

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

Д-Р ДЕНИЦА ГОШЕВА ДИМИТРОВА

ФЕНОТИПИЗИРАНЕ НА БРОНХИАЛНАТА АСТМА

АВТОРЕФЕРАТ

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

по професионално направление 7.1 Медицина,

Научна специалност: Белодробни болести, Шифър 03.01.17

Научен ръководител:
Доц. д-р Ваня Милошева Юрукова, д.м.

София, 2020 г.

Дисертационният труд е написан в обем 244 страници и е онагледен с 46 таблици, 47 фигури и 9 приложения. Библиографията обхваща 476 източника, от които 10 са на кирилица и 466 на латиница.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 26.02.2020 год. в 13:30 часа в Aula Maxima на УМБАЛ „Света Екатерина“ ЕАД, гр. София, бул. „Пенчо Славейков“ №52А пред научно жури в състав:

1. Проф. Д-р Димитър Темелков Костадинов, д.м.
2. Доц. Д-р Ваня Милошева Юрукова, д.м.
3. Доц. Д-р Димо Митев Димов д.м.
4. Проф. Д-р Благой Иванов Маринов д.м.
5. Доц. Д-р Явор Йорданов Иванов д.м.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в ККБ, МБАЛББ „Света София“ ЕАД, бул. „Акад. Ив. Гешов“ №19, както и на интернет страницата на МУ-София: <http://career.mu-sofia.bg>.

Списък на използваните съкращения:

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

СЪДЪРЖАНИЕ:

I. Въведение	3
II. Цел и задачи.....	8
III. Материал и методи	9
3.1 Изследвана популация	9
3.2 Методи.....	10
IV. Резултати и обсъждане	14
4.1 Резултати към задача 1	16
4.2 Резултати към задача 2	31
4.3 Резултати към задача 3	42
4.4 Резултати към задача 4	58
4.5 Резултати към задача 5	61
4.6 Резултати към задача 6	75
4.7 Резултати към задача 7	88
VIII. Изводи	95
IX. Приноси	96
X. Публикации и участия в научни форуми по темата на дисертацията	97

I. Въведение

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

Честотата на БА варира от 1-16% в популацията на различните страни и засяга хора от всяка възраст, раса и пол. Милева и сътр. докладват честота на БА в България, както следва: < 20 години – 9.1%, 20-44 години – 4.7%, > 44 години – 12.9%, с обща честота за популацията 9% базирайки се на данните от мултицентрово епидемиологично проучване (n=6492).

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

Тежестта на БА може да се изменя във времето, като е много важно да се разграничи ТА от неконтролирана БА. Много пациенти с неконтролирана БА могат да бъдат трудно контролирани в резултат на неподходяща терапия, проблеми с придържането към терапията или нелекувани и резистентни на лечение коморбидности.

Съществуват различни дефиниции, формирани на базата на контрол и тежест на БА. През 2010 год. от Световната Здравна Организация (СЗО) въвежда класификация на БА в три групи, всяка от които носи различно послание и предизвикателство за общественото здраве (нелекувана БА, трудна за лечение БА и резистентна на терапия БА). В последствие GINA дефинира тежестта според интензивността на лечението, необходимо за постигане на добър контрол над симптомите и екзацербациите, а през 2014 год. работна група на ERS и ATS изготви документ с инструкции за дефиниране, диагностика, поведение и лечение при ТА. ТА според дефиницията на ATS/ERS 2014, изисква лечение с висока доза ИКС и допълнителен контролиращ медикамент (ДДБА, ЛТРА, Theophylline), и/или използването на ОКС над 6 месеца през последната една година (стъпка 4, 5 според GINA 2014), за да се предотврати загубата на контрол или остава неконтролирана, въпреки това лечение.

Липсват достатъчно епидемиологични данни, но се смята, че ТА засяга приблизително от 5-10% от пациентите с БА. Холандско проучване, проведено през 2015 г. определя честотата на трудната за лечение БА и тежка рефрактерна БА в добре документирана база данни. Авторите докладват, че 24% от пациентите с БА провеждат лечение от стъпка 4 и 5 по GINA, 17% са с трудна за лечение БА (стъпка 4 и 5, но лош контрол), а 3.7% са с тежка рефрактерна БА (стъпка 4 и 5, лош контрол, добро придържане и инхалаторна техника).

ТА е с прогресивно влошаване на симптомите и чести тежки екзацербации, въпреки провежданата комплексна терапия и представлява особено предизвикателство, поради необходимостта от обширна диагностична оценка, липса на достатъчно доказателства по отношение на персонализираната терапия, както и висока консумация на ресурси в областта на здравеопазването. Неясните, подлежащи, патофизиологични механизми на заболяването доведоха до създаване на международни мрежи от специализирани центрове за изучаване на ТА. При тези пациенти концепцията за фенотипизиране на БА има нарастващо значение през последните години. Клъстерни проучвания подкрепят идеята, че клинично-възпалителните модели на БА са променливи,

но чрез тях могат да бъдат идентифицирани фенотипи, които остават стабилни във времето и подлежат на персонализиран подход за лечение.

През 2003 г. специализирани центрове в девет Европейски страни създадоха Европейска мрежа за разбиране механизмите на ТА (ENFUMOSA). Американската научна програма ТА (SARP) също представи първите си данни през 2007 г., а през 2011 г. беше създаден международен Европейски изследователския проект U-BIOPRED за събиране на проби и анализ на информация при пациенти с ТА с цел фенотипизиране.

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

Още през 1940 год. Rackemann разграничава два отделни вида БА на така наречените „extrinsic“ или алергична БА и „intrinsic“ или неалергична БА. Терминологията „extrinsic“ и „intrinsic“ БА е заменена с „алергична“ и „неалергична“ БА в официална декларация на Европейската академия по алергия и клинична имунология през 2001 г. През 1999 г. Wenzel и сътр. описват два отделни субтипа ТА, с и без еозинофилия, а през 2004 г. Miranda и сътр. предлагат диференциация на БА въз основа на възрастта (с рано и късно начало) и наличието на еозинофилия в дихателните пътища. Wenzel през 2006 г. прави класификация на потенциални фенотипни категории БА, а Simpson и сътр. идентифицират различни възпалителни фенотипи, базирани на цитологичния профил на спутума, които са в основата на проста класификационна схема: еозинофилна, неутрофилна, смесена и „паучи“ гранулоцитна (без или малко клетки) БА.

Anderson и сътр. през 2008 г. предлагат въвеждането на термина ендотип. Ендотипът е субтип на заболяването, дефиниран функционално и патофизиологично чрез молекулярни механизми или чрез отговор към терапията.

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

Развива се идеята за формиране на два ендотипа – Th-2 и не-Th2 БА и 6 фенотипа: Th2 БА: алергична с рано начало астма, еозинофилна с късно начало, провокирана от усилена БА; Не-Th2: свързана със затлъстяване, неутрофилна астма, и астма при пушачи;

По-късно тези две групи биват наречени тип 2 (T2) висока и тип 2 (T2) ниска БА или T2 БА и не-T2 БА, поради идентифициране на нова клетъчна популация от вродени лимфоидни клетки (innate lymphoid cells - ILC2), които подобно на Th-2 лимфоцитите участват за поддържане на T2 възпалението. Последните проучвания показват наличието на сложен възпалителен процес при ТА, въпреки лечението с високи дози ИКС или СКС. Възпалителните клетки играят критична роля в патогенезата на БА чрез секреция на цитокини и проинфламаторни молекули. Развива се идеята, че имунен отговор T2 и асоциираните с него цитокини доминират при ЛБА и СТА, докато при резистентна на лечение ТА, преобладава смесен T2/T1 фенотип с компонент на Th17 ангажиране.

С цел лесна идентификация на отделните фено- и ендотипове БА и проследяване на терапевтичния отговор се въведе употребата на биомаркери - измерими характеристики, които са индикатори за нормални биологични процеси, патогенни процеси или реагират на експозиция или терапевтична интервенция. Основните T2 неинвазивни биомаркери, използвани до момента в областта на фенотипизирането на БА са общи IgE, абсолютен еозинофилен брой в периферна кръв, фракция на издишан азотен окис (FeNO), серумен периостин. Липсва добре утвърден биомаркер за идентифициране на не-T2 БА. Въпреки нарастващите данни в областта на БА и утвърждаване на конкретни фено- и ендотипи, окончателното групиране на пациентите и връзката им с патобиологията остават несигурни.

През последните години подходите за фенотипизиране на БА се развиха и статистическите методи улесняват проучването на данните за идентифициране и анализ на болестните модели.

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

Концепцията за два големи ендотипа на БА – Т2 висока и Т2 ниска БА предстои да се развива и анализира. Необходими са бъдещи проучвания, които да определят механизмите на припокриване, прогресия и изменчивост на утвърдените фенотипи свързани с тези два големи ендотипа.

II. Цел и задачи

Цел:

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

Задачи:

1. Да се определи и оцени клиничното значение на пола, възрастта, началото и продължителността на бронхиалната астма, коморбидностите и тютюнопушенето при възрастни пациенти със средно-тежка и тежка бронхиална астма и да се анализират техните асоциации с контрола, тежестта, възпалителните и имунологични маркери.

2. Да се определят контрола, честотата на екзацербациите, функционалните характеристики и тежестта на бронхиалната астма и да се анализират факторите свързани с тях.

3. Да се изследват и анализират атопичен статус, общи IgE, фракция на издишан азотен окис, кръвни еозинофили и C-реактивен протеин и да се потърси асоциация с останалите изследвани клинични и имунологични характеристики.

4. Да се изследват серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A и периостин и да се определят гранични стойности на базата на резултати получени при здрави контроли с цел дефиниране на групи с високи и ниски нива на серумните маркери и да се анализират техните различия.

5. Да се групират пациентите според утвърдени биомаркери и да се анализират различията в техния възпалителен и имунологичен профил.

6. Да се проведе непреднамерен клъстерен анализ с дефиниране на клъстерни групи в изследваната популация с цел идентифициране на отделни фенотипи.

7. Да се определи терапевтичното поведение чрез алгоритъм, приложим в рутинната клинична практика.

III. Материали и методи

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

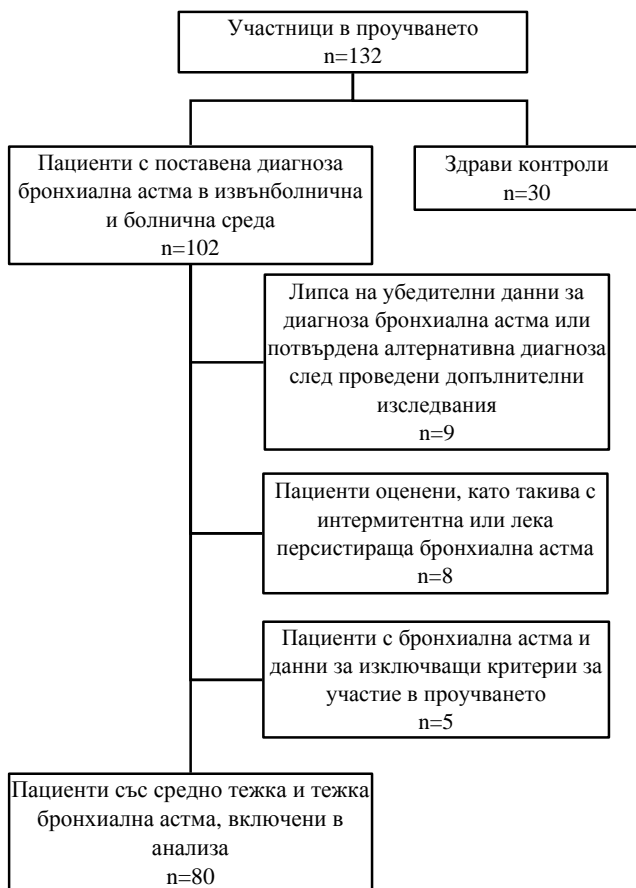
3.1 Изследвана популация

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

В крайния анализ бяха включени 80 пациента със средно-тежка (СТА) и тежка бронхиална астма (ТА), при които през последните 4 седмици не са настъпили промени в терапията (фиг. 1).

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

Исключващи критерии за участие в проучването бяха следните: екзацербация, наложила провеждането на СКС терапия през последните 4 седмици преди изследването, активна инфекция или такава довела до хоспитализация или лечение през последните 4 седмици преди изследването, интерстициална белодробна болест или друго значимо белодробно заболяване освен БА, злокачествено заболяване, аутоимунно заболяване, остър или хроничен хепатит, цироза, бъбречна недостатъчност, тежки сърдечно-съдови и ендокринологични заболявания, известна имунна недостатъчност – HIV инфекция, провеждане на терапия с ЛТРА, депо КС препарати, моноклонални антитела, имуномодулираща или имunosупресираща терапия, специфична десенсибилизация, злоупотреба с алкохол и наркотични вещества или бременност.



Фиг. 1 Схема на изследваната популация

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

3.2 Методи

3.2.1 Анкетна карта и въпросници

Всички пациенти попълниха анкетна карта. Събра се подробна информация относно първа изява, продължителност и ход на БА. Оцени се терапия, придържане и техника на инхалиране. Информирахме се за коморбидности и рискови фактори за развитие на БА и други белодробни заболявания. По анамнестични и документални данни се оцени честотата на екзацербациите през последната една година.

Използвана беше валидираната скала на Morisky, Green, Levine за оценка на придържането към терапията (MGL), която се състои от четири елемента, които определят причините за неспазване: забравяне, безгрижие, чувство за подобрене или

влошаване. Резултатът варира между 0 (силно придържачи се) и 4 (силно не придържачи се).

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

Извърши се подробен физикален преглед. Провеодоха се антропометрични измервания за определяне на височина и тегло. Индексът на телесна маса (ИТМ) се изчисли по формулата: телесно тегло/ръст² (kg/m²). В зависимост от ИТМ бяха определени пациенти с: нормално тегло – ИТМ 18.5 – 24.9; наднормено тегло – ИТМ 25 – 29.9; затлъстяване – ИТМ ≥ 30 .

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

Използваха се следните въпросници за оценка контрола на БА:

- Тест за контрол на астмата - Asthma Control Test (ACT). Той включва четири въпроса за симптоми и употреба на бързодействащ инхалатор при нужда и един въпрос за самооценка нивото на контрол за последните 4 седмици. Резултатите варират от 5 до 25 точки: от 20 до 25 точки - добре контролирана БА, от 16 до 19 точки – недобре контролирана БА, от 5 до 15 точки – много лош контрол на БА. Минималната клинично значима разлика е 3 точки.

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

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

Оцени се терапията:

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

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

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

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

Проведе се изследване на фракцията на азотен окис в издишан въздух (FeNO) чрез системата NIOX MINO (Aerocrine, Sweden). Резултатът е представен в мерни единици – частици на милиард (ppb). Измерването се извърши при следните условия: предварително определяне на нивата на азотен окис в околната среда, стайна температура 16-30°C, атмосферно налягане: 700-1060 hPa, влажност: 20-60% (некондензираща среда), издишан дебит по време на изследването: 50 ml/s \pm 10% BTPS, диапазон на измерване: 5 – 300 ppb, време на издишване: 10 секунди. Проведени бяха 3 опита и се използва средната аритметична стойност за анализ след ежемесечна калибрация с биологични контроли.

3.2.3 Спирометрия

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

3.2.4 Кожно-алергични проби (КАП)

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

3.2.5 Кръвни изследвания и серумни маркери

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

Пълна кръвна картина се изследва чрез автоматична методика с апарат Medonic M 20 S. Абсолютният брой и процентното съотношение на клетките в периферна кръв беше определено след мануално микроскопско изброяване на 300 клетки от натривка на периферна кръв оцветена по метода на Романовски-Гимза.

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

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

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

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

3.2.6 Определяне на общи IgE

Общите IgE се изследваха чрез метода ELISA с кит за количествено определяне на IgE (EUROIMMUN Total IgE ELISA, Germany). Резултатите се отчетоха спектрофотометрично чрез апарат ELISA Reader при дължина на вълната 450 nm. Определиха се стойностите на абсорбциите на стандартите и на серумите на пациентите и резултатите се отчетоха по стандартна крива в IU/ml.

3.2.7 Определяне на специфични IgE към Staphylococcus aureus ентеротоксин В

Определянето на серумните нива на специфични IgE към Staphylococcus aureus ентеротоксин В се извърши по флуоресценцимноимунен метод (FPIA) с апарат ImmunoCAP. Броят на отчетените светлинни импулси бе преобразуван в цифрова стойност. Така описаният процес се извърши напълно автоматизирано. Резултатът бе представен в kUA/L. Обхватът за измерване бе 0.1-100 kUA/L. Резултати над 0.35 kUA/L се приеха за положителни.

3.2.8 Определяне серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A

За определяне на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A в серум използвахме Human ELISA kit (Gene probe, Diacclone, France). Следвахме инструкциите на производителя, приложени във всеки кит. Резултатите се отчетоха на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със заложен 6 или 7 стандарта. Получените стойности оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

3.2.9 Определяне на серумен периостин

За определяне на периостин в серум използвахме Human periostin/osteoblast specific factor 2 (POSTN) ELISA kit (Cusabio). Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита. Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта. Получените стойности оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (ng/ml) съгласно построената калибрационна крива.

3.2.10 Определяне на серумни нива на CRP

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

3.2.11 Статистически методи

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

Категориите променливи са представени в проценти, а количествените като средна стойност и стандартно отклонение (SD) или като медиана с горна и долна четвърт на обхвата (IQR). За ниво на статистическа значимост е приета стойност на $p < 0.05$.

Приложени са следните методи: Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и Шапиро- Уйлк (Shapiro-Wilk) за проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива, Т-тест за две независими извадки (Independent Samples T-test), Метод на Ман-Уйтни (Mann-Whitney U test), Метод на Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis), Метод хи-квадрат (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test), корелационен и регресионен анализ, ROC крива анализ с определяне зоната под кривата (AUC) и клъстерен анализ.

IV. Резултати и обсъждане

Общи характеристики на изследваните групи БА и ЗК

В настоящото проучване включихме пациенти от стандартната амбулаторна практика оценени, като такива със СТА и ТА (БА), както и пациенти с различна степен на придържане и съпътстваща експозиция на тютюнев дим с цел фенотипизиране на пациентите в реалната практика. Базирайки се на литературните данни решихме, че тези две групи пациенти имат най-голяма нужда от допълнително охарактеризиране с цел изготвяне на стратегии за подобрене на контрола над заболяването. Тежестта и контрола на БА може да се изменя във времето, като неконтролираната СТА в реалната клинична практика, може да доведе до ескалация на лечението и селекция в групата на ТА. Редица проучвания дефинират ТА, като хетерогенна група, обединена от по-високата си необходимост от медицински грижи, а сравнителните групи са предимно комбинирана кохорта от пациенти с ЛБА и СТА. Ние смятаме, че СТА се отличава от ЛБА и по-скоро има повишен риск от преминаване към ТА при по-голяма продължителност на заболяването и въздействие на неблагоприятни фактори от околната среда.

Основните характеристики на групите БА и ЗК са представени на табл.1. ЗК са неатоични, с нормални спирометрични функционални показатели и без история или симптоми на белодробни заболявания или друга тежка коморбидност. Те съответстваха по пол, възраст, ИТМ и тютюнопушене на групата БА. Пациентите с БА бяха със статистически значимо по-високи нива на общи IgE, FeNO и кръвни еозинофили и по-ниски функционални характеристики (ФВК, ФЕО1, съотношение ФЕО1/ФВК) ($p < 0.05$ за всички сравнения) (табл.1).

	БА (n=80)	ЗК (n=30)
Възраст, години	45.2 ±14.2	43.4 ±13.3
Жени/мъже	52/28 (65/35%)	22/8 (73.3/26.7%)
ИТМ, kg/m ²	26.7 (22.8-30.7)	25.3 (21.6-28)
Затлъстяване, не/да	57/23 (71.3/28.8%)	6 (20%)
Тютюнопушене, не/бивш/настоящ	38/23/19 (47.50/28.75/23.75%)	17/6/7 (56.7/23.3/20%)
Пакетогодини	3.6 (0-11)	0 (0-7)
Начало, възраст	33.3 ±12	-
Начало, групи <20/20-40/>40	22/29/29 (27.5/36.25/36.25%)	-
Продължителност, год.	8.50 (3-18.75)	-
Лошо придържане	21 (26.3%)	-
КАП +/-	19/61 (23.8/76.3%)	-
Ринит, не/да	19/61 (23.7/76.3%)	-
АСQ5 резултат	1.00 (0.20-2.15)	-
АСQ7 резултат	1.00 (0.32-2.25)	-
АСТ резултат	21 (16-24)	-
Неконтролирана БА (GINA)	44 (55%)	-
Екзацербации за 1 год.	1 (0-2)	-
Екзацербации, >1 за год.	56 (70%)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	35 (43.8%)	-
Терапия стъпка 4/5 (GINA)	58 (72.5%)	-
Висока доза ИКС	40 (50%)	-
Ниска доза ОКС	10 (12.5%)	-
Общ IgE, IU/ml*	119.95 (42.30-289.51)	5.85 (2.10-15.50)
Общ IgE >100 IU/ml*	44 (55%)	0
FeNO, ppb*	29.5 (18.3-47.8)	10 (6.8-13.3)
b-Eos, cells/microL*	322 (205-509)	105 (79-185)
b-Neu, 10 ⁹ L	4.65 (3.51-5.94)	4.45 (3.25-4.90)
CRP, mg/L	2.07 (0.85-4.66)	-
Пре ФВК, Z score*	-0.94 (-1.88; -0.07)	0.73 (0; 1.13)
Пре ФЕО1, Z score*	-1.49 (-2.78; -0.49)	0.40 (-0.53; 1.23)
Пре ФЕО1/ФВК, Z score*	-1.35 (-2.30; 0.04)	-0.06 (-0.50; 0.37)
Пост ФВК, Z score	-0.61 (-1.42; 0.05)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.13 (-2.20; -0.16)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.94 (-1.86; 0.27)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	25 (31.3%)	-
Промяна на ФЕО1, %	5 (0-13.50)	-

Резултатите са представени в брой (%), средна ± стандартно отклонение (SD) (*Italic*), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Student's t-test или Mann-Whitney U test. Категорийните променливи са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; ЗК – здрави контроли; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; АСQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; *p<0.05

Табл. 1 Общи характеристики на изследваните групи на пациенти с БА и ЗК.

4.1 Резултати към задача 1

4.1.1 Разпределение по пол

В изследваната група с БА, преобладаваше женският пол (52 жени – 65% и 28 мъже – 35%), като резултатите са в потвърждение на известни до момента литературни данни за доминиране на женския пол при възрастни с БА, за разлика от БА при деца, където заболяването е по-често разпространено при мъжкия пол.

	Жени (n=52)	Мъже (n=28)
Начало	36 (20-50)	31 (19-45)
Възраст	43 (34-58)	41 (34-58)
Продължителност	8 (2-17)	13 (6-21)
Пакетогодини	3.9 (0-11)	1.8 (0-11)
Лошо придържане	15 (28.8%)	6 (21.4%)
ИТМ, kg/m²*	25 (22-30)	29 (25-33)
КАП +/-	39 (75%)	22 (78.6%)
АСQ5 резултат	1.2 (0.1-2.1)	0.9 (0.2-2.0)
АСQ7 резултат	1.17 (0.29-2.29)	0.86 (0.50-2.14)
АСТ резултат	19 (17-24)	22 (17-25)
Неконтролирана БА (GINA)	30 (57.7%)	14 (50%)
Тежка БА (ATS/ERS)	20 (38.5%)	15 (53.6%)
Екзацербации*	1 (1-2)	1 (0-1)
FeNO, ppb	30 (19-50)	30 (20-43)
b-Eos, cells/microL	307 (188-507)	330 (244-514)
b-Neu, 10 ⁹ L	4.39 (3.50-5.53)	5.43 (3.98-6.50)
Пре ФВК, Z score	-0.96 (-1.78; 0.01)	-0.91 (-1.88; -0.28)
Пре ФЕО1, Z score	-1.49 (-2.68; -0.49)	-1.53 (-2.94; -0.46)
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.21 (-1.96; -0.08)	-1.59 (-2.84; 0.09)
Пост ФВК, Z score	-0.55 (-1.41; 0.15)	-0.72 (-1.43; -0.24)
Пост ФЕО1, Z score	-1.09 (-1.95; -0.14)	-1.26 (-2.69; -0.21)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.88 (-1.64; 0.31)	-1.39 (-2.56; 0.15)
<u>Серумни нива:</u>		
IL-5, pg/ml	2.17 (1.50-3.18)	2.53 (1.95-3.33)
Периостин, ng/ml	1.86 (1.30-1.98)	1.78 (1.08-2.15)
IL-13, pg/ml	1.10 (0.35-1.69)	1.07 (0.69-3.20)
IL-17A, pg/ml	3.06 (0.49-24.85)	0.59 (0.48-13.95)
IL-6, pg/ml	1.54 (0.91-2.23)	1.06 (0.60-2.27)
IL-8, pg/ml	1.83 (0-4.50)	1.20 (0.10-5.85)
Общ IgE, IU/ml*	107.3 (34-210.5)	211.5 (56.9-428.5)
CRP, mg/L	2.00 (0.76-4.64)	2.10 (1.01-4.51)

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

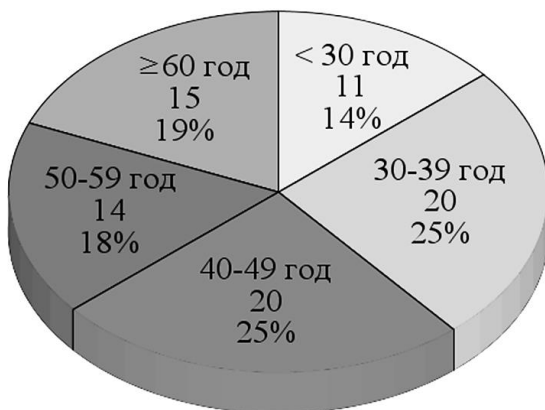
Табл.2 Характеристика на пациентите с БА при разделение по пол

Не установихме значими различия спрямо началото на БА, продължителност, контрол, симптоми, тютюнопушене, FeNO, кръвни еозинофили, серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A и периостин при сравнение по пол.

Значимо по-високи нива на серумни общи IgE и ИТМ наблюдавахме при мъжете ($p=0.044$, $p=0.015$, респективно), а при жените установихме по-чести екзацербации през последната една година ($p=0.014$) (табл.2). Подобни асоциации са докладвани и в предишни проучвания, като причината за тях не е напълно изяснена. Ние предполагахме, че те се дължат на половото разпределение в отделните възрастови групи, където доминира различна по фенотипна изява БА. Така, повишените нива на общи IgE при мъжете се дължат на по-честата изява на IgE-медирана БА в ранна възраст, докато честотата на екзацербациите при жените е отражение на тежката БА в късна възраст. Възможно е тези различия да са в резултат от въздействието на половите хормони над БА.

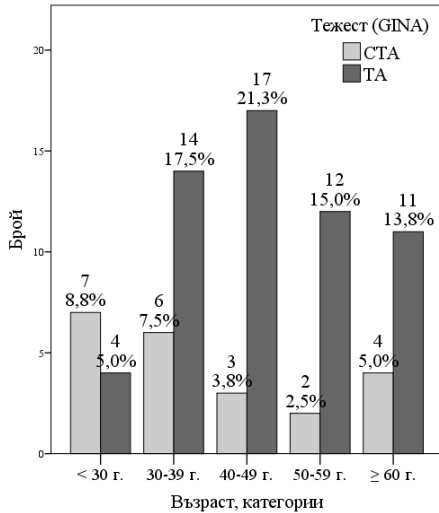
4.1.2 Разпределение по възраст

Средната възраст беше 45.38 ± 14.16 в диапазона от 19 год. до 74 год. Преобладаваха пациентите на възраст между 30 и 49 год. (фиг.2).



Фиг.2 Разпределение на пациентите с БА по възраст

Установихме по-висока честота на ТА (GINA) във възрастовите групи над 30 г. ($\chi^2=10.07$, $p=0.039$) (фиг.3).

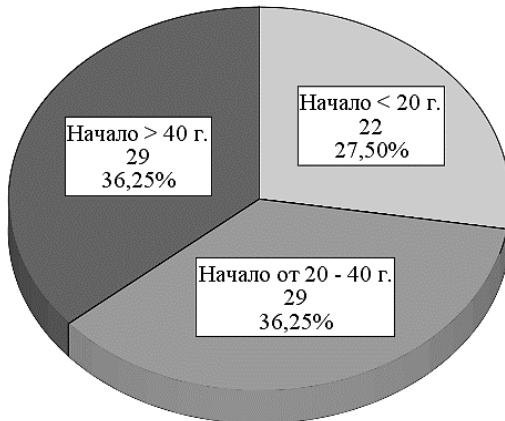


Фиг.3 Тежест на БА според разпределението по възраст. Съкращения: СТА – средно-тежка БА; ТА – тежка БА;

Нашите данни са в съответствие с резултатите от програмата SARP за силно въздействие на възрастта върху тежестта на БА, като пациентите над 45 год. имат 2.73 пъти по-висока вероятност да са с ТА.

4.1.3 Начало на БА

Средната възраст на изява на БА в изследваната от нас популация беше 33.34 ±12.01 години, а средната продължителност на БА - 8.50 (3-18.75) години. При 22 (27.50%) се установи начало на БА преди 20-годишна възраст, при 29 (36.25%) – начало между 20-40-годишна възраст, а при 29 (36.25%) начало след 40-годишна възраст. Доминираха пациентите с късна изява на БА (≥ 20 год.) (n=58; 72.50%) (фиг.4).



Фиг.4 Разпределение на пациентите с БА според възрастта на начална изява на БА

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

Характеристики на пациентите с ранно начало на БА:

Пациентите с ранно начало бяха на средна възраст 34 (27-40) г. със средна продължителност на заболяването 23 (16-29) г. В групата доминираха жените ($n=13$; 59.1%) и пациентите с атопия ($n=21$; 95.5%). Настоящите тютюнопушачи при БА с ранно начало бяха 4 (18.2%), а в 31.8% от случаите установихме лошо придържане към терапията. Коморбидностите в групата бяха със следната изява: ринит при 18 (81.8%), AERD при 6 (27.3%), затлъстяване при 5 (22.7%), ГЕРБ при 8 (36.4%) пациента. Неконтролирана БА установихме при 13 (59.1%) пациента, а ТА (ATS/ERS 2014) при 9 (40.9%). Средната честота на екзацербациите през последната една година беше 1 (0-2). Половината от пациентите в групата бяха на висока доза ИКС, а 2 (9.1%) на ниска доза ОКС. Разпределението в групата според терапевтичната стъпка беше, като следва: стъпка 3 – $n=6$ (27.3%), стъпка 4 и 5 – $n=16$ (72.7%). Средното ниво на общи IgE беше 181 (52-400) IU/ml, на FeNO – 29 (20-46) ppb, а на кръвните еозинофили и неутрофили – 244 (183-464) cells/microL и 4.54 (3.42-6.22) $\times 10^9/L$, респективно. Резултатите от функционалните изследвания, въпросниците за контрол и серумните нива на CRP, периостин и изследваните интерлевкини са отразени в табл. 3.

