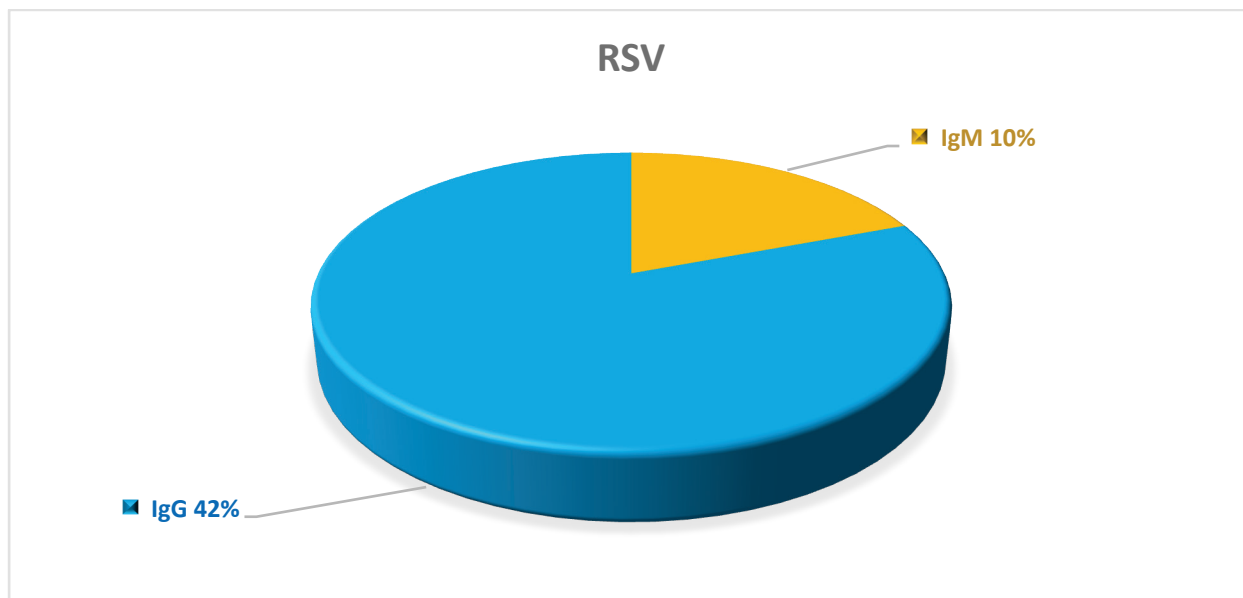
Нашите резултати: при 126 от 143 деца с астма и хоспитализация за астматичен пристъп се проведе серологично изследване за някои респираторни вируси и други патогени по метода ELISA – IgM и IgG антитела. Изследваните патогени са: **RSV, Adenovirus, Influenzavirus, Parafluenzavirus, Chlamidia pneumonia, Mycoplasma pneumonia.**

Получени резултати показват: за аденовиروзи (+) положителни IgG в 22.8% (данни за прекарана инфекция), не се установи остра инфекция с аденовирус, т.е. IgM са в 100% негативни.



Фиг. 21 – Графично изображение на данните за прекарана аденовирусна инфекция

За RSV инфекция се получиха следните данни: остра инфекция в 9.52% от астматиците с положителни (+) IgM, данни за прекарана RSV инфекция с (+) положителни IgG в 42.1%.



Фиг. 22 – Графично изображение на данните за прекарана RSV инфекция

**q14 RSV - IgM**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 не	114	79.7	90.5	90.5
1.00 да	12	8.4	9.5	100.0
Тотал	126	88.1	100.0	
Липсващ в системата	17	11.9		
Тотал	143	100.0		

**q15 RSV - IgG**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 не	73	51.0	57.9	57.9
1.00 да	53	37.1	42.1	100.0
Тотал	126	88.1	100.0	
Липсващ в системата	17	11.9		
Тотал	143	100.0		

Табл. 36 и 37 – Разпределение на случаите с остра и с прекарана RSV инфекция

Не се откриха случаи на остра хламидиална или грипна инфекция.

IgG за *Chlamydia pneumoniae* са положителни в 4%.

**q19 Chl. Pneum - IgG**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 не	121	84.6	96.0	96.0
1.00 да	5	3.5	4.0	100.0
Тотал	126	88.1	100.0	
Липсващи в системата	17	11.9		
Тотал	143	100.0		

Табл. 38 – IgG за *Chlamydia pneumoniae*

За грип (Influenzavirus): положителни IgG в 1.6%, не се установиха положителни IgM.

**q23 Influenzavirus - IgG**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 не	124	86.7	98.4	98.4
1.00 да	2	1.4	1.6	100.0
Тотал	126	88.1	100.0	
Липсващи в системата	17	11.9		
Тотал	143	100.0		

Табл. 39 – IgG за грипен вирус

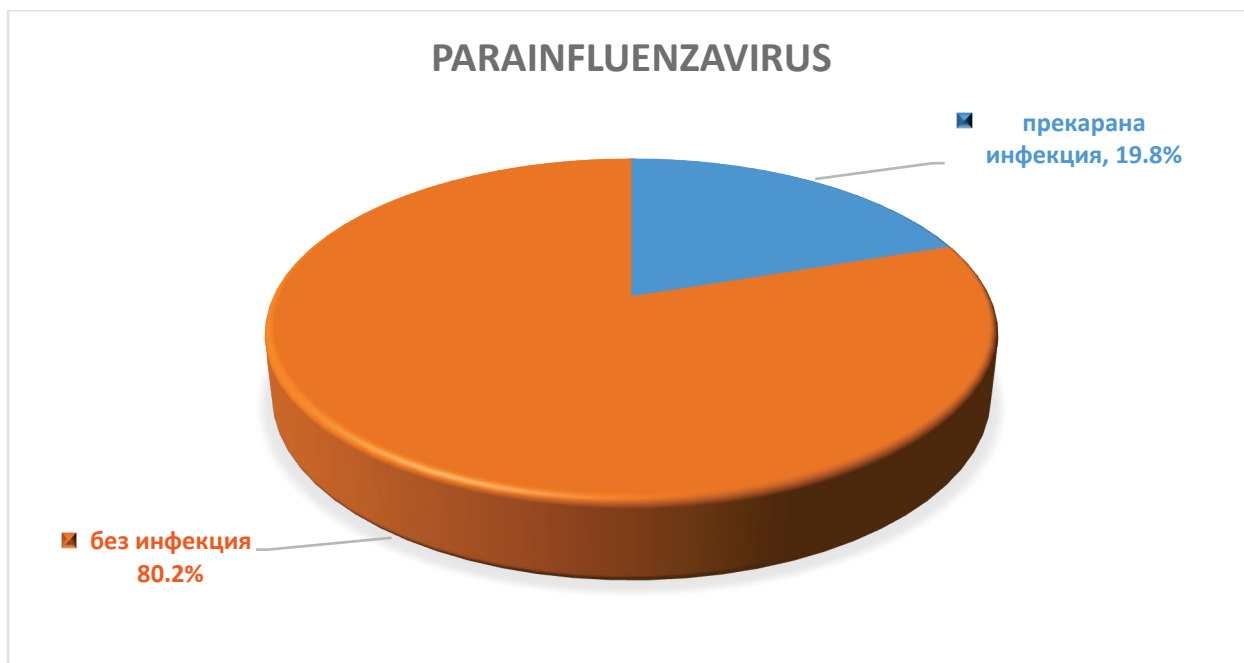
Резултатите за Mycoplasma pneumoniae показаха остра инфекция при 1 дете, което е 0.8% и прекарана такава в 3.2% (положителни IgG).

**q21 M. Pneum - IgG**

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност .00 не	122	85.3	96.8	96.8
1.00 да	4	2.8	3.2	100.0
Тотал	126	88.1	100.0	
Липсващи в системата	17	11.9		
Тотал	143	100.0		

Табл. 40 – IgG за Mycoplasma pneumoniae

При Parainfluenzavirus се откри прекарана инфекция в 19.8%, липса на остри случаи (100% отрицателни IgM антитела).



Фиг. 23 – Графично изображение на данните за прекарана парагрипна инфекция

Следователно водещ етиологичен агент от изследваните серологично микроорганизми е RSV, при който в близо 10% се установиха IgM антитела и в над 42% положителни IgG антитела. Следва като възможен причинител на астматичния пристъп: прекарана Adenovirus-на инфекция в 22.8% и Parainfluenzavirus IgG в 19.8%.

