



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

д-р Димитринка Събкова Митева

**Някои клинични и генетични фактори за
тежка астма при деца в България**

Автореферат

на дисертационен труд за присъждане на научна и
образователна степен “доктор”
Научна специалност: „Педиатрия”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

проф. д-р Пенка Илиева Переновска, дм
доц. д-р Гергана Петрова Стоянова, дм

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:

проф. д-р Радка Стефанова Тинчева, дм

София, 2021 г.

Дисертационният труд е разработен върху 164 страници, съдържа 63 фигури, 27 таблици и 2 приложения. Библиографията включва 310 източника, от които 29 на кирилица.

Дисертационният труд е представен и обсъден на Катедрен съвет на Катедрата по Педиатрия при Медицински Факултет на Медицински Университет – София, състоял се на 30.09.2020 г.

Състав на Научното жури:

- Проф. Иван Литвиненко, дм
- Проф. Стефан Стефанов, дм
- Проф. Ваня Недкова, дм
- Проф. Тоньо Шмилев, дм
- Проф. Петранка Чакърлова, дм

Резервни членове:

- Доц. Даниел Илиев, дм
- Доц. Бойко Шентов, дм

Материалите по защитата са на разположение в Деловодството на Катедра по Педиатрия и в Отдел Наука на МФ, МУ - София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 11.01.2021 г. от 14 часа в Аудиторията на СБАЛДБ “Проф.д-р Иван Митев“ ЕАД - София

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
1. Пациенти.....	8
2. Методи.....	8
2.1. Ретроспективна част от проучването.....	8
2.2. RT-PCR на единични полиморфизми на ADAM33.....	10
2.3. Методи използвани за пациентите включени в генетичното (проспективно) изследване.....	12
2.4. Проследяване на пациентите след 5 години.....	18
2.5. Статистически методи.....	18
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	20
1. По задача 1.....	20
2. По задача 2.....	23
3. По задача 3.....	34
4. По задача 4.....	40
5. По задача 5.....	41
6. По задача 6.....	47
7. По задача 7.....	54
8. По задача 8.....	57
V. ОБСЪЖДАНЕ.....	61
VI. ИЗВОДИ.....	77
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	78
VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	79

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АИА – Аспирин индуцирана астма

АР – Алергичен риносинусит

БА – Бронхиална астма

БДО – Бронходилататорен отговор

БДТ – Бронходилататорен тест

БХР – Бронхиална хиперреактвност

ВЕД – Върхов експираторен дебит

ГЕР – Гастро-езофагеален рефлукс

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

ДП – Дихателни пътища

ЗК – Здрави контроли

ЗТ – Затлъстяване

ИГДП – Инфекции на горните дихателни пътища

ИНПР – Изоставане в нервнопсихическото развитие

КАП – Кожно-алергични проби

КС – Кортикостероид

НГЛ – Национална генетична лаборатория

НТ – Наднормено тегло

ОПЛ – Общопрактикуващ лекар

ПМА – Перименструална астма

РНК – Рибонуклеинова киселина

СЗО – Световна здравна организация

СМП – Спешна медицинска помощ

ФИД – Функционално изследване на дишането

ХОББ – Хронична обструктивна белодробна болест

АСQ – Въпросник за контрола на астмата

АСQ-IA – Интервю-базирана версия на въпросник за контрола на астмата

ACT – Asthma control test (тест за контрол на астмата)

ADAM33 – A Disintegrin And Metalloprotease - цинк-зависима metalloпротеиназа

ATS – American Thoracic Society (Американско респираторно дружество)

ВМІ – Индекс на телесната маса

BTS – British Thoracic Society (Британско респираторно общество)

CCD – Cross-reactive carbohydrate determinant (кръстосано реагиращ въглехидратен детерминант)

CD – Cluster of differentiation (кълъстер на диференциация)

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ензимно-свързан имуносорбентен анализ)

ERS – European Respiratory Society (Европейско респираторно общество)

ERV – Експираторен резервен обем

FEF25-75/FEF75 – Максимален среден експираторен дебит
FEV₁ – Форсиран експираторен обем за 1 секунда
FEV₁% pred. – FEV₁ % от предвидената стойност
FEV₁/FVC – Коефициент на Тифно
FeNO – Фракция на издишан азотен оксид
FRC – Функционален остатъчен капацитет
FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer (флуоресцентен резонансен енергиен трансфер)
FVC – Форсиран витален капацитет
GINA – Global Initiative for Asthma (Глобална инициатива за астма)
ICS – Инхалаторен кортикостероид
IFN- γ – Интерферон гама
IgE – Иммуноглобулин клас E
IL – Интерлевкин
LABA – Бета-агонисти с бързо действие
LTE4 – Левкотриен E4
LTRA – Левкотриенов антагонист
NAEPP – National Asthma Education and Prevention Program
OR – Odds ratio – вероятност, риск
ORM – Orosomucoid (алфа-1-киселинен гликопротеин)
ORMDL3 - Orosomucoid like 3 (сфинго-липиден биосинтеазен регулатор 3)
PCR – polymerase chain reaction (полимеразно-верижна реакция)
qPCR – Качествена полимеразно-верижна реакция
RT-PCR – real time PCR
SABA – Бета-агонисти с бързо действие
SDS – Индекс на стандартно отклонение
SD – Стандартно отклонение
sIgE – Специфични имуноглобулини от клас E
SMAD3 – Mothers against decapentaplegic homolog 3, акроним от смесването на гените на *Caenorhabditis elegans* Sma и *Drosophila* Mad; протеина е основен в предаването на сигнала за рецептора на растежния транскрибиращ фактор бета
SIGN – Scottish Intercollegiate Guidelines Network
SNPs – Single nucleotide polymorphisms (единични нуклеотидни полиморфизми)
Th – Т хелпери
TNF α – Tumor Necrosis Factor α (фактор на туморна некроза α)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Бронхиалната астма (БА) засяга около 15% от всички деца, което я обуславя като най-честото хронично заболяване в детската възраст. Само за 10 години от 1980 г. до 1990 г. честотата на астмата е нараснала трикратно и този темп не намалява в последващите години. Открити са редица фактори, отговорни за тази тенденция, основно свързани с глобализацията, урбанизацията и съвременния начин на живот.

В последното обновяване на GINA е записано, че астмата е хетерогенно заболяване, обикновено характеризиращо се с хронично възпаление на дихателните пътища. Развитието на астма зависи от множество различни рискови фактори от околната среда, чийто ефект е различен при индивидите с различна генетична предиспозиция. Наличието на генетична предразположеност към астма е доказана отдавна чрез данни от фамилни изследвания. ADAM33 (20p13) е първият ген за предразположеност към развитие на БА и бронхиална хиперреактност. Идентифицирани са 37 SNPs на ADAM33. На базата на публикуваната информация може да се приеме, че 4 са най-често изследваните полиморфизми на ADAM33 при деца с БА в света: T1 (rs2280091, T/C), T2 (2280090, C/T), V4 (rs2787094, C/G), S2 (rs528557, G/C).