Характеристики на пациентите с късно начало на БА:

Пациентите с късно начало бяха на средна възраст 49 (39-60) год. със средна продължителност на заболяването 6 (2-12) г. Отново доминираха жените ($n=39$; 67.2%), като атопия установихме при по-нисък процент пациенти в сравнение с БА с ранно начало ($n=40$; 69%). Настоящите тютюнопушачи бяха 15 (25.9%), а в 24.1% от случаите установихме лошо придържане към терапията. Коморбидностите в групата бяха със следната изява: ринит при 43 (74.1%), AERD при 4 (6.9%), затлъстяване при 18 (31%), ГЕРБ при 16 (27.6%) пациента. Неконтролирана БА установихме при 31 (53.4%) пациента, а ТА (ATS/ERS 2014) при 26 (44.8%). Средната честота на екзацербациите през последната една година беше 1 (0-1.25). Половината от пациентите в групата бяха на висока доза ИКС, а 8 (13.8%) на ниска доза ОКС. Разпределението в групата според терапевтичната стъпка беше, като следва: стъпка 3 – $n=16$ (27.6%), стъпка 4 и 5 – $n=42$ (72.4%). Средното ниво на общи IgE беше 113 (36-254) IU/ml, на FeNO – 30 (18-53) ppb, а на кръвните еозинофили и неутрофили – 367 (229-512) cells/microL и 4.73 (3.52-5.72) $\times 10^9/L$. Резултатите от функционалните изследвания, въпросниците за контрол и серумните нива на CRP, периостин и изследваните интерлевкини са отразени в табл. 3.

	Начало < 20 год. n=22; 27.5%	Начало ≥ 20 год. n=58; 72.5%
ACQ5 резултат	0.70 (0.15-1.85)	1.20 (0.15-2.60)
ACQ7 резултат	0.71 (0.29-2.04)	1.14 (0.39-2.36)
ACT резултат	21 (18-25)	20 (16-24)
CRP, mg/L	2.20 (0.69-6.20)	2.05 (0.88-4.38)
Пре ФВК, Z score	-0.51 (-2.02;0.56)	-0.98 (-1.75; -0.15)
Пре ФЕО1, Z score	-1.15 (-3.13; -0.33)	-1.61 (-2.71; -0.50)
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.39 (-2.76; 0.11)	-1.21 (-2.16; 0.08)
Пост ФВК, Z score	-0.41 (-1.69; 0.49)	-0.74 (-1.23; 0.03)
Пост ФЕО1, Z score	-1.15 (-2.35; -0.22)	-1.12 (-2.19; -0.02)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-1.05 (-2.30; 0.20)	-0.94 (-1.82; 0.30)
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	9 (40.9%)	16 (27.6%)
Промяна на ФЕО1, %	2 (0-10)	7 (1.75-15)
IL-5, pg/ml	2.73 (1.56-3.39)	2.19 (1.80-3.32)
IL-6, pg/ml	1.09 (0.64-1.73)	1.64 (0.92-2.35)
IL-8, pg/ml *	1.73 (0-5.66)	1.63 (0-4.61)
IL-13, pg/ml	1.17 (0.34-7.28)	1.06 (0.55-1.43)
IL-17A, pg/ml	0.78 (0.45-27.08)	3.96 (0.49-20.75)
Периостин, ng/ml **	1.83 (0.98-1.94)	1.86 (1.21-2.12)

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); Използван е Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; * IL-8 беше измерен при n=22 с начало < 20 г. и n=48 с начало ≥ 20 г.; ** Периостин беше измерен при n=14 с начало < 20 г. и n=28 с начало ≥ 20 г.

Табл.3 Сравнение на БА според възраст на начална изява (ранно и късно начало)

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

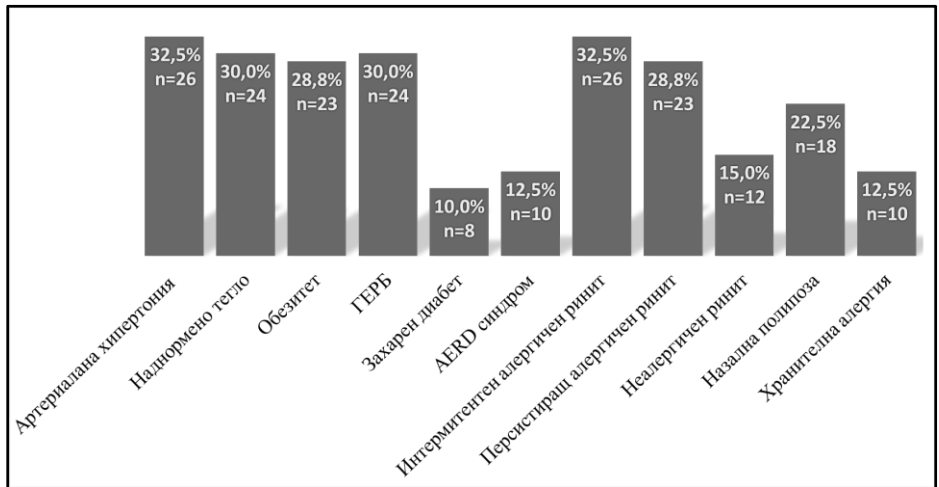
Пациентите с начало на БА след 40 год. възраст бяха на средна възраст 59 (53-66) год. със средна продължителност на заболяването 6 (2-11) г., предимно жени (n=20; 69%), като атопия установихме при по-нисък процент пациенти в сравнение с БА с ранно начало (n=19; 65.5%). Настоящите тютюнопушачи бяха 4 (13.8%), а в 31% от случаите установихме лошо придържане към терапията. Коморбидностите в групата бяха със следната изява: ринит при 23 (79.3%), AERD при 2 (6.9%), затлъстяване при 9 (31%), ГЕРБ при 8 (27.6%). Неконтролирана БА установихме при 14 (48.3%) пациента, а ТА (ATS/ERS 2014) при 12 (41.4%), като честотата е подобна на тази в останалите групи определени според начало на БА. Средната честота на екзацербациите през последната една година беше 1 (0-1.5). На терапия с висока доза ИКС бяха 48.3%, а 2 (6.9%) бяха на ниска доза ОКС. Разпределението в групата според терапевтичната стъпка беше, като следва: стъпка 3 – n=5 (17.2%), стъпка 4 и 5 – n=24 (82.8%). Средното ниво на общи IgE беше 114 (34-254) IU/ml, на FeNO – 30 (19-50) ppb, а на кръвните еозинофили и неутрофили – 390 (280-519) cells/microL и 4.16 (3.46-5.27)x10⁹/L, респективно.

При директно сравнение на двете групи пациенти с БА с начало < 20 год. и с начало > 40 год. установихме статистически сигнификантно, по-висока честота на неатопични пациенти при БА с начало > 40 год. (n=10; 34.5% в сравнение с n=1; 4.5%) (χ^2 – 6.654, p=0.036) и по-висока честота на пациенти с кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL (n=19; 65.5%, в сравнение с n=8; 36.4%) (χ^2 –4.268, p=0.039). При БА с начало > 40 год. установихме статистически значимо повишение в серумните нива на IL-6 (2.03 (1.45-3.35) pg/ml), при сравнение с останалите две групи (начало < 20 г. и начало 20-40 г.,

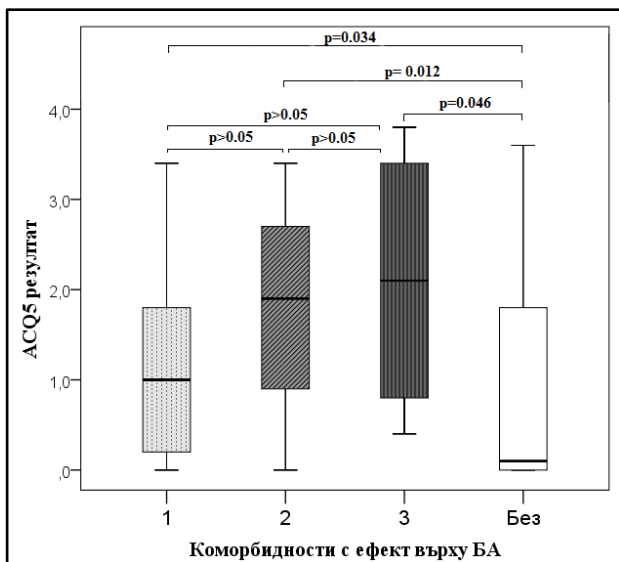
p=0.004 и p=0.001, респективно). Не открихме различия в серумните нива на CRP, общи IgE, периостин и останалите интерлевкини.

4.1.4 Коморбидности

На фиг.5 е представена честотата на съпътстващите заболявания (персистиращ ринит, AERD синдром, ГЕРБ и затлъстяване) при БА, според които се определиха следните подгрупи: пациенти без коморбидности (n=22; 27.5%), с една коморбидност (n=38; 47.5%), с две коморбидности (n=16, 20%), с три и повече коморбидности (n=4; 5%). При сравнение между подгрупите установихме статистически сигнификантно повишен резултат от ACQ5 ($\chi^2 - 8.562$, p=0.022) и ACQ7 ($\chi^2 - 7.497$, p=0.036) в групите на пациентите с една и повече коморбидности, което е свързано с по-изявени симптоми и лош контрол на заболяването (фиг.6) и е в потвърждение на литературните данни.



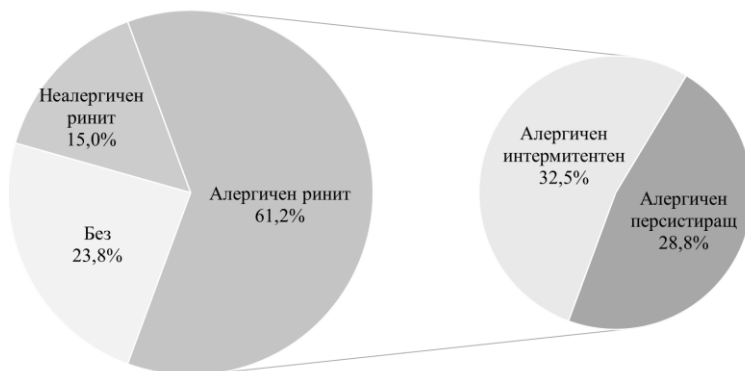
Фиг.5 Честота на съпътстващите заболявания в групата на пациенти с БА, n=80



Фиг.6 Влияние на коморбидностите върху контрола на БА

4.1.4.1 Ринит

Честота на ринит при БА в нашето проучване беше 76.3% (n=61). Неалергичен ринит установихме при 12 (15%), алергичен персистиращ ринит при 23 (28.8%), а алергичен интермитентен ринит при 26 (32.5%) пациенти с БА (фиг.7).



Фиг.7 Честота и характеристика на ринита при пациентите с БА

Серумните нива на общи IgE бяха значително по-високи при БА с алергичен ринит (220.5 (83.55 – 408.49) IU/ml) в сравнение с нивата при БА с неалергичен ринит (48.2 (8.65 – 79.18) IU/ml) и нивата при БА без съпътстващ ринит (48.2 (29.2-177.5) IU/ml) (χ^2 – 12.218, $p < 0.001$). Пациентите с БА и алергичен ринит показаха по-ранно начало на БА (28 (16.5-47) години) при сравнение с групата на БА с неалергичен ринит (44 (31.75-54.50) години) ($p = 0.034$). При БА с персистиращ алергичен ринит установихме сигнификантно по-висок резултат от ACQ5 (1.6 (0.6-3.0)) ($p < 0.001$) и ACQ7 (1.85 (0.71-3.0)) ($p < 0.001$), по-нисък резултат от АСТ (19 (14-24)) ($p = 0.032$), по-висок брой левкоцити (8.00 (6.25-9.50)) ($p = 0.033$), кръвни еозинофили (416 (192-576) cells/microL) ($p = 0.035$) и неутрофили (5.049 (3.792-6.204) $\times 10^9/L$) ($p = 0.025$) и по-нисък Z score за пре- (-1.71 (-2.40 - 0.87)) ($p = 0.020$) и пост ФЕО1/ФВК (-1.34 (-2.01-0.12)) ($p = 0.033$) при сравнение с БА и алергичен интермитентен ринит.

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

4.1.4.2 AERD

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

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

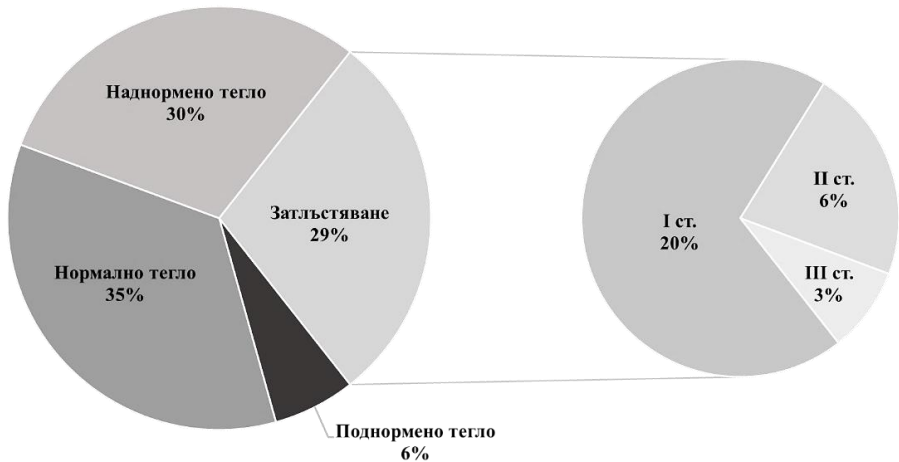
При AERD бяха сигнификантно повишени кръвните левкоцити ($p = 0.005$), еозинофили и неутрофили ($p = 0.002$ и $p = 0.007$, респективно) и серумен IL-5 ($p = 0.012$), а сигнификантно по-ниски бяха пре- ($p = 0.015$) и пост ФЕО1/ФВК ($p = 0.005$) при сравнение с БА без AERD (Табл.4).

	AERD	
	Не	Да
Възраст	42 (34-58)	44 (38-57)
Пол, жени	47 (67.1%)	5 (50%)
ИТМ, kg/m ²	27 (23-31)	28 (23-31)
Пакетогодини	3.88 (0-12)	0 (0-5)
Начало	36 (20-49)	19 (16-37)
КАП +/-	52 (74.3%)	9 (90%)
АСQ5 резултат	1.0 (0-2)	1.6 (0.6-3)
АСQ7 резултат	0.93 (0.28-2.14)	2.00 (0.71-2.86)
АСТ резултат	21 (16-24)	21 (18-25)
Неконтролирана БА (GINA)	38 (54.3%)	6 (60%)
Екзацербации /1 година	1 (0-1)	2 (0-2)
Терапия, стъпка 4/5*	48 (68.6%)	10 (100%)
Тежка БА (ATS/ERS)	28 (40%)	7 (70%)
CRP, mg/L	2.07 (0.83-4.61)	2.74 (1.20-6.50)
b-Eos, cells/microL*	295 (200-468)	819 (416-960)
b-Neu, 10 ⁹ /L*	4.483 (3.477-5.607)	6.080 (5.040-8.241)
FeNO, ppb	30 (18-47)	27 (22-65)
Пре ФЕО1, Z score	-1.36 (-2.72- -0.36)	-1.91 (-3.30- -1.14)
Пост ФЕО1, Z score*	-1.00 (-2.05- -0.05)	-1.82 (-2.93- -1.16)
Промяна ФЕО1, ml*	140 (40-290)	30 (0-140)
Пре ФЕО1/ФВК, Z score*	-1.15 (-2.03-0.12)	-2.30 (-2.99- -1.35)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score*	-0.83 (-1.74-0.31)	-2.08 (-3.14- -1.38)
IL-5, pg/ml*	2.17 (1.75-3.15)	3.30 (2.95-18.1)
IL-13, pg/ml	1.07 (0.60-1.80)	1.17 (0.4-1.92)
Периостин, ng/ml	1.88 (1.38-2.04)	1.29 (0.85-2.08)
IL-6, pg/ml	1.42 (0.72-2.03)	2.40 (1.03-3.47)
IL-8, pg/ml	1.58 (0-4.58)	2.58 (0.60-7.65)
IL-17A, pg/ml	1.38 (0.48-19.5)	0.87 (0.5-26.9)
Общи IgE, IU/ml	107.3 (39.3-245)	230.65 (56.8-499.5)
<p>Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); p-стойността е получена чрез Mann-Whitney U test. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; АСQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на милион; CRP – С-реактивен протеин; IL-8 беше изследван при n=60 без AERD и n=10 с AERD; Серумен периостин беше изследван при n=36 с AERD и n=6 без AERD; * p<0.05</p>		

Табл.4 Характеристики на пациентите с AERD

4.1.4.3 Затлъстяване

Средната стойност на ИТМ при БА в нашето проучване беше 26.72 (22.75 – 30.75). Преобладаваха пациентите с нормално телесно тегло (n=28; 35%). Затлъстяване установихме при 23 (28.8%) пациента с БА, а разпределението по степени е отразено на фиг.8. Доминираха пациентите с I ст. затлъстяване (n=16; 20%). При 7 (9%) от пациентите се наблюдаваше втора и трета степен затлъстяване. По-висока честота на затлъстяване се установи при мъжете (p=0.041). Не открихме значими различия в изследваните клинични и възпалителни показатели в групата на пациентите с БА и затлъстяване при сравнение с пациентите с БА и нормално или наднормено тегло. ИТМ корелира положително със серумните нива на CRP ($r=0.402$, $p<0.001$). Установихме сигнификантно повишение на CRP (2.81 (1.34.80) mg/L) и кръвни еозинофили (410 (252-548) cells/microL) при БА с ИТМ ≥ 25 (p=0.008 и p=0.003 респективно) при сравнение с БА и ИТМ < 25 (табл.5).



Фиг.8 Разпределение на пациентите с БА по ИТМ

	ИТМ < 25 n=33; 41.3%	ИТМ ≥ 25 n=47; 58.8%
Възраст, години	41 (29-58)	46 (37-58)
Жени/мъже*	26/7 (78.8/21.2%)	26/21 (55.3/44.7%)
Пакетогодини	3.75 (0-10)	2 (0-15)
Начало	31 (19-47)	36 (19-49)
Лошо придържане	11 (23.4%)	10 (30.3%)
Ринит, не/да	9/24 (27.3/72.7%)	10/37 (21.3/78.7%)
ГЕРБ	7 (21.2%)	17 (36.2%)
КАП +/-	24 (72.7%)	37 (78.7%)
АСQ5 резултат	0.80 (0-1.80)	1.20 (0.20-2.40)
АСQ7 резултат	0.86 (0.28-2.14)	1.42 (0.42-2.29)
АСТ резултат	21 (17-25)	21 (16-24)
Неконтролирана БА (GINA)	18 (54.5%)	26 (55.3%)
Екзацербации за 1 год.	1 (1-2)	1 (0-2)
Екзацербации, >1 за год.	10 (30.3%)	12 (25.5%)
Тежка БА (ATS/ERS)	11 (33.3%)	24 (51.1%)
Терапия стъпка 4/5 (GINA)	21 (63.6%)	37 (78.8%)
Висока доза ИКС	14 (42.4%)	26 (55.3%)
Ниска доза ОКС	4 (12.1%)	6 (12.8%)
Общ IgE, IU/ml	111 (47-221)	154 (39-356)
Общ IgE >100 IU/ml	19 (57.6%)	25 (53.2%)
FeNO, ppb	29 (18-46)	30 (21-54)
b-Eos, cells/microL*	238 (146-405)	410 (252-548)
b-Eos ≥ 300 cells/microL*	12 (36.4%)	30 (63.8%)
b-Neu, 10 ⁹ L	4.15 (3.42-5.62)	4.98 (3.81-6.20)
CRP, mg/L*	1.15 (0.54-3.95)	2.81 (1.31-4.80)
Пре ФВК, Z score	-0.59 (-1.53; 0.49)	-0.98 (-2.08; -0.22)
Пре ФЕО1, Z score	-1.34 (-2.68; -0.22)	-1.69 (-3.00; -0.56)
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.12 (-2.02; -0.32)	-1.42 (-2.50; 0.12)
Пост ФВК, Z score	-0.30 (-1.36; 0.53)	-0.79 (-1.45; -0.17)
Пост ФЕО1, Z score	-1.03 (-1.95; 0.09)	-1.21 (-2.67; -0.26)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.71 (-1.72; 0.18)	-1.23 (-2.19; 0.31)
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	8 (24.2%)	17 (36.2%)
Промяна на ФЕО1, %	6 (0-12.5)	4 (0-15)
IL-5, pg/ml	2.10 (1.60-3.20)	2.45 (1.80-3.35)
IL-6, pg/ml	1.43 (0.69-2.10)	1.46 (0.75-2.46)
IL-8, pg/ml	1.40 (0-4.40)	2.00 (0.20-5.00)
IL-13, pg/ml	0.95 (0-2.13)	1.11 (0.93-1.80)
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.48-17.35)	4.92 (0.48-27.60)
Периостин, ng/ml	1.89 (1.49-2.16)	1.68 (1.18-1.93)

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); Използван е Mann-Whitney U тест. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ОКС – орални кортикостероиди; АСТ – тест за контрол на астмата; АСQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; LLN – долна граница на нормата; CRP – С-реактивен протеин; IL-8 беше измерен при n=31 с ИТМ < 25 и n=39 с ИТМ ≥ 25; Периостин беше измерен при n=20 с ИТМ < 25 и n=22 с ИТМ ≥ 25; *p<0.05

Табл. 5 Характеристики на пациентите според ИТМ

Скорошни данни на Periyalil и сътр. показват, че мастната тъкан при пациентите със затлъстяване и БА се различава от мастната тъкан при пациенти със затлъстяване без БА. Висцералната мастна тъкан на пациентите със затлъстяване и БА има значително по-високи нива на макрофаги, особено M1 макрофаги, в сравнение с мастната тъкан на затлъстели хора без БА, и това корелира с циркулиращите нива на С-реактивен протеин. Пациентите в нашето проучване с неконтролирана БА също показаха повишение на CRP и кръвните неутрофили пропорционално на ИТМ в групата (виж 4.2.1). Този резултат отразява зависимости в групата на неконтролирани затлъстели пациенти с по-висока експресия на системни възпалителни маркери.

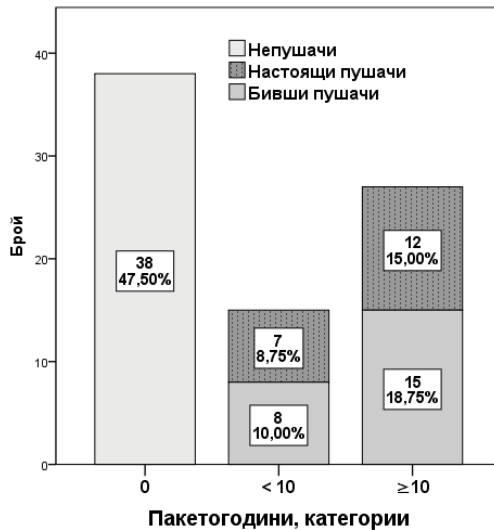
От друга страна при пациентите с наднормено тегло и затлъстяване в общата група на контролирани и неконтролирани пациенти с БА установихме завишени нива на кръвни еозинофили при сравнение с пациентите с нормален ИТМ. Съществуват данни в литературата, че затлъстяването повлиява имунния отговор, променя функцията на Т-клетките и модулира Т2 възпалението, в насока на поддържане и усиляване на имунните отговори. Предварителните данни в нашия анали са в съответствие с резултатите, които получихме от фенотипния и клъстерен анализ, описани в задачи 5 и 6. Идентифицирахме група пациенти със затлъстяване, предимно мъже с високи кръвни еозинофили при ниски нива на FeNO. Подкрепяме идеята на Lugogo и сътр., че механизмите, които медиират еозинофилното възпаление при БА със затлъстяване, вероятно са подобни на тези, медиращи еозинофилията при пациенти с нормално тегло, но под въздействието на метаболитната дисфункция и оксидативен стрес сурогатните маркери за еозинофилия (FeNO) са понижени, което поставя пациентите в риск, при провеждане на лечение според нивата на FeNO.

4.1.4.4 ГЕРБ

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

4.1.5 Тютюнопушене и БА

При 42 (52.5%) пациенти с БА установихме експозиция на цигарен дим (настоящи $n=19$ (23.75%) и бивши $n=23$ (28.75%) тютюнопушачи). Непушачите бяха 38 (47.5%). При 27 (33.75%) установихме експозиция ≥ 10 пакетогодини (фиг.9). Иванов и сътр. през 2015 г. също установяват, че 30.7% от 540 пациенти с БА, участвали в национално проучване проведено в България са тютюнопушачи.



Фиг.9 Разпределение на пациентите с БА според тютюнопушене и пакетогодини

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

- по-висока честота на ГЕРБ ($n=13$; 48.1%, в сравнение с $n=11$; 20.8%) ($\chi^2=6.392$, $p=0.011$)

- по-често неконтролирана БА ($ACQ7 \geq 1.5$) ($n=15$; 55.6%, в сравнение с $n=17$; 32.1%) ($\chi^2=4.109$, $p=0.043$)

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

- по-висок процент БА с късно начало (≥ 20 год. възраст) ($n=24$, 88.9%, в сравнение с $n=34$; 64.2%), ($\chi^2=5.490$, $p=0.019$)

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

При сравнение на настоящите тютюнопушачи с непушачи/бивши тютюнопушачи установихме следните характеристики на настоящите тютюнопушачи (табл.6):

- доминиране на женският пол ($n=16$; 84.2%) ($\chi^2=4.042$, $p=0.044$)

- по-висока честота на СТА ($n=15$; 78.9%) ($\chi^2=5.216$, $p=0.022$)

- по-висок процент на терапия от стъпка 3 ($n=13$; 68.4%) ($\chi^2=20.928$, $p<0.001$)

- по-висок процент на пациенти с FeNO <30 ppb ($n=15$; 78.9%) ($\chi^2=8.352$, $p=0.004$)

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

	Непушачи n=38; 47.5%	Бивши пушачи n=23; 28.8%	Настоящи пушачи n=19; 23.8%	P
Възраст, години	49 (35-64)	44 (37-56)	37 (27-49)	0.046*
Жени	23 (60.5%)	13 (56.5%)	16 (84.2%)	-
ИТМ, kg/m ²	27 (23-31)	27 (23-31)	26 (21-31)	-
Пакетогодини	0	10 (6-15)	10 (4.5-15)	-
Начало	33 (17-51)	38 (19-49)	30 (20-39)	-
Лошо придържане	7 (18.4%)	6 (26.1%)	8 (42.1%)	-
Ринит, да	27 (71.1%)	20 (87%)	14 (73.7%)	-
ГЕРБ	8 (21.1%)	8 (34.8%)	8 (42.1%)	-
АСQ5 резултат	0.80 (0-2.05)	1.80 (0.60-2.60)	0.60 (0.20-1.80)	-
АСQ7 резултат	0.86 (0.28-2.28)	1.71 (0.57-2.57)	1.00 (0.28-2.00)	-
АСТ резултат	21 (17-25)	19 (16-23)	23 (15-25)	-
Неконтролирана БА	19 (50%)	15 (65.2%)	10 (52.6%)	-
Екзацербации	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	20 (52.6%)	11 (47.8%)	4 (51.1%)	-
Висока доза ИКС	23 (60.5%)	13 (56.5%)	4 (21.1%)	0.002
Ниска доза ОКС	5 (13.2%)	4 (17.4%)	1 (5.3%)	-
Общ IgE, IU/ml	96 (39-285)	127 (57-390)	133 (51-206)	-
b-Neu, ppb	31 (22-56)	31 (19-60)	20 (10-29)	0.026*
FeNO ≥ 30 ppb	23 (60.5%)	13 (56.5%)	4 (21.1%)	0.015
b-Eos, cells/microL	328 (198-513)	385 (228-516)	238 (124-425)	-
b-Eos, %	4 (2.3-7)	5 (4-7)	3 (2-5)	0.023#
b-Eos ≥ 300 cells/microL	20 (52.6%)	15 (65.2%)	7 (36.8%)	-
b-Neu, 10 ³ L	5.04 (3.65-6.05)	3.79 (3.25-5.75)	4.98 (3.99-5.67)	-
CRP, mg/L	2.30 (1.18-4.88)	1.88 (0.51-4.70)	2.00 (0.64-4.32)	-
Пре ФВК, Z score	-1.10 (-1.91; -0.01)	-0.59 (-2.13; 0.01)	-0.87 (-1.36; -0.16)	-
Пре ФЕО1, Z score	-1.65 (-3.04; -0.54)	-1.52 (-3.00; -0.21)	-1.27 (-2.11; -0.36)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.56 (-2.75; 0.12)	-1.47 (-2.40; -0.67)	-0.74 (-1.53; 0.37)	-
Пост ФВК, Z score	-0.78 (-1.43; -0.00)	-0.28 (-1.73; 0.42)	-0.55 (-0.88; 0.10)	-
Пост ФЕО1, Z score	-1.19 (-2.39; -0.22)	-1.16 (-2.48; 0.10)	-0.57 (-1.48; -0.26)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-1.17 (-2.51; 0.16)	-0.89 (-2.19; -0.21)	0.16 (-1.26; 0.52)	-
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	14 (36.8%)	8 (34.8%)	3 (15.8%)	-
Промяна на ФЕО1, %	3.5 (0-15)	7 (2-12)	3 (0-14)	-
IL-5, pg/ml	2.18 (1.36-3.24)	2.15 (1.90-3.31)	2.40 (1.80-3.55)	-
IL-6, pg/ml	1.42 (0.89-2.26)	1.65 (0.70-2.31)	1.10 (0.52-2.16)	-
IL-8, pg/ml ¹	0.60 (0-4.58)	1.52 (0-4.88)	3.05 (0.48-5.28)	-
IL-13, pg/ml	1.17 (0.98-2.91)	0.95 (0-1.15)	1.06 (0-5.45)	-
IL-17A, pg/ml	4.96 (0.51-27.60)	0.77 (0.45-24.50)	0.57 (0.42-6.51)	Δ
Периостин, ng/ml ²	1.95 (1.53-2.11)	1.50 (1.03-1.96)	1.88 (1.16-1.93)	-

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

*p<0.05 при сравнение на непушачи с настоящи пушачи
#p<0.05 при сравнение на бивши с настоящи пушачи
Δp<0.05 при сравнение на непушачи с бивши пушачи

Табл.6 Характеристики на пациентите според експозицията на тютюнев дим

Установихме тенденция за по-висока честота на непродържане към терапията на активните тютюнопушачи (n=8; 42.1%) при сравнение с непушачи и бивши пушачи (n=13; 21.3%) (χ^2 -3.236; p=0.072). Тази пациентска група трябва да се обърне специално внимание поради сериозен риск за възникване на късни последици и тежки екзацербации.

При 11 от пациентите с експозиция на цигарен дим установихме персистираща бронхиална обструкция, въпреки висока бронхиална реверзибилност. Не наблюдавахме различия в честотата на персистираща бронхиална обструкция между групите при сравнение според активност и продължителност на тютюнопушенето. Най-вероятно поради въздействието на допълнителни фактори в групата на непушачите (влияние на тежестта и персистиращо неконтролирано възпаление), които също могат да доведат до възникване на трайна бронхиална обструкция.