## 16. Зависимост между FeNO и показателите от ФИД: ФЕО1, ВЕД, МСЕД 25-75

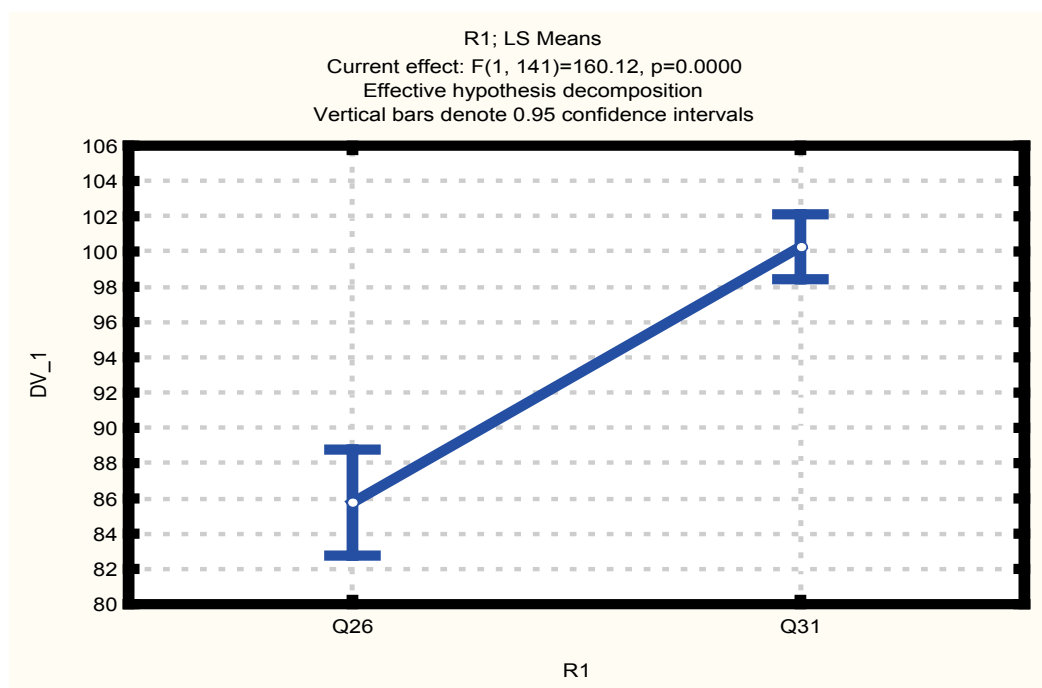
Функционалното изследване на дишането (спирометрия, ФИД) е основен апаратен метод на оценка и проследяване на децата с астма и тяхната белодробна функция. Интерес представлява изследването на зависимост между двата метода – ФИД и FeNO като неинвазивни методики, оценяващи различни аспекти на бронхиалната астма. Спазвайки изискванията на ERS/ATS спирометрията е винаги последваща методика на изследването на FeNO. От ФИД са използвани няколко динамични показатели за оценка на

белодробната функция: ФЕО1, ВЕД, МСЕД 25/75%. При анализ на промените във ФЕО1 се установява значимо нарастване на показателя след лечение.

ФЕО1	Средна аритметична	Стандартна грешка	95% Доверителен интервал		Брой
			Долна граница	Горна граница	
Изходно измерване	85.76	1.52	82.76	88.77	142
Проследяване ( 3 м)	100.27	0.93	98.43	102.11	142
p	0.000				

Табл. 41 – Промени във ФЕО1 при хоспитализация на пациентите с астма и след тримесечно проследяване

При изследване на показателите на функционално изследване на дишането при пациентите с бронхиална астма се определи средната стойност на форсирания експираторен обем за една секунда (ФЕО1) – **85.76%** при хоспитализация (при пристъп) и след 3 месечен период на проследяване – **100.27%**. Статистическата преценка за промяната на този показател е за значимо нарастване в периода на проследяване и изследване в състояние на клинична ремисия на астмата (фиг. 23).



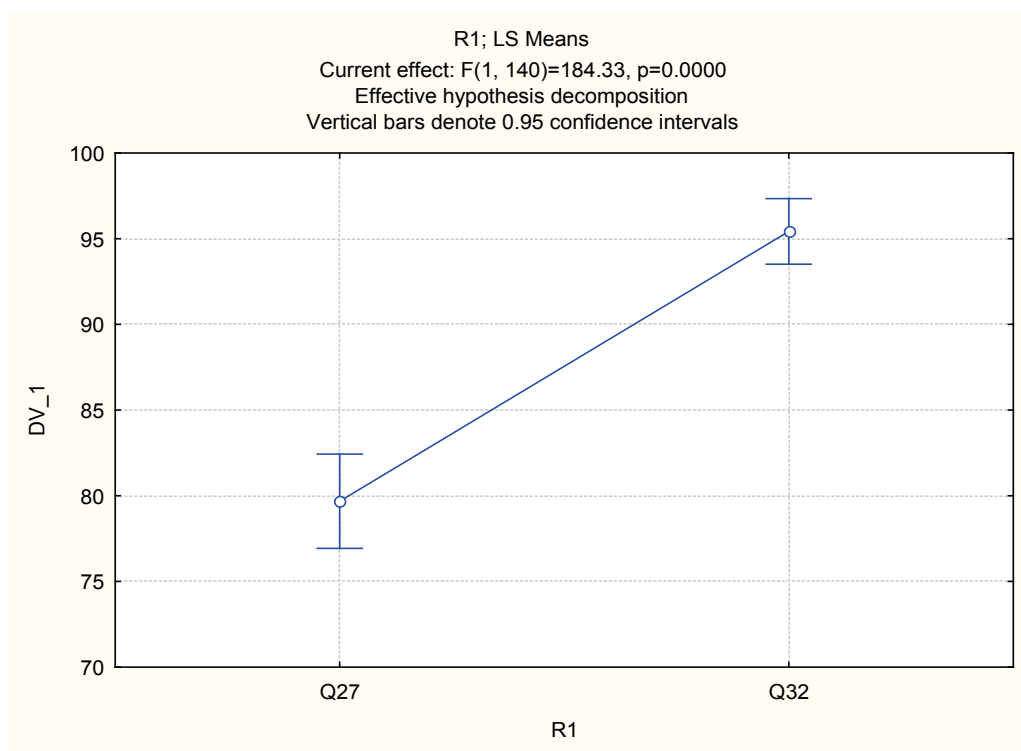
Фиг. 24 – Графично изображение на промените във ФЕО1 при астматици – изходни и след тримесечно проследяване

При анализ на друг показател от ФИД: върхов експираторен дебит (ВЕД) – промените са аналогични (табл. 42):

ВЕД	Средна аритметична	Стандартна грешка	95% Доверителен интервал		Брой
			Долна граница	Горна граница	
Изходно измерване	79.68	1.39	76.93	82.43	141
Проследяване ( 3 м)	95.43	0.97	93.51	97.34	141
p		0.000			

Табл. 42 – Промени във ВЕД при хоспитализация на пациентите с астма и след тримесечно проследяване

Възходяща промяна се установява при проследяване на върховия експираторен обем (ВЕД, PEF), при който също се регистрира нарастване от **79.68%** на **95.43%** за 3 месечен период (фиг. 24).

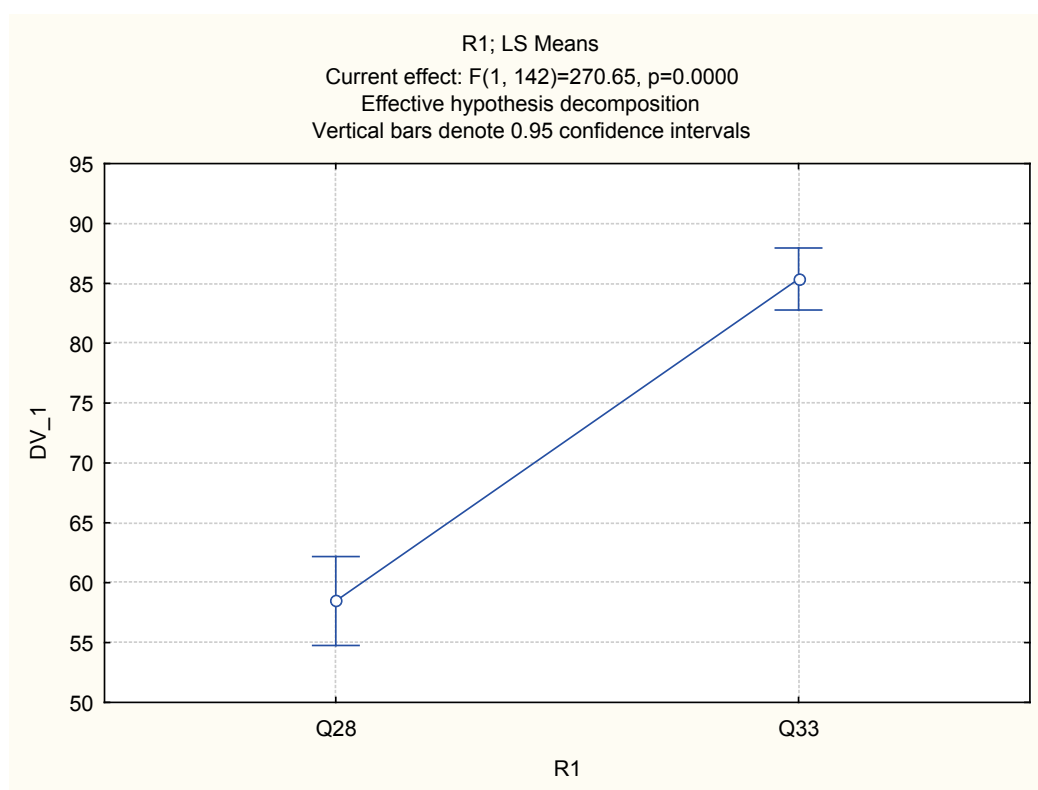


Фиг. 25 – Графично изображение на промените във ВЕД – изходни и след три месеца

Най-значими са промените в периферните показатели на ФИД – нарастването на максималния среден експираторен дебит (МСЕД) МСЕД 25/75% е от **58.46%** на **85.35%** в рамките на 3 месечното проследяване на дихателната функция и клиничното състояние на пациентите с астма (табл. 43 и фиг. 25).