Придружаващи заболявания, представляващи рискови фактори за развитието на астма са: алергичен ринит (АР), наднормено тегло (НТ) и гастроезофагеален рефлукс (ГЕР).

Около 15-20% от астматиците по света са с тежко клинично протичане. Дефиниция за тежка БА е дадена през 2014 г. от съвместна работна група на ERS и ATS: БА, която изисква контролиращо лечение стъпка 4-5 по GINA високи дози инхалаторни кортикостероиди (ICS) (възрастово специфична): плюс LABA или левкотриенов антагонист/теофилин) през последната година или системни КС през повече от половината месеци на предходната година за поддържане на контрол или неконтролирана астма, въпреки проведеното лечение.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на настоящата дисертация е да се опишат характеристиките на тежката астма при деца в България и да се установи ролята на основните четири от единичните полиморфизми на ADAM33.

Задачи

- Ретроспективно определяне на честотата на тежка астма сред пациентите, лекувани в Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Александровска“ за период от 5 години (януари 2010-декември 2014).
- Да се оцени честотата на придружаващите заболявания, които могат да се отразят върху контрола и тежестта на бронхиалната астма в тази ретроспективна кохорта (алергичен ринит, наднормено тегло, гастро-езофагеален рефлукс).
- Да се оптимизират праймери за T1 (rs2280091, T/C), T2 (2280090, C/T), V4 (rs2787094, C/G) и S2 (rs528557, G/C) от единичните полиморфизми на ADAM33 за RT-PCR и изработване на протокол за работа с тях.
- Да се подберат пациенти с бронхиална астма, както и съответна контролна група пациенти, при които да се извърши генетично изследване след получаване на информирано съгласие от родителите за проспективно проучване.
- Да се анализира как тежестта на астмата при пациентите от проспективната кохорта се отразява на резултатите от функционално изследване на дишането и лабораторните показатели (диференциална кръвна картина, назална еозинофилия, общи и специфични IgE и Th17).
- Да се определи разпределението на посочените полиморфизми в българските пациенти.
- Да се установи влиянието на откритите полиморфизми за клиничния ход и контрола на бронхиалната астма при изследваните деца.
- Да се определи разпределението на изследваните полиморфизми при пациентите, които остават с клинична тежка астма и след 5 годишно проследяване (януари 2014-декември 2019).

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

A. ПАЦИЕНТИ

В проучването са обособени две части:

1. Ретроспективна част

Включени са всички пациенти (1075 деца), хоспитализирани в отделението за хронични белодробни заболявания на Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД поради екзацербация на бронхиална астма за периода от 1-ви януари 2010 до 31-ви декември 2014. В случаите с повече от една хоспитализация на един и същ пациент, неговите данни са отчетени еднократно.

2. Проспективна част

Включени са две групи деца - 79 деца с БА и 29 здрави контроли (ЗК). Контролната група е по-малка, поради по-трудно намиране на деца с подписано информирано съгласие, когато получената информация не допринася полза директно за самите деца. В групата на децата с БА са включени 20 деца с тежка астма, прецизирани при ретроспективното проучване и 59 деца с БА, която не се класифицира като тежка. Двете подгрупи са близки по полово и възрастово разпределение.

B. МЕТОДИ

2.1. Ретроспективна част от проучването

Извършен е ретроспективен анализ на медицинската документация на хоспитализираните деца в отделението за хронични белодробни заболявания на Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД за период от 5 години (от 1-ви януари 2010 до 31-ви декември 2014). Това са 1075 деца (640 момчета и 435 момичета, на средна възраст 9,23 години). В анализа са включени всички пациенти, постъпили по повод на астматичен пристъп. За всички деца е събрана подробна анамнеза:

1. фамилна обремененост за бронхиална астма и алергии по майчина, бащина линия или по първа линия (брата и сестри);

2. давност на астмата: начало и ход на заболяването (първи симптоми, момент на диагностициране на астмата, начало, вид и продължителност на контролиращо лечение, брой екзацербации годишно, последен пристъп, последно лечение, ниво на контрол);

3. собствен атопичен терен: наличие на алергичен ринит, конюнктивит, атопичен дерматит, хранителна/медикаментозна/инсект алергия или друга алергия; проведени тестове за алергия (серологични/ КАП - ако има такива);

4. тегло при раждането и послеродов период; наличие на съпътстващи заболявания – с акцент наднормено тегло/затлъстяване и гасторезофагеален рефлукс; антропометрични данни (като абсолютни стойности и преизчислени като СДС по таблиците за българската популация публикувани през 2007 година;

5. анамнеза за вредни навици (тютюнопушене) на родителите/пациентите;

6. резултати от функционалното изследване на дишането при наличие на такова (преди и след пристъпа);

7. оценена е и тежестта на екзацербацията, наложила хоспитализация (продължителност на лечение с кортикостероид, пулсоксиметрични данни, физикални данни и време за резолюция на пристъпа);

8. резултати от въпросници за качество на живот и за контрол на астмата (само при пациентите, при които са налични);

Пациенти с повече от 1 хоспитализация за посочения период са оценявани само за едната хоспитализация (с по-продължителния болничен престой, по-дългото приложение на венозни кортикостероиди, по-лоши показатели от лабораторните и функционалните изследвания).

След обработка на данните се определи групата на пациентите с тежка астма.

Тежестта на астмата бе дефинирана според стъпалото на контролиращото лечение по GINA, изходната спирометрия, степента на наличие на астма симптомите извън пристъп (дневни, нощни, нужда от спасителен медикамент, ограничение във физическата активност) (таблица 1).

Таблица 1. Използвани методи за класификация на тежестта на астмата според стъпалото на контролиращото лечение, изходната спирометрия и тежестта на симптомите

Класификация на тежестта		GINA стъпало	Според изходната спирометрия	Според симптомите извън пристъп
Интермитентна		Само SABA	FEV ₁ >100%	Няма
Лека	персистираща	Стъпало 1 и 2	FEV ₁ >80%	1-2
Умерена		Стъпало 2 и 3	FEV ₁ 60-80%	3-4
Тежка		Стъпало 4 и 5	FEV ₁ < 60%	5-6

Извършена е съответна статистическа обработка.