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

Подобни резултати докладват учените от проучването U-BIOPRED, в което са включени пациенти с ТА при непушачи (n=311), ТА при бивши и настоящи пушачи (n=110), ЛБА и СТА при непушачи (n=88) и здрави контроли непушачи (n=101). Въпреки, че селектираните пациенти в U-BIOPRED са с по-тежка БА, при сравнение с нашето проучване (средна честота на докладваните екзацербации 2.5/годишно, по-висока употреба на СКС), физиологичните и клиничните характеристики на ТА при бивши и настоящи пушачи не се различават значимо от групата на ТА при непушачи с изключение на по-късна изява на БА и по-висока честота на ГЕРБ.

При допълнителен анализи на групите с експозиция на тютюнев дим, изследователите в U-BIOPRED доказаха разлики между настоящите и бившите пушачи в протеомиката на храчките, подчертавайки критичната роля на оксидативния стрес при настоящите пушачи и загуба на епителна бариерна защитна функция при бивши пушачи.

Sleich и сътр. докладват по-лош контрол и по-чести екзацербации при настоящи тютюнопушачи в сравнение с непушачи и бивши тютюнопушачи в белгийската кохорта пациенти с ТА (n=350). Аналогично, в нашето проучване при ТА (ATS/ERS 2014) установихме пропорционална корелационна зависимост между броя на екзацербациите и пакетогодините (виж 4.2.2).

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

4.2 Резултати към задача 2

4.2.1 Контрол на БА

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

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

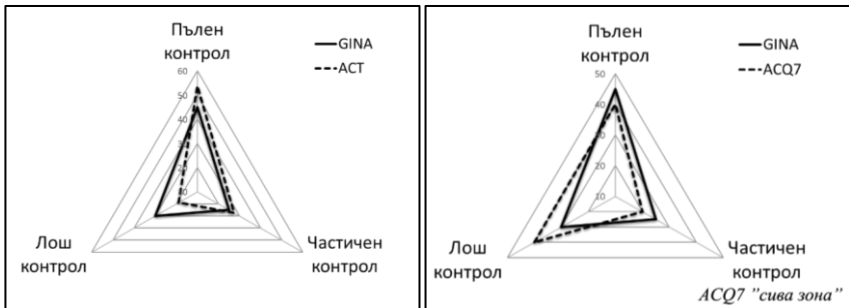
Според критериите на GINA пълен контрол установихме при 36 (45%) от пациентите, частичен контрол при 20 (25%), а лош контрол при 24 (30%) (табл. 7).

В нашето проучване честотата на неконтролирана БА определена чрез различни методи (GINA – 55%, АСТ < 20 – 46.3%, ACQ7 > 1.50– 40%) е подобна на тази цитирана от други автори (Braido и сътр. – 38.5%; Price и сътр. – 45%; Demoly и сътр. - 54%).

Пациентите с лош контрол на БА в нашето проучване бяха по-възрастни, провеждаха по-често терапия стъпка 4 и 5 и при по-висок процент установихме алергичен персистиращ ринит.

Неконтролираната БА беше с по-чести екзацербации и по-високи нива на кръвни еозинофили. Повишени стойности на FeNO установихме при пациентите с лош контрол в сравнение с тези с пълен контрол на БА ($p=0.026$). Въпреки, че средната стойност за пакетогодините беше по-висока в подгрупата с лош контрол, резултатът не достигна статистически значима достоверност. Сигнификантно по-ниски стойности за пре- и пост ФЕО1 измерихме при пациентите с лош контрол в сравнение с тези с пълен контрол на БА ($p=0.023$ и $p=0.018$, респективно).

Не наблюдавахме статистически значими разлики в серумните нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A, периостин, общи IgE и CRP между групите на пълно, частично и лошо контролирана БА (табл. 7).



Фиг.10 Разпределение на пациентите с БА (%) според контрола оценен чрез различни методи

	Контрол GINA			p
	Пълен n=36 (45%)	Частичен n=20 (25%)	Лош n=24 (30%)	
Възраст	43 (33-59)	38 (30-43)	50 (41-61)	1
Жени	22 (61.1%)	12 (60.0%)	18 (75.0%)	-
ИТМ, kg/m ²	26 (23-30)	25 (22-34)	27 (24-30)	-
Начало	35 (19-51)	21 (7.25-35)	39 (25-51)	2
Лошо придържане	9 (25%)	7 (35%)	5 (20.8%)	-
Пакегодини	0 (0-9.5)	3.9 (0-10)	5.5 (0-15)	-
КАП +/-	28 (77.8%)	16 (80%)	17 (70.8%)	-
Терапия, стъпка 3	12 (33.3%)	9 (45.0%)	1 (4.2%)	<0.05
стъпка 4/5	24 (66.7%)	11 (55.0%)	23 (95.8%)	
Алергичен персистиращ ринит	8 (22.2%)	4 (20.0%)	11 (45.8%)	<0.05
АСQ5 резултат	0.20 (0-0.95)	0.90 (0.45-1.80)	2.90 (2.05-3.20)	*
АСQ6 резултат	0.17 (0-0.79)	0.75 (0.50-1.67)	2.59 (1.71-3.00)	*
АСQ7 резултат	0.42 (0.04-0.86)	1.00 (0.61-2.11)	2.79 (2.14-3.11)	*
АСТ резултат	24 (22-25)	19 (17-22)	14 (11-18)	*
Екзацербации/1 год.	1 (0-1)	1 (0-2)	2 (1-4)	3
Тежка БА (ATS/ERS)	9 (25%)	7 (35%)	19 (79.2%)	<0.05
b-Eos, cells/microL	240 (139-412)	305 (222-462)	473 (361-779)	3
b-Neu, 10 ⁹ L	4.39 (3.44-5.69)	5.25 (3.53-5.93)	4.90 (3.85-6.79)	-
FeNO, ppb	26 (18-41.5)	31.5 (12-56)	36.5 (22-74)	4
Пре ФЕО1, Z score	-0.99 (-2.26; -0.18)	-1.67 (-3.20; -0.63)	-2.26 (-3.11; -0.79)	4
Пост ФЕО1, Z score	-0.65 (-1.81; 0.17)	-1.15 (-2.47; -0.41)	-1.60 (-2.83; -0.26)	4
промяна ФЕО1, %	2 (0-10)	5.5 (2-16)	7.5 (3-15)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.30 (-1.88; 0.05)	-1.15 (-2.54; 0.31)	-1.51 (-2.38; -0.04)	-
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.88 (-1.44; 0.45)	-0.96 (-1.99; 0.31)	-1.13 (-2.12; 0.21)	-
IL-5, pg/ml	2.10 (1.47-3.08)	2.38 (1.27-3.46)	2.33 (1.92-5.20)	-
IL-13, pg/ml	1.04 (0.08-1.71)	1.15 (0.88-4.78)	1.10 (0.92-2.23)	-
IL-17A, pg/ml	0.77 (0.50-17.9)	2.75 (0.44-24.9)	5.17 (0.47-26.5)	-
IL-6, pg/ml	1.17 (0.51-2.19)	1.48 (0.76-2.42)	1.57 (1.16-2.53)	-
IL-8, pg/ml	0.83 (0-4.44)	2.42 (0-5.43)	2.03 (0-7.26)	-
Периостин, ng/ml	1.73 (1.29-2.11)	1.90 (0.98-1.98)	1.93 (1.18-2.08)	-
Серумен общ IgE, IU/ml	91.7 (32.6-346.6)	129.9 (40-269)	134 (60.7-217)	-
CRP, mg/l	2.00 (0.68-4.46)	2.53 (0.66-5.03)	2.35 (1.23-4.58)	-

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

Табл.7 Характеристика на пациентите според постигнатия контрол (GINA)

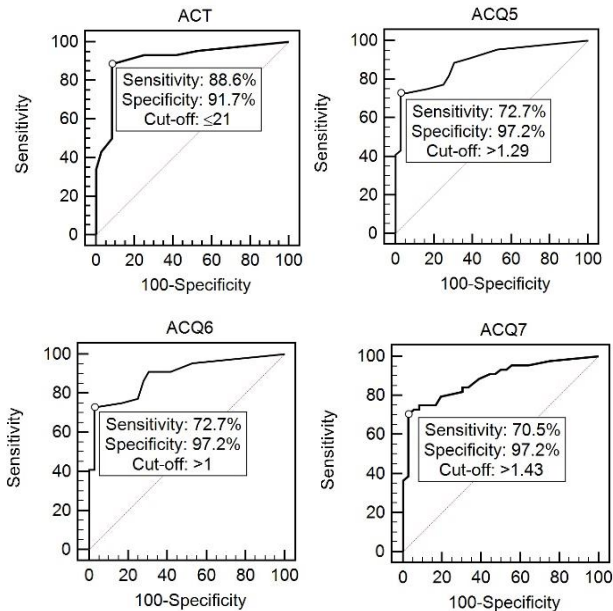
При сравнение на използваните тестове за оценка на контрола, установихме че АСТ има 58.3% съвпадение с GINA критериите за определяне на лош контрол. Съвпадението за АСQ 5, 6 и 7 е съответно 95.8%, 91.7%, 95.8% (табл.8, фиг.10).

		Контрол (GINA)			
		Пълен n=36 (45%)	Частичен n=20 (25%)	Лош n=24 (30%)	
Контрол АСТ	Пълен	33 (91.7%)	9 (45.0%)	1 (4.2%)	43 (53.8%)
	Частичен	3 (8.3%)	10 (50.0%)	9 (37.5%)	22 (27.5%)
	Лош	0	1 (5.0%)	14 (58.3%)	15 (18.8%)
Контрол АСQ5	Пълен	26 (72.2%)	8 (40.0%)	0	34 (42.5%)
	Сива зона	9 (25.0%)	4 (20.0%)	1 (4.2%)	14 (17.5%)
	Лош	1 (2.8%)	8 (40.0%)	23 (95.8%)	32 (40%)
Контрол АСQ6	Пълен	27 (75.0%)	10 (50.0%)	0	37 (46.3%)
	Сива зона	8 (22.2%)	4 (20.0%)	2 (8.3%)	14 (17.5%)
	Лош	1 (2.8%)	6 (30.0%)	22 (91.7%)	29 (36.3%)
Контрол АСQ7	Пълен	25 (69.4%)	7 (35.0%)	0	32 (40%)
	Сива зона	10 (27.8%)	5 (25.0%)	1 (4.2%)	16 (20%)
	Лош	1 (2.8%)	8 (40.0%)	23 (95.8%)	32 (40%)

Съкращения: GINA - Global Initiative for Asthma (Глобалната инициатива за астма); АСТ – тест за контрол на астмата; АСQ – въпросник за контрол на астмата;

Табл.8 Сравнение между методите за оценка на контрола

Обединихме частично контролирана и лошо контролирана БА според GINA в група наречена неконтролирана БА. Така дефинирахме две подгрупи на контролирана (n=36; 45%) и неконтролирана БА (n=44; 55%) и проведохме ROC AUC анализ за установяване способността на АСТ и АСQ за идентифициране на пациентите с неконтролирана БА (Фиг.11).



Фиг.11 ROC AUC анализ на АСТ, АСQ5,6,7 за разграничаване на неконтролирана от контролирана БА според GINA

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

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

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

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

Табл.9 Характеристики на ACQ7 и АСТ при диагностициране на неконтролирана БА. Съкращения: PPV-позитивна предиктивна стойност; NPV-негативна предиктивна стойност.

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

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

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

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

Прагът за АСТ установен в нашето проучване е по-висок от този цитиран в литературата (< 20 точки), което предполагаме, че се дължи на по-тежка форма на БА, в сравнение с проучванията в общата популация на пациенти с БА, където честотата на ЛБА варира от 50-75%. Прагът за ACQ и най-вече за ACQ7 съвпада значително с цитираните в литературата данни (1.50 точки). По-ниската чувствителност на ACQ7 при гранична стойност от 1.43 е разбираема и обяснима с описаната в литературата „сива зона“, като резултати между 0.75 и 1.50 определят група от пациенти, които са на границата на адекватен контрол на БА. По литературни данни способността на метода да открива добре контролирана БА е най-оптимална при гранична стойност от 0.75.

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

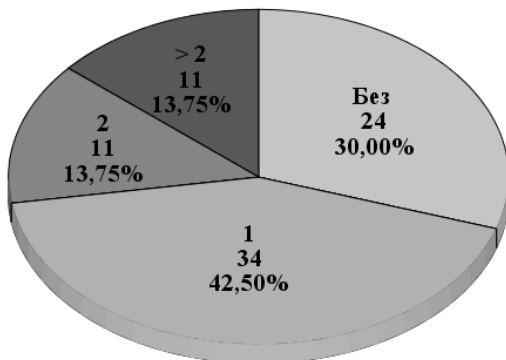
При тези пациентите с непълен контрол на БА ($n=47$; 58.8%) установихме следните корелации:

- ACQ5 и абсолютен брой на кръвните еозинофили: $r=0.495$, $p < 0.001$
- ACQ5 и екзацербации: $r=0.319$, $p=0.029$
- ACQ7 и абсолютен брой на кръвните еозинофили или: $r=0.538$, $p < 0.001$
- ACQ7 и екзацербации: $r=0.413$, $p=0.004$
- АСТ и абсолютен брой на кръвните еозинофили: $r= -0.405$, $p=0.005$

- Абсолютен брой на кръвните еозинофили и FeNO: $r=0.432$, $p=0.002$
- FeNO и промяна на ФЕО1 при БДТ (%): $r=0.311$, $p=0.033$
- CRP и ИТМ: $r=0.475$, $p=0.001$
- Абсолютен брой на кръвните неутрофили и ИТМ: $r=0.302$, $p=0.039$
- Пре ФЕО1 и серумен периостин: $r=-0.437$, $p=0.042$
- Пост ФЕО1 и серумен периостин: $r=-0.475$, $p=0.026$
- Серумен IL-6 и възраст: $r=0.323$, $p=0.027$
- Серумен IL-6 и серумен IL-8: $r=0.327$, $p=0.040$

4.2.2 Екзацербации

Средната честота на екзацербациите през последната една година в нашето проучване беше 1 (0-2) екзацербации (фиг. 12).



Фиг.12 Честота на екзацербациите при пациентите с БА

Броят на екзацербациите през изминалата година корелираше значително с:

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

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

Разделихме пациентите на две групи:

- ≤ 1 екзацербация през изминалата година ($n=58$, 72.5%)
- > 1 екзацербация през изминалата година ($n=22$, 27.5%) – чести екзацербации

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

- Неконтролирана БА според GINA: OR 8.64 (95%CI 2.23-33.52), $p=0.002$
- Кръвни еозинофили ≥ 550 cells/microL: OR 8.16 (95% CI 2.00-33.30), $p=0.003$
- FeNO > 30 ppb: OR 5.96 (95% CI 1.82-19.46), $p=0.003$

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

Ние отчитаме по-висок процент на пациенти с \geq 1 екзацербации (70%) най-вероятно поради селекцията на по-тежка БА в нашето проучване. Иванов и сътр. съобщават за 56% с \geq 1 екзацербации през последната година и 24.6% с две и повече екзацербации. Те установяват, че важни фактори допринасящи за екзацербациите са високата употребата на КДБА, тютюнопушенето и коморбидностите. Други основни рискови фактори описани в литературата, значително се прекриват с описаните от нас: неконтролираната БА, висока употреба на КДБА, неадекватен прием на ИКС, нисък ФЕО1, висока реверзибилност, персистираща експозиция на вредности, коморбидности, повишението на FeNO особено при възрастни пациенти с алергична БА, както и еозинофилия в спутум и периферна кръв.

4.2.3 Функционални показатели

Функционалните характеристики на пациентите с БА са изведени в табл.10 и 11. При 25 (31.3%) установихме персистираща бронхиална обструкция, от които 18 (72%) бяха с ТА ($\chi^2=11.792$, p=0.001), а 6 (24%) с АЕРД ($\chi^2=4.397$, p=0.036). Освен с лош контрол ACQ7 - 2.14 (1.14-2.64) (p=0.001), фиксираната бронхиална обструкция се асоциираше и с по-висок еозинофилен брой - 425 (263-659) cells/microL (p=0.021).

		БА; n=80
Пре ФВК, Z score		-0.94 (-1.88; -0.07)
Пост ФВК, Z score		-0.61 (-1.42; 0.05)
Пре ФЕО1, Z score		-1.49 (-2.78; -0.49)
Пре ФЕО1	<LLN	38 (47.5%)
Пост ФЕО1, Z score		-1.13 (-2.20; -0.16)
Пост ФЕО1	<LLN	29 (36.3%)
Пре ФЕО1/ФВК, Z score		-1.35 (-2.30; 0.04)
Пре ФЕО1/ФВК	<LLN	33 (41.3%)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score		-0.94 (-1.86; 0.27)
Пост ФЕО1/ФВК	<LLN	25 (31.3%)
Промяна на ФЕО1, %		5 (0-13.50)

Резултатите са представени като n (%), медиана и интерквартилен обхват. Съкращения: LLN – долна граница на нормата; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек; ФВК – форсиран витален капацитет;

Табл. 10 Функционални характеристики на пациентите с БА.

	Пре ФЕО1/ФВК > LLN n=46; 57.5%	ФЕО1/ФВК нормализиране след БДТ n=9; 11.3%	Пост ФЕО1/ФВК < LLN след БДТ n=25; 31.3%	p
Жени	33 (71.7%)	6 (66.7%)	13 (52%)	-
ИТМ, kg/m ²	27 (23-33)	25 (23-28)	27 (23-30)	-
Пакетогодини ≥ 10	17 (37%)	3 (33.3%)	7 (28%)	-
Начало	36 (19-50)	43 (35-52)	28 (17-44)	Δ
Продължителност	7 (2.75-14)	3 (2-10.5)	18 (6.5-27.5)	0.001#Δ
Лошо придържане	12 (26.1%)	4 (44.4%)	5 (20%)	-
КАП +/-	39 (84.8%)	7 (77.8%)	15 (60%)	-
АСQ7 резултат	0.71 (0.14-1.85)	0.86 (0.72-2.00)	2.14 (1.14-2.64)	0.003#
АСТ резултат	22 (18-25)	22 (15-24)	19 (16-23)	-
Неконтролирана БА	24 (52.2%)	3 (33.3%)	17 (68%)	-
Екзацербации	1 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-2.5)	-
Тежка БА (ATS/ERS)	14 (30.4%)	3 (33.3%)	18 (72%)	0.003
Терапия стъпка 4/5	29 (63%)	7 (77.8%)	22 (88%)	-
Висока доза ИКС	15 (32.6%)	4 (44.4%)	21 (84%)	0.001
Ниска доза ОКС	4 (8.7%)	1 (11.1%)	5 (20%)	-
Общ IgE, IU/ml	113 (47-278)	181 (66-472)	85 (35-264)	-
FeNO, ppb	26 (16-40)	60 (22-121)	31 (23-66)	0.013*#
FeNO ≥ 30 ppb	20 (43.5%)	6 (66.7%)	14 (56%)	-
FeNO > 50 ppb	6 (13%)	5 (55.6%)	8 (32%)	0.012
b-Eos, cells/microL	283 (190-463)	324 (101-686)	425 (264-659)	#
b-Eos ≥ 300 cells/microL	20 (43.5%)	5 (55.6%)	17 (68%)	-
b-Neu, 10 ⁹ L	4.08 (3.46-5.84)	4.42 (3.43-5.42)	5.42 (4.28-6.08)	-
CRP, mg/L	1.70 (0.80-4.93)	4.10 (1.09-4.90)	2.36 (0.90-4.31)	-
Промяна на ФЕО1, %	2 (0-6.25)	15 (7.5-19)	12 (3.5-20.5)	<0.001*#
IL-5, pg/ml	2.13 (1.77-3.20)	2.65 (1.28-3.48)	2.50 (1.91-3.20)	-
IL-6, pg/ml	1.36 (0.72-2.21)	1.75 (0.31-2.89)	1.40 (0.95-2.27)	-
IL-8, pg/ml	1.55 (0-4.65)	2.05 (0.38-4.10)	1.38 (0-6.94)	-
IL-13, pg/ml	1.08 (0.53-1.83)	0.87 (0-1.11)	1.16 (0.97-5.80)	Δ
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.46-16.68)	14.50 (0.54-27.55)	1.63 (0.50-27.25)	-
Периостин, ng/ml	1.78 (1.16-2.04)	2.11 (1.16-2.65)	1.88 (1.31-1.96)	-

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

*p<0.05 при сравнение на ФЕО1/ФВК норма с ФЕО1/ФВК нормализиране след БДТ
#p<0.05 при сравнение на ФЕО1/ФВК норма с ФЕО1/ФВК < LLN след БДТ
Δp<0.05 при сравнение на ФЕО1/ФВК нормализиране след БДТ с ФЕО1/ФВК < LLN след БДТ

Табл. 11 Характеристики на пациентите според наличие и персистиране на белодробна обструкция установена чрез ФЕО1/ФВК

Установихме следните корелационни зависимости между изследваните функционални характеристики и останалите показатели при БА:

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

Корелациите на ФЕО1 с ACQ и АСТ останаха да персистируют само в групата на пациентите с начална нормална белодробна функция.

Корелацията с ACQ7 беше логична поради включване на ФЕО1 в 7-ми въпрос при оценката на контрола.

Редица проучвания докладват данни за слаба връзка между контрола на симптомите и белодробната функция при пациенти с БА, на базата на които този показател беше изведен от GINA, единствено като маркер за оценка на риска. Поради тази причина проведехме по обстоен анализ на нашите резултати и установихме, че корелационната зависимост между контрола на симптомите и ФЕО1 се запазва единствено в групата от пациенти с начална нормална белодробна функция (без обструкция), но не остава да персистира при оценка на пациентите с начална бронхиална обструкция, независимо от това дали на фона на бронходилатация се постига или не се постига пълна обратимост. Нашите резултати са в подкрепа на данни цитирани от Abuguz и сътр., че пациентите с нормална базална белодробна функция имат по-добра перцепция и проява на симптоми при настъпване на понижение на функционалните показатели. При пациентите със съпътстваща базална обструкция такава асоциация не се наблюдава. Добрият субективно оценен от пациентите контрол не изключва наличието на значителна бронхиална обструкция.

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

Средните стойности на функционалните характеристики при пациентите със СТА и ТА бяха в границите на нормалните показатели, но при сравнение между двете групи пациенти установихме, че ТА се отличава със статистически сигнификантно по-ниски стойности на ФВК, ФЕО1 и ФЕО1/ФВК. Бронхиалната реверзибилност беше представена в почти еднаква степен в двете групи, но по-висока честота на персистираща бронхиална обструкция наблюдавахме в групата на ТА (виж 4.2.4). При 31.3% от всички пациенти установихме пост ФЕО1/ФВК под долната граница на нормата ($z \text{ score} < -1.64$). Характеристиките на тази група с персистираща бронхиална обструкция бяха висока честота на ТА и AERD, лош контрол, високи кръвни еозинофили и изразена продължителност при по-ранно начало на заболяването.

4.2.4 Тежест

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

Табл. 12 Разпределение на пациентите според тежестта на БА определена чрез критериите на GINA и ATS/ERS

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

Пълен контрол (според ACQ7) беше постигнат при 18 (31%) от пациентите с ТА в сравнение с 14 (63.6%) при пациентите със СТА ($\chi^2 = 7.621, p=0.022$). Персистираща бронхиална обструкция се срещаше по-често при ТА (n=22; 37.9%) ($\chi^2=4.382, p=0.036$). Само 6 (10.3%) с ТА и 13 (59.1%) със СТА бяха настоящи пушачи, 32 (55.2%) с ТА и 6 (27.3%) със СТА съответно бяха непущачи, а 20 (34.5%) с ТА и 3 (13.6%) със СТА – бивши пушачи ($\chi^2=20.983, p<0.001$). Всички пациенти с AERD бяха с ТА.

Ние наблюдавахме при ТА (GINA) сигнификантно по-висок резултат за ACQ5 - 1.345 (0.200-2.600) (p=0.025) и ACQ7 - 1.430 (0.428-2.605) (p=0.014), и по-нисък резултат за ACT - 19 (16-23) (p=0.019). ТА се характеризираше с повишени кръвни еозинофили (383 (231-519) cells/microL) (p=0.028), висок FeNO (30.5 (21.8-60.5) ppb) (p=0.020) и пониски функционални показатели – пост ФЕО1 (Z score -1.500 (-2.670; -0.095)) (p=0.030) и пост ФЕО1/ФВК (Z score -1.190 (-2.205; 0.158)) (p=0.020).

II. Според критериите на ATS/ERS 2014 (табл.13): ТА установихме при 35 (43.8%). Подобно на характеристиката на ТА по GINA (виж по-горе): преобладаваше женският пол (n=20; 57.1%), пациентите над 40-годишна възраст (n=26; 74.3%), като 19 (54.3%) бяха с полисенситизация към инхалаторни алергени, а 4 (11.4%) бяха настоящи пушачи. При 7 (20%) установихме AERD. Пълен контрол (според ACQ7) беше постигнат при по-нисък процент (n=5; 14.3%) от пациентите с тежка БА в сравнение с пациентите със средно-тежка БА (n=27; 60%) ($\chi^2 = 20.571, p<0.001$). Подобен резултат установихме и при сравнение на двете групи според постигнат контрол оценен с ACT ($\chi^2=14.819, p<0.001$). Персистираща бронхиална обструкция се срещаше по-често в групата на пациентите с ТА (n=18; 51.2%) ($\chi^2=11.792, p=0.001$), като процента е по-висок от този наблюдаван при ТА, оценена според GINA.

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

	Тежест (ATS/ERS)		p
	СТА n=45	ТА n=35	
Възраст	40 (32-56)	46 (40-58)	-
Пол, жени	32 (71.1%)	20 (57.1%)	-
ИТМ, kg/m ²	25 (22 - 30)	28 (24-33)	-
Затлъстяване	10 (22.2%)	13 (37.1%)	-
Пакегогодини	4.50 (0-10)	0 (0-11)	-
Тютюнопушене, не/бивш/да	18/12/15 (40/26.7/33.3%)	20/11/4 (57.1/31.4/11.4%)	-
Лошо придържане	21 (46.7%)	0	<0.001
Начало	32 (18-48)	35 (20-48)	-
КАП +/-	34 (75.6%)	27 (77.1%)	-
ГЕРБ	13 (28.9%)	11 (31.4%)	-
AERD	3 (6.7%)	7 (20%)	-
Назални полипи	6 (13.3%)	12 (34.3%)	0.026
АСQ5 резултат	0.40 (0-1.20)	2.00 (1.00-3.00)	<0.001
АСQ7 резултат	0.57 (0.14-1.14)	2.14 (1.10-2.86)	<0.001
АСТ резултат	23 (19-25)	17 (14-21)	<0.001
Неконтролирана БА (GINA)	18 (40%)	26 (74.3%)	0.002
Екзацербации / 1 година	1 (0-1)	1 (1-2)	0.014
Терапия, стъпка 4/5	23 (51.1%)	35 (100%)	<0.001
Висока доза ИКС	5 (11.1%)	35 (100%)	<0.001
Ниска доза ОКС	1 (2.2%)	9 (25.7%)	0.002
CRP, mg/L	1.62 (0.66-4.56)	2.81 (1.20-5.10)	-
b-Eos, cells/microL	244 (147-398)	470 (290-651)	<0.001
b-Neu, 10 ⁹ /L	4.42 (3.50-5.53)	5.04 (3.60-6.20)	-
FeNO, ppb	28 (16-47)	31 (22-62)	-
Пре ФВК, z score	-0.33 (-1.07; 0.55)	-1.65 (-2.37; -0.93)	<0.001
Пост ФВК, z score	-0.26 (-0.98; 0.55)	-1.15 (-1.86; -0.53)	<0.001
Пре ФЕО1, Z score	-0.77 (-1.61; -0.15)	-2.49 (-3.18; -1.69)	<0.001
Пост ФЕО1, Z score	-0.50 (-1.14; 0.15)	-2.06 (-2.78; -1.25)	<0.001
Промяна ФЕО1, ml	80 (0-270)	150 (50-260)	-
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-0.96 (-1.77; 0.47)	-1.93 (-2.98; -0.65)	0.003
Пост ФЕО1/ФВК, Z score	-0.66 (-1.39; 0.59)	-1.68 (-2.79; -0.14)	0.001
Пост ФЕО1/ФВК < LLN	7 (15.6%)	18 (51.4%)	0.001
IL-5, pg/ml	2.18 (1.55-3.15)	2.40 (1.90-3.28)	-
IL-13, pg/ml	1.06 (0.30-1.80)	1.15 (0.95-1.67)	-
Периостин, ng/ml	1.78 (1.18-2.00)	1.93 (1.38-2.15)	-
IL-6, pg/ml	1.50 (0.60-2.20)	1.40 (0.98-2.27)	-
IL-8, pg/ml	0.75 (0-3.98)	3.25 (0.50-10.15)	0.047
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.45-18.70)	5.34 (0.51-26.15)	-
Общи IgE, IU/ml	85 (37-229)	181 (59-349)	0.048

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

Табл.13 Характеристики на пациентите според тежестта на БА (ERS/ATS).

Корелации при ТА (ATS/ERS 2014):

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

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

Нашите констатации за ТА значително се прекриват с данните от други проучвания, в които участват големи кохорти на пациенти с ТА.

Ние намерихме значително по-високото ниво на серумен IL-8 при сравнение на ТА със СТА. Zhang и сътр. докладват данни за повишени серумни нива на IL-8 при 246 неконтролирани пациенти с БА и неадекватна редукция в нива при лош клиничен КС отговор. Асоциирането на ТА с повишено ниво на IL-8 в храчките или БАЛ е съобщено по-рано при възрастни и деца. Вероятно IL-8 играе важна роля при рефрактерната неутрофилна астма и е индикатор за неутрофилни фенотипове при пациенти с БА, но ние не открихме допълнителна корелация на IL-8 в групата на ТА с останалите възпалителни и имунологични характеристики.