МСЕД 25/75	Средна аритметична	Стандартна грешка	95% Доверителен интервал		Брой
			Долна граница	Горна граница	
Изходно измерване	58.46	1.88	54.74	62.18	143
Проследяване (3 м)	85.35	1.31	82.76	87.94	143
p		0.000			

Табл. 43 – Промени в МСЕД 25/75 – изходни и след 3 месеца



Фиг. 26 – Графично изображение на промените в МСЕД 25/75 за астматици (изходни и след 3 месеца)

Потърси се зависимост между промените в издишания азотен окис и показателите от ФИД – изходни и след проследяване и клинично-функционална ремисия на децата с астма:

Корелации

			Промяна на азотния окис	Промяна на ФЕО1	Промяна на ВЕД	Промяна на МСЕД 25/27
Коефициент на Спирман	Промяна на азотния окис	Коефициент на корелация Sig. (2-tailed)	1.000	-.212*	-.105	-.059
		Брой пациенти	.	.011	.217	.483
	Промяна на ФЕО1	Коефициент на корелация Sig. (2-tailed)	143	1.000	.578**	.694**
Брой пациенти		142	.011	.000	.000	
Промяна на ВЕД	Коефициент на корелация Sig. (2-tailed)	142	142	140	142	
		Брой пациенти	141	140	141	141
	Промяна на МСЕД 25/27	Коефициент на корелация Sig. (2-tailed)	141	140	141	141
Брой пациенти		143	142	141	143	

\* Корелацията е значима на 0.05 ниво

\*\* Корелацията е значима на 0.01 ниво

Табл. 44 – Статистически корелационни зависимости между FeNO и показателите от ФИД

Анализирана е динамиката в стойностите на азотния окис като тя е съпоставена с промените в изследваните величини: ФЕО1, ВЕД и МСЕД 25/75%. Получени са **негативни корелации**, т.е. нарастването на стойностите на динамичните показатели от ФИД е свързано с намаляване на стойностите на издишан азотен окис. Обаче единствено за ФЕО1 тази негативна корелация е значима – което означава, че **увеличаване на ФЕО1 води до значимо намаляване на азотния окис**. За другите два показателя не се потвърждава значима корелационна връзка.

## 17. Зависимост на FeNO от типа на астмоконтролиращото лечение

Децата с бронхиална астма се разпределиха според провеждането на лечение на астмата и типа на използвания медикамент за контрол в следните групи:

- без контролиращо лечение – 58 деца
- с левкотриенов модулатор – 17 деца
- инхалаторен кортикостероид – 38 деца
- комбиниран препарат (ICS+LABA) – 10 деца
- комбинация ЛТА+ИКС – 20 деца

При проследяване на средните величини на FeNO се установяват високи стойности в групата на децата на ИКС и комбинирана терапия – ИКС+ЛТА, съответно **38.8 ppb** и **35.6 ppb**, което не е статистически значима разлика с останалите групи астматици. Следователно, не се установява зависимост между стойностите на азотен окис и типа на медикаментозен контрол на бронхиалната астма (табл. 45 и 46).

Определящи параметри

q13 FeNO ppb	Брой пациенти	Средно отклонение	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	95% доверителен интервал за средна величина		Минимум	Максимум
					Долна граница	Горна граница		
					.00 без	58		
1.00 АЛТ	17	25.2941	29.02534	7.03968	10.3707	40.2176	5.00	125.00
2.00 ИКС	38	38.8421	34.40579	5.58136	27.5332	50.1510	4.00	148.00
3.00 Комбиниран препарат	10	27.0000	27.56810	8.71780	7.2790	46.7210	6.00	98.00
4.00 АЛТ+ИКС	20	35.6500	42.75546	9.56041	15.6398	55.6602	5.00	204.00
Тотал	143	30.6434	30.10274	2.51732	25.6671	35.6196	4.00	204.00

Табл. 45 – Стойности на FeNO при астматици според вида на контролиращия медикамент

Това се потвърждава и от проведените допълнителни статистически тестове – чрез проведения тест ANOVA не се установява значима разлика в средните величини на азотния окис според вида на контролиращия препарат:

### ANOVA

q13 FeNO ppb

	Сума от квадрати	Разлика	Среден квадрат	F	Sig.
Между групите	5068.558	4	1267.140	1.415	.232
В групите	123608.3	138	895.712		
Тотал	128676.8	142			

*Табл. 46 – Статистическа зависимост между FeNO стойностите и вида на контролиращия медикамент за астма*

## V. ОБСЪЖДАНЕ

За последните няколко десетилетия неинвазивните методи за оценка на състоянието и възпалителните процеси в дихателните пътища претърпяха бурно развитие. Те се наложиха като лесни, удобни и безопасни за пациентите с астма методи за диагноза и контрол на заболяването. Изследването на издишания азотен окис е безспорно един от основните наложили се диагностично-терапевтични мониторинг – методи. Самостоятелното му използване крие опасност от погрешни диагностични заключения. Би следвало методиката да се прилага в рамките на комплекс от диагностични подходи към заболяването „бронхиална астма“ заедно с клинични, анамнестични и функционални параметри, свързани с диагнозата и контрола на заболяването.

За едноетапното on-line измерване на FeNO е желателно възрастта на пациентите да бъде над 5 години, за да се осигури активно съдействие при провеждане на изследването. В проведеното популационно изследване не се установиха странични и негативни последствия от техническото изпълнение на метода.

Преобладаването на **мъжкия пол** при астматиците е в съответствие с литературните данни за по-чести бронхообструктивни епизоди и изява на астма при момчета [81]. Рискът от астма при момчетата остава по-висок до 10-годишна възраст, изравнява се с този при момчетата към 15-годишна възраст, а след 15-тата година е по-висок при женския пол [43].

При оценка на ролята на **фамилната обремененост** за астма установихме, че сред астматиците над половината от пациентите са фамилно обременени анамнестично: при 95 от 143 пациенти, което е **66.4%** относителен дял на децата с астма и фамилна обремененост. Това е в подкрепа на данните на редица други изследователи, разглеждащи генетичната предиспозиция към атопия и астма, като главен рисков фактор за изявата на заболяването в детска възраст [41,58,71].

**Собственият атопичен терен** е друг основен рисков фактор за астма. При нашите резултати е налице водеща роля на този фактор в групата на астматиците, като при 91 от общо 143 деца с астма се установява наличие на алергични заболявания (в **63.6%**). От алергичната патология основно място заема алергичния риносинусит. Ние установихме алергични прояви от страна на горните дихателни пътища при 67 деца (**46.9%** от болните с бронхиална астма).

Интересни данни се получиха в групата на астматиците. При анализ на корелационните зависимости между **нивата на FeNO и антропометрични показатели** като: ръст, тегло и ИТМ (BMI). Резултатите показаха значима и положителна зависимост, която е умерена по сила за ръста и теглото (с коефициент на корелация съответно  $r=0.44$  и  $r=0.36$ ) и слаба по сила за ИТМ (корелационен коефициент на Pearson  $r=0.193$ ). Получените резултати съответстват на изводи в литературата, сочещи положителна връзка между издишания азотен окис и стойностите на ръста и теглото [90,31].

В проведеното изследване се направи разпределение на децата по **давност на заболяването „бронхиална астма“**. Давността се определи като интервал между поставяне на диагнозата и провеждане на първото изследване на FeNO. При обособените три групи с най-голям относителен дял – **50.3%**,  $n=72$  се оказа групата с давност на заболяването над 5 години.

Анализът на провежданото **контролиращо лечение** преди и след болничното лечение показва интересни данни. По-голямата част от хоспитализираните пациенти с пристъп на бронхиална астма не са приемали медикаменти за контрол на заболяването преди приема в болница: **40.6%** са нелекувани. От останалите с провеждана терапия основен дял заемат децата, приемащи с ИКС: **26.6%**, следвани от антилевкотриенови антагонисти: **11.9%**. След дехоспитализация децата имат променена последваща терапия на основното заболяване с нарастване на относителния дял на ЛТА група от 11.9% на 35.9%, както и на децата с ИКС от 26.6% на 35.2%. Наблюдава се значително и сигнификатно понижение на дела на нелекуваните деца от

**40.6%** на **10.6%**. Ние не установихме връзка между стойностите на FeNO и типа на провеждана контролираща терапия.

**Общият серумен IgE** се използва като лабораторен маркер за атопия. Нивото на общите IgE сред атопици корелира с размера на таргетния орган. Най-ниски стойности се отчитат при лица с алергичен ринит, най-високи стойности при тези с атопичен дерматит и междинни при астматици [29]. В направеното от нас изследване при 91 болни от групата на астматиците бяха проучени общи IgE (с нормална стойност до 100 IU/mL). Установи се минимална стойност 5 IU/mL, максимална стойност – 900 IU/mL, средна стойност **252.69** IU/mL и голямо стандартно отклонение на изследвания показател: 250.345 IU/mL. Следователно общите IgE са сигнификатно по-високи при пациентите с астма.