2.2. RT-PCR на единични полиморфизми на ADAM33 (T1 (rs2280091, T/C), T2 (2280090, C/T), V4 (rs2787094, C/G) и S2 (rs528557, G/C)) и изработване на протокол за работа с тях

Солево изолиране на ДНК от венозна кръв – двудневен протокол-PCR реакция

Принцип: Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод, използван в молекулярната биология и се приема за златен стандарт за точна, чувствителна и бърза диагностика на подредбата в нуклеиновите киселини.

При изработването на сондите за настоящия проект е използван гасител BHQ1 и флорофори FAM и HEX и използвахме PCR-апарат за извършване на амплификационната реакция. Rotor-Gene 3000 (Corbett Research).

За направата на праймерите по проекта бе използвана наличната световна база данни и специфичен софтуер - PrimerDesign, Primer3, база данни за човешки праймери и сонди, специализирани сайтове за тест на вторични структури. Праймерни и SNP база данни OMIM (from the NCBI), SNPedia, Huger Navigator и RT Primer DB. Проверка на получените праймери и сонди бе извършена, чрез <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Изработените и използвани за настоящето изследване праймери и сонди са показани на таблица 2.

Таблица 2. Олигонуклеотидна последователност на използваните при RT-PCR анализ праймери и сонди за съответните SNPs в ADAM33.

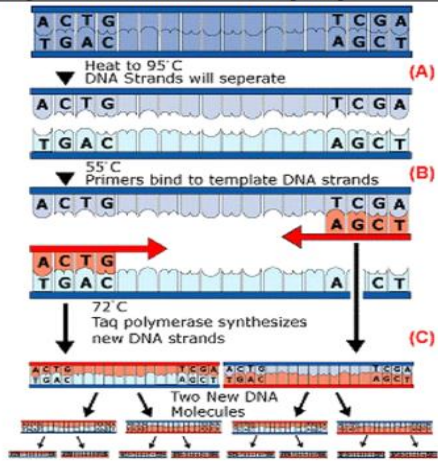
NCBI rs	Праймери	Сонди
rs 528557	F: CTC AACCCACGAGATCTTTTCG R: GGT CATGCCCGCTTTGTT	G allele: FAM-CCTGGA AAGGAGCCT-BHQ1 C allele: HEX-CCTGGA AAGGAACC-BHQ1
rs2280091	F: CCCAAAGATGGCCACACA R: GGCATGAGCCCTTCCCTTCT	C allele: FAM-CACCCACGGAGTT-BHQ1 T allele: HEX- ACCCCATGGAGTTGG-BHQ1
rs2280090	F: CCCAAAGATGGCCACACA R: GGCATGAGCCCTTCCCTTCT	C allele: FAM-TGGACAGCCCTGGC-BHQ1 T allele: HEX-TGGACAGTCCTGGC-BHQ1
rs2787094	F: TGGCCAGAAGCTAGTGGTCCT R: CAGGAAGGAAGGTCCCAAA	C allele: FAM-CTCCCCTGCAGCCT-BHQ1 G allele: HEX-CTCCCCTGGAGCCT-BHQ1

Процедура на RT-PCR:

Работи се върху лед, размразяват се разтворите от фризера и се приготвя Master Mix в една голяма епруветка, като се смесват необходимите количества dH₂O, буфер, dNTPs, Taq полимеразата (която веднага се прибира във фризера), праймери и сонди според броя на PCR реакциите. Така получената смес се разпределя по 8 µl в предварително подготвени и надписани индивидуални епруветки (фигура 1). Съотношението за всеки SNPs е индивидуално и е показано в раздела – резултати.

Следващите условия за провеждане на RT-PCR реакция са показани като пример:

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	45 sec	30
Хибризация на праймерите	50 - 60°C	45 sec	
Синтез на нова верига (елонгация)	72 °C	60 sec	
Краен Синтез	72°C	5 min	1



Фигура 1. Примерна схема на процеса на RT-PCR

За достоверно изследване е нужно наличие на негативни (липса на контаминация от другите проби, както и липса на флуоресценция без наличие на ДНК) и позитивни контроли (за отхвърляне на фалшиво положителни резултати). Благодарение на този дисертационен труд е създадена система за определяне на T1, T2, S2 и V4 полиморфизми на АДAM33 и са изследвани 108 деца (79 с астма и 29 контроли).

2.3. Методи използвани за пациентите включени в генетичното (проспективно) изследване

3.1 Клинични методи:

1) **Детайлна фамилна анамнеза** (bronхиална астма; атопия; хронични белодробни заболявания), анамнеза за началото и хода на заболяването (екзацербации/хоспитализации в предходните 12 месеца), наличие на коморбидитет (алергичен ринит, атопичен дерматит, хранителна/медикаментозна/инсект алергия), стъпало на контролиращото лечение до момента на изследването, проведени тестове за алергия

(серологични/КАП - ако има такива), анамнеза за вредни навици (тютюнопушене) на родителите/пациентите.

2) **Определяне нивото на контрол на астмата** (добре контролирана, контролирана и лошо контролирана (неконтролирана) се осъществява посредством попълване на въпросник – Asthma control questionnaire (QOL TECHNOLOGIES Ltd 2003, Professor Elizabeth Juniper, www.qoltech.co.uk) валидизиран български превод за децата от 10-17 години и версия на въпросника – интервю (interviewer-administered version – ACQ-IA) за децата от 6-10 години.

С негова помощ се отчита степента на постигане на основната цел на контролиращото лечение - минимизиране на симптоматиката, запазена физическата активност, ограничена употреба на кратко действащи бета-2 агонисти и липса на стеснение на дихателните пътища (FEV₁).

Петте най-важни симптома са еднакви и при възрастни и при деца и са включени в ACQ. Шестият въпрос е за броя впръсквания кратко действащ бета-2 агонист дневно. Пациентите отговарят на първите шест въпроса по 7 точкова скала (0=без нарушение; 6=максимално нарушение), имайки предвид тяхното състояние през предходната седмица (нощни събуждания, симптоми при събуждане, ограничение на физическата активност, задух, свиркане и употреба на медикамент при нужда – кратко действащ бета-2 агонист). На последният 7-ми въпрос оценката се дава спрямо пре-бронходилататорния FEV₁.

Изчисление на резултата от ACQ: Всеки въпрос има еднаква тежест при изчисляване на резултата, който представлява средната стойност от отговорите на 7-те въпроса. По този начин скорът е от 0 (тотално контролирана астма) до 6 (изключително слабо контролирана астма).

За приложение на ACQ в клиничната практика е необходимо да се осигури разпознаване на голяма част от пациентите с неадекватен контрол на астмата. За клинични проучвания: оптимален праг за “добре контролирана” астма е 1.50. Положителна предиктивна стойност = 0.88 (това означава, че за пациентите

с ACQ резултат 1.50 или по-висок има 88% вероятност тяхната астма да е “недобре” контролирана).