4.3 Резултати към задача 3

4.3.1 Атопичен статус

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

Характеристики на атопичната БА:

Пациентите с атопична БА бяха на средна възраст 41 (33-57) г. Доминиращ беше женския пол (n=39; 63.9%). Затлъстяване установихме при 18 (29.5%) пациента. Настоящи тютюнопушачи бяха 16 (26.2%) със средна експозиция от 3.5 (0-10) пакетогодини. Началото на БА беше на средна възраст от 30 (17-47) г. с продължителност 10 (3.5-19.5) г. При 14 (23%) установихме лошо придържане към терапията. Честотата на ринит беше 80.3% (n=49), а на ГЕРБ 29.5% (n=18). Средните стойности за ACQ7 и АСТ бяха както следва: 0.86 (0.29-2.14) и 22 (17-25). Неконтролирана БА установихме при 33 (54.1%) от пациентите с атопична БА. При 18 (29.5%) установихме данни за повече от 1 екзацербация през последната една година. ТА (ATS/ERS) имаха 27 (44.3%). Висока доза ИКС използваша 30 (49.2%) от пациентите, а ниска доза ОКС – 6 (9.8%) Средните серумни нива на общи IgE бяха статистически сигнификантно по-високи при сравнение с неатопичната БА - 177.5 (78.4 - 366) IU/ml (U=163,Z=-4.709,p<0.001) и 67.2% имаха нива на общ IgE > 100 IU/ml. Средното ниво на FeNO беше 29 (18-44) ppb, а броя на кръвните еозинофили и неутрофили, както следва - 295 (196-486) cells/microL и 4.68 (3.55-5.88) 10⁹/L. Белодробните функционални показатели в групата бяха както следва: пре ФЕО1, Z score -1.27 (-2.31; -0.26); пре ФВК, Z score -0.63 (-1.78; 0.35); пре ФЕО1/ФВК, Z score -1.17 (-1.96; 0.12); пост ФЕО1, Z score -1,03 (-2.03; -0.03); пост ФВК, Z score -0.42 (-1.41; 0.34); пост ФЕО1/ФВК, Z score -0.83 (-1.64; 0.31). При 15 (24.6%) от пациентите с атопична БА установихме персистираща бронхиална обструкция при средно повишение на ФЕО1 след бронходилатация 4 (0-11) %. Средните серумни нива на интерлевкините, периостина и CRP са отразени на табл. 14.

Характеристики на неатопичната БА:

Пациентите с неатопична БА бяха на средна възраст 51 (35-63) г. Женският пол отново доминираше с по висока честота (n=13; 68.4%). Затлъстяване установихме при 14 (26.3%) пациента. Настоящи тютюнопушачи бяха 3 (15.8%) със средна експозиция от 3.75 (0-15) пакетогодини. Началото на БА беше на средна възраст значимо по-късна от атопичната БА - 43 (30-53) год. (U=389,Z=-2.149,p=0.032) с продължителност 6 (2-18) г. При 7 (36.8%) установихме лошо придържане към терапията. Честотата на ринит беше 63.2% (n=12), а на ГЕРБ 31.6% (n=6). Средните стойности за ACQ7 и АСТ бяха както следва: 1.71 (0.71-2.29) и 18 (15-23). Неконтролирана БА установихме при 11 (57.9%) от пациентите с неатопична БА. При 4 (21.1%) установихме данни за повече от 1 екзацербация през последната една година. ТА (ATS/ERS) имаха 8 (42.1%) от пациентите с неатопична БА. Средните серумни нива на IgE бяха 32 (6.8-53) IU/ml и 15.8% от пациентите с неатопична БА имаха нива на общи IgE > 100 IU/ml. Средното ниво на FeNO беше 30 (18-83) ppb, като значително по-висок процент неатопична БА (n=8; 42.1%), в сравнение с атопичната БА (n=11; 18%) бяха с ниво на FeNO > 50 ppb (p=0.031). Броя на кръвните еозинофили в групата неатопична БА беше 385 (238-522) cells/microL, а на кръвните неутрофили - 4.42 (3.51-6.01) 10⁹/L. Белодробните функционални показатели в групата бяха значимо по-ниски при сравнение с атопичната БА: пре ФЕО1, Z score -2.64 (-3.40; -0.63) (U=364,Z=-2.437,p=0.015); пре ФВК, Z score -1.41 (-2.38; -0.89); пре

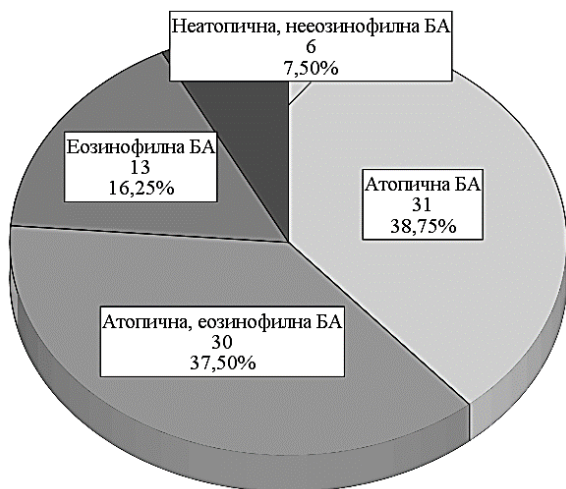
ФЕО1/ФВК, Z score -2.01 (-2.77; -0.65); пост ФЕО1, Z score -1.77 (-2.85; -0.50) (U=378,Z=-2.273,p=0.023); пост ФВК, Z score -1.09 (-1.51; -0.35); пост ФЕО1/ФВК, Z score -1.82 (-2.79; -0.21). При 10 (52.6%) установихме персистираща бронхиална обструкция ($\chi^2 = 5.302, p=0.021$) при средно повишение на ФЕО1 след бронходилатация 10% (3-17%) (U=406,Z=-1.987,p=0.047). Средните серумни нива на интерлевкини и периостина и CRP са отразени на табл. 14.

Не намерихме сигнификантна разлика между атопична БА и неатопична БА при сравнение по тежест, контрол, екзацербации, пакетогодини, ИТМ, симптоми, кръвни еозинофили, серумни нива на IL-5, IL-6, IL-17A, IL-13, IL-8 или периостин ($p>0.05$, за всички сравнения).

	Атопична БА n=61; 76.2%	Неатопична БА n=19; 23.8%
CRP, mg/L	2.04 (0.94-4.75)	2.36 (0.50-4.30)
IL-5, pg/ml	2.22 (1.79-3.40)	2.30 (1.55-3.15)
IL-6, pg/ml	1.40 (0.68-2.11)	1.89 (0.96-3.24)
IL-8, pg/ml *	1.85 (0.05-4.69)	0.55 (0-4.74)
IL-13, pg/ml	1.08 (0.87-2.13)	1.04 (0-1.45)
IL-17A, pg/ml	3.00 (0.52-21.90)	0.51 (0.45-31.40)
Периостин, ng/ml **	1.86 (1.27-2.08)	1.74 (1.18-2.06)

Резултатите са представени в медиана и интерквартилен обхват (IQR); Сравненията са проведени чрез Mann-Whitney U тест. Съкращения: БА – бронхиална астма; CRP – С-реактивен протеин; * IL-8 беше измерен при n=52 с атопична БА и n=18 с неатопична БА; **Периостин беше измерен при n=30 с атопична БА и n=12 с неатопична БА;

Табл. 14 Серумни нива на интерлевкини, периостин и CRP при атопична и неатопична БА.



Фиг.13 Разпределение на пациентите с БА според атопичен статус и абсолютен еозинофилен кръвен брой

Субанализ на групата атопична БА

При атопичната БА установихме две подгрупи на БА с високо еозинофилно възпаление (≥ 300 cells/microL) и БА с ниско еозинофилно възпаление (< 300 cells/microL). Сравнение между подгрупите е представено на табл. 16, фиг.13. Пациентите с атопична, еозинофилна БА бяха по-възрастни (47 (39-57) г.) и с по-късно начало на БА (38 (21-49)г.), в сравнение с атопична, нееозинофилна БА (възраст - 37 (30-49) г., начало-24 (10-38г.)) ($p=0.046$ и $p=0.023$, респективно). Атопичната, еозинофилна БА беше по-лошо контролирана според ACQ и АСТ резултатите. Статистически значимо по-висок процент от пациентите с атопична, еозинофилна БА бяха с тежка БА при сравнение с атопичната, нееозинофилна БА. При пациентите с атопична, еозинофилна БА установихме значимо по-висок неутрофилен кръвен брой и по-високи серумни нива на IL-6. Не открихме значими различия при сравнение на двете групи по пол, коморбидности, тютюнопушене, придържане, екзацербации, белодробната функция, FeNO, серумните нива на общи IgE, CRP, IL-5, IL-8, IL-13, IL-17A и перистин (табл.16)

Субанализ на групата неатопична БА

След анализ на групата с неатопична БА, идентифицирахме две подгрупи на пациенти с високо еозинофилно възпаление (≥ 300 cells/microL) и БА с ниско еозинофилно възпаление (< 300 cells/microL). Това подразделение и сравнение с групата на атопична БА е представено в табл. 16, фиг.13

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

Пациентите с неатопична, еозинофилна БА бяха на средна възраст 54 (43-66) г. ($p<0.05$ при сравнение с атопична БА). Женският пол доминираше. Затлъстяване установихме в 30.8%. Настоящи тютюнопушачи бяха 7.7% със средна експозиция от 3.75 (0-17) пакетогодини. Началото на БА беше на средна възраст от 43 (26-54) год. с продължителност 6 (2.5-20) г. При 4 (30.8%) пациента установихме лошо придържане към терапията. Честотата на ринит беше 61.5%, а на ГЕРБ 23.1%. Средните стойности за ACQ7 и АСТ бяха както следва: 2.14 (1.24-2.86) ($p<0.05$ при сравнение с атопичната БА и неатопичната, нееозинофилна БА) и 18 (12-22). Неконтролирана БА установихме при 10 (76.9%) ($p<0.05$) от пациентите с неатопична, еозинофилна БА. При 4 (30.8%) установихме данни за повече от 1 екзацербация през последната една година. ТА (ATS/ERS) имаха 7 (53.8%) от пациентите с неатопична, еозинофилна БА. Средните серумни нива на IgE бяха 57 (31-94) IU/ml, като само 23.1% от пациентите с неатопична, еозинофилна БА имаха нива на общ IgE > 100 IU/ml. Средното ниво на FeNO беше 67 (23-91) ppb ($p<0.05$ при сравнение с атопичната БА и неатопичната, нееозинофилна БА), а на кръвните еозинофили - 511 (383-797) cells/microL ($p<0.05$ при сравнение с атопичната БА и неатопичната, нееозинофилна БА). Белодробните функционални показатели в групата бяха значително по-ниски при сравнение с атопичната БА и неатопичната, нееозинофилна БА (Табл.15): пре ФЕО1, Z score -3.03 (-3.44; -2.09); пре ФВК, Z score -1.49 (-2.42; -1.21); пре ФЕО1/ФВК, Z score -2.46 (-3.10; -0.89); пост ФЕО1, Z score -2.67 (-2.90; -1.53); пост ФВК, Z score -1.31 (-1.82; -0.78); пост ФЕО1/ФВК, Z score -1.93 (-3.19; -0.87). При 9 (69.2%) от неатопичните, еозинофилни пациенти с БА установихме персистираща бронхиална обструкция ($\chi^2 - 10.582$, $p=0.005$) при средно повишение на ФЕО1 след бронходилатация 13 (5.5-18.5) % ($\chi^2 - 6.072$, $p=0.048$). При сравнение на пациентите с неатопична, еозинофилна БА и атопична, еозинофилна БА установихме различия във функционалните характеристики и нивата на общи IgE, като групата с

неатопична, еозинофилна БА имаше по-ниски ФЕО1 и ФЕО1/ФВК, при по-висока вариабилност, а ниват на общи IgE бяха значително понижени. Различия в останалите характеристики не наблюдавахме (табл. 16). Средните серумни нива на интерлевкините, периостин и CRP са отразени на табл. 16.

Подгрупа на неатопична, нееозинофилна БА

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

Пациентите в тази хрупа имаха следните характеристики: средна възраст 42 (33-60) г. с доминиращ женски пол (n=4; 66.7%) при средна възраст на начало на БА 39 (30-55) г. и продължителност 3 (1.75-6) г. Затлъстяване установихме при 1 (16.7%) пациент. Настоящи тютюнопушачи бяха 33.3% (n=2) със средна експозиция от 6 (0-15) пакетогодини. При 3 (50%) пациента установихме лошо придържане към терапията. Честотата на ринит беше 66.7% (n=4), а на ГЕРБ 50% (n=3). Средните стойности за ACQ7 и АСТ бяха както следва: 0.57 (0.11-1.43) и 20 (17-24). Неконтролирана БА установихме при 1 (16.7%) пациент. Честотата на екзацербациите беше ниска (0.5 (0-1)). ТА (ATS/ERS) имаше 1 (16.7%) от пациентите с неатопична, нееозинофилна БА. Средните серумни нива на IgE бяха 5.6 (2.9-16) IU/ml. Средното ниво на FeNO беше 19 (11-25) ppb, броят на кръвните еозинофили и неутрофили беше съответно - 161 (98-245) cells/microL и 4.04 (3.38-6.65) $10^9/L$. Белодробните функционални показатели в групата бяха както следва: пре ФЕО1, Z score -0.81 (-2.79; -0.31); пре ФВК, Z score -0.88 (-1.84; -0.17); пре ФЕО1/ФВК, Z score -0.82 (-2.02; 0.76); пост ФЕО1, Z score -0.69 (-1.78; -0.22); пост ФВК, Z score -0.44 (-0.95; 0.15); пост ФЕО1/ФВК, Z score -0.57 (-1.79; 0.72). При 1 (16.7%) установихме персистираща бронхиална обструкция при средно повишение на ФЕО1 след бронходилатация 4 (0-21)% (табл.15).

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

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

Табл. 15 Белодробна функция при различните фенотипи формиращи според атопия и еозинофилия.

	Атопична БА		Неатопична, еозинофилна БА n=13
	Неоезинофилна n=31	Еозинофилна n=30	
Възраст*	37 (30-49) ‡	47 (39-57)	54 (43-66)
Пол, жени	21 (67.7%)	18 (60%)	9 (69.2%)
ИТМ, kg/m ²	25 (22-30)	28 (25-34)	28 (23-31)
Затлъстяване	7 (22.6%)	11 (36.7%)	4 (30.8%)
Пакетогодини	3.5 (0-10)	2 (0-13)	3.75 (0-17)
Гюгионопушене, настоящи	10 (32.3%)	6 (20%)	1 (7.7%)
Лошо придържане	9 (29%)	5 (16.7%)	4 (30.8%)
Начало*	24 (10-38) ‡	38 (21-49)	43 (26-54)
Продължителност	14 (5-23)	7 (2.75-17)	6 (2.5-20)
ГЕРБ	8 (25.8%)	10 (33.3%)	3 (23.1%)
Назални полипи	4 (12.9%)	10 (33.3%)	3 (23.1%)
АСQ5 резултат*	0.40 (0-1.20) ‡	1.70 (0.55-3.00)	1.80 (1.15-2.60)
АСQ7 резултат*	0.57 (0.14-1.14) ‡	1.72 (0.71-2.75)	2.14 (1.24-2.86)
АСТ резултат*	23 (19-25) ‡	19 (14-23)	18 (12-22)
Неконтролирана БА*	13 (41.9%)	20 (66.7%)	10 (76.9%)
Тежка БА (ATS/ERS)*	8 (25.8%)	19 (63.3%)	7 (53.8%)
Екзацербации / 1 година	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (1-2)
Терапия, стъпка 4/5	20 (64.5%)	24 (80%)	11 (84.6%)
Висока доза ИКС*	10 (32.3%)	20 (66.7%)	9 (69.2%)
Ниска доза ОКС	2 (6.5%)	4 (13.3%)	4 (30.8%)
CRP, mg/L	1.88 (0.67-4.70)	2.40 (1.28-5.16)	2.60 (0.93-4.49)
b-Eos, cells/microL*	200 (97-250)	486 (414-613)	511 (383-797)
b-Neu, 10⁹/L*	4.01 (3.25-5.46)	5.27 (4.32-6.57) *	5.03 (3.48-6.14)
FeNO, ppb*	27 (16-42) Δ	31.5 (22-55)	67 (23-91)
Пре ФЕО1, Z score*	-0.85 (2.32; 0.08) Δ	-1.51 (-2.43; -0.56)	-3.03 (-3.44; -2.09)#
Пост ФЕО1, Z score*	-0.64 (-1.99; 0.25) Δ	-1.14 (-2.19; -0.16)	-2.67 (-2.90; -1.53) #
Промяна ФЕО1, %*	2 (0-10)	6 (0.75-11)	13 (5.5-18.5) #
Пре ФЕО1/ФВК, Z score	-1.14 (-1.78; 0.37) Δ	-1.42 (-2.12; 0.05)	-2.46 (-3.10; -0.89)
Пост ФЕО1/ФВК, Z score*	-0.66 (-1.43; 0.52) Δ	-1.11 (-1.70; 0.26)	-1.93 (-3.19; -0.87) #
Пост ФЕО1/ФВК < LLN*	7 (22.6%)	8 (26.7%)	9 (69.2%)
Серумен IL-5, pg/ml	2.10 (1.00-3.20)	2.45 (1.94-3.50)	2.65 (1.63-5.00)
Серумен IL-13, pg/ml	1.07 (0.60-2.75)	1.08 (0.89-1.83)	1.15 (0.48-9.30)
Серумен периостин, ng/ml	1.91 (1.66-2.08)	1.56 (0.94-2.06)	1.74 (1.24-1.94)
Серумен IL-6, pg/ml*	0.93 (0.52-1.65) ‡	1.71 (1.14-2.82)	1.90 (1.05-3.52)
Серумен IL-8, pg/ml	1.23 (0-4.33)	2.90 (0.28-9.29)	0 (0-4.55)
Серумен IL-17A, pg/ml	1.63 (0.52-19.50)	4.96 (0.52-24.73)	0.50 (0.43-33.65)
Серумен общ IgE, IU/ml*	171 (52-364) Δ	193 (107-428)	57 (31-94) #

Табл. 16 Анализ на пациентите според атопичен статус и абсолютен брой кръвни еозинофили

Нашите данни са в съответствие с цитираните в литературата характеристики на двата фенотипа – атопична БА с ранно начало и високи IgE и неатопична БА с късно-начало и високи кръвни еозинофили.

Открихме малка група пациенти с неатопична, нееозинофилна БА с доминиране на женският пол, с нормален ИТМ, по-висока честота на СТА и със запазена белодробна функция и контрол. Характеристиката на тази група е в дискрепанс с описан в други проучвания фенотип на нееозинофилна БА при жени със затлъстяване.

Последно описаният фенотип на неатопична, нееозинофилна БА, която е предимно СТА, съответства на представената от Fahy концепция за по-тежка изява на тип 2 БА и по-лека изява на не-тип 2 БА. Това не изключва съществуването на не-тип 2 ТА модифицирана от индивидуални фактори свързани с по-тежка изява на заболяването.

Нашите данни за повишени серумни нива на IL-13 при атопична и неатопична еозинофилна БА в сравнение с неатопична, нееозинофилна БА, подкрепят концепцията за общи T2 имунорегулаторни пътища, независимо от атопичния статус. Вероятно поради тази причина 49.2% от атопична БА показаха комбинирано повишение на кръвните еозинофили ≥ 300 cells/microL, а при 23.1% от пациентите с еозинофилна БА установихме данни за повишение на общите IgE > 100 IU/ml.

В статистически фенотипни проучвания често се съобщава за кълстери с висока честота на атопична БА, които могат да бъдат хетерогенни по отношение на тежестта на симптомите, белодробната функция и тенденцията за екзацербации. В съответствие на това твърдение са нашите данни при атопични пациенти с БА, разделени според нивото на кръвни еозинофили на атопична, еозинофилно и атопична, нееозинофилна БА. Пациентите с атопична, еозинофилна БА бяха по-възрастни с по-късно начало, повече симптоми, по-лош контрол, по-тежка БА, на по-висока доза ИКС и съпътстващо повишение на кръвните неутрофили и IL-6 при сравнение с атопична, нееозинофилна БА.

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

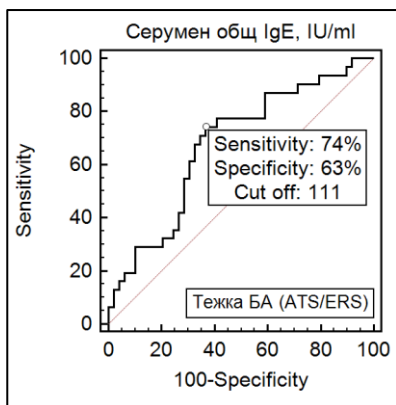
Ние установихме средна стойност (медиана) на серумните общи IgE 119.95 (42.30-289.51) IU/ml, с максимална измерена стойност - 1983 IU/ml и минимална – 0.1 IU/ml.

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

Значително по-високи нива на IgE установихме при атопични пациенти (177.50 (78.40-366.0) IU/ml) в сравнение с неатопични (32 (7-61) IU/ml) ($p < 0.001$), при БА с интермитентен (142.70 (68.9-364.0) IU/ml) или персистиращ (277.00 (126.50-499.50) IU/ml) алергичен ринит в сравнение с БА с неалергичен ринит (48 (11-73) IU/ml) или БА без ринит (48 (29-178) IU/ml) ($\chi^2=21.418$, $p < 0.001$). Пациентите с ТА (ATS/ERS) също бяха с по-високи общи IgE (181 (57-390) IU/ml) в сравнение със СТА (85 (35-253) IU/ml) ($p=0.048$).

От проведения ROC AUC анализ установихме, че граничната стойност от 111 IU/ml има чувствителност 74% (95%CI 55-88) и специфичност 63% (95%CI 48-77) за идентифициране на пациентите с тежка БА (ATS/ERS) AUC 0.750 (95%CI 0.639-0.860), SE 0.057, $p < 0.0001$, Youden index J 0.406 фиг.14

Само частични резултати доказват по-високи нива на общи IgE при ТА в сравнение с ЛБА и СТА, големите кохорти на ТА не отчитат значими различия в нивата му асоциирани с тежестта на БА



Фиг.14 ROC AUC анализ за възможността на серумните общи IgE да идентифицират пациенти с ТА

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

При пациентите с нива на общи IgE ≥ 100 IU/ml установихме по-висока честота на ТА (n=25; 56.8%) и по-висок процент пациенти, провеждащи лечение с висока доза ИКС (n=27; 61.4%), при сравнение с тези с общ IgE < 100 IU/ml (ТА при n=10; 27.85%; употреба на ИКС при n=13; 36.1%) (χ^2 -6.785, p=0.009; χ^2 -9.096, p=0.011, респективно).

Не установихме значими асоциации на нивата на общи IgE с другите изследвани възпалителни и имунологични характеристики. Липсваха ясни зависимости на общите IgE с останалите възпалителни и имунологични показатели, което ни дава основание да свържем този биомаркер единствено с идентификацията на алергичната БА.

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

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

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

Средната стойност (медиана) на b-Eos беше 322 (205-509) cells/microL (максимална измерена стойност - 2125 cells/microL; минимална измерена стойност - 41 cells/microL).

Установихме следните корелации на нивата на броя еозинофили в периферна кръв с:

- ACQ5 резултат: $r=0.441$ (95%CI 0.247-0.604), p<0.001

- ACQ7 резултат: $r=0.473$ (95%CI 0.283-0.628), $p<0.001$
- АСТ резултат: $r=-0.334$ (95%CI -0.516- -0.124), $p=0.002$

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

- ACQ7: $r = 0.379$, $p=0.025$
- серумен IL-5: $r = 0.416$, $p=0.013$

При неконтролирана БА кръвните еозинофили корелираха с:

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

Значително по-висок брой кръвни еозинофили установихме при неконтролирана БА, оценена чрез $ACQ7 \geq 1.5$ (473 (324-697) cells/microL) ($p<0.001$) и $ACT < 20$ (425 (267-518) cells/microL) ($p=0.015$). Броят на кръвните еозинофили беше значително по-висок при AERD (819 (416-960) cells/microL) ($p=0.002$), при $FeNO > 50$ ppb (462 (385-792) cells/microL) ($p=0.010$) и пост ФЕО1/ФВК $< LLN$ (425 (267-576) cells/microL) ($p=0.021$). Установихме значимо по-високи кръвни еозинофили при ТА (ATS/ERS) (470 (290-651) cells/microL) ($p=0.001$), при пациентите с ИТМ ≥ 25 (410 (252-548) cells/microL) ($U=471$, $Z=-2.981$, $p=0.003$) и при тези на висока доза ИКС (465 (278-562) cells/microL) ($\chi^2=15.309$, $p<0.001$) или СКС като стъпка 5 в терапията (645 (294-1106) cells/microL) ($U=184$, $Z=-2.415$, $p=0.016$). При допълнителен анализ установихме, че 90 % от пациентите на лечение с ниски дози СКС или висока доза ИКС имаха добро придържане към терапия.

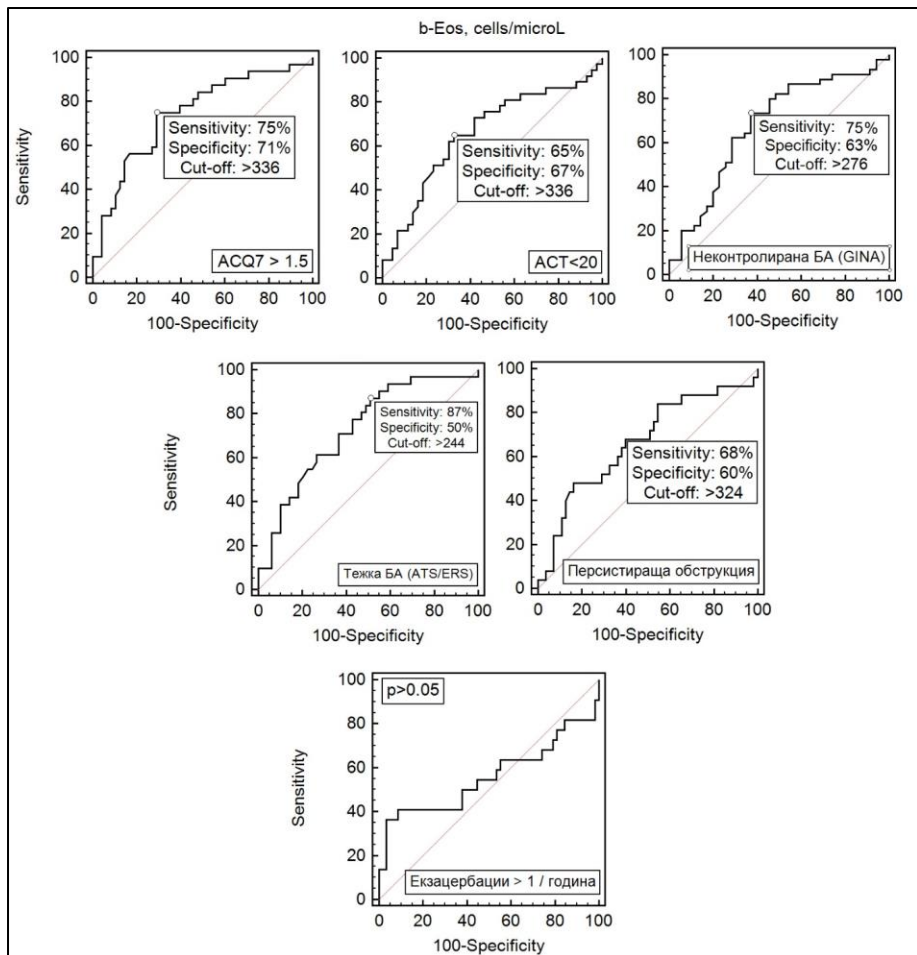
Гранични стойности за броя на кръвните еозинофили, cells/microL	Екзацербации >1		Неконтролирана, GINA		Тежка, ATS/ERS	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
<100 (11.3%) vs ≥ 100 (88.8%)	1.46	0.23	0.46	0.50	1.91	0.17
<150 (16.3%) vs ≥ 150 (83.8%)	0.08	0.77	3.68	0.06	5.08	<0.05
<200 (22.5%) vs ≥ 200 (77.5%)	0.39	0.53	4.41	<0.05	6.92	<0.05
<250 (35%) vs ≥ 250 (65%)	0.03	0.88	9.09	<0.05	11.74	<0.05
<300 (47.5%) vs ≥ 300 (52.5%)	0.05	0.82	7.05	<0.05	8.94	<0.05
<350 (52.5%) vs ≥ 350 (47.5%)	0.60	0.44	10.21	<0.05	8.28	<0.05
<400 (58.8%) vs ≥ 400 (41.3%)	0.96	0.33	4.90	<0.05	11.99	<0.05
<450 (65%) vs ≥ 450 (35%)	0.47	0.50	4.70	<0.05	13.41	<0.05
<500 (73.8%) vs ≥ 500 (26.3%)	3.37	0.07	1.57	0.21	12.18	<0.05
<550 (83.8%) vs ≥ 550 (16.3%)	9.02	<0.05	1.27	0.26	6.94	<0.05

Табл.17 Екзацербации, тежест и контрол според различни гранични стойности за броя на кръвните еозинофили.

Повишение на броя на кръвните еозинофили ≥ 550 cells/microL се асоциираше с повече от 1 екзацербация/година. Ние установихме, че още при гранични стойности от 150 и 200 cells/microL има значими различия в честотата на неконтролирана и тежка БА сред пациентите (табл.17).

Определихме възможността на кръвните еозинофили за отличаване на пациентите с неконтролирана БА, ТА и персистираща бронхиална обструкция (фиг.15):

- Неконтролирана БА от контролирана БА (GINA): Кръвните еозинофили имаха чувствителност 75% (95%CI 60-87) и специфичност 63% (95%CI 46-79) за гранична стойност > 276 cells/microL, Youden index J 0.389 при AUC 0.683 (95%CI 0.570-0.783), SE=0.062, p=0.029.
- Неконтролирана БА от контролирана БА (ACQ7≥1.5): Кръвните еозинофили имаха чувствителност 75% (95%CI 57-89) и специфичност 71% (95%CI 56-83) за гранична стойност > 336 cells/microL, Youden index J 0.458 при AUC 0.744 (95%CI 0.634-0.835), SE=0.058, p<0.0001.
- Неконтролирана БА от контролирана БА (ACT<20): Кръвните еозинофили имаха чувствителност 65% (95%CI 48-80) и специфичност 67% (95%CI 52-81) за гранична стойност > 336 cells/microL, Youden index J 0.323 при AUC 0.658 (95%CI 0.543-0.760), SE=0.063, p=0.012.
- ТА от СТА (ATS/ERS 2014): Кръвните еозинофили имаха чувствителност 87 % (95%CI 70-96) и специфичност 50% (95%CI 34-64) за гранична стойност > 244 cells/microL, при AUC 0.750 (95%CI 0.639-0.860), SE=0.057, p<0.0001.
- Персистираща бронхиална обструкция (пост ФЕО1/ФВК < LLN) от тези без персистираща бронхиална обструкция: Кръвните еозинофили имаха чувствителност 68% (95%CI 47-85) и специфичност 60% (95%CI 46-73) за гранична стойност > 324 cells/microL при AUC 0.662 (95%CI 0.528-0.797), SE=0.069, p=0.018.



Фиг.15 ROC AUC анализ за способността на броя на кръвните еозинофили да идентифицира пациенти с неконтролирана БА, тежка БА, БА с персистираща обструкция и БА с чести екзацербации (повече от 1 екзацербация за година).

Характеристиките на неоеозинофилна БА ($b\text{-Eos} < 300 \text{ cells/microL}$) и еозинофилна БА ($b\text{-Eos} \geq 300 \text{ cells/microL}$) са отразени на табл.18

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

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

Табл.18 Характеристики на еозинофилна и неоеозинофилна БА.