Наблюдаваната тенденция за **нарастване на нивото на общия IgE с възрастта** е в съответствие с резултатите и на други автори и е статистически значима: изчислен е по-скоро слаб корелационен коефициент от 0.23, който е статистически значим и положителен. [39, 94]. Според Saarinen UM и сътр. [102] общият серумен IgE е полезен тест с висока специфичност, но ниска сензитивност за отдиференциране на атопици от неатопици – високите нива предполагат атопия, докато ниските са малко информативни. Нормалните стойности на общия IgE през първите години от живота не могат да изключат по-късна клинична манифестация. Освен това, голямото припокриване между IgE нивата при атопици и неатопици намалява клиничната тежест на този показател.

В дисертационния си труд С. Милева и сътр. отчита различие в стойностите на IgE при фамилно необременени и фамилно обременени деца: **повишени стойности на IgE са отчетени при 46% от фамилно обременените за астма деца**, спрямо 22% от фамилно необременените, което отразява ролята на наследствения фактор върху стойностите на общия серумен IgE [6].

От останалите показатели изследвани в дисертационния труд внимание заслужава да се отдели на **периферната (кръвна) еозинофилия**, която се явява неспецифичен маркер на алергично (еозинофилно) възпаление. В групата на децата с бронхиална астма **средната стойност на кръвните еозинофили е 3.52%**, като се установи голяма вариабилност на този показател (стандартно отклонение 3.89). Не се установи статистически значимо завишение на еозинофилите в кръвта при астматици в сравнение със здравите и болните контроли. Следователно показателят е с **ниска специфичност** като маркер на еозинофилно възпаление.

Чрез прилагането на корелационен анализ се установи наличие на **връзка между кръвната еозинофилия и FeNO**. Връзката между двете променливи е положителна и умерена по сила с корелационен коефициент на Pearson  $r=0.277$ , т.е. можем да твърдим, че при **нарастване на еозинофилията в кръвта се повишават и стойностите на FeNO**. Установената зависимост между двата показателя е важна, поради връзката им с алергичното възпаление на дихателните пътища.

С по-голямо значение за **локалното алергично възпаление** е установяването на **еозинофилия в назален секрет или хрчка на астматици**. При децата с астма се изследва назален секрет за еозинофили чрез натривка от среден носен ход и последващо микроскопиране. При тези, които отделиха спонтанно хрчка се проведе цитологично изследване на хрчка (при 19 деца от групата на астматиците). Средната стойност на **назалната еозинофилия е 4.26%**, с индекс на стандартно отклонение 3.49%. Чрез корелационен анализ се установи наличие на **положителна и умерена по сила корелационна връзка** между изследваните променливи – FeNO и назална еозинофилия.

Установи се синергично отклонение на три променливи, свързани с алергичното възпаление на дихателните пътища: **периферна еозинофилия, назална еозинофилия и издишан азотен окис**, което показва наличие на системен и локален алергичен отговор при децата с бронхиална астма.

Подобна зависимост **не** се установи при изследване на еозинофилите в храчка, вероятно поради малкия брой пациенти в тази група (19 бр.) и относително високото разсейване на стойностите на наблюдаваната променлива.

Не се установи зависимост между стойностите на FeNO и на общите IgE, т.е. няма нарастване на стойностите на FeNO при астматици с високи общи IgE (корелационен коефициент 0.068).

Основна цел на представената работа е да се **проучат нивата на издишания азотен окис при деца с астма** при хоспитализацията им при **обостряне** на основното заболяване (пристъп) и в **извън пристъпен период**. Получените резултати се съпоставиха с тези на контролните групи. Контролните групи са две: здрави контроли – при които се очакват нормални стойности на азотния окис, и болни контроли – с кистична фиброза, при които се очаква стойностите на издишания азотен окис да са под нормалните [46].

При изследваните 171 деца се установяват средни стойности на **FeNO от 26.84 ppb**. При групата деца с астма те са **30.64 ppb**, което е приблизително два пъти над нормата (5-15 ppb). Нивата на издишания азотен окис за болните с бронхиална астма са статистически значимо по-високи в сравнение с тези при двете използвани контролни групи (здравите и болните контроли), което се потвърждава и от други автори [24, 110, 32, 47].

Подобна разлика не се открива при сравняването на двете контролни групи: при **здравите контроли средната стойност на азотния окис е 8.33 ppb**, а при **болните с муковисцидоза: 6.75 ppb**. Съпоставянето на двете контролни групи не показва статистически значими разлики в средните величини на тествания параметър, за разлика от литературни данни, които отчитат сигнификатно по-ниски нива на FeNO при болни с муковисцидоза.

При анализ на данните за децата с астма и тяхното проследяване в три месечен период, се установи статистически значимо намаляване на средните

стойности на азотния окис. При 143 деца с астма от първоначални средни стойности на азотен окис от **30.64 ppb** се регистрира понижение до **16.82 ppb**, което е статистически достоверно намаляване на тествания параметър. Получените резултати демонстрират, че стойностите на азотния окис при деца с астма корелират с контрола на заболяването, т.е. липсата на контрол (обостряне на заболяването) води до нарастване на стойностите на FeNO [110].

Приложението на **парентерален кортикостероид** води до сигнификатно понижение на стойностите на азотния окис в рамките на 24 часа от изследването. Ако при децата без приложен стероид средните нива на FeNO са **33.05 ppb**, то в групата пациенти с приложен кортикостероид те са **18.7 ppb**, т.е. значимо по-ниски [ 37].

Групирането на пациентите с астма в пристъп по оценка на **тежестта на пристъпа** – средно-тежък и тежък и изследването на FeNO в двете групи не показва статистически значими разлики в тествания параметър в зависимост от тежестта на пристъпа.

Изследването на стойностите на FeNO в отделните **възрастови групи** показва тенденция за нарастване на стойностите с възрастта. Установи се наличие на умерена по сила корелационна зависимост с корелационен коефициент  $r=0.443$ . Получените резултати са еднопосочни със заключения на други автори по отношение на нарастване на FeNO с възрастта [91].

**Етиологичните аспекти на екзацербацията при децата с астма** от гледна точка на възможна вирусна и микоплазмено – хламидиална етиология според нашите данни имат следната структура: най-честа причина за екзацербацията на астмата е **RSV** инфекция (данни за остра инфекция се установиха при **9.52%** от астматиците с положителни (+) IgM, а данни за прекарана RSV инфекция с (+) положителни IgG при **42.1%**), следвана от прекарана аденовирусна инфекция (в **22.8%** (+) положителни IgG.) и такава,

предизвикана от **Parainfluenzavirus** (прекарана инфекция при **19.8%** от астматиците). Случаите на инфектирани с грип, микоплазма и хламидия пневмония са единични.

Следователно възможен водещ етиологичен агент от изследваните серологично агенти е RSV, при който в близо 10% се установиха IgM антитела и в над 42% положителни IgG антитела. Следва като възможен причинител на астматичния пристъп: прекарана аденовироза в 22.8% и парагрипна инфекция с IgG в 19.8%.

Важно значение сред резултатите намират установените зависимости между FeNO и показателите от ФИД – ФЕО1, ВЕД и МСЕД 25/75. При последните, тримесечното проследяване в клинична ремисия показва тенденция към покачване и нормализиране, най-отчетливо установено като промяна за МСЕД 25/75, който нараства от **58.46%** на **85.35%** в рамките на 3 месеца. Налице е обратна корелационна зависимост (негативна корелация) със стойностите на FeNO, които намаляват при подобрене на показателите от ФИД. Най-отчетлива е тази корелация за ФЕО1.

От всичко изложено в литературния обзор по темата и от представените резултати следва естествено преминаване от научните идеи и разработки към практическото използване на метода.

ATS разработва т.нар. **GRADE** критерии за значимост на метода за изследване на издишания азотен окис. Всяка индикация оценява значимостта му като: „висока“ (H), „умерена“ (M), „ниска“ (L) и „много ниска“ (VL) и препоръчва неговото използване в следните случаи [49]:

- За диагностично уточняване на еозинофилно възпаление на дихателните пътища (H)
- При лица с хронични дихателни симптоми за определяне на стероидната чувствителност (H)
- За диагноза на бронхиална астма в подкрепа на останалите клинични и инструментални методи (M)

- При интерпретация на стойностите да се използват не само референтни стойности, но и т.нар. cut off стойности (L)
- Препоръчва се отчитане на фактора възраст на пациентите. При тези под 12 години за преценка на стойностите на NO (H)
- Стойности на FeNO < 25 ppb при възрастни и < 20 ppb за деца определят малко вероятно еозинофилно възпаление на дихателните пътища и КС чувствителност (M)
- Стойности на FeNO > 50 ppb при възрастни и > 35 ppb при деца с клинична симптоматика показват голяма вероятност за еозинофилно възпаление и КС чувствителност (H)
- Стойности между 25-50 ppb (20-35 ppb деца) се интерпретират с повишено внимание, основно в клиничен контекст (H)
- Препоръка за използване на метода за мониториране на дихателното възпаление при пациенти с астма (H)
- Сигнификатно нарастване на NO да се отчита при нарастване на същия с над 20% при стойности над 50 ppb или с повече от 10 ppb при стойности под 50 ppb между две измервания (L)
- За оценка на значим ефект от антиинфламаторната терапия да се използва редукция на показателя от 20% при стойност над 50 ppb и с повече от 10 ppb при стойност под 50 ppb (L)

Напредъкът в технологиите и стандартизацията направиха метода за измерване на FeNO много удобен и лесен, с възможност за ново измерение към традиционните клинични похвати на оценка и контрол на дихателните заболявания. Създаването на **алгоритми** за интерпретация на стойностите на NO и техните динамични промени е с цел на подобряване на клиничната ефективност на метода.