3.2 Инструментални методи:

3.2.1 Функционално изследване на дишането (ФИД) с извършване на бронходилататорен тест за оценка на отговора (БДО) при постъпване в клиниката, в съответствие със световните стандарти (ATS/ERS). Пост-бронходилататорната спирометрия се провежда съгласно утвърдения в Клиниката по педиатрия на УМБАЛ „Александровска“ протокол, съобразен с възрастта на изследваните пациенти: 15 мин след прилагането на 200 µg (две впръсквания дозиран аерозол с обемна камера) Salbutamol или 0.02 ml/kg, приложени с компресорен небулизатор с маска. БДО се оценява като процент от промяната на FEV1 в сравнение с изходната измерена стойност и като абсолютна промяна в ml. БДО се отчита като положителен при $\Delta FEV1 \geq 12\%$ и/или 200 ml.

Спирометриите са проведени в Кабинета за изследване на дихателната функция на Клиника по Педиатрия, УМБАЛ “Александровска” с MASTERSCREEN PNEUMO SPIROMETER’98 (Care Fusion) при спазване на разписаните технически инструкции за работа, почистване и дезинфекция на апаратурата и на кабинета.

Изследването се извършва в следната последователност:

бавна спирометрия → форсирана експирация → бронходилататорен тест

Към различните етапи на изследването се преминава, след най-подробно обяснение на достъпен език изискванията за изпълнение на тестовете и след като сме убедени в усвояването и разбирането им.

3.2.2 Лабораторни методи - биомаркери на алергичното възпаление

Периферна еозинофилия - автоматично (от хемоанализатор) и микроскопско броене на еозинофилен брой в натривка от кръв на предметно стъкло, оцветена по Giemsa. Определя се според броя на еозинофилите в периферна кръв. За положителни се приемат стойности от 450–500 клетки/мм³; изразена еозинофилия

– над 1500 клетки/мм³. Изброявани бяха и неутрофилите, при които за норма са приети стойностите 1 500–8 000 клетки/мм³.

Оценката на назалната еозинофилия се осъществи с микроскопско броене на еозинофилен брой в натривка на назален секрет на предметно стъкло, взета със стерилен тампон, оцветена по Giemsa. Откриването на еозинофили в намазка от носен секрет подпомага доказването на придружаващия алергичен ринит, особено при деца. Констатацията на еозинофили в носния секрет насочва за алергия, а преобладаването на неутрофилите подсказва за инфекциозен процес. Наличието на еозинофили във високи концентрации, корелира добре със степента на изразеност на симптомите.

За значителна еозинофилия се приема праг от 5% еознофили от всички клетки в цитограмата. Известно е, че този праг е със специфичност от 94,1% за атопични заболявания.

Изследване на общи IgE с ELISA методика, **EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG** (EV 3840 – 9601 E), от отделен серум от кръвта на пациентите. С ELISA тестовите китове се осъществява количествено *in vitro* изследване на човешки антитела от клас IgE в серум или плазма. Тестовият кит съдържа микротитърна плака с гнезда, покрити с поликлонални антитела срещу човешки IgE. В първата стъпка на реакцията, разредените серуми на пациентите се инкубират. IgE от пробата се свързват към антителата. За детекция на свързаните IgE се провежда втора инкубация с ензим-маркирано анти-човешко IgE (ензимен конюгат). Определянето на концентрацията на IgE се измерва посредством калибрационна крива. Отчитането се извършва при дължина на вълната 450/630 nm с програма PGM с 4 стандарта (калибратора) 0 U/ml, 10 U/ml, 100 U/ml и 500 U/ml. Резултатите са количествени и се дават в U/ml. Нормалните стойности се определиха спрямо горната референтна граница на нормата за съответната възраст на детето (таблица 3).

Таблица 3. Референтни стойности за серумно ниво на специфични IgE

Възраст	Горна референтна граница, U/ml
1-5 години	60
6-9 години	155
10 – 15 години	199
> 16 години	100

Изследване на специфични IgE с Euroline Allergy Profile Pediatrics, Enzyme Allergo Sorbent Test (EAST) на Euroimmune® (Medizinische Labordiagnostica, AG, 2014, Germany).

При 96 деца атопичният статус е изследван с китовете EUROLINE Pediatric (комплекс от най-честите хранителни и аероалергени в детска възраст). Тестваха се допълнително още 14 деца с реактива - EUROLINE Pediatric Inhalation – кит за инхалаторни алергени. Дигиталното отчитане на резултатите се осъществи със скениращо устройство (Cannon®) и лицензиран програмен продукт EUROLIneScan program. Тест китовете на EROLINE предоставят полуколичествено in vitro изследване на човешки IgE антитела в серум или плазма. Тестовите стрипове първо се активират с универсален буфер, след което се инкубират при първата реакция със серумите на пациента. Ако в тествания серум има специфични антитела от клас IgE, те се свързват с алергена. За визуализиране на свързаните антитела се провежда втора инкубация с ензим-маркирани моноклонални човешки IgE (ензимен конюгат), който катализира ензимна реакция. В долния край на всеки тест-стрип е разположена индикаторна лента, представляваща вътрешно-лабораторен качествен контрол. Само при коректно проведена инкубация цветната реакция на контролната индикаторна лента става видима.

Тестът EUROLINE е полуколичествен метод. Скалата за отчитане на резултатите се изразява в EAST системата в седем класа – от 0 до 6 (таблица 4).

Таблица 4. EAST скала за отчитане на резултата

EAST клас	Концентрация [kU/l]	Интерпретация
0	< 0.35	неоткриваеми IgE
1	0.35 – 0.7	много нисък титър IgE, често липсват клинични симптоми при налично сенсibiliзиране
2	0.7 – 3.5	нисък титър IgE, съществува сенсibiliзиране, често с клинични симптоми при по-високите стойности на класа
3	3.5 – 17.5	сигнификантен титър IgE, обичайно са налични клинични симптоми
4	17.5 – 50	висок титър IgE, почти винаги са налице симптоми
5	50 – 100	много висок титър IgE
6	> 100	абнормно висок титър IgE

(продължение на табл.4)

Алергени, заложи в тест-лентите EUROLINE Pediatric (11 аероалергена, 15 хранителни алергена и CCD маркер):

Аероалергени: gх Grass mix 2 (timothy grass, cultivated rye), t3 Birch (бреза), w6 Mugwort (див пелин), d1Der. Pteronyssinus (дом. прах), d2Der. Farinae (дом. прах), e1 Cat (котка), e2 Dog (куче), e3 Horse (кон), m2 Cladisorium her. (мухъл/плесен), m3 Aspergillus fum. (мухъл/плесен), m6 Alternariq alt. (мухъл/плесен).