Броят на еозинофилите в периферната кръв е лесно приложим и универсално достъпен сурогатен биомаркер за еозинофилия на дихателните пътища, който е широко използван през последните години. Мета-анализ на 14 проучвания (2405 пациента) намира чувствителност 71% и специфичност 77% на кръвните еозинофили при идентифицирането на спутумна еозинофилия. Оптималната гранична стойност за определяне на еозинофилно възпаление в дихателните пътища чрез кръвните еозинофили най-вероятно попада в границите между 150 и 400 cells/microL.

4.3.4 Фракция на издишан азотен окис (FeNO)

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

Установихме следните корелации на нивата на FeNO с:

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

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

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

- екзацербациите: $r = 0.429$, $p=0.010$

- серумен IL-13: $r = 0.414$, $p=0.014$

Корелации на FeNO при неконтролирана БА с:

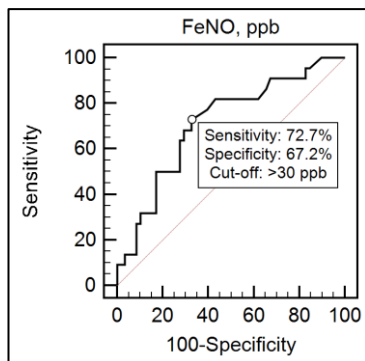
- броя кръвни еозинофили: $r=0.432$, $p=0.002$

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

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

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

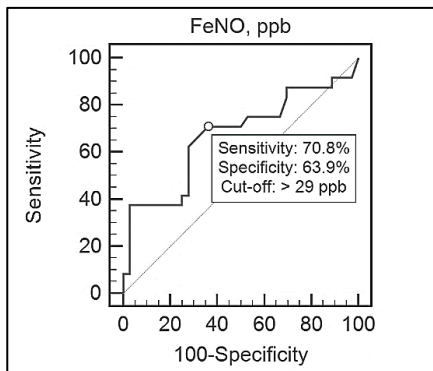
От проведения ROC AUC анализ установихме, че граничната стойност на FeNO от 30 ppb имаха чувствителност 72.7% (95%CI 50-89) и специфичност 67.2% (95%CI 54-79) за идентифициране на чести екзацербатори с БА (> 1 екзацербации/година) AUC 0.713 (95%CI 0.601-0.809), SE 0.065, $p=0.001$, Youden index J 0.399 (фиг.16).



Фиг. 16 ROC AUC анализ за възможността на FeNO да идентифицира чести екзацербатори при БА (> 1 екзацербации/година).

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

Способността на FeNO за дискриминиране на пациентите с лош контрол от тези с пълен контрол, определен по GINA, (в анализа не са включени пациенти с частичен контрол) беше с чувствителност 70.8% (95%CI 49-87) и специфичност 63.9% (95%CI 46-79) за гранична стойност > 29 ppb при AUC 0.671 (95%CI 0.537-0.787), SE=0.076, p=0.025 (Фиг.17).



Фиг.17 ROC AUC анализ на FeNO за разграничаване на пациентите с лош контрол от тези с пълен контрол (GINA) (в анализа не са включени пациентите с частичен контрол)

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

Табл.19 Екзацербации, тежест и контрол според различни гранични стойности за FeNO.

Разпределението на пациентите при зададени предварително гранични стойности според препоръките на ATS от 2011 г. беше както следва: < 25 ppb: n=32 (40%), 25-50 ppb: n=29 (36.3%), > 50 ppb: n=19 (23.8%).

Нива на FeNO > 50 ppb бяха асоциирани с пре ФЕО1/ФВК < LLN (n=12,63.2%) ($\chi^2=4.935, p=0.026$), пре ФЕО1 < LLN (n=13,68.4%) ($\chi^2=4.373, p=0.037$), кръвни еозинофили \geq 250 cells/microL (n=16, 84.2%) ($\chi^2=4.042, p=0.044$) и неконтролирана БА (n=15, 78.9%) ($\chi^2=5.774, p=0.016$).

Пациентите с FeNO > 50 ppb имаха значително по-високи нива на кръвни еозинофили (462 (385-792) cells/microL) (U=353, Z=-2.561, p=0.010) и по-ниски функционални показатели (преФЕО1/ФВК, Z score -1.99 (-2.50;-1.42), постФЕО1/ФВК, Z

score -1.40 (-1.93; -1.10)) (U=319,Z=-2.945,p=0.003, U=332,Z=-2.804,p=0.00, респективно) в сравнение с пациентите с FeNO \leq 50 ppb (еозинофили 276 (191-469) cells/microL, пре ФЕО1/ФВК, Z score -0.90 (-2.03;0.36), пост ФЕО1/ФВК, Z score -0.54 (-1.82;0.45)).

Пациентите с FeNO > 50 ppb демонстрираха по-изразен бронходилататорен отговор и промяна във ФЕО1 с 11 (4-20) %, в сравнение с 3 (0-10) % за пациентите с FeNO \leq 50 ppb (U=320, Z=-2.963, p=0.003).

Честотата на пациентите с кръвни еозинофили \geq 300 cells/microL според различни гранични стойности за FeNO е показана на табл. 20

		b-Eos cells/microL			
		< 300		\geq 300	
		Брой	%	Брой	%
FeNO, категории	< 30 ppb	23	60.5%	17	40.5%
	\geq 30 ppb	15	39.5%	25	59.5%
	\leq 50 ppb	34	89.5%	27	64.3%
	> 50 ppb	4	10.5%	15	35.7%

Табл.20 Асоциация на нивата на FeNO с b-Eos

Нашите данни са в съгласие с наблюдаваните позитивни умерени корелационни зависимости на FeNO с кръвните еозинофили. Установихме, че 39.5% от пациентите с FeNO \geq 30 ppb са с кръвни еозинофили < 300 cells/microL, а други 40.5% от пациентите с FeNO < 30 ppb са с кръвни еозинофили \geq 300 cells/microL. Този дискрепанс е подобен на описания от Ctesro и сътр при анализ на FeNO и еозинофили в спутума при пациенти провеждащи лечение с ИКС.

Фенотипното характеризиране на пациенти провеждащи терапия, може да бъде сложно поради повлияване на биомаркерите от провежданото лечение. Ние предполагахме, че бихме могли по този начин да идентифицираме неповлияващите се маркери от настоящата терапия, които биха оформили отделни фенотипи на фона на лечение. Възможно е по-ниските нива на FeNO при пациентите с повишени кръвни еозинофили да се дължат на лечението с ИКС, което локално повлиява нивото на FeNO, или да са понижени вследствие подтиснато образуване или повишена консумация поради тютюнопушене, затлъстяване или под въздействие на други фактори свързани с повишен оксидантен стрес. Нашите данни също потвърдиха понижението на FeNO при настоящи тютюнопушачи, както и при фенотип със затлъстяване.

Jones и сътр. докладват, че FeNO е свързан с положителна прогностична стойност за загуба на контрол между 80 и 90%. Нашите резултати не потвърдиха способността на FeNO да открива неконтролирана БА, въпреки че при силно изразени крайности в контрола (много добър и много лош контрол), нива над 29 ppb имат 70.8% чувствителност и 63.9% специфичност за идентифициране на лошо контролирана БА. Това най-вече се дължи на факта, че нивата на FeNO в общата група пациентите с БА отразяват подлежащите възпалителните механизми при конкретни фенотипи, докато допълнителни фактори могат да въздействат с различна сила върху контрола на БА при друга част от пациентите.

Асоциацията на FeNO с честотата на екзацербациите я коментирахме по горе в текста.

Интересни са данните, че FeNO е значимо повишен в групата на пациенти с висока употреба на КС, аналогично на нивата на кръвните еозинофили, което наблюдавахме при неатопична еозинофилна БА с високо придържане и персистираща

бронхиална обструкция. Това вероятно е във връзка с коментираната резистентност на локалното възпаление при по-тежки форми на еозинофилна БА.

В допълнение, ние установихме същевременно значимо повишение на FeNO в групата на пациентите с преФЕО1/ФВК < LLN и изразена реверзибилност до нормализиране на съотношението след БДТ, тъй като в тази група бяха селектирани 44.4% пациенти с лошо придържане към терапията, предимно атопични. Ние предполагаем, че FeNO може да се използва за идентифициране на пациентите с лош къмплайнс в практиката.

Повишените нива на FeNO регистрирани при еднократно измерване трябва да се оценяват внимателно и в комплексност с други измервания и клинични корелации. Сериен измерване след подобряване на придържането с цел отчитане динамиката в нивата на FeNO е изключително полезно при отчитане на степента на повлияване на възпалението.

4.3.5 С-реактивен протеин (CRP)

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

Установихме следните на нивата на CRP при БА с:

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

Корелации на CRP при СТА:

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

Табл. 21 Корелации на CRP и IL-6 в групата на СТА

** p<0.01; * p<0.05

Корелации на CRP при неконтролирана БА с:

- ИТМ: $r=0.475$, $p=0.001$

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

- серумен периостин: $r = 0.657$, $p=0.008$

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

Нивата на CRP при пациентите с БА в нашето проучвания очаквано показва асоциация с ИТМ и IL-6. CRP беше повишен при по-възрастни пациенти с БА, аналогично на серумните нива на IL-6. CRP и IL-6 са два функционално свързани биомаркера. Производството на С-реактивен протеин в черния дроб се стимулира от IL-6. IL-6 и CRP се разглеждат, като възпалителни биомаркери и често в литературата се използват за оценка на наличието и тежестта на нискостепенно възпаление. При субанализ на СТА открихме корелация на CRP с ИТМ, IL-6 и кръвните неутрофили и на IL-6 съответно с CRP, кръвните неутрофили и възрастта. Подобни корелационни зависимости не наблюдавахме в групата на ТА, което ни кара да мислим че нивата на CRP и IL-6 имат допълнителни имунологични стимули, които повлияват резултата при ТА.

При ТА установихме силна асоциация между нивата на CRP и серумен периостин, които пропорционално съвместно нарастват в корелационна връзка. Не открихме в литературата данни за подобна асоциация между CRP и серумните нива на периостина. Ние предполагаме, че повишените нива на периостин при БА са свързани с нискостепенно възпаление в следствие на персистиращи увреждащи фактори в дихателните пътища, които от своя страна водят до асоциацията на периостин с понижените нива на белодробна функция.

4.4 Резултати към задача 4

Серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A и периостин бяха статистически значимо по-високи при БА в сравнение със ЗК (табл.22).

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

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

Табл.22 Серумни нива на изследваните интерлевкини и периостин при БА и ЗК.

4.4.1 Серумни нива на интерлевкин 5 (IL-5)

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

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

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

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

Тези резултати са в подкрепа на концепцията за тип 2 имунен отговор и доминиращ IL-5 медиран път за персистиращо, еозинофилно възпаление при клинична изява на ТА при AERD

4.4.2 Серумни нива на интерлевкин 6 (IL-6)

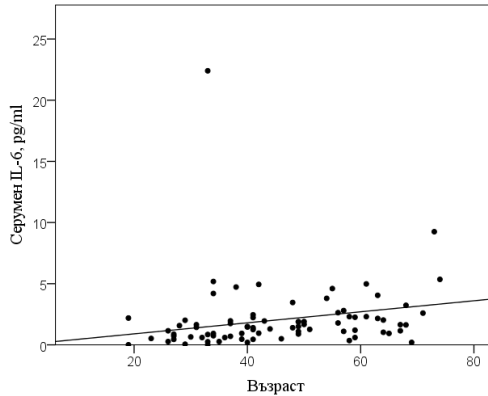
Ние определихме средната стойност (медиана) на серумните нива на IL-6 при БА - 1.45 (0.73-2.25) pg/ml при максимално измерена стойност - 22.40 pg/ml и минимална – 0 pg/ml.

Серумните нива на IL-6 корелираха с:

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

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

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



Фиг.18 Корелация между серумните нива на IL-6 и възрастта при пациентите с БА

IL-6 е проинфламаторен медиатор, изследван при редица хронични възпалителни заболявания. Неговото повишение с възрастта може да предполага настъпване на имунорегулаторни дефекти в клетъчната функция.

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

4.4.5 Серумни нива на интерлевкин 8 (IL-8)

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

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

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

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

При прилагане на 95-я перцентил от групата на ЗК за IL-8 (8.30 pg/ml), като гранична стойност, дефинирахме подгрупи пациенти с нисък IL-8 (≤ 8.30 pg/ml) ($n=60$, 85.7%) и висок IL-8 (> 8.30 pg/ml) ($n=10$, 14.3%). Пациентите с висок IL-8 бяха предимно с неконтролирана БА (ACQ7 - 2.28 (1.29-2.90)) ($U=163$, $Z=-2.303$, $p=0.021$), с по-нисък постФЕО1, Z score (-2.59 (-3.12; -0.52)) ($U=182$, $Z=-1.981$, $p=0.048$) и по-висок IL-6 (2.13 (1.33-6.20) pg/ml) ($U=156$, $Z=-2.425$, $p=0.015$).

4.4.3 Серумни нива на интерлевкин 13 (IL-13)

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

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

- FeNO: $r = 0.414$, $p = 0.014$

Този резултат е в съответствие с данните за индуциран от IL-13 синтез на FeNO в дихателните пътища на тип 2 БА. Тази връзка е доказана в клиничните проучвания за биологично лечение.

При прилагане на 95-я перцентил от групата на ЗК за IL-13 (3.30 pg/ml), като гранична стойност, дефинирахме подгрупи пациенти с нисък IL-13 (≤ 3.30 pg/ml) ($n=63$, 78.8%) и висок IL-13 (> 3.30 pg/ml) ($n=17$, 21.3%). Пациентите с висок IL-13 имаха значително по-високи нива на IL-5 (3.20 (2.53-4.10) pg/ml) ($U=279$, $Z=-3.024$, $p=0.002$) и по-нисък IL-17A (0.50 (0.45-0.78) pg/ml) ($U=276$, $Z=-3.053$, $p=0.002$). Тези резултати подкрепят концепцията за тип 2 БА с едновременно повишение на ключови тип 2 IL, като IL-5 и IL-13 и не тип 2 БА с нисък тип 2 IL-13 и повишение на IL-17A.

4.4.4 Серумни нива на интерлевкин 17A (IL-17A)

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

Серумните нива на IL-17A корелираха със:

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

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

4.4.6 Серумни нива на периостин

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

Установихме следните корелации между нивата на периостин и:

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

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

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

- пре ФЕО1: $r=-0.437$, $p=0.042$

- пост ФЕО1: $r=-0.475$, $p=0.026$

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

От друга страна при неконтролирана БА установихме зависимо понижение на ФЕО1 при повишени нива на периостин. Литературни данни предполагат тясна връзка между периостин и фиброгенеза в отговор на белодробно увреждане.

Ние предполагаме, че повишените нива на периостин при БА са свързани с нискостепенно възпаление в следствие на персистиращи увреждащи фактори в дихателните пътища, които от своя страна водят до асоциацията на периостин с понижените нива на белодробна функция. За съжаление, неможахме да потвърдим ролята на периостина, като биомаркер за тип 2 БА.

Ние не установихме асоциация на серумния периостин с други тип 2 биомаркери при БА, като тези наши резултати са в подкрепа на данни докладване от Agache и сътр., и Wagener и сътр.

4.5 Резултати към задача 5

Независимо от успешното идентифициране на различни фенотипни особености в нашата кохорта пациенти с БА (астма с ранно начало, астма с късно начало, atopична БА, еозинофилна БА, БА при затлъстяване, чести екзацербатори, астма при тютюнопушачи, астма с хронична обструкция, AERD и др.), установихме значително припокриване на възпалителните характеристики (нива на кръвни еозинофили, FeNO, общи IgE) сред различните фенотипни групи. За съжаление подходът за фенотипизиране, базиран на клиничните признаци може да не доведе до изясняване механизмите на БА. Това се потвърждава в проучването U-BIOPRED, след като анализи на проби от дихателните пътища и кръв не бяха в състояние да предоставят полезна информация за основните механизми на заболяването при предварително дефинираните клинични групи. Тези анализи доведоха до развитие на стратегии за фенотипизиране, базирани на възпалителните характеристики, чрез анализ на биомаркери свързани с определен спутумен цитологичен модел и последващо развитие на молекулярни и генетични подходи за фенотипизиране. В 50-70% от случаите са открити характеристики за имунен отговор от тип 2, на базата на изследвани биомаркери, като най-често използваните за дефиниране на T2 БА са кръвните еозинофили и FeNO. Използването на серумни интерлевкини (IL) за оценка на възпалението на дихателните пътища е ограничено, тъй като те са предимно локални медиатори, поради което изследване на индуциран спутум и БАЛ (инвазивни и отнемачи време процедури) са по-надеждни. От друга страна, предполагаме, че може да съществува системна възпалителна реакция, която да се открива в серумни проби при резистентна на лечение БА и може да е причина за поддържане на локалното възпаление, въпреки инхалаторната терапия. В този случай измерването на серумните интерлевкини в комбинация с други биомаркери може да бъде полезна стратегия при откриването и оценката на тежките терапевтично резистентни подгрупи на БА. Редица автори докладват откриваеми нива на ILs в БАЛ, спутум и също в серум. В литературата липсват данни за директни сравнения на нивата на IL в БАЛ/храчка и серума от една и съща популация БА, но две проучвания на Akiki и сътр. и Liang и сътр. потвърждават съществуването на отделни серумни IL-модели при пациенти с БА. Те предполагат, че измерването на IL в кръвта може да бъде полезно при оценката на TA. Llano и сътр. от друга страна използват серумните нива на IL-6, 8, 5, 13, 17, TNF-алфа и периостин за оценка на група пациенти с бронхообструктивни състояния (ХОББ, БА и АСО) и доказват смесен възпалителен модел при АСО, комбиниран между характеристиките на БА и ХОББ. Те установяват по-високи средни серумни нива на IL-5 при пациентите с БА, и на IL-8 при тези с ХОББ. Периостинът в тяхното проучване не е показал категорична способност за дискриминиране между групите, докато IL-13 се е оказал основно свързващо звено в мрежовия анализ и при трите групи. Тези констатации

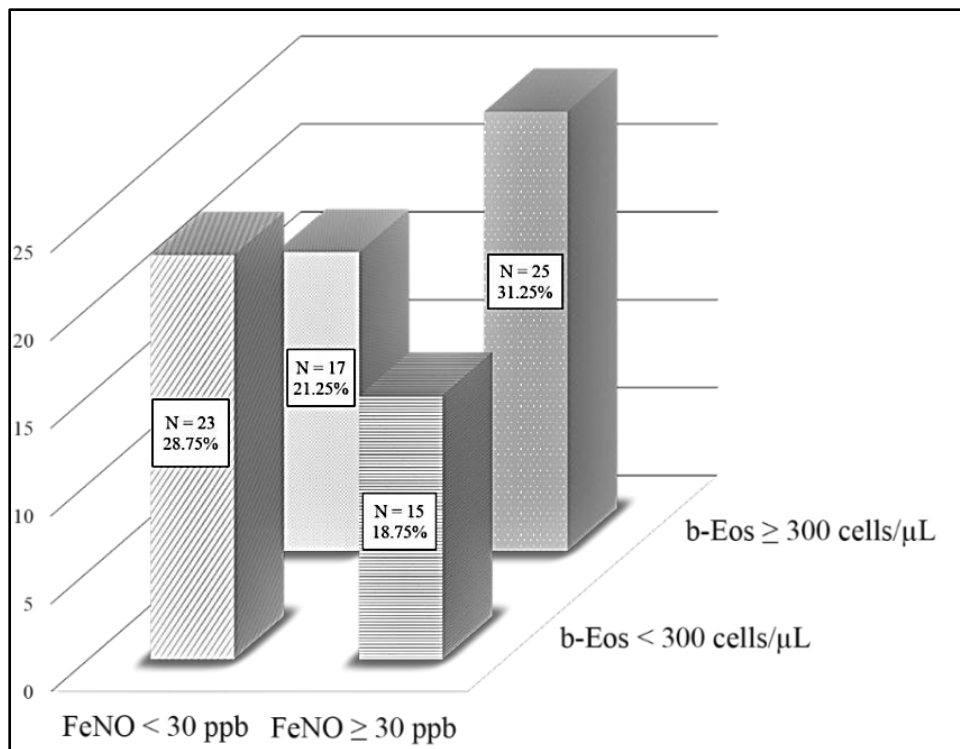
са в съответствие с хетерогенния възпалителен фон на пациенти с хронични бронхообструктивни състояния, вероятно континуум между не тип 2 и тип 2 възпаление със значително припокриване в голяма част от случаите.

Ние предполагахме, че класифицирането на пациентите със СТА и ТА от реалната клинична практика, в зависимост от наличието или отсъствието на системен и локален тип 2 възпалителен отговор, може да ни даде информация за комплексния имунологичен профил на всяка група.

Класифицирахме пациентите според резултатите от изследваните тип 2 биомаркери – FeNO и b-Eos. Избрахме именно тях, тъй като в нашата кохорта те показва значими възможности за отдиференциране на отделни групи пациенти, докато общите IgE и периостина не демонстрираха такива. Определихме 4 отделни групи, след като избрахме гранична стойност за кръвните еозинофили ≤ 300 cells/microL, а за FeNO ≤ 30 ppb на база на литературните данни. Граничната стойност от 300 cells/microL за кръвните еозинофили е широко приета за дефиниране на тип 2 еозинофилна БА. Средното ниво на кръвните еозинофили в нашата популация също беше много близо до тази гранична стойност, което ни осигури равномерно разпределение на групите. В литературата са анализирани много различни гранични стойности за FeNO в зависимост от целта на изследването (диагностична способност при КС наивни пациенти, ръководене на терапията с ИКС, използване като биомаркер за еозинофилна астма и др.) и популациите (непушачи, пушачи, ЛБА или ТА и др.). Граничните стойности за FeNO при откриване на еозинофилна астма варират в широки граници - от 19 ppb до 76 ppb, но най-често се използват стойности от 20 до 35 ppb. Ние използвахме гранична стойност за FeNO - 30 ppb, базирайки се на литературните данни. От друга страна нивата на FeNO ≥ 30 ppb показваха ясна зависимост с екзацербациите, както и е близо до средното ниво в нашата популация, което ни осигурява равномерно разпределение на пациентите в групите.

Базирана на биомаркери фенотипизация:

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



Фиг.19 Разпределение на пациентите в четири групи според FeNO и еозинофилите в кръвта.

Установихме статистически значими различия между групите при сравнение по възраст, ИТМ, тютюнопушене, пакетогодини, начало на БА, контрол, екзацербации, тежест, терапия, кръвни неутрофили, CRP, бронхиална реверзибилност (табл.23,24). Нивата на общи IgE бяха без статистически значими различия между групите, докато честотата на атопичните пациенти (позитивни КАП) беше както следва: група 1 – 78.3%, група 2 – 76.2%, група 3 – 86.7%, група 4 – 68% (табл.23).

Серумните нива на IL-5 бяха сигнификантно по-високи в група 2 ($p < 0.05$ за всички сравнения). Нивата на IL-6 и IL-13 бяха статистически сигнификантно повишени в групи 2, 3 и 4 ($p < 0.05$ в сравнение със ЗК). IL-6 беше сигнификантно повишен в група 2 и 4 при сравнение с група 1. Не наблюдавахме статистически значими разлики в нивата на IL-8 между анализираните групи и ЗК, но се отчете тенденция за по-висок IL-8 в група 1 при сравнение със ЗК. Нямаше значителна разлика в нивата на IL-13 между предварително дефинираните групи БА. Установихме, че IL-17A е значително повишен във всичките 4 групи на БА, в сравнение със ЗК ($p < 0.05$), като най-високи нива на IL-17A се намериха в групи 3 и 4. Серумните нива на периостин бяха сигнификантно повишени във всички групи при сравнение със ЗК. (табл.25, 26 ; фиг.20).

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

	↓FeNO/↓b-Eos Група 1 N=23 (28.8%)	↓FeNO/↑b-Eos Група 2 N=17 (21.3%)	↑FeNO/↓b-Eos Група 3 N=15 (18.8%)	↑FeNO/↑b-Eos Група 4 N=25 (31.3%)	p
	T2 ниска БА при атопични пушачи	T2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване	T2 висока БА с атопия и чести екзацербации	T2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна БА	
Възраст, години	<i>37.9 ±13.9</i>	<i>51.5 ±12.6</i>	<i>49 ±16.3</i>	<i>45.8 ±12.6</i>	0.010 ¹
Пол, жени/мъже	17/6 73.9/26.1%	9/8 52.9/47.1%	9/6 60/40%	17/8 68/32%	-
ИТМ, kg/m ²	24.3 (20.3-27.8)	29.6 (25.9-33.9)	25.7 (22.7-30.3)	26.7 (23.7-30.1)	0.033 ²
Затлъстяване	4 (17.4%)	8 (47.1%)	4 (26.7%)	7 (28%)	-
Тютюнопушене Не/Ех/Да	7/5/11 30.4/21.7/47.8%	8/5/4 47.1/29.4/23.5%	11/3/1 73.3/20/6.7%	12/10/3 48/40/12%	0.026
Пакетогодини	5 (0-10)	4 (0-10)	0 (0-2)	3.8 (0-15)	*
Начало, възраст	28 (19-38)	43 (19-51)	25 (7-57)	37 (28-49)	**
Начало, групи <20/20-40/>40	7/12/4 30.4/52.2/17.4%	5/3/9 29.4/17.6/52.9%	7/2/6 46.7/13.3/40%	3/12/10 12/48/40%	0.026
КАП отр/моно/поли	5/5/13 21.7/21.7/56.5%	4/3/10 23.5/17.6/58.8/	2/5/8 13.3/33.3/53.3%	8/6/11 32/24/44%	-
ACQ5	0.6 (0-1.6)	1 (0.2-2.0)	0.2 (0-1.2)	2.2 (1.0-3.0)	0.001 ³
ACQ7	0.71 (0.14-1.43)	1.42 (0.29-2.14)	0.29 (0.14-0.86)	2.14 (1.10-2.86)	<0.001 ⁴
ACT	22 (18-25)	22 (16-25)	23 (17-25)	18 (13-21)	0.006 ⁵
Неконтролирана БА	10 (43.5%)	7 (41.2%)	5 (33.3%)	22 (88%)	0.001
Екзацербации	1 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (1-2.5)	0.007 ⁶
Екзацербации > 1/год.	4 (17.4%)	1 (5.9%)	6 (40%)	11 (44%)	0.021
Тежка БА (ATS/ERS)	6 (26.1%)	9 (52.9%)	4 (26.7%)	16 (64%)	0.024
Терапия, стъпка 4/5	11 47.8%	13 76.5%	13 86.7%	21 84%	0.018
Висока доза ИКС	6 (26.1%)	9 (52.9%)	6 (40%)	19 (76%)	0.001
Ниска доза ОКС	0	1 (5.9%)	3 (20%)	6 (24%)	0.051
Придържане, лошо	8 (34.8%)	4 (23.5%)	4 (26.7%)	5 (20%)	-

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

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

² p<0.05 група 1 сравнена с група 2;

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

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

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

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

* p<0.05 група 1 сравнена с група 3;

** p<0.05 група 1 сравнена с група 4;

Съкращения: ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACT – тест за контрол на астмата; ACQ – въпросник за контрол на астмата; ИКС – инхалаторен кортикостероид; ОКС – орален кортикостероид;

Табл. 23 Демографски, клинични и терапевтични характеристики на изследваните групи, формиращи на базата на FeNO и b-Eos

	↓FeNO/↓b-Eos Група 1 N=23 (28.8%)	↓FeNO/↑b-Eos Група 2 N=17 (21.3%)	↑FeNO/↓b-Eos Група 3 N=15 (18.8%)	↑FeNO/↑b-Eos Група 4 N=25 (31.3%)	p
	T2 ниска БА при атопични пушачи	T2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване	T2 висока БА с атопия и чести екзацербации	T2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна БА	
Общ IgE, IU/ml	94.9 (13.4-220.5)	85.1 (38.9-247.1)	102.8(42.9-356)	174.7 (65-374.1)	-
Общ IgE > 100 IU/ml	11 (47.8%)	8 (47.1%)	8 (53.3%)	17 (68%)	-
FeNO, ppb	16 (10-23)	21 (16-24)	42 (30-54)	62 (40-86)	<0.001 ¹
b-Eos, cells/microL	207 (118-260)	504 (389-626)	200 (94-250)	476 (413-767)	<0.001 ²
b-Neu, 10 ⁹ L	4.0 (3.5-5.6)	5.7 (4.7-6.6)	3.3 (2.6-5.5)	5.0 (4.1-6.2)	<0.006 ³
CRP, mg/L	1.13 (0.56-3.40)	3.57 (2.00-8.05)	3.86 (1.12-6.10)	1.78 (0.70-4.21)	0.023 ⁴
Пре ФЕО1, Z score	-1.12 (-2.39;0.20)	-2.15 (-3.33;-0.41)	-0.85 (-3.07;-0.16)	-1.81 (-2.78;-0.87)	-
ПреФЕО1/ФВК, Z score	-0.96 (-1.69;0.47)	-1.53 (-2.86;0.47)	-1.34 (-1.92;0.12)	-1.91 (-2.43;-0.54)	-
ПреФЕО1/ФВК < LLN	6 (26.1%)	8 (47.1%)	6 (40%)	13 (52%)	-
Пост ФЕО1, Z score	-0.89 (-1.91; 0.25)	-1.83 (-2.77; -0.37)	-0.64 (-2.05; 0.20)	-1.36 (-2.44; -0.37)	-
ПостФЕО1/ФВК, Z score	-0.54 (-1.43; 0.56)	-1.34 (-2.62; 0.46)	-0.82 (-1.68; 0.24)	-1.40 (-1.88; -0.045)	-
ПостФЕО1/ФВК < LLN	4 (17.4%)	7 (41.2%)	4 (26.7%)	10 (40%)	-
промяна ФЕО1, %	3 (0-8)	2 (0-12)	5 (0-17)	8 (4-17)	0.028 ⁵
Промяна ФЕО1, ml	60 (0-230)	50 (0-195)	100 (10-390)	180 (80-320)	0.049 ⁵

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

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

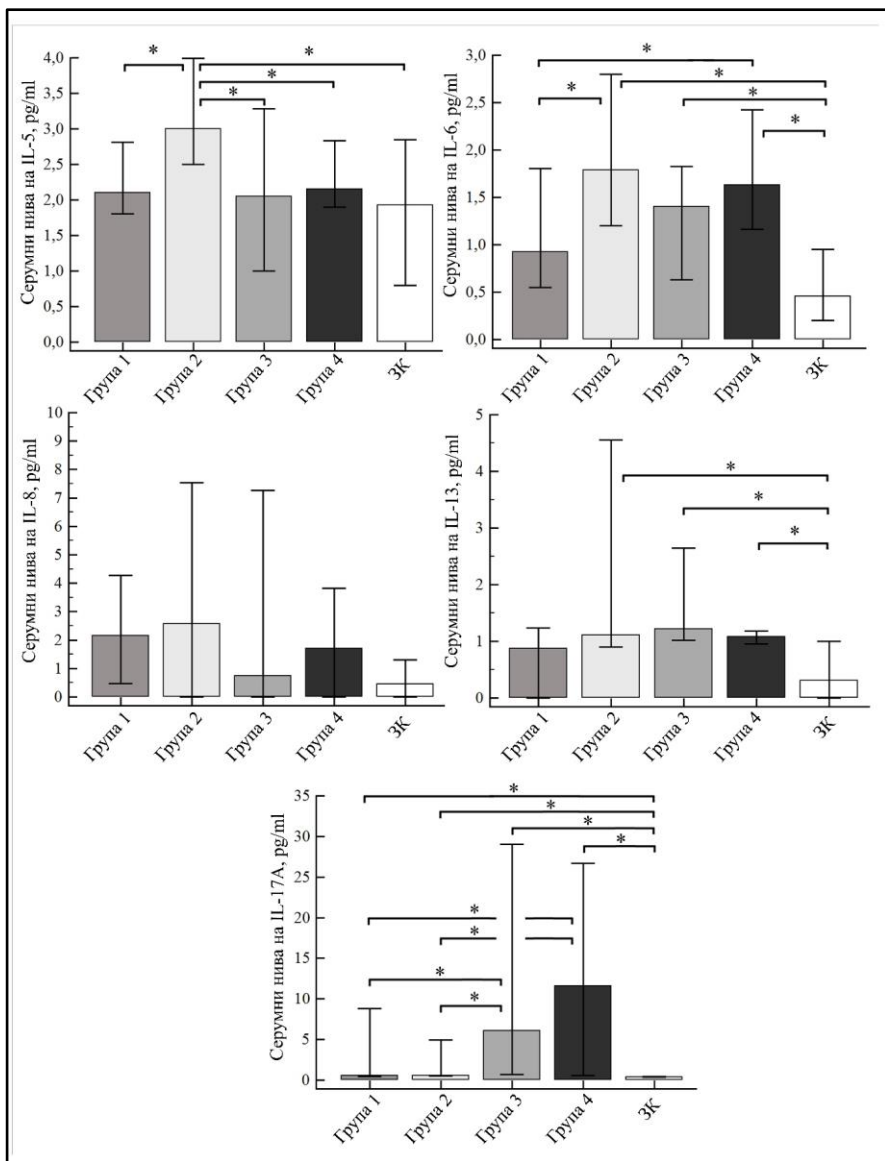
Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; CRP – С-реактивен протеин; LLN – долна граница на нормата;

Табл.24 Функционални и възпалителни характеристики на изследваните групи, формирани на базата на FeNO и b-Eos

	↓FeNO/↓b-Eos Група 1 N=23 (28.8%)	↓FeNO/↑b-Eos Група 2 N=17 (21.3%)	↑FeNO/↓b-Eos Група 3 N=15 (18.8%)	↑FeNO/↑b-Eos Група 4 N=25 (31.3%)	p
	T2 ниска БА при атопични пушачи	T2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване	T2 висока БА с атопия и чести екзацербации	T2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна БА	
IL-5, pg/ml	2.10 (1.75-2.95)	3.00 (2.36-4.10)	2.05 (1.00-3.31)	2.15 (1.48-3.15)	0.035
IL-6, pg/ml	0.93 (0.45-1.96)	1.79 (1.07-3.02)	1.40 (0.60-1.89)	1.63 (1.13-3.05)	-
IL-8*, pg/ml	2.15 (0.15-4.73)	2.58 (0-8.69)	0.75 (0-7.45)	1.70 (0-4.50)	-
IL-13, pg/ml	0.87 (0-1.43)	1.11 (0.63-8.00)	1.22 (1.00-2.75)	1.08 (0.90-1.33)	-
Периостин**, ng/ml	1.90 (1.18-2.10)	1.53 (1.03-2.15)	1.95 (1.74-2.29)	1.73 (1.03-1.94)	-
IL-17A, pg/ml	0.59 (0.42-11.90)	0.55 (0.47-5.76)	6.08 (0.56-29.60)	11.60 (0.51-28)	0.024

Резултатите са представени като n (%), медиана и интерквартилен обхват. Използван е статистически метод за сравнение Kruskal-Wallis с post hoc анализ; *IL-8 е изследван при n=70: Група 1 – n=21; Група 2 – n=14; Група 3 – n= 13; Група 4 – n=22; ** периостин е изследван при n=42: Група 1 – n=15; Група 2 – n=12; Група 3 – n=6; Група 4 – n=9;

Табл.25 Нива на изследваните серумни цитокини и периостин в отделните групи, формиращи на базата на FeNO и b-Eos.