Важно значение има въпросът за т.нар. **cut off** стойност на FeNO – **стойност на тествания параметър, над която с голяма вероятност може да се твърди, че при пациента се касае за бронхиална астма.**

Данни от проучване на Shaw и сътр. [103] и на Olin и сътр. [91] при проследяване на разпределението на стойностите на FeNO при неселектирана популация от 2,200 мъже и жени установяват параболично разпределение на показателя с изтегляне на параболата надясно, средна стойност от 16.0 ppb, минимална 2.4 ppb и максимална 199 ppb. При cut off point **26 ppb** се установява сигнификантна спутумна еозинофилия над 2%.

В проучване на Chan и сътр. се доказва, че стойностите на FeNO при атопици са по-високи, отколкото при неатопици. Chan и сътр допускат, че наличието на алергичен ринит и тежестта на атопията се отразяват при отчитането на т.нар. cut off стойност на FeNO. В клинично проучване Shaw и сътрудници съобщават за оптимален cut off point за клинично значим FeNO, кореспондиращ с еозинофили от храчка над 2% от 26 ppb. Подобни проучвания, целящи да определят оптимален cut off point за диагноза на бронхиалната астма, използвайки FeNO като показател показват значимост на нива от 20 до 25 ppb. [114, 44, 48].

**Към момента категорично е известно, че е налице припокриване между средните нива на FeNO при здрави хора и при популацията на пациенти със стабилна астма.**

При статистическата обработка чрез метода на т.н. ROC (receiver – operating curve), чиято цел е да се дефинират два показателя: **чувствителност (sensitivity)** – е шансът за коректна класификация на болните (т.е. наистина болен пациент да бъде класифициран на база на FeNO за болен); и **1-специфичност (1-specificity)** – е шансът за грешна класификация на болните (т.е. здрав пациент да бъде класифициран на база на FeNO за болен). Целта е да намерим такива нива на FeNO, за които чувствителността е голяма (над 80%) и 1-специфичността – малка (под 20% например).

Анализът на нашите данни показва следните закономерности (табл. 47):

На табл. 47 според стойностите на азотния окис е направено разпределение на групите пациенти с астма: до 20 ppb, 21-35 ppb и над 35 ppb.

#### FeNO с корекция

	Честота	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Стойност до 20 ppb	65	45.5	45.5	45.5
21-35 ppb	37	25.9	25.9	71.3
36+ ppb	41	28.7	28.7	100.0
Тотал	143	100.0	100.0	

Табл. 47 – Разпределение според стойностите на FeNO в три групи при пациентите с астма: до 20 ppb, 21-35 ppb и над 35 ppb

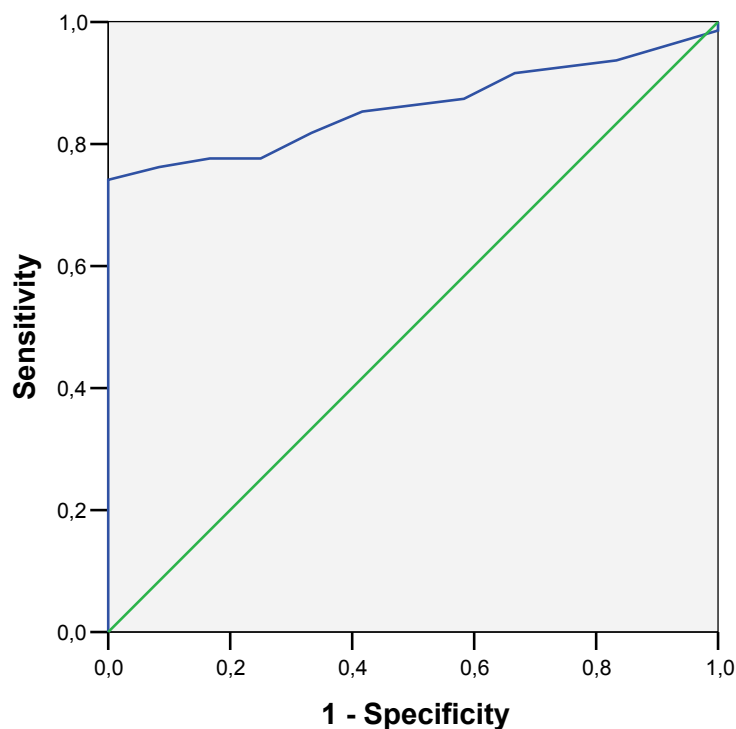
Анализът има за цел да установи такива стойности на FeNO, за които бихме могли да имаме добра класификация на пациентите към групи болни с астма или здрави.

	Брой	Средно отклонение	Медиана	Мода	Макс.	Мин.	Персентил	Персентил	Персентил	Персентил	Стандартна грешка на средно отклонение
Група болни FeNO	143	30.64	22.00	5.00	4.00	4.00	5.00	13.00	37.00	91.80	2.52
Контрола FeNO	12	8.33	8.00	5.00	13.00	5.00	5.00	6.00	10.75		0.78

Табл. 48 – Разпределение на стойностите на азотния окис в групата на децата с астма и здравата контролна група

Ако на случаен принцип се диагностицират пациентите, бихме очаквали около 50% шанс да сме точни. В такъв случай на графиката, която е дадена бихме били на диагоналната зелена линия – под и над нея имаме 50% от цялата площ на графиката.

### ROC Curve



Diagonal segments are produced by ties.

Синята линия дава по-добра представа, защото под нея имаме повече от 50% от площта – в случая 86.1%, което е дадено на таблицата под графиката.

### Площ под кривата

Резултати на променливите от теста: FeNO ppb

Площ	Стандартна грешка <sup>a</sup>	Безсимптомна Sig <sup>b</sup>	95% Безсимптомна доверителен интервал	
			Долна граница	Горна граница
.861	.032	.000	.799	.923

Резултати на променливите от теста: FeNO ppb има поне една взаимовръзка между позитивната и негативната величина при равна или по-голяма стойност. Статистиката може и да е повлияна:

- a. При непараметрични допускания
- b. Нулева хипотеза: истинска площ =0.5

Табл. 48 – Резултати на променливите от теста: FeNO ppb

На табл. 48 са дадени различните нива на чувствителност и 1-специфичност за всяка стойност на FeNO. Като се увеличава прагът за FeNO може да се видят различните нива за диагностична стойност. При ниво FeNO **19.5 ppb** – всички пациенти над тази стойност ще са болни и под нея – здрави. Тук бихме имали 100% коректна класификация на здравите (като здрави) и около 60% коректна класификация на болните.

Нива от около FeNO=12.5 дават 76.2% коректна класификация на болните като болни и около 8.3% грешна класификация на здравите като болни.

## Координати на кривата

Резултати на променливите от теста: FeNO ppb

Положителни, ако са по-големи или равни на	Чувствителност	1-Специфичност
3.0000	1.000	1.000
4.5000	.986	1.000
5.5000	.937	.833
6.5000	.916	.667
7.5000	.874	.583
8.5000	.853	.417
9.5000	.818	.333
10.5000	.776	.250
11.5000	.776	.167
12.5000	.762	.083
13.5000	.741	.000
14.5000	.713	.000
15.5000	.678	.000
16.5000	.643	.000
17.5000	.615	.000
18.5000	.580	.000
19.5000	.559	.000
20.5000	.545	.000
21.5000	.517	.000
22.5000	.469	.000
23.5000	.441	.000
24.5000	.427	.000
25.5000	.413	.000
26.5000	.392	.000
27.5000	.378	.000
28.5000	.371	.000
30.0000	.350	.000
31.5000	.336	.000
32.5000	.322	.000
34.0000	.301	.000
35.5000	.287	.000
36.5000	.273	.000
37.5000	.245	.000
38.5000	.238	.000
40.5000	.217	.000
42.5000	.210	.000
43.5000	.182	.000
45.0000	.168	.000
47.0000	.161	.000
49.0000	.154	.000
50.5000	.147	.000
51.5000	.140	.000
54.0000	.126	.000
57.0000	.112	.000
58.5000	.105	.000
61.0000	.098	.000
66.0000	.084	.000
72.5000	.070	.000
78.0000	.063	.000
85.5000	.056	.000
91.5000	.049	.000
95.0000	.042	.000
111.5000	.035	.000
134.0000	.021	.000
145.5000	.014	.000
176.0000	.007	.000
205.0000	.000	.000