Хранителни алергени: f1 Egg white (яйчен белтък), f75 Egg yolk (яйчен жълтък), f2 Cow's milk (краве мляко), f3 Codfish (бяла риба), f76 α -Lactoalbumin, f77 β -Lactoglobulin, f78 Casein (казеин), e204 Bovine serum albumin (телешки серум албумин), f4 Wheat flour (бяло брашно), f9 Rice (ориз), f14 Soybean (соя), f13 Peanut (фъстък), f17 Hazelnut (лешник), f31 Carrot (морков), f35 Potato (картоф), f49 Apple (ябълка), CCD marker, Indicator band.

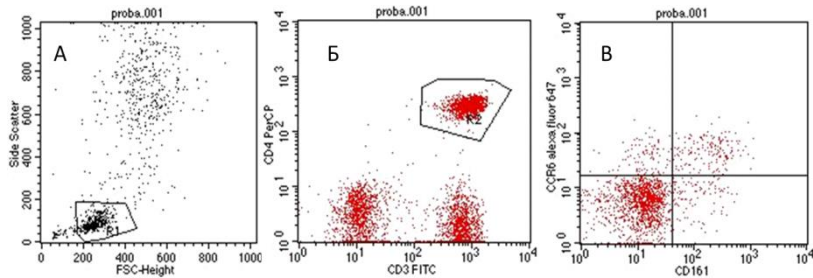
Алергени, заложи в тест-лентите EUROLINE Pediatric Inhalation (20 аероалергена и CCD маркер): g6 Timothy grass (тимотейка), g12 Cultivated rye (култивирана ръж), t2 Alder (елша), t3 Birch (бреза), t4 Hasel (лешник), w6

Mugwort (див пелин), w8 Dandelion (глухарче), w9 English plantain (английски живовляк), d1 Der. Pteronyssinus (дом. прах), d2 Der. Farinae (дом. прах), e1 Cat (котка), e2 Dog (куче), e3 Horse (кон), e6 Guinea pig (морско свинче), e82 Rabbit (заек), e84 Hamster (хамстер), m1 Penicillum not. (мухъл/плесен), m2 Cladosporium her. (мухъл/плесен), m3 Aspergillus fum. (мухъл/плесен), m6 Alternaria alt. (мухъл/плесен), CCD marker, Indicator band.

Под абривиатурата CCD се разбира cross-reactive carbohydrate determinant (кръстосано реагираща въглехидратна детерминанта). Такива детерминанти могат да бъдат открити в редица алергени от растителен и животински произход. В резултат на значителното структурно сходство CCDs могат да причинят силна кръстосана реактивност.

Изследване на Th17

При 64 деца се изследва и процента Th17 лимфоцити в периферна венозна кръв, чрез флоуцитометрично изследване на четирицветен двулазерен флоуцитометър FACSCalibur (фиг.2).



Фигура 2. Определяне на Th17 лимфоцитна субпопулация чрез флоуцитометрия. А. По големина и гранулираност (R1 електронен прозорец); Б. По експресия на CD3 и CD4. В. По експресия на CCR6 и CD161

2.4. Проследяване на пациентите след 5 години

Всички пациенти с бронхиална астма, включени в проспективното изследване, бяха потърсени 5 години след първоначалната оценка. Беше снета

подробна енамнеза от пациентите и родителите относно клиничния ход на заболяването и провежданото лечение, оцени се контрола на астмата и се извърши функционално изследване на дишането.

2.5. Статистически методи за обработка на данните

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен с програма Software package for statistical analysis (SPSS®), IBM 2009, версия 19 (2010) и Excel (v.2010). За генетичните анализи са използвани специализиран софтуер Quagen, 2011; HAPLOTYPE ANALYSIS (Elides NG, 2009) и Genecalculators.net. Графичните изображения, са изготвени основно с помощта на Excel и на SPSS v.19.

3.1 Дескриптивна статистика

Използвани са методите на дескриптивната статистика за описание на демографската и клинична характеристика на пациентите, както и за изследваните лабораторни и функционални параметри. За представяне на категорични данни са използвани абсолютен брой и относителен дял, докато качествените са представени чрез показателите на централната тенденция и разсейването.

3.2 Тестове за определяне нормалността на разпределението (Колмогоров-Смирнов, Шапиро-Уилкс). Тестовите са използвани за проверка дали данните за количествените променливи са с нормално разпределение, като е прилаган единият или другият тест, в зависимост от обема на извадките. Формата на разпределението определя преценката дали ще бъдат използвани параметрични или непараметрични тестове за сравнение на извадки, както и кои характеристики на централната тенденция и разсейването ще бъдат използвани за описателно представяне на изходните данни.

3.3 Тестове за сравняване на количествени показатели в различните групи (сравняване на средни – means). При сравняването на две групи използвахме T-test при нормално разпределение и Mann-Whitney при разпределение, различно от

нормалното. При сравняване на повече от две групи – ANOVA – post-hoc-analysis или съответно Kruskal-Wallis test.

3.4 Корелационен анализ

Използвахме корелационен анализ – между категорийни признаци (метод на χ^2 - квадрат при повече от две групи на една от променливите и Fisher's Exact test при таблици с размерност 2×2); между категорийни и количествени признаци (Дисперсионен анализ – ANOVA) и между количествени признаци (корелационен и регресионен анализ) за определяне наличието на връзка (с асоциативен или причинно-следствен характер) между два или повече показателя, каква е нейната сила, форма и посока.

За ниво на значимост бе избрано $\alpha=0.05$, т.е. при стойности на $p < \alpha$ се отхвърля нулевата хипотеза.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. *Задача 1. Ретроспективно определяне на честотата на тежка астма сред пациентите лекувани в отделението за хронични респираторни заболявания на Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД за период от 5 години (януари 2010-декември 2014)*

За посочения период в отделението за хронични заболявания в Клиниката по педиатрия са хоспитализирани 1075 пациенти с пристъп на бронхиална астма. Някои пациенти са лекувани многократно, но са отчетени само веднъж. Разпределението на бройката пациенти през годините е сравнително постоянна - около 200 деца, като най-голям е бил броят им през 2010 година – 262 деца, а най-малък - 192 през 2013 година. Няма статистически значима разлика в горепосочените стойности ($p > 0,05$, Chi-Square Test). От една страна, поради увеличаване на броя на лечебните заведения (държавни и частни), в които да се приемат и лекуват деца с бронхиална астма след 2010-та година, а от друга –

поради изваждането от общия брой на пациенти с повторна и следваща хоспитализация след 2010 година (таблица 5).