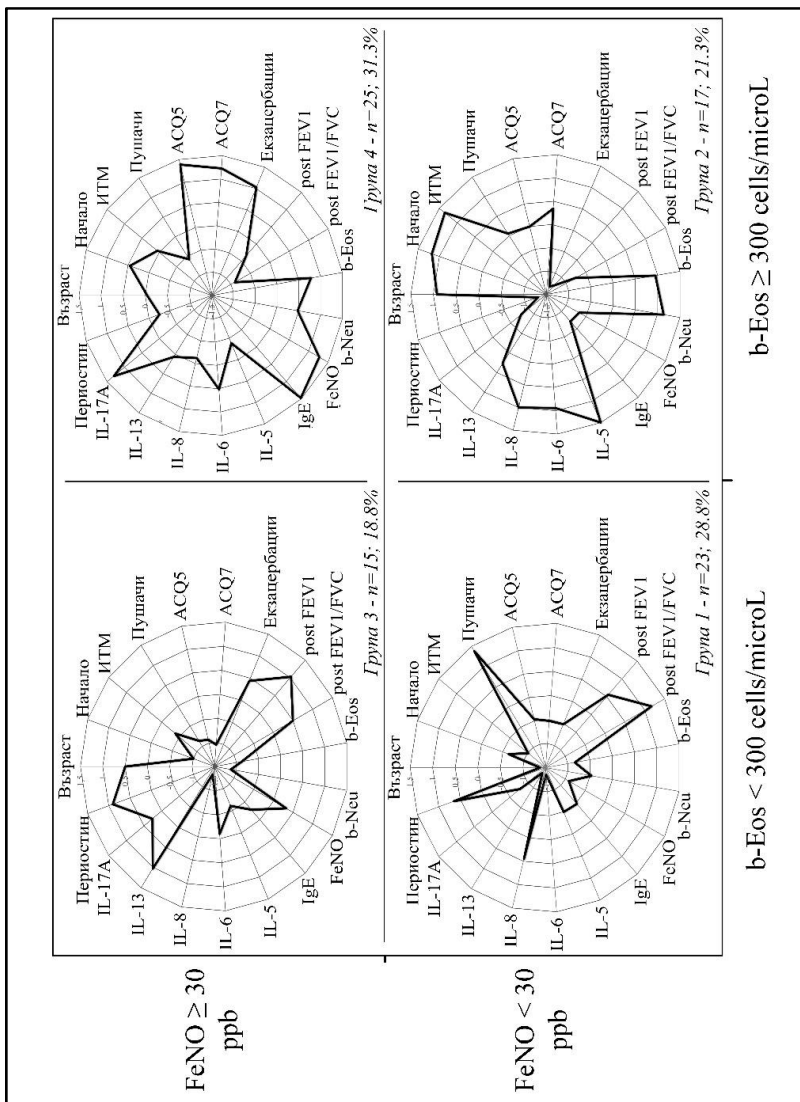
Фиг.20 Интергрупови сравнения на серумните нива на интерлевкините. * $p < 0.05$; Р-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis post hoc анализ и корекция на Bonferroni; IL-8 се изследва при $n = 70$ пациента с БА: Група 1 - $n=21$; Група 2 - $n=14$; Група 3 - $n=13$; Група 4 - $n=22$; Съкращения: ЗК – здрави контроли; Данните са представени чрез медиана и 95% доверителен интервал.

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

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

Табл.26 Статистически анализ при сравнение на групите една с друга и със ЗК според демографски, клинични, функционални и възпалителни характеристики.

Комбинираната оценка на демографските, биометричните, клиничните, функционалните, имунологичните и възпалителните характеристики на пациентите в различните групи е представена чрез радарни графики (Фиг.21). Графиките показват визуализация на отделен модел за всяка група. Асоциациите между променливите са ясно представени.



Фиг.21 Радарни графики за по-добра визуализация на характеристиките на групите във връзка със серумните нива на измерените интерлевкини. От центъра към периферията на графиката стойността на променливата се увеличава. Скалата от -1.5 до +1.5 представя з резултата за всяко измерване. Съкращения: b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; АСТ – тест за контрол на астмата; АСQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; FVC – форсиран витален капацитет; FEV1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; IL – интерлевкин

Базирайки се на използваните неинвазивни биомаркери, при 70.1% от пациентите със СТА и ТА открихме данни за висока Т2 БА. Само 28.8% бяха с ниска Т2 БА. Тези данни са в съответствие с цитираната в литературата честота на Т2 БА. По-голямата част от пациентите с ТА в нашето проучване (82.9%) попадат в група с персистиращ възпалителен отговор от тип 2.

Пациентите в група 1 (\downarrow FeNO/ \downarrow b-Eos) бяха най-млади, предимно жени с нормален ИТМ и около 70% са бивши или настоящи тютюнопушачи (настоящи - 47.8%). Само при 17.4% началото на заболяването е след 40 г., при останалите е било в по-ранна възраст. Доминираха пациенти с позитивни КАП (78.3%). Средните стойности от въпросниците за оценка на контрола бяха задоволителни, но въпреки това, според критериите на GINA при 43.5% заболяването остава недобре контролирано. Честотата на екзацербациите и ТА беше ниска. Едва 26.1% провеждаха лечение с висока доза ИКС. Нивата на общи IgE, FeNO, b-Eos, b-Neu, CRP бяха ниски, а белодробната функция сравнително запазена (табл.26). Открихме повишени серумни нива на периостин и IL-17A в сравнение със ЗК. Не открихме статистически значими различия в нивата на периостин при сравнение на група 1 с останалите групи БА, докато серумните нива на IL-17A бяха значимо по-ниски в група 1 при сравнение с групи 3 и 4. От радарната графика се визуализира пик и статистическа тенденция за повишение на серумните нива на IL-8 и периостин в асоциация с по-висок процент на настоящи тютюнопушачи. Чувствителността на еозинофилното възпаление към КС е добре известна, така че обсъждаме възможността в група 1 да са включени пациенти с тип 2 БА, но отрицателни биомаркери поради добър отговор към ИКС. Възможно е фактори от околната среда или индивидуални характеристики да са довели до по-ниска експресия на биомаркерите за тип 2 БА, което също може да е оказало ефект върху анализиранията група. Pavlidis и сътр. също установяват наличие на генна сигнатура за тип 2 БА в група пациенти с ниски FeNO/b-Eos. Въпреки това, базирайки се на биомаркерната характеристика решихме да определим тази група като фенотип на Т2 ниска БА при атопични тютюнопушачи.

В предишни проучвания тютюнопушенето е свързано с по-ниско еозинофилно възпаление и по-нисък FeNO. От друга страна, някои проучвания показват, че пушенето може да поддържа еозинофилното възпаление, особено при възрастните пациенти. Тези наблюдения са в съответствие с характеристиките на субектите, класифицирани в групи 2 и 4 (високи b-Eos), където пациентите са по-възрастни и част от тях са били изложени на тютюнев дим в миналото. Симптомите, обострянията и тежестта са по-ниски в група 1 в сравнение с останалите и белодробната функция въпреки тютюнопушенето все още е запазена. По-младата възраст и по-малкото пакетогодини могат да обяснят несъответствието между експозицията и белодробната функция. Експозицията на тютюнев дим в група 1 и полисензитивността към инхалаторни алергени може да доведе до субселекция на пациентите в група на припокриване (АСО) в бъдеще. В радарната диаграма открихме, че IL-8 показва известна тенденция на нарастване спрямо останалите маркери в група 1. Това е в съответствие с по-рано докладваните данни за индукция на IL-8 от тютюневия дим и повишаването му в плазмата на пациенти с АСО.

В група 2 (\downarrow FeNO/ \uparrow b-Eos) b-Eos са високи, но локалното тип 2 възпаление (FeNO ниво) е потиснато и това е свързано с по-ниска честота на екзацербации. Възможно е, провежданата терапия да е повлияла този резултат, но въпреки това висок процент остават неконтролирани и с персистираща обструкция. Базирайки се на цитирани вече данни предполагахме, че понижението на FeNO в тази група при персистиращо

еозинофилно възпаление може да се дължи на по-високата честота на затлъстяване. Пациентите в група 2 бяха най-възрастни, доминираха жените, но съотношението между половете не бе така ясно изразено. Това е групата с най-висок ИТМ и 47.1% от участниците бяха със затлъстяване. Настоящите тютюнопушачи бяха нисък процент (23.5%). БА в тази група беше предимно с късно начало, като в 52.9% се е извила след 40 год. възраст. Доминираха пациенти с позитивни КАП (76.5%). Контролът на симптомите беше недостатъчен и неконтролирана БА според критериите на GINA установихме при 41.2%. Честотата на екзацербациите беше ниска, но установихме висок процент (52.9%) на ТА, като 76.5% в групата провеждаха лечение от стъпка 4/5. Нивата на общи IgE и FeNO бяха ниски. Абсолютният брой на кръвните еозинофили беше най-висок в тази група, като се установи съвместно повишение на кръвните неутрофили и CRP. Белодробната функция беше понижена, като при 41.2% бронхиалната обструкция остана да персистира (табл.26). Открихме повишени серумни нива на IL-5, IL-6, IL-13, IL-17A и периостин в сравнение на група 2 със ЗК. От радарната графика се визуализира пиково повишение свързано със статистическа значимост за IL-5 и IL-6, както и тенденция за по-висок IL-8, асоциирани с високи кръвни еозинофили и неутрофили, висок ИТМ, късна изява и по-напреднала възраст. Това ни даде основание да характеризираме тази група като фенотип на Т2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване. Haldar и сътр. съобщават, че затлъстяването е свързано с повишени симптоми, намалено еозинофилно възпаление, женски пол, късно възникване на БА и намален отговор на ИКС. Анализът на участващите в програмата за изследване на тежка астма (SARP) показва, че повишеният ИТМ е свързан със специфични клинични характеристики при ТА - женски пол, късно начало и нужда от СКС. Тези две проучвания подкрепиха концепцията, че фенотипът на БА е относително хомогенен при затлъстели пациенти с висока експресия на симптом, ниска атопия и еозинофилия, и относителна резистентност към КС.

От друга страна Sutherland и сътр. описват 2 различни клъстера на пациенти с БА и затлъстяване. Те наблюдават хетерогенност, както в проявата на симптоми, така и в нивата на възпалителните биомаркери при пациентите с висок ИТМ. Bates и сътр. докладват, че най-малко два различни фенотипа със затлъстяване могат да се проявят при БА. Фенотип на алергична БА, модулиран от затлъстяване с персистиращо системно възпаление и стимулация на тип 2 имунния отговор, и друг фенотип, свързан само със затлъстяването при неатоична БА с късно начало. По-нови концепции приемат, че вероятно има много различни фенотипи на БА при затлъстяване, най-вероятно всички идентифицирани до момента фенотипи при незатлъстели пациенти, но с допълнителни характеристики, настъпили вследствие механични и възпалителни въздействия от повишения ИТМ. Други изследователи представят доказателства за съществуването и на три фенотипа асоциирани със затлъстяването: 1. Асоцииран с ранно начало, висок тип 2, изразена бронхиална хиперреактивност и тежки екзацербации; 2. Асоцииран с късно начало нисък тип 2, който се смята че възниква вследствие въздействие на затлъстяването върху белодробната физиология; 3. Асоцииран само със женския пол и неутрофилно възпаление в дихателните пътища.

Ние смятаме, че в група 2 са включени пациенти с повишен от затлъстяването имунен отговор тип 2, което води до смесено повишение на двете кръвни клетъчни групи - еозинофили и неутрофили асоциирани със съответния интерлевкинов профил. Връзката между b-Eos и серумните нива на IL-5 в тази група е в съгласие с резултатите

ни до момента и с тези на други автори, но се различава от резултатите на Akiki и сътр. Те докладват данни за цитокинов профил, съставен от IL-5, IL-13, IL-8 и други медиатори, който не се асоциира с високи b-Eos, а с b-Neu и затлъстяване. По-високите нива на IL-6, IL-8 и CRP в група 2 могат да обяснят набирането на неутрофили в смесеноклетъчно възпаления отговор, както и да се асоциират с персистиращо системно възпаление и метаболитна дисфункция, свързана със затлъстяването в групата.

Интересно е, че пациентите в групи 3 и 4 са с персистиращо повишение на FeNO със/без повишение на b-Eos, въпреки по-високите дози на ИКС и честото приложение на СКС. Предполагаме, че в тези случаи се е развила резистентност към КС активност. Механизмите обуславящи тази резистентност най-вероятно се дължат на системното повишение на IL-17A и в двете групи, по-силно изразено в група 4.

Пациентите в група 3 (\uparrow FeNO/ \downarrow b-Eos) бяха на средна възраст 49 години, преобладаваха жени с нормален ИТМ, непушачи, с предимно ранно начало на заболяването, но при 40% се наблюдава изява и след 40 годишна възраст. В тази група доминираха атопичните пациенти с положителни КАП (86.7%) (33.3% и 53.3% - моно- и полисенситизирани, респективно). Ние наблюдавахме неконтролирана БА при 33.3%, а ТА при 26.7%, но честотата на екзацербациите беше значително по-висока, като при 40% се наблюдаваха повече от 1 екзацербация през последната година, а 86.7% от пациентите бяха на стъпка 4/5 от терапията. Общите IgE, FeNO и CRP бяха повишени, докато кръвните еозинофили и неутрофили - ниски. Белодробната функция беше запазена. Открихме повишени серумни нива на IL-6, IL-13, IL-17A и периостин в сравнение със ЗК. При сравнение между групите установихме по-високи нива на IL-17A в група 3 при сравнение с група 1 и 2. От радарната графика се визуализира пиково повишение на IL-13, IL-17A и периостин, асоциирани с повишен FeNO и висока честота на екзацербации при запазена белодробна функция.

Това ни даде основание да характеризираме тази група като фенотип на T2 висока БА с атопия и чести екзацербации

Тази група потвърждава ролята на високия FeNO като рисков фактор за екзацербации при пациенти на ИКС терапия и предполага IL-13 медирана продукция на NO при алергична БА. Повишените нива на IL-17A и IL-6 в сравнение със ЗК могат да бъдат свързани с наблюдаваните по-чести обостряния в тази група, и поставят въпроса за тяхното влияние при тип 2 ТА и КС резистентност.

Пациентите в група 4 (\uparrow FeNO/ \uparrow b-Eos) бяха на средна възраст 46 години, предимно жени с нормален ИТМ. Доминираха непушачи или бивши тютюнопушачи с късно начало на БА, дялът на настоящите пушачи в групата беше 12%. КАП бяха положителни в 68% от случаите. Контролът на симптомите беше лош и 88% бяха с неконтролирана БА според критериите на GINA. Честотата на екзацербациите и на ТА (64%) беше висока. Терапия стъпка 4/5 провеждаха 84% от участниците в тази група. Нивата на общи IgE, FeNO, кръвни еозинофили и неутрофили бяха повишени. CRP бе сравнително нисък. Белодробната функция беше намалена и 40% бяха с персистираща бронхиална обструкция, при висока вариабилност на ФЕО1 след БДТ. Открихме повишени серумни нива на IL-6, IL-13, IL-17A и периостин в сравнение на група 4 със ЗК. Серумните нива на IL-17A бяха значимо по-високи в група 4 в сравнение с група 1 и 2, а тези на IL-6 при сравнение с група 2. Серумните имунологични характеристики на група 4 значително се прекриваха с тези на група 3, но клиничната изява в група 4 беше по-тежка, при по-високи средни нива на IL-17A в група 4. От радарната графика се визуализира пиково

повишение на IL-17A в асоциация с повишен FeNO, общи IgE, кръвни еозинофили, ниска функция, лош контрол и висока честота на екзацербации.

Това ни даде основание да характеризираме тази група като фенотип на T2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна на лечение БА.

Данните в нашето проучване за асоциация на тежестта с комбинираното повишение на b-Eos и FeNO е в съответствие с резултатите, докладвани от други автори. Повишените нива на IL-6, IL-13 и IL-17A в група 3 и 4 предполагат комбинирано активиране на имунната система при пациенти с рефрактерна на лечение тип 2 ТА и изискват по-нататъшно изследване за развитие на персонализиран подход. Нашето проучване подкрепя идеята за IL-17A усилване на тип 2 имунния отговор при БА.

Agache и сътр. разглеждат нивата на IL-17A в серума, като независим рисков фактор за развитието на тежка БА. Активността на Th17 води до повишена контрактилността и пролиферация на гладките мускули на дихателните пътища и се свързва по-често с КС резистентност и неутрофила БА. Agache и Akdis представят идея за смесен тип2/Th17 ендотип. Те предполагат, че имунният отговор от тип 2 и IL-17 може да причини прекомерно увреждане на тъканите. Th2/Th17 клетки са идентифицирани в БАЛ на пациенти с БА, КС резистентност и обструкция на дихателните пътища. Seys и сътр. описват "IL-5, IL-17A, IL-25-висока" възпалителна картина на дихателните пътища при възрастни пациенти с неконтролирана БА, въпреки поддържащата терапия. Резултатите от Hasegawa и сътр. също показват повишена регулация на IL-17A във връзка с цитокини от тип 2 в серум на неконтролирани пациенти. Допълнителни анализи в U-BIOPRED идентифицират два отделни модела свързани с висока експресия на тип 2 цитокини и липса на КС отговор: 1. Висока тъканна еозинофилия, FeNO и екзацербации и 2. Висока спутумна еозинофилия и ИТМ. Учените от U-BIOPRED разработват също модел на Th1, Th2 и Th17 фенотип с релативна КС резистентност при рефрактерна БА.

На скоро докладвани данни в кохорта на 42 деца в България с БА и кистична фиброза, които са в съответствие с нашите данни за значимо повишение на тип 17 имунния отговор при децата с тежка, неконтролирана БА.

Хетерогенността на изследваната популация ни даде възможност да оценим способността на биомаркерите от тип 2 (b-Eos и FeNO) за идентифициране на по-тежки групи БА в реалната клинична практика. Установихме, че СТА и ТА показват различен серумен профил на интерлевкини. Идентифицирането на типа 2 / IL-17A, описано в нашето проучване, може да се използва за по-добра стратификация на пациентите при разработването на нови терапии.

Базирайки се на този подход за селекция на пациентите, открихме съществуването на различни фенотипи еозинофилна БА (със и без съпътстващ IL-17A имуноен отговор) с различно ниво на контрол, тежест и екзацербации. Пациентите с еозинофилна/IL-17A фенотип са със значително по-тежко протичащо заболяване, като тези с комбинирано повишение на FeNO/b-Eos/IL-17A са с най-тежката форма на БА, а при комбинирано повишение на FeNO/IL-17A имат по-малко симптоми, но повишена честота на екзацербации. Пациентите с изолирана еозинофилна БА без повишение на IL-17A оформиха ясно група със затлъстяване и комбинирана активност на IL-5 с неутрофилен асоциирани медиатори, като IL-6 и IL-8. Интересни биха били данните при сравнение на групите спрямо отговора им към биологична (анти-IgE и анти-IL-5) терапия в бъдеще.

Нивото на серумен персиостин беше значимо повишено във всички групи при сравнение със ЗК, но не установихме статистически значими различия между групите на

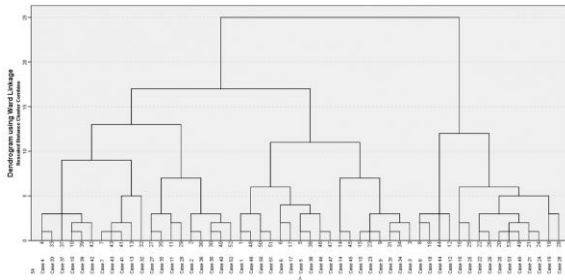
висока тип 2 и ниска тип 2 БА. Отчетохме пикови нива в средните му стойности в група 3, където IL-13 също беше с пикови средни стойности, което може да демонстрира тенденция за асоциация между двата маркера. За съжаление не беше възможно измерването на серумен периостин и IL-8 при всички пациенти с БА, но бъдещи наши проучвания ще ни дадат повече информация за допълнителни техни асоциации.

При 8 (42.1%) от настоящите тютюнопушачи установихме положителни биомаркери за тип 2 БА, подобно на проучването на Pavlidis и сътр. 50% от настоящите тютюнопушачи също са класифицирани с тип 2 висока БА.

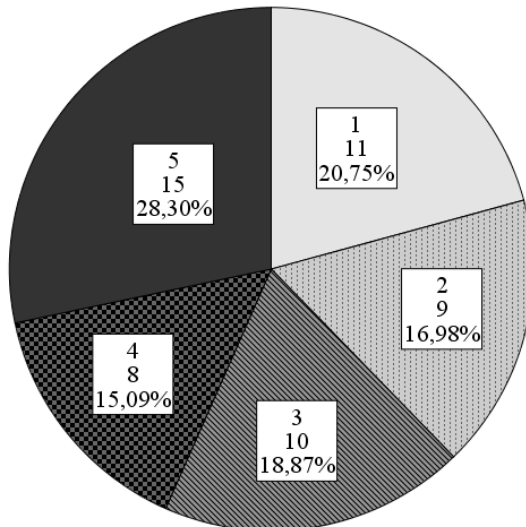
4.6 Резултати към задача 6

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

След проведен факторен анализ - принципен компонентен анализ (PCA) на 38 вариабилни (серумните нива на IL-8 и периостин не бяха включени, тъй като не са изследвани при всички пациенти) селектирахме 11 от тях, които да бъдат използвани в клъстерен анализ: начало, ИТМ, ACQ6, пакетогодини, b-Eos, b-Neu, FeNO, пост ФВК, пост ФЕО1/ФВК, реверзибилност на ФЕО1, IL-17A. Проведохме йерархичен анализ (Hierarchical Cluster Analysis) чрез клъстерен метод на Вард (Ward's method) с измерване на квадратичните евклидови разстояния (Squared Euclidean Distance). От дендрограма се ориентирахме за групирането на пациентите в 3 основни клъстера, 2 от тях с 2 подклъстера, общо 5 клъстера (Фиг.22, 23).



Фиг. 22 Дендрограма от проведения йерархичен анализ.



Фиг. 23 Процентно съотношение на пациентите в отделните клъстери.

Характеристиките на клъстерите са представени последователно в табл. 40.

	Клъстер 1 N=11 (20.8%)	Клъстер 2 N=9 (17%)	Клъстер 3 N=10 (18.9%)	Клъстер 4 N=8 (15.1%)	Клъстер 5 N=15 (28.3%)	
	Тютюнопушене и късно начало		Атопична БА и ранно начало		Еозинофилна БА	
	Лоша белодробна функция с висока реверзибилност (ACO)	Запазена функция, повече симптоми при атопия и лошо придържане	Атопична БА с ранно начало и чести екзацербации	БА със затлъстяване при атопични мъже	Еозинофилна БА с късно начало	
Възраст, години	51.2 ±12.3	49.9 ±10	31.2 ±6.7	46.6 ±13.5	49.3 ±12.6	0.010
Пол, жени	7 (63.6%)	7 (77.8%)	7 (70%)	2 (25%)	11 (73.3%)	-
Начало, възраст	38.5 ±16.7	43.7 ±10.4	13.9 ±7.0	26.3 ±13.6	37.8 ±15.95	0.001
Продължителност	11 (6-18)	4 (1.5-10)	17 (11-23)	17 (7.25-32)	6 (3-18)	0.024
Начало, групи (<20; 20-40; >40)	2/3/6 (18/27/55%)	0/4/5 (0/44/56%)	8/2/0 (80/20/0%)	3/4/1 (38/50/12%)	2/7/6 (13/47/40%)	0.003
Пакетогодини	10 (4-22)	15 (0-21.5)	3.50 (0-6.25)	0 (0-0)	0 (0-12)	0.019
Тютюнопушене, не/бивши/да	2/6/3 (18/55/27%)	3/3/3 (33/33/33%)	4/3/3 (40/30/30%)	7/0/1 (88/0/12%)	9/5/1 (60/33/7%)	-
Пакетогодини >10	7 (63.6%)	6 (66.7%)	2 (20%)	1 (12.5%)	4 (26.7%)	0.031
AERD	0	0	0	3 (37.5%)	10 (66.7%)	0.015
ITM	23 (22-28)	27 (25-29)	23 (19-32)	32 (28-46)	28 (24-34)	-
Затлъстяване	1 (9.1%)	2 (22.2%)	3 (30%)	5 (62.5)	6 (40%)	-
ГЕРБ	3 (27.3%)	4 (44.4%)	4 (40%)	1 (12.5%)	5 (33.3%)	-
Ринит	6 (54.5%)	7 (77.8%)	9 (90%)	5 (62.5%)	11 (73.3%)	-
КАП отр/моно/поли	5/2/4 (46/18/36%)	2/2/5 (22/22/56%)	0/3/7 (0/30/70)	0/2/6 (0/25/75%)	7/1/7 (47/7/47%)	-
Лошо придържане	3 (27.3%)	4 (44.4%)	3 (30%)	0	2 (13.3%)	-
ACQ5	1.40 (0.40-1.80)	3.20 (2.00-3.50)	0.50 (0.15-1.65)	1.30 (0.35-1.95)	2.60 (1.60-3.00)	<0.001
ACQ6	1.50 (0.33-1.67)	2.83 (1.75-3.17)	0.56 (0.13-1.46)	1.17 (0.29-1.79)	2.50 (1.67-2.83)	<0.001
ACQ7	1.85 (0.86-2.14)	2.71 (1.64-3.07)	0.64 (0.39-1.39)	1.64 (0.79-1.97)	2.71 (2.14-3.00)	0.002
ACT	19 (17-23)	14 (10-19)	20 (18-25)	19 (16-24)	16 (11-21)	0.011
Неконтролирана БА	8 (72.7%)	9 (100%)	9 (90%)	5 (62.5%)	13 (86.7%)	-
Контрол пълен/частичен/лош	3/6/2 (27/55/18%)	0/1/8 (0/11/89%)	1/7/2 (10/70/20%)	3/3/2 (38/38/25%)	2/3/10 (13/20/67%)	0.009
Екзацербации	1 (0-3)	1 (1-3.5)	1.5 (0.75-2.25)	0.5 (0-1)	2 (1-5)	0.046
Екзацербации > 1/г.	3 (27.3%)	2 (22.2%)	5 (50%)	0	9 (66%)	0.037
Тежка БА (ATS/ERS)	6 (54.5%)	5 (55.6%)	4 (40%)	7 (87.5%)	13 (86.7%)	-
Терапия, стъпка 4/5	8 (72.7%)	7 (77.8%)	6 (60%)	7 (87.5%)	15 (100%)	-
Висока доза ИКС	7 (63.6%)	5 (55.6%)	5 (50%)	7 (87.5%)	14 (93.3%)	-
ОКС	1 (9.1%)	2 (22.2%)	1 (10%)	0	6 (40%)	-

Таблицата продължава на следващата страница

	Клъстер 1 N=11 (20.8%)	Клъстер 2 N=9 (17%)	Клъстер 3 N=10 (18.9%)	Клъстер 4 N=8 (15.1%)	Клъстер 5 N=15 (28.3%)	
	Тютюнопушене и късно начало		Атопична БА		Еозинофилна БА	
	Лоша белодробна функция с висока реверзибилност (АСО)	Запазена функция, повече симптоми при атопия и лошо придържане	Атопична БА с ранно начало и чести екзацербации	БА със затлъстяване при атопични мъже	Еозинофилна БА с късно начало	
ПреФЕО1	-3.20 ±0.74	-0.52 ±0.76	-1.09 ±1.43	-2.26 ±0.87	-2.69 ±1.12	<0.001
ПостФЕО1	-2.47 ±0.87	-0.14 ±0.55	-0.76 ±1.44	-2.18 ±0.80	-2.26 ±1.09	<0.001
ПреФВК	-2.04 ±1.13	-0.47 ±1.02	-0.86 ±1.39	-1.38 ±0.70	-1.74 ±1.04	0.027
ПостФВК	-1.17 ±1.19	-0.21 ±0.77	-0.85 ±1.42	-1.25 ±0.61	-1.39 ±0.96	-
ПреФЕО1/ФВК	-2.54 ±0.77	0.01 ±1.18	-0.43 ±1.13	-1.64 ±1.66	-2.01 ±1.16	<0.001
ПостФЕО1/ФВК	-2.41 ±0.74	0.14 ±0.84	-0.17 ±1.10	-1.69 ±1.55	-1.71 ±1.13	<0.001
постФЕО1/ФВК <LLN	9 (91.8%)	1 (11.1%)	1 (10%)	4 (50%)	8 (53.3%)	0.003
Промяна ФЕО1,%	16 (12-21)	5 (0-9)	4 (0.75-6.25)	1 (0-2.75)	10 (4-20)	<0.001
Промяна ФЕО1, мл.	250 (190-450)	90 (0-280)	130 (38-287)	25 (0-60)	180 (80-290)	0.006
FeNO, ppb	23 (15-47)	30 (9.5-40)	25 (12-43)	24 (17-33)	68 (39-104)	0.002
FeNO ≥ 30 ppb	4 (36.4%)	5 (55.6%)	4 (40%)	2 (25%)	13 (86.7%)	0.024
b-Eos	336 (220-410)	396 (324-512)	206 (80-298)	456 (262)	742 (504-861)	<0.001
b-Eos ≥ 300	7 (63.6%)	7 (77.8%)	2 (20%)	5 (62.5%)	14 (93.3%)	0.005
b-Eos, %	4 (3-5)	4 (3.5-7)	3.5 (1.75-4.25)	4.5 (3.25-5.75)	7 (5.60-8.00)	<0.001
Общ IgE	61 (25-178)	114 (45-237)	214 (61-299)	225 (50-630)	126 (57-194)	-
Общ IgE > 100IU/ml	5 (45.5%)	6 (66.7%)	6 (60%)	5 (62.5%)	9 (60%)	-
b-Neu	5.38 ±1.35	5.77 ±2.46	3.82 ±1.04	6.33 ±2.01	5.19 ±1.91	0.012
CRP	2.36 (0.64-4.61)	1.50 (1.23-3.58)	1.13 (0.58-3.88)	4.14 (2.25-7.33)	2.81 (0.90-6.50)	-

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

Табл. 27 Клинико-инфламаторни характеристики на клъстерите.