The test result variable(s): FeNO ppb has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

- a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

Таб. 48 – Нива на чувствителност и 1-специфичност за всяко ниво на азотния окис

## Клиничен алгоритъм и практическо приложение на метода:

### Диагностичен аспект при симптоматични пациенти, нетретирани с КС:

	Ниски	Нормални	Средно-високи	Високи
Еозинофилно възпаление	Малко вероятно	Малко вероятно	Налично, но в умерена степен	Значимо (сигнификантно)
FeNO (ppb) Деца <12г.	< 5 ppb	5-20 ppb	20-35 ppb	>35 ppb
Да се мисли за:	Първична цилиарна дискинезия, муковисцидоза, БПД	„Свиркащ“ бронхит, ГЕР, неутрофилна астма, дисфункция на гласните връзки, тревожност /хипервентилация, имунни дефицити, нарушения в ГДП	Интерпретация, базирана на клиничната симптоматика	При комбинация с обективизирана реверзибилна бронхиална обструкция астмата е много вероятно, добър ефект от инхалаторни или орални КС

**Алгоритъм за интерпретация на FeNO стойностите при пациенти, третиращи с противовъзпалителни медикаменти с/без клинична симптоматика:**

	Ниски	Нормални	Средно-високи	Високи
Еозинофилно възпаление	Малко вероятно	Малко вероятно	Налично, но в умерена степен	Значимо (сигнификантно)
FeNO (ppb) Деца <12г.	< 5 ppb	5-20 ppb	20-35 ppb	>35 ppb (или нараствене с повече от 60% от предходното измерване)
Да се мисли за:	ВРD, СF, хронично белодробно заболяване	<b>При симптоматични пациенти</b> – преоценка на диагнозата: ГЕР, „свиркащ“ бронхит, заболявания на ГДП, неутрофилна астма, тревожност/хипервентиляция, имунни дефицити, дисфункция на гласните връзки <b>При асимптомни пациенти</b> – търсене на добър комплайънс с лечението, намаляване на дозата на ИКС или спиране на лечението	<b>При симптоматични пациенти:</b> Неадекватно ИКС лечение (комплайънс или инхалаторна техника) <b>При асимптомни пациенти</b> – без промяна в дозата на ИКС при стабилен пациент	<b>При симптоматични пациенти:</b> Технически приспособления, оптимизиране на дозата, комбинирана терапия <b>При асимптомни пациенти:</b> без промяна в дозата на ИКС при стабилен пациент

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От направения литературен преглед и проучване на деца с бронхиална астма е видно, че няма един диагностичен тест с абсолютна диагностична или предсказваща стойност за заболяването. Водеща е клиничната преценка, проследяването на пациентите във времето, както и комплекс от лабораторни и инструментални методи на диагностика.

В настоящата работа основна цел е да се изследва и оцени една сравнително нова неинвазивна методика, свързана с проучване на стойностите на издишания азотен окис при деца с астма, съобразно тяхното клинично и функционално състояние. Направени са собствени измервания на FeNO при 143 деца с астма, които са съпоставени с две контролни групи. Изследването на издишан азотен окис е метод с безспорни предимства като неинвазивност и информативност и е подходящ, независимо от тежестта на пристъпа. Има отчетлива диагностична стойност при деца с обострена астма с установени сигнификатно повишени стойности при деца с астма в пристъп. Проследяването на децата с астма и на азотния окис показва значимо понижение при овладяване на клиничната симптоматика на тествания показател. Параметърът показва негативна промяна от парентерална КС терапия. Има синергична промяна с периферната и локална (назална) еозинофилия при децата с астма. Стойностите на азотния окис демонстрират нарастване с възрастта, без значими полови различия в нашето изследване. Антропометричните показатели: ръст, тегло и ИТМ имат съществено влияние върху издишания азотен окис, като най-голямо значение има ръста на пациентите с астма. Установи се завишение на общите IgE в настоящата работа при пациентите с астма. Намериха се данни за нарастване на IgE с възрастта. Не се установи зависимост между IgE тотал и промените на стойностите на FeNO.

Направи се оценка на етиологичния спектър на инфекциозно-индуцираните астматични пристъпи със серологични изследвания по ELISA методика, което установи водеща роля на RSV, последван от парагрип и аденовирус за астма-екзацербациите.

## VII. ИЗВОДИ

В резултат на проведеното изследване могат да се направят следните изводи:

1. Стойностите на издишания азотен окис (FeNO) са сигнификатно по-високи при деца с астма, като показват зависимост от клиничната фаза на заболяването (пристъп или извънпристъпен стадий) и провеждането на контролиращо лечение.
2. Азотният окис показва повлияване от възрастта на астматиците, както и от антропометричните показатели ръст, тегло и ИТМ.
3. В наблюдаваните контролни групи, FeNO е достоверно по-нисък. Не се открива значима разлика между здравите контроли и контролната група болни деца с муковисцидоза.
4. Изследването на лабораторни показатели като кръвна еозинофилия и локална (тъканна) еозинофилия – назална и в хрчка, имат своята диагностична стойност. Показателите са с голяма вариабилност, но се наблюдава положителна корелация между FeNO и кръвната, както и назална еозинофилия. Подобна връзка не се установява между FeNO и еозинофилите в хрчка.
5. Установихме завишени общи IgE при децата с астма. Намерихме възходяща възрастова промяна на този показател. Не се установи корелация между FeNO и общите IgE.
6. В етиологията на астматичния пристъп се доказва съществена роля на прекараната RSV инфекция.
7. Провеждането на функционално изследване на дишането е неотменно диагностично изследване с голяма роля за мониториране на лечението и контрол на бронхиалната астма. Търсенето на зависимост с FeNO като неинвазивен маркер показва тяхната разнопосочна промяна – т.е. подобреният контрол на астмата с тенденция за нарастване на тестваните динамични показатели от ФИД – ФЕО 1, ВЕД и МСЕД

25/75 има за следствие понижение на FeNO в периода на проследяване. Най-изразена е тази зависимост за ФЕО1.

8. Методът на изследване на издишан азотен окис има голям бъдещ потенциал, но все още и много неизвестни по отношение на изразената вариабилност на стойностите и на ролята му при диференциране на фенотиповете на бронхиалната астма в детска възраст.
9. Астмата е **клинична диагноза** и няма еднозначен тест за нейното диагностициране и оценка. Интерпретацията на стойностите на FeNO би трябвало да бъде в съчетание с данните от клиничния преглед, образните, лабораторни и инструментални изследвания, а не самостоятелно.

## **Справка на приносите на дисертационния труд:**

### **Приноси с оригинален характер:**

1. Направено е обширно проучване на стойностите на FeNO при деца с астма в България, като децата са проследени и изследвани в динамика съобразно клиничната симптоматика на заболяването.
2. Изследвани са маркери на алергичното възпаление.
3. Изведени са важни корелации на FeNO с апаратни и лабораторни маркери.

### **Приноси с потвърдителен характер:**

1. Потвърждават се повишените нива на FeNO при деца с астма.
2. Потвърждава се понижението на FeNO в резултат от КС лечение.
3. Потвърждават се промените на FeNO (положителната динамика на показателя) с възрастта.
4. Потвърждава се корелацията на FeNO с антропометричните показатели ръст, тегло и ИТМ.
5. Потвърждава се синергичната промяна на FeNO с кръвната и назална еозинофилия.

### **Приноси с приложен характер:**

1. Доказано е мястото на метода на изследване на FeNO като диагностичен маркер при пациенти с бронхиална астма
2. Представя се значението на метода при мониториране на заболяването и медикаментозния контрол.
3. Предложен е практически диагностично-терапевтичен алгоритъм.

**Списък с научните публикации и участие в научни форуми във връзка с дисертационния труд:**

**Публикации:**

1. Периферна и назална еозинофилия при деца с астма и целогодишен алергичен ринит – Р. Маркова, Р. Кабакчиева, П. Переновска – сп. „Практическа педиатрия” – брой 4, година 2005
2. Приложение на издишания азотен окис в педиатричната практика за диагноза и контрол на бронхиалната астма – Р. Маркова, П. Переновска, сп. „Наука пулмология”, брой 1/2008, стр. 24-28
3. Използване на метода за измерване на издишан азотен окис (FeNO) в амбулаторната практика за диагноза и контрол на деца с бронхиална астма – Р. Маркова, М. Янкова, сп. „Практическа педиатрия“, брой 5/2016
4. Exhaled nitric oxide (FeNO) among Bulgarian children with asthma exacerbation – R. Markova, P. Perenovska – Croation Medical Journal 2016 (под печат)

**Участия в научни форуми:**

1. Периферна и назална еозинофилия при деца с астма и целогодишен алергичен ринит – Р. Маркова, Р. Кабакчиева, П. Переновска – постер 19 – X-ти юбилеен конгрес по педиатрия – 02-04.06.2005 г. – гр. София
2. Изследване на издишания азотен окис при деца с бронхиална астма – доклад: Р. Маркова, М. Янкова, П. Переновска, XII-ти Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев бряг 22-24.05.2011 г.