Таблица 5. Брой и разпределение по пол на хоспитализираните деца през отделните по години

година	2010	2011	2012	2013	2014	
момчета	135	124	124	128	129	p=0,43
момичета	127	91	87	64	66	p=0,17
общо	262	215	211	192	195	p=0,07

Рехоспитализациите на пациентите, които не са включени в статистическото изчисление за честотата на тежка астма варират между 14 (през 2010 година) и 53 (през 2013 година) (фиг.3).



Фигура 3. Брой на рехоспитализациите през годините

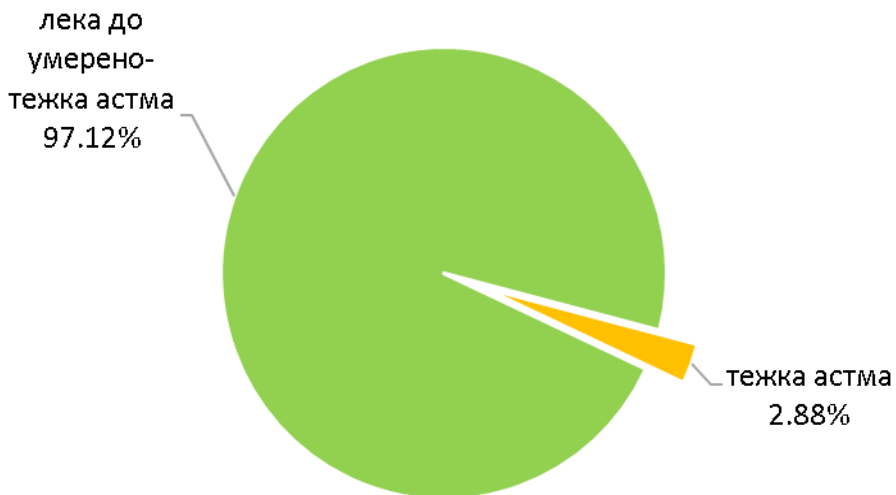
От пациентите, хоспитализирани за посочения период, 31 от децата отговаряха на критериите за тежка астма (табл.6). Стойностите са приблизително еднакви - около 2,9% (фиг.4), не се установи статистически значима разлика през отделните години ($p=0,99$, Chi-Square Test).

Таблица 6. Брой и процентно разпределение на пациентите с тежка астма през годините

година	2010	2011	2012	2013	2014	усреднена стойност
брой пациенти с тежка астма	8	6	6	5	6	31
% спрямо всички хоспитализации за астма [§]	2,90	2,43	2,43	2,04	2,48	2,47
% спрямо хоспитализирани деца *	3,05	2,79	2,84	2,60	3,08	2,88

* не са включени последващи хоспитализации след първата на пациентите

§ включени всички хоспитализации, но без корекцията в броя на тежките астматици.



Фигура 4. Процент на деца с тежка астма в изследваната популация

Разпределение по пол: 16 момичета и 15 момчета. Честотата на тежката астма е по-ниска при момчетата (2,34%), в сравнение с момичетата (3,67%), но разликата е статистически несигнификантна ($p=0.155$, Chi-Square Test, Yates correction).

2. Задача 2. Да се оцени честотата на придружаващите заболявания, които могат да се отразят върху контрола и тежестта на бронхиалната астма в тази ретроспективна кохорта (алергичен ринит, наднормено тегло, гастро-езофагеален рефлукс)

2.1 Алергичен ринит

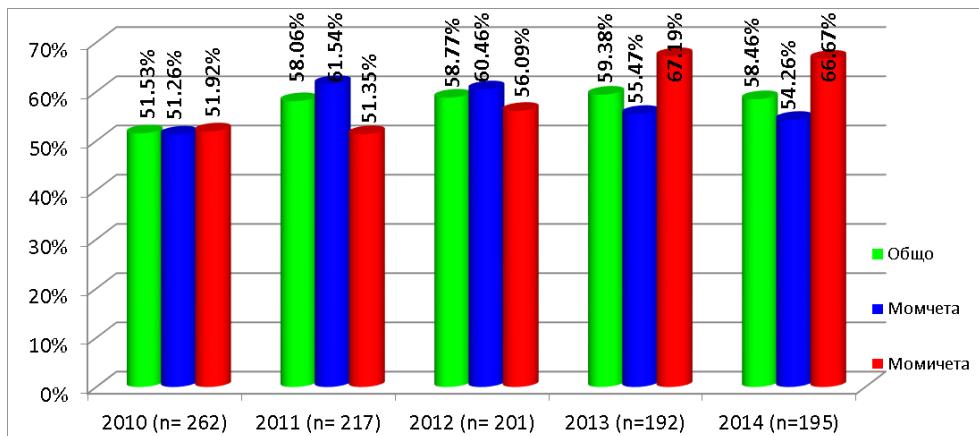
Близо 60% от децата за посочения период са имали и алергичен ринит – 658 пациента. Разпределението по пол на пациентите през годините е представено на таблица 7. Процентното разпределение на децата с АР общо и по пол по години е графично представено на фигура 5.

Таблица 7. Брой и разпределение на пациентите по пол съобразно наличие на алергичен ринит през годините

	2010 година		2011 година		2012 година		2013 година		2014 година		
	АР +	АР -	АР +	АР -	АР +	АР -	АР +	АР -	АР +	АР -	
момчета	81	77	55	88	78	51	71	57	70	59	p>0,05
момичета	54	50	38	36	46	36	43	21	44	22	p>0,05
общ брой	135	127	93	124	124	87	114	78	114	81	p>0,05
p>0,05											

АР + - с алергичен ринит; АР- - без алергичен ринит

Налице е статистически значима тенденция за нарастване на процента на момчетата с АР спрямо тези без АР през последните години, като през 2013 и 2014 години процента при момчетата превишава този при момчетата ($p=0,04$, Chi-Square Test).