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

Резултатите са представени в брой (%), медиана и интерквартилен обхват (IQR); р-стойността е получена чрез Kruskal-Wallis с post hoc анализ и корекция на Dunn. Категорийните вариабилни са анализирани чрез chi-square test. Съкращения: N – брой; БА – бронхиална астма; ACO – припокриване на астма и хронична обструктивна белодробна болест; IL-8 беше измерен при C1-n=9; C2-n=6; C3- n=10; C4-n=6; C5-n=15;
* р<0.05 при сравнение на атопична БА с еозинофилна БА и атопична БА с БА при тютюнопушене
× р<0.05 при сравнение на еозинофилна БА с атопична БА и еозинофилна БА с БА при тютюнопушене
‡р<0.05 при сравнение на C1 с C3, C2 с C3 и C2 с C4
р<0.05 при сравнение на C1 с C3, C1 с C5, C2 с C5 и C4 с C5

Табл.28 Имунологични характеристики на клъстерите.

	C1 vs. C2	C1 vs. C3	C1 vs. C4	C1 vs. C5	C2 vs. C3	C2 vs. C4	C2 vs. C5	C3 vs. C4	C3 vs. C5	C4 vs. C5
Възраст`		*			*				*	
Начало`		*			*				*	
Продължителност	*				*	*				
Пакетогодини		*	*	*		*				
ИТМ			*			*		*		
АСQ6	*			*	*	*			*	*
АСТ	*			*	*	*			*	
Екзацербации						*		*		*
ПреФЕО1`	*	*				*	*		*	
ПреФЕО1/ФВК`	*	*					*		*	
ПостФЕО1`	*	*				*	*		*	
ПостФЕО1/ФВК`	*	*					*		*	
Промяна на ФЕО1	*	*	*						*	*
Общ IgE										
FeNO				*			*		*	*
b-Eos				*	*		*	*	*	*
b-Neu`		*						*		
CRP						*		*		

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

Табл.29 Статистически анализ на клиничните, възпалителни и имунологични характеристики между кълстерите.

Сравнение на дефинираните кълстери със ЗК:

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

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

Табл.30 Сравнение на серумните ILs при кълстерите на тютюнопушачи, атопична и еозинофилна БА със ЗК

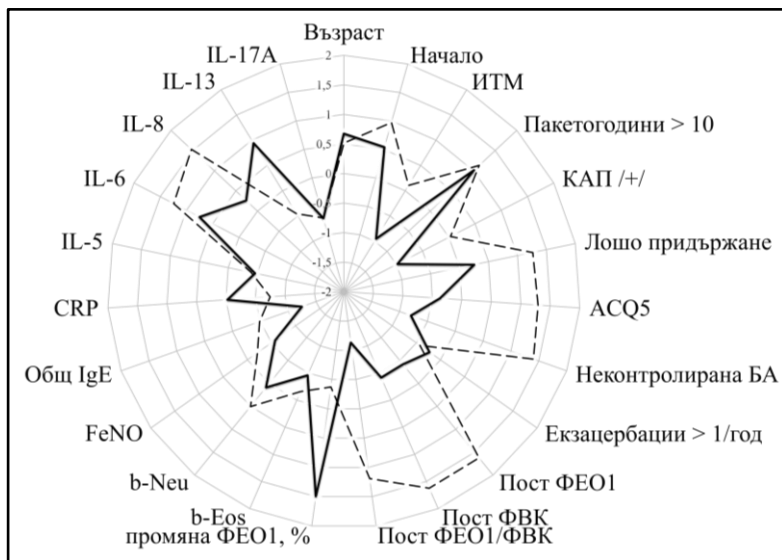
	C1 vs. ЗК	C2 vs. ЗК	C3 vs. ЗК	C4 vs. ЗК	C5 vs. ЗК
IL-5	-	-	-	-	0.029
IL-6	0.002	0.001	-	-	0.002
IL-8*	-	0.049	-	-	-
IL-13	-	-	-	-	0.008
IL-17A	0.017	0.003	0.001	0.009	<0.001

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

Табл.31 Сравнение на серумните нива на ILs при основните кълстери със ЗК

В първата група пациенти (n=20; 37.8%) установихме доминираща експозиция на цигарен дим на фона на основни астматични характеристики (високи кръвни еозинофили и атопия) и късно начало на БА. Тази група нарекохме - **БА при тютюнопушене и късно начало** с модел на комбинирана висока IL-6/IL-8/IL-13/IL-17A системна реакция при сравнение със ЗК и се състоеше от два клъстера – **С1 и С2** (фиг. 24).

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

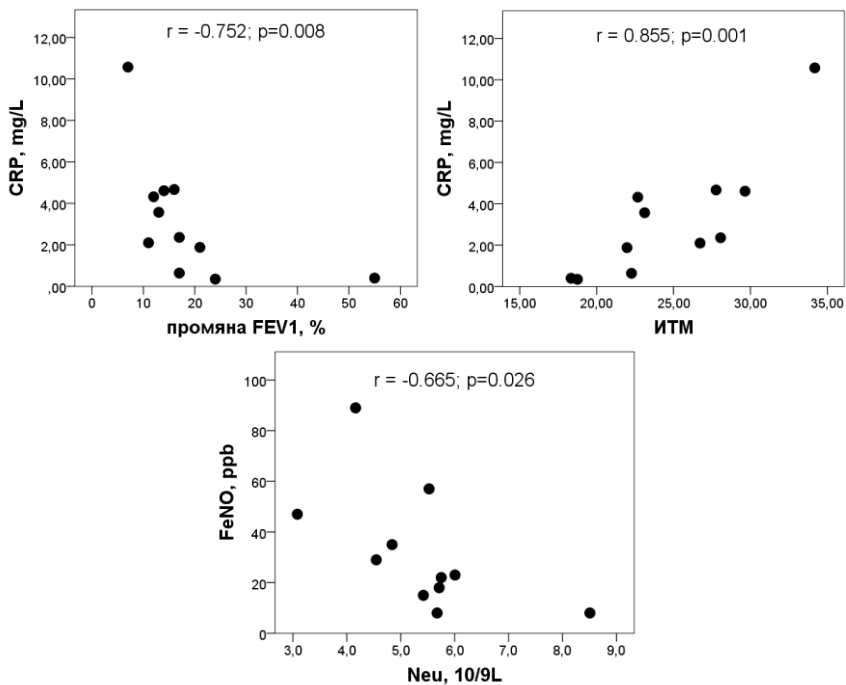


Фиг.24 Радарна графика на С1 (непрекъсната линия) и С2 (линия тип дълги тирета). От центъра към периферията на графиката стойността на променливата се увеличава. Скалата от -1.5 до +1.5 представя з резултата за всяко измерване. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; rrb – частици на билион; IL – интерлевкин; CRP – С реактивен протеин; промяна ФЕО1 – процентно повишение след БДТ

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

Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 51.2 год. със средна възраст на изява на БА 38.5 год. Доминираше женският пол, късното начало и голяма продължителност на БА - 11 (6-18) год. При 81.8% установихме експозиция на цигарен дим, а при 63.6% тази експозиция е продължила над 10 год. ИТМ беше нормален и само при 1 наблюдавахме затлъстяване. Честотата на ГЕРБ беше 27.3%, а на съпътстващ ринит 54.5%. КАП бяха позитивни при 54.5%, при средно ниво на общи IgE - 61 (25-178) IU/ml.

Лошо придържане към терапията установихме при 27.3%. Контролът на БА беше лош, като 72.7% от пациентите бяха с недобре контролирана БА. 27.3% от пациентите бяха с чести екзацербации. Честотата на ТА в групата беше 54.5%. Белодробната функция беше намалена, като при 91.8% се установи персистираща бронхиална обструкция, въпреки високата реверзибилност на ФЕО1. Нивото на FeNO беше 23 (15-47) ppb. Средните нива на кръвните еозинофили бяха 336 (220-410) cells/microL. При 63.6% установихме кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL. Кръвните неутрофили бяха сигнификантно по-високи в сравнение с С3 и без значима разлика спрямо другите групи. CRP не показва статистически значими различия спрямо останалите групи. Пациентите в този клъстер бяха със значимо повишение на IL-6 и IL-17A при сравнение с СЗ. При 36.4% имаше данни за високо серумно ниво на IL-13.

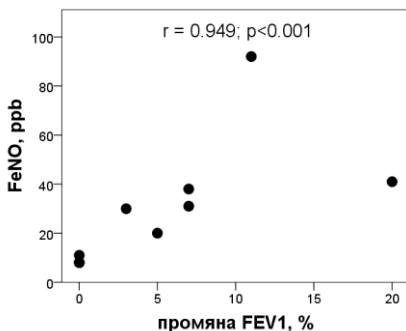


Фиг. 25 Корелационни зависимости в С1

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

Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 49.9 год. със средна възраст на изява на БА 43.7 год. Доминираше женският пол и всички в групата бяха с късното начало на БА с кратка продължителност - 4 (1.5-10) год. При 66.7% установихме експозиция на цигарен дим, която е продължила над 10 год. ИТМ беше нормален и само 2 бяха със затлъстяване. Честотата на ГЕРБ (44.4%) и съпътстващ ринит (77.8%) беше по-висока от тази в С1. КАП бяха позитивни при по-висок процент (77.8%) пациенти в сравнение с С1 (54.5%), при средно ниво на общ IgE - 114 (45-237) IU/ml. Лошо

придържане към терапията установихме при 44.4%. Контролът на БА беше по-лош от С1 и 100% от пациентите бяха с недобре контролирана БА. 22.2% от пациентите бяха с чести екзацербации. Честотата на ТА в групата беше 55.6%. Белодробната функция беше запазена, като само при 1 от пациентите установихме персистираща бронхиална обструкция. Средното ниво на FeNO беше 30 (9.5-40) ppb, а на кръвните еозинофили - 396 (324-512) cells/microL. При 77.8% установихме кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL. Средните нива на кръвните неутрофили и CRP бяха нормални. Пациентите в този клъстер бяха със сигнификантно повишение на IL-6, IL-8 и IL-17A при сравнение с ЗК.



Фиг. 26 Корелационни зависимости във С2

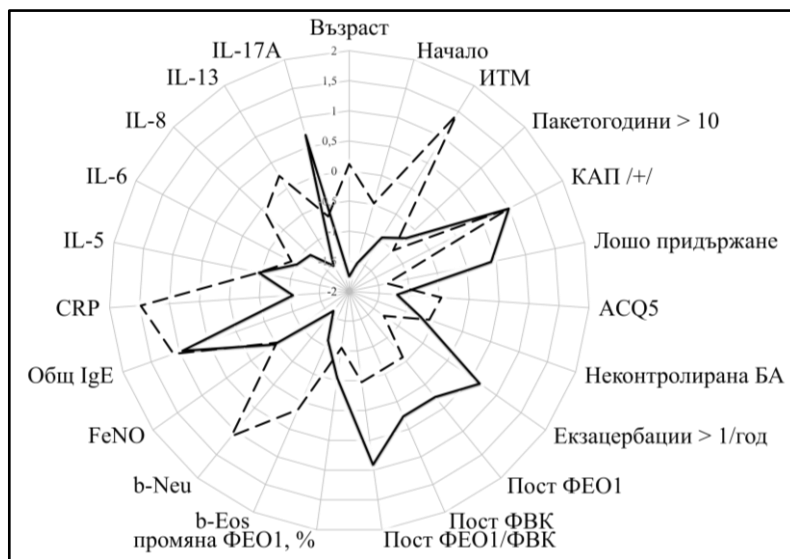
Атопичната БА доминираше в С2. В С1 продължителността на БА беше по-голяма от тази в С2, което рефлектира на понижена белодробна функция и почти всички участници в С1 бяха с персистираща бронхиална обструкция, за разлика от тези в С2. Повисока честота на лошо контролирана БА и високи симптоми установихме в С2 при сравнение с С1, но честотата на екзацербациите беше еднаква. На базата на характеристиките на С1 за БА с голяма продължителност при възрастни пациенти и висока експозиция на тютюнев дим с персистираща бронхиална обструкция и висока вариабилност приехме, че този клъстер изпълнява характеристиките на БА-ХОББ синдром на припокриване (АСО). В този клъстер установихме модел на висок IL-6/IL-13.

В групата БА при тютюнопушене и късно начало установихме значимо повишение на IL-13 при сравнение със ЗК, което е в съответствие с данни на Llano и сътр., където IL-13 е основно свързващо звено в мрежов анализ на три бронхообструктивни състояния (БА, ХОББ и АСО). Пациентите в С2 споделят общи характеристики с С1, но БА в С2 е с по-кратка продължителност, повече симптоми при висока честота на атопия и лошо придържане. Пациентите в С2 имат предимно запазена белодробна функция, но ние предполагаем, че при персистиране на описаните характеристики предстои прогресивен спад на функционалните показатели и в динамика селекция на тези пациенти в С1. Ние намерихме модел на висок IL-6/IL-8 системен имуен отговор в С2, което подкрепя резултатите ни към задача 5 за асоциация на IL-8 с фенотип асоцииран с тютюнопушенето.

Повишените нива на IL-6, както в клъстера на тютюнопушачите и при тези с еозинофилна БА, свързваме с по-възрастната популация селектирана в тези групи, в асоциация с корелационната зависимост с възрастта на този маркер установена в цялата популация на пациенти с БА в нашето проучване. Възможно е IL-6 при по-възрастните

пациенти в тези групи да отразява имунорегулаторни нарушения настъпили с напредване на възрастта и продължителността на БА. Предходни проучвания потвърждават, че стареенето води до повишени нива на циркулиращи цитокини като TNF α , IL-1 и IL-6, които са във връзка с негативни здравни резултати и по-висока смъртност. Причината за повишените нива на IL-6 при възрастни хора, е неясна. Вероятно са във връзка с последователно, нискостепенно активиране на възпалителните клетки с напредване на възрастта.

При идентифицираната втора група (n=18; 34%) установихме доминиращи атопия и ранно начало в характеристиките, затова я нарекохме - **атопична БА** с модел на изолирано повишение на IL-17A при сравнение със ЗК и се състоеше от два клъстера – **С3 и С4** (фиг. 27) със следните характеристики:

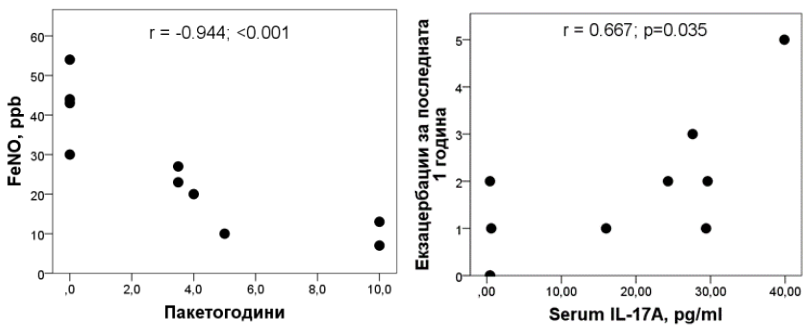


Фиг.27 Радарна графика на С3 (непрекъсната линия) и С4 (линия тип дълги тирета). От центъра към периферията на графиката стойността на променливата се увеличава. Скалата от -1.5 до +1.5 представя з резултата за всяко измерване. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; rrb – частици на билион; IL – интерлевкин; CRP – С реактивен протеин; промяна ФЕО1 – процентно повишение след БДТ

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

Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 31.2 год. и средна възраст на изява на БА 13.9 год. Доминираше женският пол, ранното начало и голяма продължителност на БА - 17 (11-23) год. При 60% установихме експозиция на цигарен дим, но с нисък брой пакетогодини и само при 20% е продължила над 10 год. ИТМ беше

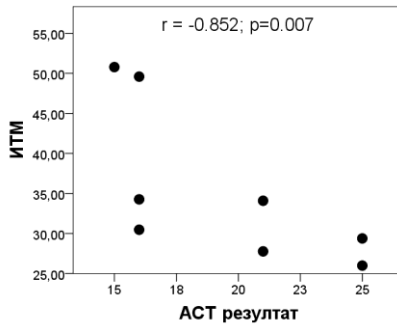
нормален и само при 3 от пациентите в групата имаше данни за затлъстяване. Честотата на ГЕРБ беше 40%, а на съпътстващ ринит 90%. КАП бяха позитивни при всички пациенти в групата. Средното ниво на общи IgE беше 214 (61-299) IU/ml. Лошо придържане към терапията установихме при 30%. Средният резултат от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



Фиг. 28 Корелационни зависимости в С3

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

Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 46.6 год. със средна възраст на изява на БА 26.3 год. Доминираше мъжкият пол и по-късно начало на БА. Средната продължителност на заболяването беше 17 (7.25-32) год. При 1 пациент установихме експозиция на цигарен дим продължила над 10 год. ИТМ беше висок и 62.5% бяха със затлъстяване. Честотата на ГЕРБ беше ниска, а на съпътстващ ринит 62.5%. КАП бяха позитивни при всички, при средни нива на общи IgE 225 (50-630) IU/ml. Не установихме лошо придържане към терапията. Контролът на БА беше предимно непълен, но честотата на екзацербациите беше ниска. Честотата на ТА в групата беше 87.5%. Отчитаме факта, че по-висок процент (87.5%) от пациентите бяха на терапевтична стъпка 4 в сравнение с С3. Белодробната функция беше намалена, като при 50% се установи персистираща бронхиална обструкция. Средното ниво на FeNO беше 24 (17-33) ppb. Средното ниво на кръвните еозинофили беше 456 (262) cells/microL. При 62.5% установихме кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL. Абсолютната стойност на кръвните еозинофили и неутрофили и CRP бяха по-високи в сравнение с С3. Пациентите в този клъстер бяха със значимо повишение на IL-17A при сравнение с ЗК.



Фиг. 29 Корелационни зависимости в С4

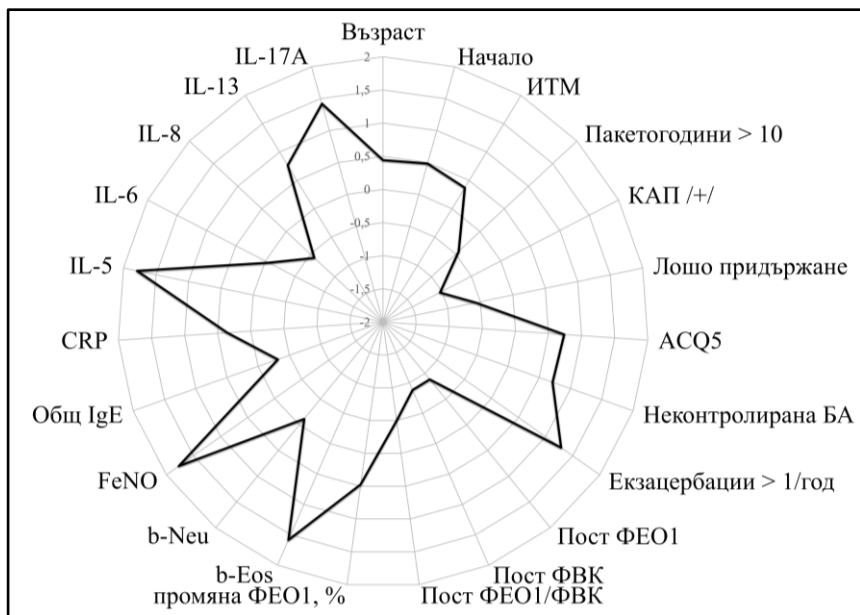
Всички пациенти в С3 и С4 бяха с установена алергия към инхалаторни алергени чрез КАП и високи средни нива на общи IgE. Пациентите в С4 се отличаваха от тези в С3, предимно по ИТМ. В С3 бяха селектирани пациентите с атопична БА с ранно начало и нормален ИТМ, непушачи с добра белодробна функция. При сравнение на С3 с С2 (атопична БА при пушачи с нормална белодробна функция), установихме ясни различия. Пациентите в С2 бяха с по-висока експресия на симптоми и повишена еозинофилна и неутрофилна реакция в периферна кръв, което отразява неблагоприятното въздействие на тютюнопушенето при атопични пациенти. Късното начало на БА при пушачи предполага възможно участие на тютюнопушенето като допълнителен рисков фактор за възникване на БА при атопични пациенти.

Ние наблюдавахме по-висока честотата на екзацербации в групата на атопичните непушачи, най-вероятно поради по-ниска употреба на медикаменти (n=4; 40% на стъпка 3 по GINA) при ниска експресия на симптоми и нормална белодробна функция, при персистиращо възпаление. Това поставя болните в риск от по-чести екзацербации, което налага разработване на допълнителни стратегии за оценка на контрола при тези болни и предотвратяване на бъдещия риск.

Ние наблюдавахме модел на висок IL-17A системен отговор в С3, което е в подкрепа на данните ни представени към задача 5, за IL-17A медирано усилване на възпалителния отговор при T2 TA с чести екзацербации.

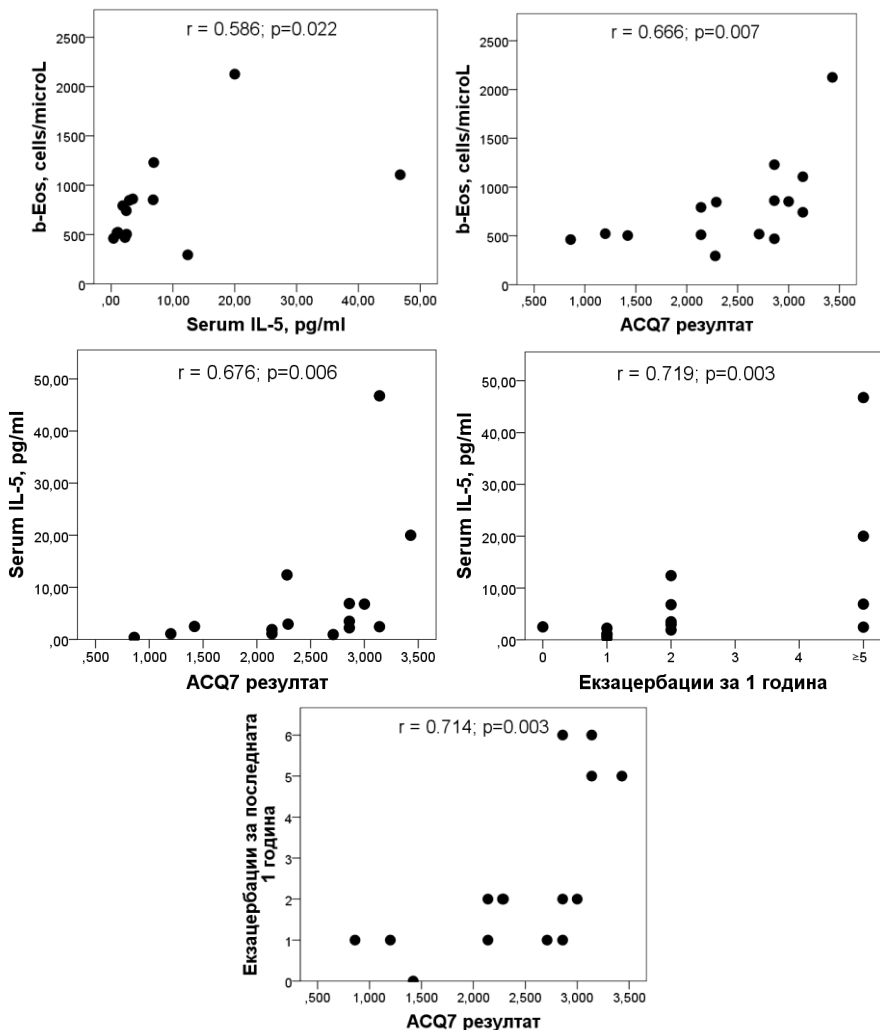
Пациентите в С4 бяха предимно мъже с атопична БА, затлъстяване, повече симптоми при сравнение с С3 и по-ниска белодробна функция, на фона на нисък FeNO, а високи кръвни еозинофили, поради което тази група наподобява описаната група 2 от анализа в задача 5 и най-вероятно представя субселекция на пациенти от нея. Тези данни отново подкрепят съществуването на фенотип БА със затлъстяване и атопия при мъже с комбиниран еозинофилно/неутрофилен системен възпалителен модел и високи нива на CRP.

Третата група нарекохме клъстер 5 (С5) (фиг.30): Еозинофилна БА с късно начало



Фиг. 30 Радарна графика на С5 (непрекъсната линия). От центъра към периферията на графиката стойността на променливата се увеличава. Скалата от -1.5 до +1.5 представя z резултата за всяко измерване. Съкращения: БА – бронхиална астма; b-Eos – абсолютен брой на кръвните еозинофили; b-Neu – абсолютен брой на кръвните неутрофили; ИТМ – индекс телесна маса; КАП – кожно-алергични проби; ACQ – въпросник за контрол на астмата; FeNO – фракция на издишан азотен окис; ФВК – форсиран витален капацитет; ФЕО1 – форсиран експираторен обем за 1 сек.; ppb – частици на билион; IL – интерлевкин; CRP – С реактивен протеин; промяна ФЕО1 – процентно повишение след БДТ

Пациентите в този клъстер бяха на средна възраст 49.3 год. със средна възраст на изява на БА 37.8 год. Доминираше женският пол и късното начало, при по-кратка продължителност на БА. При 40% установихме експозиция на цигарен дим, като при 26.7% беше над 10 пакетогодини. ИТМ беше леко повишен и 40% бяха със затлъстяване. Честотата на съпътстващ ринит беше 73.3%, а на ГЕРБ 33%. КАП бяха позитивни при 53.4%, при средно ниво на общ IgE 126 (57-194) IU/ml. Лошо придържане към терапията установихме при 2-ма пациенти в клъстера. Контролът на БА беше лош, като 86.7% бяха с недобре контролирана БА. 66% от пациентите бяха с чести екзацербации. Честотата на ТА в групата беше 86.7%. Белодробната функция беше намалена, като при 53.3% се установи персистираща бронхиална обструкция. Нивото на FeNO беше 68 (39-104) ppb. Кръвните еозинофили бяха силно повишени - 742 (504-861) cells/microL. Кръвните неутрофили и CRP не се различаваха спрямо другите групи. Пациентите в този клъстер бяха със значимо повишение на IL-5, IL-6, IL-13 и IL-17A при сравнение с ЗК.



Фиг. 31 Корелационни зависимости в С5

Както в предходния анализ, така и тук откриваме базисно повишение на серумните нива на IL-17A при всички фенотипи на ТА при сравнение със ЗК, но пиковите повишения на този серумен маркер в едни от най-тежките фенотипи ни кара да приемем неговото съвместно участие при развитието или модифицирането на Т2 ТА. Група 4 и С5 показват значимо припокриване, което ни кара да приемем, че сме дефинирали фенотип в реалната практика на резистентна висока Т2/IL-17A ТА.

Анализирахме корелационните зависимости в клъстерите и установихме, че в С1 (АСО) повишението на CRP е свързано с по-ниска бронхиална реверзибилност и по-висок ИТМ, докато нивата на FeNO намаляват правопрпорционално на повишението на кръвните неутрофили, които индиректно отразяват не-Т2 имунният отговор при БА и

тютюнопушене. В С2 (БА при атопични пушачи с лошо придържане) повишението на FeNO се асоциира с по-висок бронходилататорен отговор. В С3 (атопична БА с ранно начало при непушачи) установихме намаление на FeNO при нарастване броя на пакетогодините и увеличение на екзацербациите в асоциация с повишение на серумните нива на IL-17A. В С4 (атопична БА със затлъстяване) повишението на ИТМ правопрпорционално е свързано с намален контрол, оценен чрез АСТ. В С5 (еозинофилна БА с късно начало) установихме силни асоциации на кръвните еозинофили с IL-5 и ACQ (5,6,7), а от друга страна на IL-5 с ACQ (5,6,7) и екзацербациите, като по-високият ACQ е свързан с по-чести екзацербации през последната година.