3. Неинвазивни методи за оценка на алергичното възпаление при деца с бронхиална астма – доклад – Р. Маркова: XII-ти Национален педиатричен конгрес с международно участие – 31.05 – 02.06.2012 г., гр. Пловдив
4. Етиологични аспекти на астматичния пристъп при деца над 5 годишна възраст – Р. Маркова, М. Янкова, П. Переновска, Кр. Мекушинов – постер 35 – IV-ти Конгрес на Българското дружество по белодробни болести – 14-17.06.2012 г, гр. София
5. Инхалаторни, имунологични и цитологични маркери на алергичното възпаление при деца с бронхиална астма – Р. Маркова, доклад, XIII-ти конгрес по Педиатрия с международно участие – Несебър, 28-31.05.2015 г.
6. Влияние на антропометричните показатели – ръст, тегло и индекс на телесна маса (ИТМ) върху стойностите на издишания азотен окис (FeNO) при деца с астма – Р. Маркова, М. Янкова, П. Переновска – постер – XIII-ти конгрес по Педиатрия с международно участие – Несебър, 28-31.05.2015 г.

## VIII. ЛИТЕРАТУРА

1. Галева И. Хиперезинофилни състояния: патобиологични механизми. Педиатрия 2006; 46: 9-14
2. Генкова Н., Бошева М. Измерване на азотния оксид в издишания въздух при деца – неинвазивен маркер на възпалението на дихателните пътища, 2015 г, Наука пулмология, кн. 3, стр. 25-30
3. Генкова Н. Роля на нивата на азотния оксид в издишания въздух за диагнозата на някои белодробни заболявания във възрастта 5-18 години – Дисертационен труд – 2016 г – МУ – Пловдив
4. Люцканова Ц., М. Бошева, Н. Генкова. Промени в нивото на IgE у деца с бронхиална астма, Българска медицина, том III, бр. 1–2, стр 28–30. 5
5. Милева Ж., Попов Т., Станева М., ”Честота и характеристика на алергичните болести в България”, Алергия и астма, 2000, прил. 1;3-32.
6. Милева С. Клинико-лабораторни показатели определящи вероятен риск за астма в ранна детска възраст – Дисертационен труд, МУ – София, 2009 г
7. Национален консенсус за диагноза, профилактика и лечение на бронхиалната астма в детска възраст, София, 2003
8. Переновска П. Диференциална диагноза на бронхиалната обструкция в детска възраст. Лекарска практика 2005; 6:3-6
9. Рачева Р. Фамилна обремененост при деца с атопична бронхиална астма. Медицински преглед – Алергология и клинична имунология, XXI, 1998; 2,3-9
10. Стоева Т., Митрова Р., Ганева М., и др. Фракция на издишан азотен оксид (FeNO) при деца под 7 години. Наука „Пулмология“ 1/2011

11. Стоева Т., Митрова Р., Ганева М., и др. Характеристика на респираторните симптоми, фракция на издишан азотен оксид и белодробна функция при деца на седемгодишна възраст, след прекаран бронхиолит, Наука „Пулмология“ 2/2012
12. Улевинов Н., Переновска П., Димов В. Сравнителни цитологични проучвания при деца с риносинуит и бронхиална астма. Педиатрия 2001; 41, 21-23
13. Филчев С. Бронхиална астма при децата. Педиатрия 2004; 44, 15-20
14. Цочева И – Есенната “епидемия“ от екзацербации на астмата при деца – вирус ли е главния заподозрян? – Medical, брой 23, 76-78
15. Цочева И., Райчева Л., Филчев С. Серумен цитокинов профил при деца с остър пристъп на бронхиална астма. Педиатрия 2005; 2,16-18
16. Цочева И., Правчанска – Семкова М., Балева М. Роля на общия серумен имуноглобулин IgE и домашните алергени при деца на 2 години с бронхиална астма. Съвременна медицина 2005; 1:3-8
17. Юрукова В., Роси Дж., Измерване на азотен окис при атопични деца с лека астма. Пневмология и фтизиатрия 36, 2001, N:3, 14-17
18. Юрукова В. Клинико-имунологични аспекти на леката бронхиална астма. Дисертационен труд, София, 2002 г.
19. Юрукова В. Ролята на азотния окис в респираторната патофизиология. Пневмология и фтизиатрия 35, 2000, N:1, 42-46
20. Юрукова В., Роси Д. А. Еозинофили и ЕСР в бронхоалвеоларна лаважна течност при пациенти с лека астма. Пневмология и фтизиатрия, 39, 2004, 1

21. Юрукова В, Роси Д.А. Еозинофилия и сенсбилизация при деца с атопична астма. Пневмология и фтизиатрия, 2000, 3, 32-36
22. Ahanchian H, Jones C, Chen Y-s, Sly P. Respiratory viral infections in children with asthma: do they matter and can we prevent them? BMC Pediatr. 2012; 12:147
23. Alving K, Janson C, Nordvall L. Performance of a new hand – held device for exhaled nitric oxide measurement in adults and children, Respir Res 2006; 7:67
24. Alving K, Weitzberg E, Lundverg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. Eur Respir J 1993; 6:1368-1370
25. Artlich A, Hagenah J, Jonas S, et al. Exhaled nitric oxide in childhood asthma. Eur J Pediatr 1996; 155:698-701
26. Artlich A., Busch T, Lewandowski K, Jonas S et al. Childhood asthma: exhaled nitric oxide in relation to clinical symptoms. Eur Respir J 1999; 13:1396-1401
27. ATS /ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 912-930
28. Avital A, Uwyed K, Berkman N, et al. Exhaled nitric oxide is age – dependent in asthma. Ped Pulmonol J 2003; 36:433-438
29. Baldacci S, Omenaas E, Oryszczyn MP, et al. Allergy markers in respiratory epidemiology. Eur Respir J. 2001 Apr ; 17(4):773-90
30. Baraldi E, Azzolin NM, Cracco A, Zacchello F. Reference values of exhaled nitric oxide in healthy children 6-15 years old. Pediatr Pulmonol 1999; 27:54-58

31. Barros R, Moreira A, Fonseca J, et al. Obesity and airway inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1501-1502
32. Battaglia S, den Hertog H, Timmers MC, et al. Small airways function and molecular markers in exhaled air in mild asthma. *Thorax* 2005; 60:639-644
33. Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, et al. Stomach NO synthesis. *Nature* 1994; 368:502
34. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy*. 1999 Mar; 29(3):342-6
35. Borrill Z, Clough D, Truman N, et al. A comparison of exhaled nitric oxide measurements performed using three different analysers. *Respir Med* 2006; 100:1392-1396
36. Boulet LP, Turcotte H, Brochu A. Persistence of airway obstruction and hyperresponsiveness in subjects with asthma remission. *Chest* 1994; 105:1024-1031
37. Buchvald F, Bisgaard H. Comparisons of the complementary effect on exhaled nitric oxide of salmeterol vs montelukast in asthmatic children taking regular inhaled budesonide. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91:309-313
38. Burney P, Malmberg E, Chinn s, et al. The distribution of total and specific IgE in the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Mar; 99(3):314-22
39. Burr ML, Merrett TG, Dunstan FD, Maguire MJ. The development of allergy in high – risk children. *Clin Exp Allergy*. 1997 Nov; 27(11):1247-53
40. Busse WW. Role and contribution of viral respiratory infections to asthma. *Allergy*. 1993; 48(17 Suppl):57-61

41. Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, et al. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Oct; 162(4 Pt 1):1403-6
42. Culotta E, Koshland DE: NO news is good news,*Science*“ 1992; 258:1862-1865.
43. De Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burney P. Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med*.2000 Jul; 162(1):68-74
44. Deykin A, Massaro AF, Coulston E, Drazen JM, Israel E. Exhaled nitric oxide following repeated spirometry or repeated plethysmography in healthy individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1237-1240
45. Di Rosa R., et al.Glucocorticosteroids inhibit the expression of an inducible but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 1990, (87); 1043-1049
46. Downey D,Elborn JS. Nitric oxide, iNOS, and inflammation in cystic fibrosis. *J Pathol* 2000; 190:115-116
47. Dressel H, de la Motte D, Reichert J,et al. Exhaled nitric oxide: independent effects of atopy, smoking, respiratory tract infection, gender and height. *Respir Med* 2008; 102:962-969
48. Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003; 123:751-756.
49. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC et al. American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of

exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep 1; 184(5):602-15.

50. ERS Handbook Paediatric Respiratory Medicine. Chapter: Exhaled nitric oxide, induced sputum and exhaled breath analysis.