Фигура 5. Процент на децата AP и БА в изследваната популация през различните години

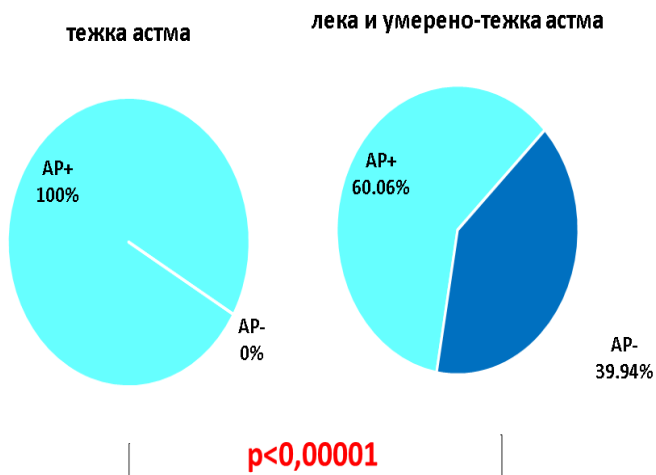
Възрастта (изчислена в месеци) на пациентите с AP е статистически по-голяма от тази на пациентите без AP, отнесено към всяка отделна година ($p < 0,05$, ANOVA) с изключение на 2011 година, когато се наблюдава същата тенденция, но статистически несигнификантна ($p = 0,07$ за момчетата, $p = 0,06$ за момичетата, ANOVA). Подробно данните са представени на таблица 8. Няма статистически значима разлика във възрастовото разпределение между двата пола при пациентите ($p = 0,317$, Mann-Whitney U test). Не се установи и статистически значима разлика във възрастовото разпределение на пациентите с AP през отделните години ($p = 0,259$, Kruskal-Wallis Test), както и при пациентите без AP ($p = 0,291$, Kruskal-Wallis Test).

Таблица 8. Възраст (в месеци) и полово разпределение на пациентите съобразно наличие на алергичен ринит през годините

	2010		2011		2012		2013		2014		
	момчета	момичета	момчета	момичета	момчета	момичета	момчета	момичета	момчета	момичета	
AP-	80,92±5,02	76,58±5,46	78,90±7,18	85,30±9,32	66,98±6,29	85,72±8,38	65,77±4,82	86,57±8,35	77,35±8,12	69,34±7,31	$p > 0,05$
AP+	107,38±4,74	107,29±6,67	100,04±5,25	104,78±8,59	104,65±6,04	102,84±7,47	95,59±5,74	99,23±7,81	101,13±5,16	100,38±6,25	$p > 0,05$
	$p = 0,0013$	$p = 0,0009$	$p = 0,07$	$p = 0,06$	$p = 0,0006$	$p = 0,012$	$p = 0,014$	$p = 0,04$	$p = 0,049$	$p = 0,013$	

AP + - с алергичен ринит; AP- - без алергичен ринит

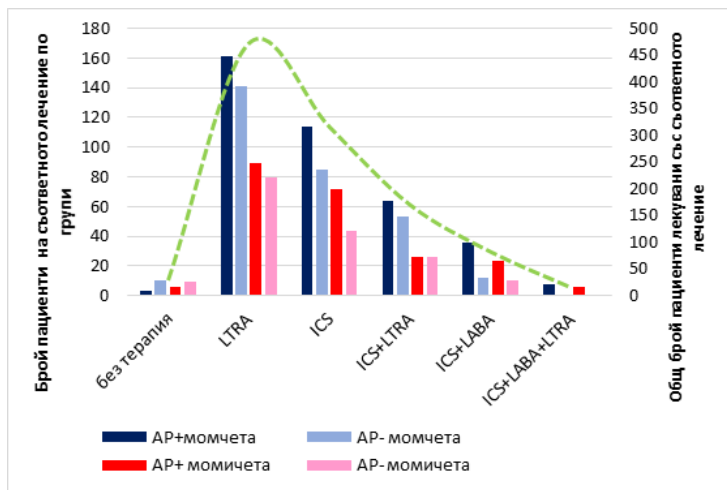
Всички деца, идентифицирани като пациенти с тежка астма (31), имат и придружаващ АР 100%. В същото време общата честота на АР при другите деца е 60,06% ($p < 0,00001$, Chi-Square Test) (фиг.6).



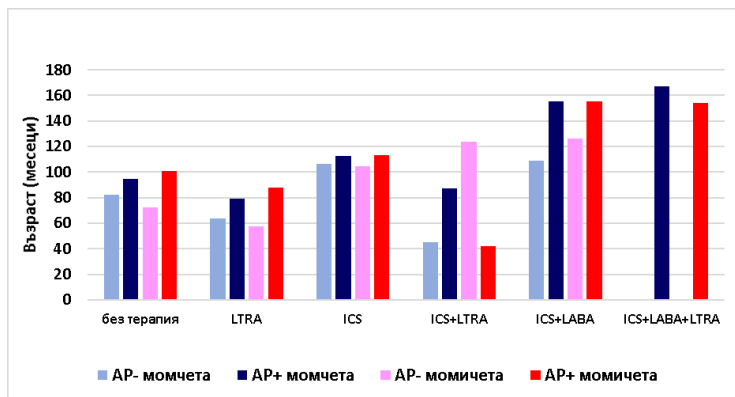
Фигура 6. Процент на децата с АР разпределени в две групи - тежка астма и лека до умерено-тежка астма

Всички пациенти с АР са получавали терапия с антихистамин (100%). В групата от деца без АР антихистамини са назначавани в над 95% от случаите /398 деца/, което е статистически незначимо ($p = 0,82$, Chi-Square Test).

По отношение на контролиращата терапия за БА 28 пациента са прилагали само Вентолин при нужда), а 14 са на тройна комбинация (ICS+LABA+LTRA). Най-много пациенти са на левкотриенови антагонисти (фиг.7). Пациентите на комбинираните медикаменти са с най-голяма възраст (в месеци) (фиг. 8).