Чрез лесно достъпни за практиката методи (неинвазивна оценка на издишан въздух и кръвни маркери) ние потвърдихме наличието на смесен Т2 и не Т2 имунен отговор при ТА. Смесеният възпалителен фенотип при тютюнопушене (С1, С2) и затлъстяване (С4) бяха очаквани, но наблюдавахме съпътстващо повишение на IL-17A (маркер предимно за не Т2 БА) в С3 и С5, където биомаркерите за Т2 БА бяха най-силно силно изявиени. Механизмите по-които IL-17A се намесва в имунния отговор са неясни, но нашите данни показват асоциация с по-тежка изява на БА при повишение на серумните му нива.

Точно идентифициране на пациенти с висок Т2 е с изключително приложно значение поради възможността за провеждане на биологично таргетно лечение.

Чрез базиран на биомаркери анализ ние установихме, че около 70% от пациентите са с Т2 висок фенотип, но чрез клъстерния анализ открихме допълнителни сложни взаимовръзки между клиничните и възпалителни Т2 и не Т2 характеристики. Проследяване на клъстерите с ТА биха ни осигурили важна информация за отговора към биологичната терапия.

4.7 Резултати към задача 7

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

На базата на препоръките за определяне на Т2 ТА и не Т2 ТА на GINA 2019 установихме, че всички пациенти с ТА в нашето проучване попадат в групата на Т2 ТА ($b\text{-Eos} \geq 150 \text{ cells/microL}$ и/или $\text{FeNO} \geq 20 \text{ ppb}$ и/или алергична БА и/или нужда от СКК) спрямо един или повече от критериите. Избрът на гранични стойности на Т2 биомаркерите в GINA е базиран на най-ниската стойност асоциирана в проучванията с отговор към биологична терапия.

Държим да отбележим, че все още няма категорично утвърдени гранични стойности за биомаркерите в практиката, които да са общоприети за дефиниране на Т2 БА.

Критериите за започване на анти IgE терапия са утвърдени вследствие на дългогодишната употреба на лечението, като до 2018 год. в България анти IgE терапията беше единственото биологично лечение одобрено за лечение на пациентите с ТА.

През последните години проучвания с анти-IL5/IL5R и анти IL4R (анти IL-4/IL13) демонстрираха данни за значима клинична полза с намаляване честотата на екзацербациите при пациенти с повишен абсолютен брой на кръвните еозинофили. В

повечето проучвания бе приета гранична стойност за кръвните еозинофили ≥ 300 cells/microL. В следствие при провеждане на субанализ на дните изследователите установиха, че клинично значима разлика в честотата на екзацербациите започва да се наблюдава още при гранична стойност от ≥ 150 cells/microL и прогресивно тази полза нараства с увеличението на кръвните еозинофили измерени преди включване на терапията. В България през 2018 г. беше одобрена анти IL-5 терапията и бяха приети критерии за започването ѝ, като граничната стойност на кръвните еозинофили, съответстваше на заложените международни препоръки от ≥ 300 cells/microL. Анти IL4R (Анти IL4/IL13) и другите биологични терапии насочени срещу IL-13, TSLP и др. все още не са одобрени за лечение на пациенти с ТА в България. През 2018 г. в САЩ, а през 2019 г. и в Европа беше одобрено използването на анти IL4R биологична терапия при еозинофилен фенотип ТА.

При 4 (12.50%) от пациентите с T2 ТА с данни за алергична БА в нашето проучване се установиха IgE < 30 IU/ml, поради което не бяха подходящи за включване на лечение с анти-IgE, а при 1 (3.13%) се установиха силно повишени нива на общи IgE (>1000 IU/ml), но поради високо телесно тегло попадна извън дозовия интервал на биологичната терапия с анти-IgE. При 5 (15.63%) не се потвърди сенсibiliзация към целогодишен инхалаторен алерген, въпреки повишени общи IgE. Пациентите с T2 ТА в нашето проучване, изпълняващи критериите на GINA 2019 за включване на лечение с анти-IgE (КАП и/или специфични IgE позитивни към инхалаторен алерген, серумни общи IgE и килограми включени в дозовия интервал, екзацербация през последната една година) бяха 22 (68.75%) пациента.

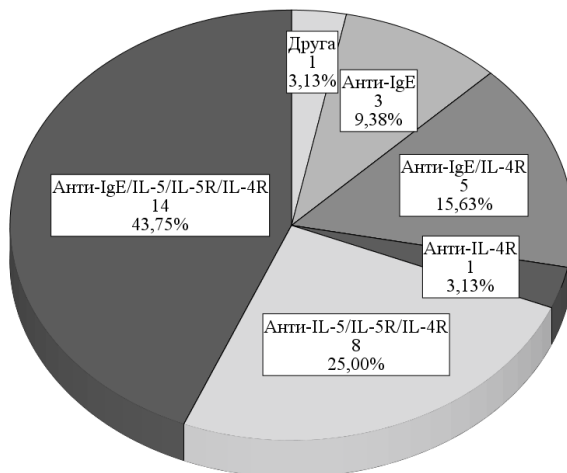
Пациентите с T2 ТА в нашето проучване, изпълняващи критериите на GINA 2019 за включване на лечение с анти-IL5/IL5R (кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL, екзацербация през последната една година) бяха 22 (68.75%) пациента.

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

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

В нашето проучване при използване на критериите за кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL или FeNO ≥ 25 ppb и екзацербация през последната една година хипотетично 28 (87.50%) от пациентите с T2 ТА биха били подходящи за включване на лечение с анти-IL4R.

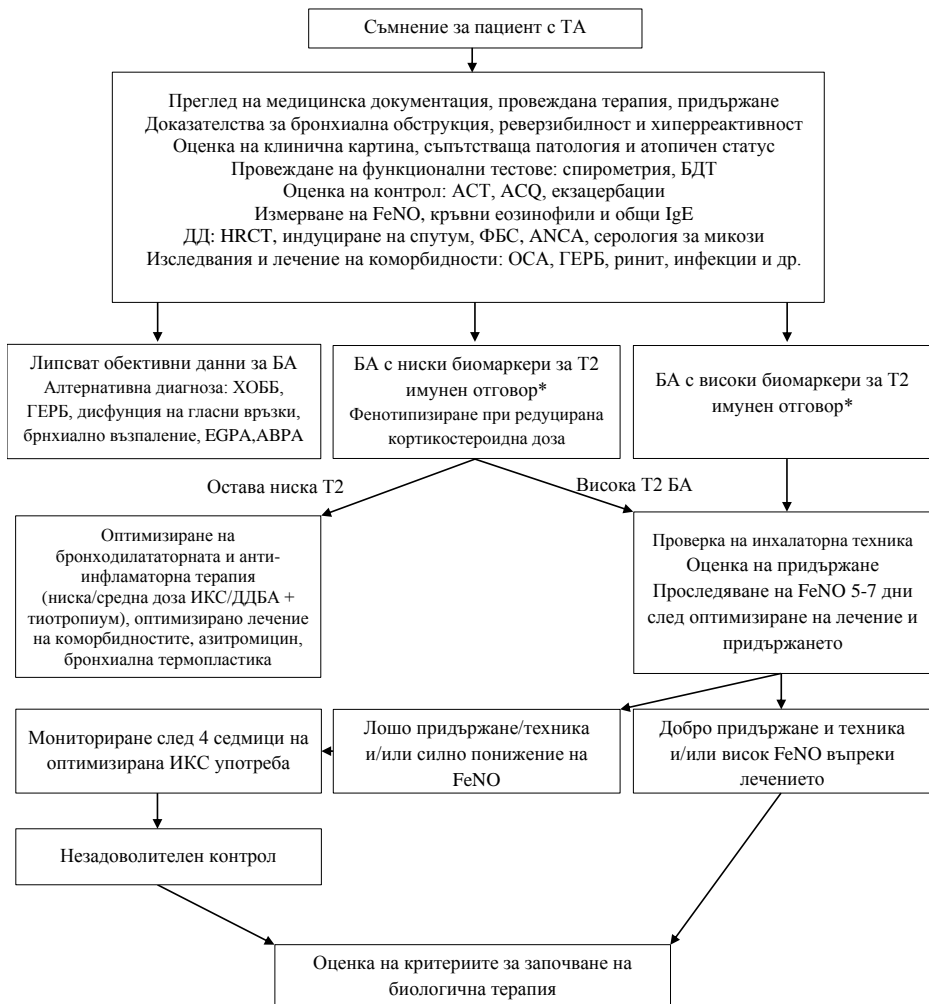
Базирайки се на тези критерии, установихме, че голям процент от пациентите изпълняват критериите за повече от една биологична терапия (фиг.32).



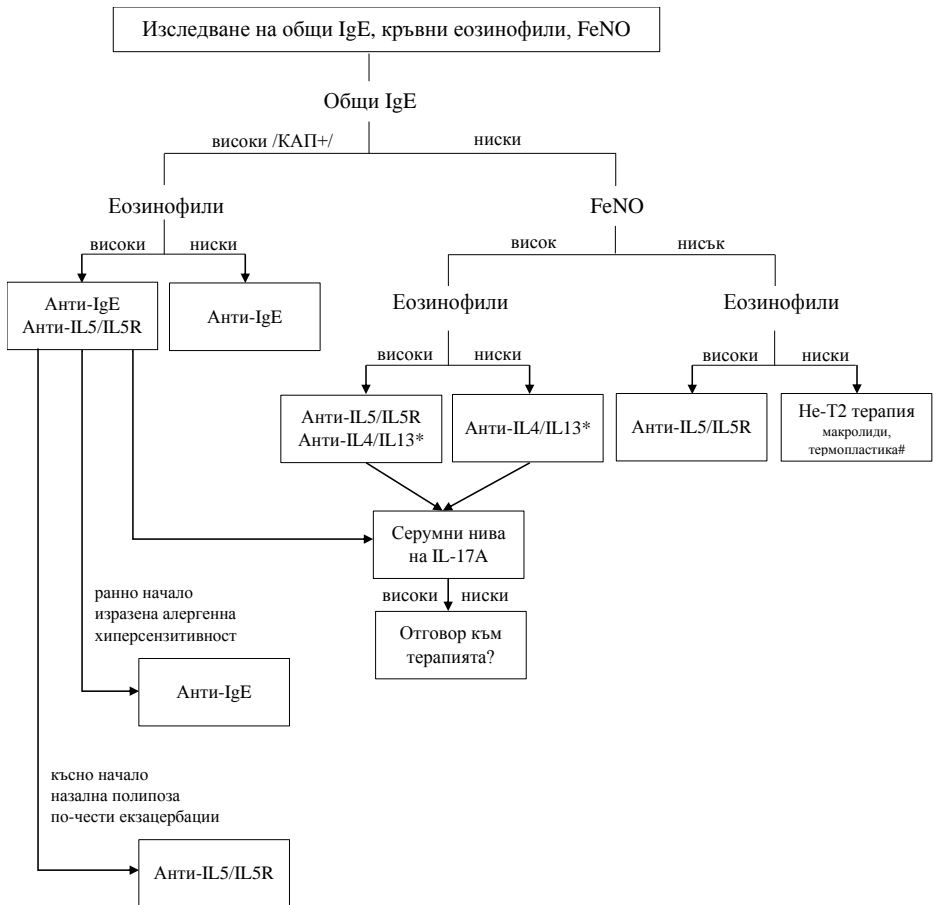
Фиг. 32 Разпределение на пациентите с ТА според критериите на GINA 2019 за лечение с биологична терапия.

Значителното препокриване на терапевтичните възможности повдига въпроса за биомаркери, определящи и насочващи избора на най-подходящата биологична терапия. Такива предиктивни биомаркери според GINA 2019 за анти-IgE терапия са ранно начало на заболяването, изразена алергенна хиперсензитивност, високи нива на FeNO и b-Eos, докато за анти-IL5 са късната изява на БА, назална полипоза, по-чести екзацербации и високи еозинофили. За анти-IL4R (анти-IL4/IL13) предиктивни биомаркери са високите нива на FeNO и кръвни еозинофили. Става ясно, че между предиктивните биомаркери за терапевтичен отговор има значителна степен на препокриване. Има непосредствена нужда от определяне на гранични стойности за биомаркерите на които да се базира избора на терапия. Бъдещи проучвания и наблюдения ще внесат повече яснота в терапевтичното поведение.

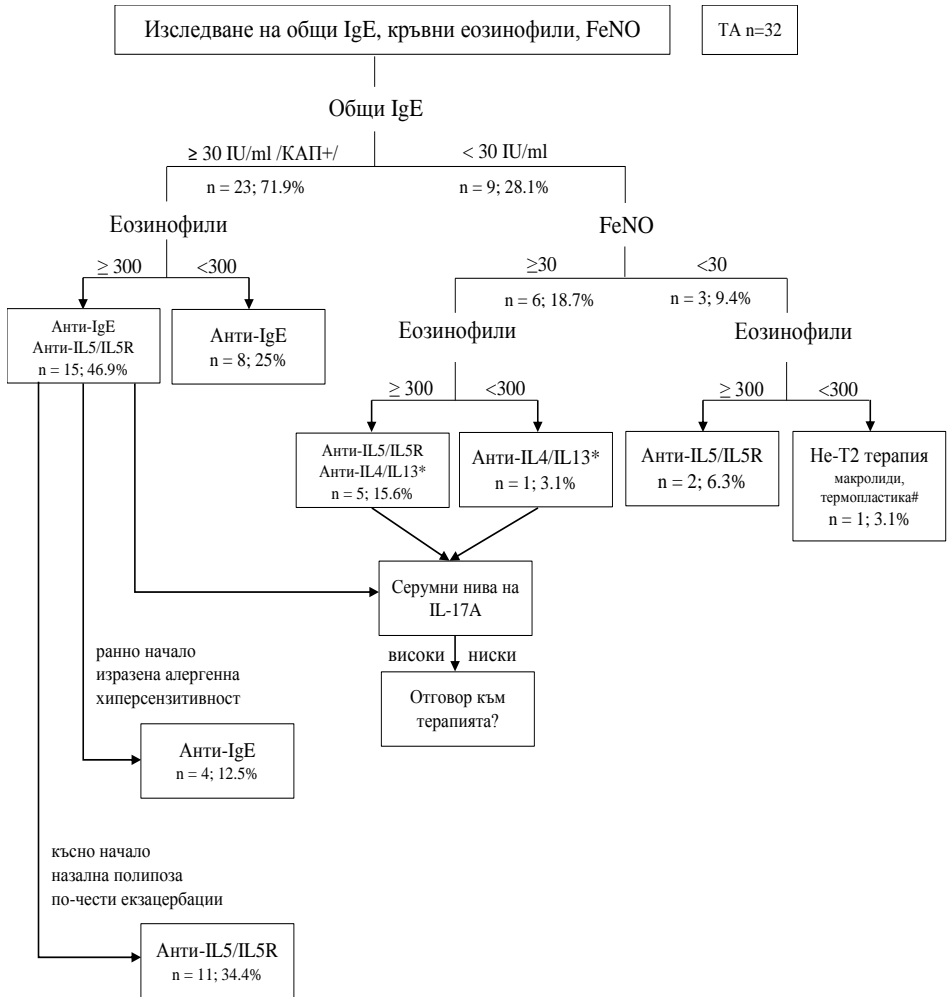
Базирайки се на данните от нашето проучване, изготвихме алгоритъм за оценка на пациентите суспектни за ТА (фиг.34) и избор на биологична терапия (фиг.35, 36).



Фиг. 34 Алгоритъм за оценка и поведение при пациентт suspectни за ТА. *високи Т2 биомаркери са кръвни еозинофили ≥ 300 cells/microL и/или FeNO ≥ 30 ppb. Съкращения: ТА – тежка астма, БДТ – бронходилаторен тест, АСТ – астма контрол тест, АСQ – въпросник за оценка на контрола на астмата, FeNO – фракция издишан азотен окис, ФБС – фибробронхоскопия, HRCT – компютърна томография с висока резолюционна способност, ANCA - анти неутрофилни цитоплазмени антитела, ОСА – обструктивна сънна апнея, ГЕРБ – гастроезофагеална рефлуксна болест, ХОББ – хронична обструктивна белодробна болест, ЕГРА – еозинофилина грануломатоза с полиангиит, АВРА – алергична бронхопулмонална аспергилоза, Т2 – тип 2, ИКС – инхалаторен кортикостероид, ДДБА – дългодействащ бета2 агонист.

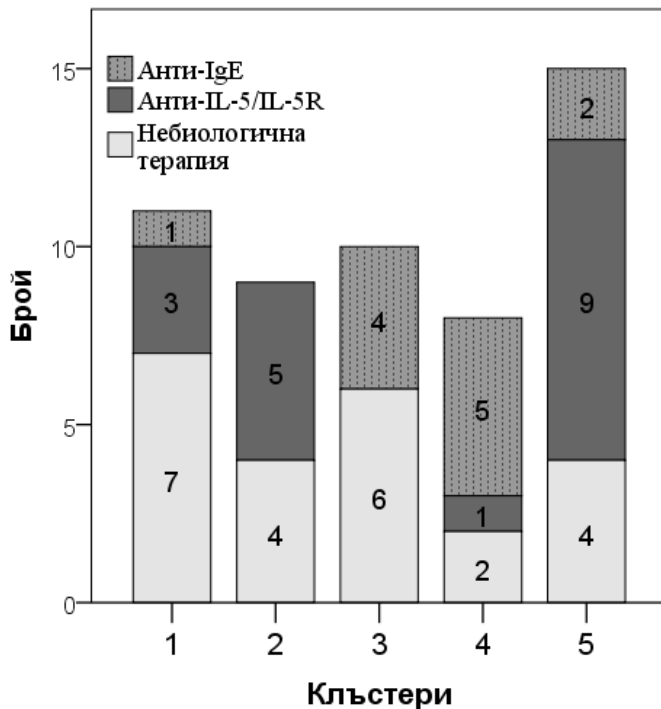


Фиг. 35 Алгоритъм за избор на биологично лечение на ТА. * терапията не е одобрена за използване в Р.България, одобрена в САЩ и Европа, # при достъп до център провеждащ бронхиална термопластика



Фиг. 36 Процентно разпределение на пациентите с ТА подходящи за биологична терапия в настоящото проучване според описания алгоритъм за лечение. КАП – кожно-алергични проби * терапията не е одобрена за използване в Р.България, одобрена в САЩ и Европа, # при достъп до център провеждащ бронхиална термопластика

Терапевтични стратегии при дефинираните клъстери на базата на разработените алгоритми (фиг. 37):



Фиг. 37 Биологично лечение в дефинираните клъстери.

За всички клъстери: подобряване на придържането, лечение на коморбидностите и прекратяване експозицията на вредности и алергени.

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

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

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

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

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

VIII. Изводи

1. Бронхиалната астма е хетерогенно заболяване, при което се наблюдават 4 клинични фенотипа, 4 фенотипа чрез биомаркерна класификация и 5 клъстера чрез непреднамерен клъстерен анализ.

2. Идентифицират се 4 клинични фенотипа: атопична, нееозинофилна БА с ранно начало и високи общи IgE; атопична, еозинофилна БА с късно начало, лош контрол и високи IgE; неатопична еозинофилна БА с късно начало, лош контрол и персистираща бронхиална обструкция; неатопична, нееозинофилна предимно СТА с добър контрол и запазена белодробна функция.

3. На базата на биомаркерна класификация се обособяват 4 фенотипа СТА и ТА: T2 ниска БА при атопични тютюнопушачи, T2 висока еозинофилна БА с късно начало и затлъстяване, T2 висока БА с атопия и чести екзацербации, T2/IL-17A висока, еозинофилна, тежка, рефрактерна на лечение БА.

4. Чрез непреднамерен клъстерен анализ се идентифицират 3 клъстерни групи на ТА и неконтролирана СТА: БА при тютюнопушачи, атопична БА и еозинофилна БА.

5. БА при тютюнопушачи се състои от 2 отделни клъстера: C1 – БА с ниска белодробна функция и висока реверзибилност, дълга продължителност и доминиращ IL-6/IL-13 серумен модел; C2 – БА със запазена функция, повече симптоми при атопия и лошо придържане и доминиращ IL-6/IL-8 серумен модел.

6. В атопичната БА се забелязват 2 отделни клъстера: C3 - Атопична БА с ранно начало, чести екзацербации и доминиращ IgE/IL-17A серумен модел; C4 - БА със затлъстяване при атопични мъже с доминиращ IgE/CRP/b-Neu системен модел.

7. В клъстер 5 на еозинофилна БА доминира IL-5/IL-6/IL-13/IL-17A серумен модел, като повишението на IL-17A е най-отчетливо и отразява активираният смесен системен имунен отговор в тази група. Характеристиките на клъстер 5 и група 4 от биомаркерния анализ се припокриват значително и отразяват най-тежката проява на БА в нашето проучване, което предполага, наличие на смесен фенотип на резистентна T2/IL-17A ТА.

8. Рискови фактори за чести екзацербации при БА са лош контрол, високи кръвни еозинофили и FeNO, тежка БА, назална полипоза и персистиращ ринит, ниски белодробни функционални показатели и високи нива на IL-5.

9. Високите кръвни еозинофили доказано се асоциират с намален контрол, понижение на белодробната функция, ТА, по-чести екзацербации и серумни нива на IL-5, докато с FeNO показана умерена зависимост.

10. FeNO се асоциира с висока бронхиална реверзибилност при пациенти с неконтролирана БА и лошо придържане, което отразява неговата допълваща информационна сила при оценка на тези пациенти и доказахме асоциацията му със серумните нива на IL-13, което го прави потенциален, доминиращ биомаркер при избор на биологична анти-IL-13 терапия.

11. Серумните нива на IL-6 са в асоциация с възрастта, CRP, IL-8 и кръвните неутрофили, което потвърждава ролята му като маркер на нискостепенното системно възпаление.

12. Серумните нива на периостин се асоциират с понижени функционални характеристики, но нямат директна връзка с T2 характеристики на БА.

IX. Приноси

С оригинален характер:

1. За пръв път в България се провежда клъстерен анализ на базата на комплексна оценка на клинично-възпалителни и имунологични характеристики с цел фенотипизиране и индивидуален подход при СТА и ТА в реалната клинична практика.

2. Идентифицирахме Т2 тежък, рефрактерен на лечение фенотип с повишени серумни нива на IL-17A.

3. Доказахме, че серумните нива на IL-5 са рисков фактор за чести екзацербации и идентифицирахме фенотип на AERD, свързан с отчетливо повишение на серумните нива на IL-5.

4. Установихме, че при затлъстяване FeNO може да бъде неадекватен биомаркер за еозинofilно възпаление, което налага неговата внимателна употреба при тази група пациенти с БА при взимане на терапевтични решения.

5. Доказахме асоциация на високите серумни нива на периостин с понижени показатели на белодробната функция и липса на директна връзка с Т2 БА.

С потвърдителен характер:

1. ТА при възрастни се характеризира с доминиране на женския пол, висока изява на симптоми и коморбидности, ниска белодробна функция, чести екзацербации, високи кръвни еозинофили и общи IgE.

2. БА с Т2 характеристики е с по-тежко протичане.

3. Коморбидностите имат пряко въздействие върху контрола на БА и съчетанието между тях води до значителна изява на симптоми.

4. Установихме притеснително висока честота на тютюнопушене при пациенти с БА в съответствие с докладваните данни от международни и национални проучвания. Комбинацията от непридържане към терапията при настоящите тютюнопушачи поставя тази пациентска група в сериозен риск за възникване на късни последици.

5. БА остава неконтролирана при висок процент от пациентите със СТА и ТА, като ACQ показва по-добро съвпадение с критериите на GINA при определяне на лошо контролирана БА.

6. Доказахме, че използваните въпросници за оценка на контрола имат добра специфичност и чувствителност за употреба в клиничната практика.

7. Доказахме ролята на кръвните еозинофили, като фактор за по-тежко протичаща БА и чести екзацербации.

8. Доказахме ролята на FeNO, като предиктор за чести екзацербации.

С приложен характер:

1. Подобри се придържането и се оптимизира терапията на групите с неконтролирана БА.

2. Потвърди се практическото значение на изследваните биомаркери.

3. Определиха се гранични стойности за серумните медиатори на базата на изследвани ЗК.

4. Изработи се алгоритъм за поведение и персонализиран подход при лечение на ТА.

5. Болните с ТА бяха оценени, класифицирани и насочени за биологично лечение според индивидуалните им характеристики.

VII. Публикации и участия в научни форуми по темата на дисертацията

8.1. Публикации

1. Д. Димитрова, В. Юрукова. Съвременен лечение на бронхиална астма. Пулмология и педиатрия. Медик арт 2015, 2: 7-12.
2. D. Dimitrova, V. Youroukova. Severe asthma: definition, immunological characterization and molecular-targeted therapy. Thoracic Medicine 2015; 7(2): 8-25.
3. Д. Димитрова, В. Юрукова. Серумен периостин. Нов биомаркер за рефрактерно Th2/еозинофилно възпаление и ремоделиране на дихателните пътища при бронхиална астма. Medical Magazine 2015, 20: 18-22.
4. Д. Димитрова. Бронхиалната астма в клиничната практика: препоръки и предизвикателства. Топмедика 2016, 2: 9-13.
5. V. Youroukova, D. Dimitrova, Y. Slavova, A. Valerieva, S. Lesichkova. Eosinophilic phenotype - the dominant inflammatory type of uncontrolled moderate and severe bronchial asthma. Thoracic Medicine, 2016; 8(3):8-21.
6. В. Юрукова, Д. Димитрова. Постигане на добър контрол на симптомите и редукия на риска при бронхиална астма. GP News 2017, брой 1, 38-42.
7. V. Youroukova, D. Dimitrova, A. Valerieva, S. Lesichkova, Ts. Velikova, E. Ivanova-Todorova, K. Tumangelova. Phenotypes determined by cluster analysis in moderate to severe bronchial asthma. Folia Medica, 2017 Jun 1;59(2):165-173. DOI: 10.1515/folmed-2017-0031.
8. Д. Димитрова, В.Юрукова. Бронхиалната астма – „step down“ или „step up“. Топмедика 2017, 2: 26-29.
9. D. Dimitrova, V. Youroukova, K. Tumangelova-Yuzeir, E. Ivanova-Todorova, Ts. Velikova. Serum periostin levels in patients with moderate to severe persistent bronchial asthma. C.R.Acad.Bulg.Sci.2019; 72 (7): 966-972. DOI: 10.7546/CRABS.2019.07.15. IF (2018) 0.321.
10. D. Dimitrova, V. Youroukova, K. Tumangelova-Yuzeir, E. Ivanova-Todorova, Ts. Velikova. Serum levels of IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 and IL-17A in pre-defined groups of adult patients with moderate and severe bronchial asthma. Respir Med. 2019 Jun 26; 154:144-154. DOI: 10.1016/j.rmed.2019.06.024. IF (2019) 3.237.

8.2. Участия в международни форуми и резюмета публикувани в списания

1. D. Dimitrova, V. Youroukova, Y. Slavova, D. Marinova, Ts. Velikova, K. Tumangelova. Serum periostin as a biomarker for diagnosis and management of patients with moderate and severe persistent asthma. Poster presentation 032. 3rd European Update Congress in Pneumology, PneumoUpdate Europe 2016, Prague, Czech Republic, 24-25 June 2016, Best poster award.
2. Vania Youroukova, Denitsa Dimitrova, Yanina Slavova, Spaska Lesichkova. Cluster Analysis Of Patients With Moderate To Severe Uncontrolled Bronchial Asthma. International Severe Asthma Forum 2016 (ISAF 2016), 17 - 19 November 2016, Manchester, UK. Clin Transl Allergy 2017, 7(Suppl 2):14
3. Denitsa Dimitrova, Vania Youroukova, Tsvetelina Velikova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Anna Valerieva. Serum Periostin Levels As A Biomarker For Impaired Lung Function In Adult Patients With Moderate To Severe Asthma. Poster award. International Severe Asthma Forum 2016 (ISAF 2016), 17 - 19 November 2016, Manchester, UK. Clin Transl Allergy 2017, 7(Suppl 2):14

4. Youroukova V., Dimitrova D., Valerieva A., Velikova T., Tumangelova-Yuzeir K. Serum IL-6, IL-17A and periostin levels in different clusters of adult patients with moderate to severe asthma. Poster Discussion Session (PDS). EAACI International Congress 2017, 17-21 June 2017, Helsinki, Finland. Allergy. Volume 72, Issue S103, 10.1111/all.13251
5. Dimitrova D., Youroukova V., Velikova T., Tumangelova-Yuzeir K. Periostin and IL-17A: serum levels in adult patients with moderate to severe bronchial asthma. Poster Discussion Session (PDS). EAACI International Congress 2017, 17-21 June 2017, Helsinki, Finland. Allergy. Volume 72, Issue S103, 10.1111/all.13251
6. D. Dimitrova, V. Youroukova, T. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir, S. Lesichkova. Serum levels of IL-6 in adult patients with moderate to severe asthma. Thematic poster presentation. ERS International Congress 2017, 09-13. September 2017, Milan, Italy. European Respiratory Journal 2017 50: PA1166; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA1166
7. D. Dimitrova, V. Youroukova, T. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir. Predictors of severe exacerbations in patients with moderate and severe asthma. Accepted for poster discussion presentation at the ERS International Congress 15-19 September 2018 Paris, France. European Respiratory Journal 2018 52: PA5500; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA5500
8. D. Dimitrova, V. Youroukova, T. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir. Serum levels of IL-5, IL-6 and IL-8 in moderate and severe asthma clusters. Accepted for poster discussion presentation at the ERS International Congress 15-19 September 2018 Paris, France. Awarded the ERS Young Scientist Sponsorship. European Respiratory Journal 2018 52: PA5060; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA5060

8.3. Участия в български форуми

1. Д. Димитрова, В. Юрукова, Я. Славова, М. Преславова, Ц. Великова, К. Тумангелова. Маркери на възпалението при неконтролирана умерено тежка и тежка персистираща бронхиална астма. ОР 24. 6ти конгрес на БДББ, 9-12 Юни 2016, Златни пясъци. Торакална медицина 2016, VIII (прил 1): 34-34
2. Д. Димитрова, В. Юрукова, Ц. Великова, К. Тумангелова-Юзеир. Периостин и IL-17A: Серумни нива при възрастни пациенти със средно-тежка и тежка бронхиална астма. Лятна научна среща на БДББ, 22-24.06.2018 Боровец, България
3. Д. Димитрова, В. Юрукова. Високи нива на азотен окис в издишан въздух –риск фактор за чести екзацербации при умерено тежка и тежка персистираща бронхиална астма. ОР 4.3. 7ми конгрес на БДББ, 18-21 октомври 2018, Златни пясъци, България
4. Д. Димитрова, В. Юрукова, Ц. Великова, К. Тумангелова-Юзеир. Серумни нива на IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 и IL-17A при предварително дефинирани Th2-субгрупи на пациенти с умерено тежка и тежка бронхиална астма. ОР 4.3. 7ми конгрес на БДББ, 18-21 октомври 2018, Златни пясъци, България

8.4. Проекти свързани с темата на дисертацията

1. Участие в ГРАНТ, 2015 г. Финансираща организация: Съвет по медицинска наука, Медицински университет – София. Номер на проекта: № 308/15.01.2015, договор №75/2015. Тема: Фенотипизиране на бронхиална астма. Ръководител на проекта: доц. Ваня Юрукова д.м.