51. Franklin PJ, Taplin R, Stick SM. A community study of exhaled nitric oxide in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:69-73

52. Fritscher LG, Rodrigues MT, Zamel N, et al. The effect of Montelukast on exhaled nitric oxide of alveolar and bronchial origin in inhaled corticosteroid-treated asthma. *Respir Med* 2009; 103:296-300

53. Gabriele C, Pijnenburg MW, Monti F, et al. The effect of spirometry and exercise on exhaled nitric oxide in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16:243-247

54. Genkova N, M. Todorova, B. Marinov et al. Exhaled nitric oxid is associated with pseudomonas aeruginosa infection and peripheral airway obstruction in cystic fibrosis, *J of Cystic Fibrosis*, 2013 (Supp.1), ISSN1569-1993

55. Gerlach H, Rossaint R, Pappert D, et al. Autoinhalation of nitric oxide after endogenous synthesis in nasopharynx. *Lancet* 1994; 343:518-519

56. GINA 2015

57. Global Strategy for Asthma Management and Prevention – 2010

58. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeger RS, et al. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec; 114(6):1282-7

59. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, et al. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7809-7813
60. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, et al. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:852-857
61. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009; 360:973-984
62. Heymann PW, Carper HT. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Aug; 114 (2):239-47
63. Jilma B, Kastner J, Mensik C, et al. Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sci* 1996; 58:469-476
64. Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, et al. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J* 2003; 21:433-438
65. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes M. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:454-457
66. Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1996; 9:196-201
67. Kleinert H, Pautz A, Linker K, et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 2004; 500:255-266

68. Kondo R, Haniuda M, Yamanda T, et al. Effects of respiratory pressure on nitric oxide in exhaled breath. Is exhaled nitric oxide really unaffected by pressure? *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 139:33-40
69. Koopman M, Arets HG, Uiterwaal CS, et al. Comparing 6 and 10 sec exhalation time in exhaled nitric oxide measurements in children. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44:340-344
70. Kotaniemi-Syrjanen A, Reijonen TM, et al. Wheezing requiring hospitalization in early childhood: predictive factors for asthma in a six-year follow-up. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002 Dec; 13(6):418-25
71. Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Holgate ST. Predicting persistent disease among children who wheeze during early life. *Eur Respir J*. 2003 Nov; 22(5):767-71
72. Lannero E, Wickman M, Pershagen G, et al. Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life (BAMSE). *Respir Res*. 2006 Jan 5; 7:3
73. Leuppi JD, Salome CM, Jenkins CR, et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med*; 163:406-412
74. Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, et al. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother counter more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:176-81.
75. Los H, Postmus PE, Boomsma DI. Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin Res* 2001; 4:81-93
76. Lundberg JO, Weitzberg E, Nordavall SL, et al. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J* 1994; 7:1501-1504

77. Lundberg JO, Weitzberg E, Nordvall SL, et al. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J* 1994; 7:1501-1504
78. Malinowschki A. Nitric oxide exchange in central and peripheral airways. Determinants in Health and Respiratory disease. Uppsala, Acta Universitatis Upsaliensis, 2008(PhD thesis)
79. Malmberg LP, Petays T, Haahtela T, et al. Exhaled nitric oxide in healthy nonatopic school-age children: determinants and height-adjusted reference values. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41:635-642
80. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med*. 1995 Jan 19; 332(3):133-8
81. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995 Jan 19; 332(3):133-8
82. Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics* 2002 Feb; 109 (2 Suppl):362-7. Review – done
83. Martinez FD. Heterogeneity of the association between lower respiratory illness in infancy and subsequent asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2(2):157-61. Review
84. Menzel L, Kosterev AA, Curl RF, et al. Spectroscopic detection of biological NO with a quantum cascade laser. *Appl Phys B* 2001; 72:859-863
85. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Portable exhaled nitric oxide measurement: Comparison with the “gold standard” technique. *Chest* 2007; 131:410-414

86. Miller JE. Predictors of asthma in young children: does reporting source affect our conclusions? *Am J Epidemiol.*2001 Aug 1; 154 (3):245-50
87. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and cotrolls. *Cell* 1994; 78”915-918
88. Nutku E, Gounni AS, Olivenstein R, et al. Evidence for expression of eosinophil-associated IL-12 messenger RNA and immunoreactivity in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.*2000 Aug; 106(2):288-92
89. Olin AC, Aldenbratt A, Ekman A, et al.Increased nitric oxide in exhaled air after intake of a nitrate – rich meal. *Respir Med* 2001; 95:153-158
90. Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, et al. Height, age and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest* 2006; 130:1319-1325
91. Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, Lissner L, Bake B, Toren K. Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest* 2006; 130:1319-1325.
92. ousquet J, Chanez P, Lacoste JY, et al. Eosinophilic inflammation in asthma.*N Engl J Med.*1990 Oct 11; 323(15):1033-9
93. Payne DN, Adcock IM, Wilson NM, et al. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1376-1381
94. Petridou E, Kanariou M, Liatsis M, et al. Factors influencing serum immunoglobulin E levels in Greek children.*Allergy.*1995 Mar; 50(3):210-4

95. Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ et al. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax*. 2012 Mar; 67(3):199-208.
96. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, et al. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J* 1999; 13:1386-1390
97. Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, et al. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:831-836
98. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al. Measuring airway inflammation in asthma; eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:539-544
99. Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J* 1998; 11(4):828-34
100. Platts-Mills TA, Vaughan JW, Blumenthal K, et al. Decreased prevalence of asthma among children with high exposure to cat allergen: relevance of the modified Th2 response. *Mediators Inflamm*. 2001 Dec; 10(6):288-91. Review
101. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84:731-765
102. Saarinen UM, Juntunen K, Kajosaari M. Serum immunoglobulin E in atopic and non-atopic children aged 6 months to 5 years. A follow – up study. *Acta Paediatr Scand*. 1982 May; 71(3):489-94

103. Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:231-237.
104. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, et al. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics*. 1995 Apr; 95(4):500-5
105. Silkoff P. History, technical and regulatory aspects of exhaled nitric oxide. *J Breath Res* 2008; 2:037001
106. Silkoff PE, Mc Clean P, Spino M, et al. Dose-response relationship and reproducibility of the fall in exhaled nitric oxide after inhaled beclomethasone dipropionate therapy in asthma patients. *Chest* 2001; 119:1322-1328
107. Silkoff PE, Mc Clean PA, Slutsky AS, et al. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:260-267
108. Silverman M, Wilson N. Wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* 1997; 52:936-937
109. Silvestri M, Spallarossa D, Youroukova Frangova V et al. Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood eosinophilia in atopic children with mild intermittent asthma. *Eur Respir J*; 1999:13, 321-326
110. Sippel JM, Holden WE, Tilles SA, et al. Exhaled nitric oxide levels correlate with measures of disease control in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:645-650

111. Smith AD, Cowan JO, Brasset KP, et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352:2163-2173

112. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:453-459

113. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhale nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:473-478

114. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, Taylor DR. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:473-478.

115. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet*. 1999 Aug 14; 354(9178):541-5

116. Stirling RG, Kharitonov SA, Campbell D, et al. Increase in exhaled nitric oxide levels in patients with difficult asthma and correlation with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Asthma and Allergy Group. Thorax* 1998; 53:1030-4

117. Strachan DP. Family size, infection and atopy:the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax*. 2000 Aug; 55 Suppl 1:S2-10

118. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ*. 1989 Nov 18; 229(6710):1259-60

119. Szeffler SJ, Mitchell H, Sorkness CA, et al. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomized controlled trial. *Lancet* 2008; 372:1065-1072
120. Taylor DR, Mandhane P, Greene JM, et al. Factors affecting exhaled nitric oxide measurements: the effect of sex. *Respir Res* 2007; 8:82
121. Ten Hacken NHT, Meijer RJ, Kerstjens HAM, van der Mark TW, Postma DS. Exhaled nitric oxide in stable asthmatic patients does not relate to parameters of disease severity. *Eur Respir J* 1996; 9: Suppl.23, 416S
122. Travers J, Marsh S, Aldington S, et al. Reference ranges for exhaled nitric oxide derived from a random community survey of adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:238-242
123. Turktas H, Oguzulgen K, Kokturk N, et al. Correlation of exhaled nitric oxide levels and airway inflammation markers in stable asthmatic patients. *J Asthma* 2003; 40:425-430
124. Turner S. Exhaled nitric oxide and the management of childhood asthma – yet another promising biomarker "has been" or a misunderstood gem. *Paediatr Respir Rev*. 2014 Aug 7.
125. Turner SW, Palmer LJ, Rye PJ, et al. Infants with flow limitation at 4 weeks: outcome at 6 and 11 years. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May 1; 165(9):1294-8
126. Van der Valk RJ, Baraldi E, Stern G et al. Daily exhaled nitric oxide measurements and asthma exacerbations in children. *Allergy* 2012 Feb; 67(2):265-71

127. Van der Valk RJ, Caudri D, Savenje O et al. Childhood wheezing phenotypes and FeNO in atopic children at age 8. *Clin Exp Allergy* 2012 Sep; 42(9):1329-36
128. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, et al. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*.2000 Feb; 30(2):187-93
129. Warke TJ, Fitch PS, Brown V, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002; 57:383-387
130. Young S, O’Keeffe PT, et al. The association between early life lung function and wheezing during the first 2 yrs of life. *Eur Respir J*. 2000 Jan; 15(1):151-7
131. Youroukova V, et al. Orally exhaled nitric oxide levels appear to be related to the degree of airway obstruction in untreated childhood asthma – *Am.J.Respir.Crit Care Med*, 1998, (157); No:3, A469
132. Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO, et al. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 1999; 13:327-333