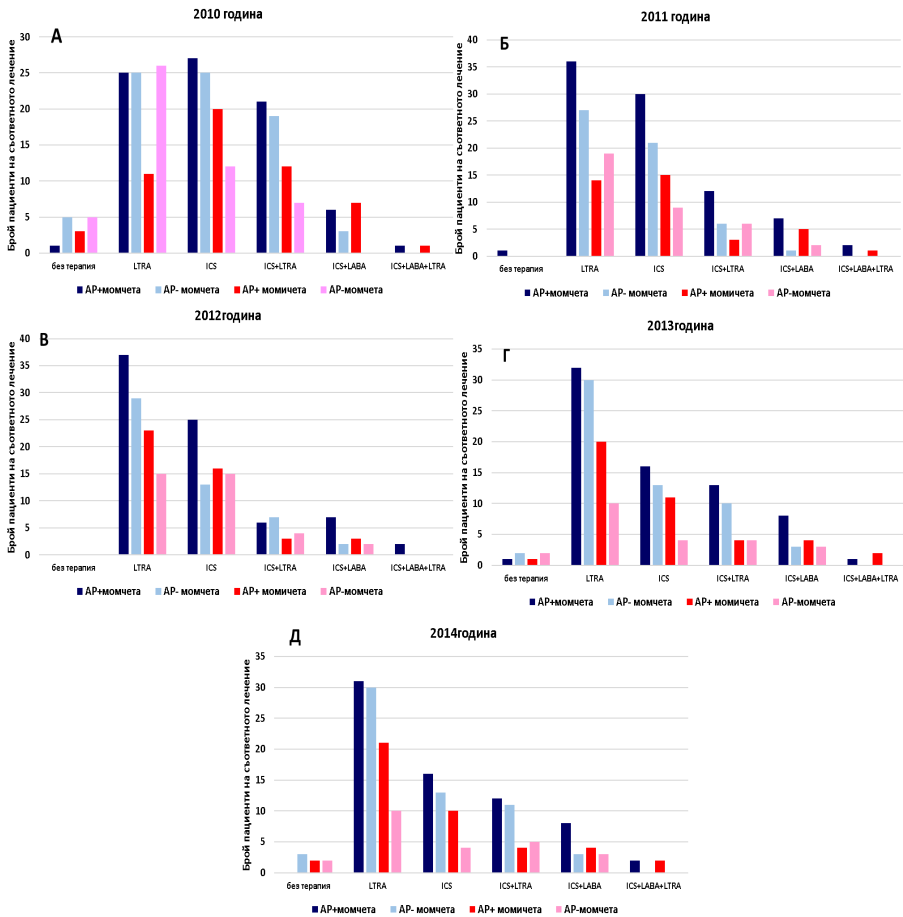


Фигура 7. Брой пациенти на съответната терапия разпрделени по пол и по наличие или отсъствие на AP (LTRA - левкотриен рецепторен антагонист; ICS - инхалаторен кортикостероид; LABA - дългодействащ бета-2 агонист)



Фигура 8. Средна възраст на пациентите на съответната контролираща терапия, разпрделени по пол и по наличие или отсъствие на AP

Интересен е паралелът през годините на различните терапии спрямо наличието на AP и LTRA - през 2010 година децата на които е изписван такъв медикамент повечето са без AP, но това се променя през следващите години (фиг.9 а-д).



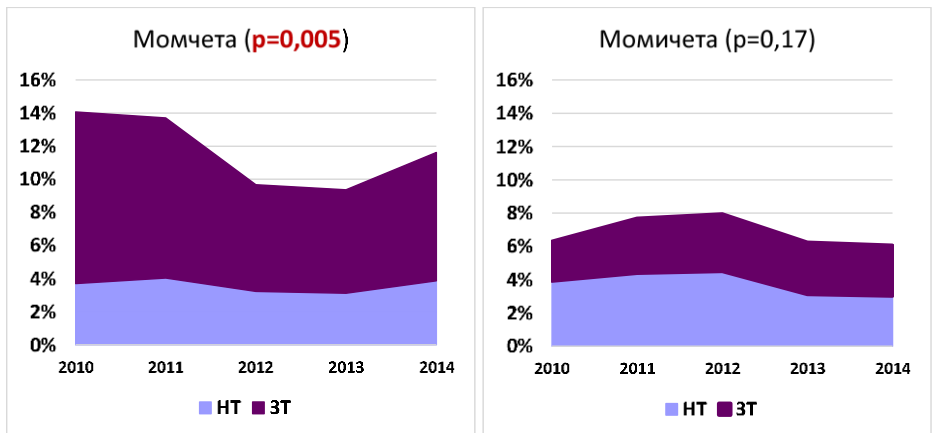
Фигура 9. Брой пациенти на съответната контролираща терапия разпределени по пол и по наличие или отсъствие на AP за всяка една година. А - 2010 година; Б - 2011 година; В - 2012 година; Г - 2013 година; Д - 2014 година

По отношение на другите придружаващи заболявания 28,8% от пациентите с AP имат и ГЕР (190 деца) и 13,52% са с наднормено тегло (89 деца). Има статистическа значима разлика в честотата на ГЕР при децата с AP спрямо тези без AP ($p < 0,00001$, Chi-Square Test). Подобна разлика има и по отношение на наднорменото тегло ($p = 0,00013$, Chi-Square Test).

2.2. Наднормено тегло/затлъстяване

От включените в анализа 1075 деца 9,6% (104 деца) са с наднормено тегло (НТ) ($BMI\ 2,5 < SDS < 3$) или затлъстяване (ЗТ) ($BMI\ SDS > 3$). От тези деца 28,5% са момичета (30 деца). Общо 65 деца са със затлъстяване - 13 момичета (20%) и 43 момчета. Няма статистически значима разлика по отношение на процента деца с НТ съобразно пола ($p=0,769$, Chi-Square Test), но има такава по отношение на децата със ЗТ в полза на момчетата ($p=0,01$, Chi-Square Test). При сравняване на стойностите за отделните години се запазва същата тенденция за НТ ($p=0,58$, t-Test), а за ЗТ ($p=0,004$, t-Test). Тези разлики се дължат основно на различното съотношение при момчетата на ЗТ спрямо НТ през годините ($p=0,05$, F-Test). При момичетата няма статистически значима разлика в това отношение ($p=0,170$, F-Test).

Съответният брой и процентното им разпределение по пол и година са представени на таблица 9 и фигура 10.



Фигура 10. Процентно разпределение на децата със ЗТ и НТ в изследваната популация през различните години за съответния пол

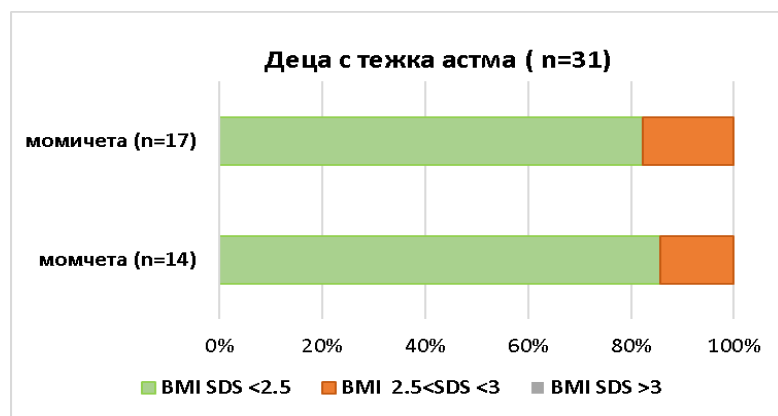
Таблица 9. Брой пациенти със ЗТ или НТ и процентната им честота, разпределени по пол и година

	2010 година		2011 година		2012 година		2013 година		2014 година		p, F-Test
	НТ	ЗТ	НТ	ЗТ	НТ	ЗТ	НТ	ЗТ	НТ	ЗТ	
момичета	5 (3,7%)	14 (10,37%)	5 (4,03%)	12 (9,67%)	4 (3,22%)	8 (6,45%)	4 (3,12%)	8 (6,25%)	5 (3,87%)	10 (7,75%)	p=0,005
момчета	5 (3,93%)	3 (2,36%)	4 (4,39%)	3 (3,29%)	4 (4,5%)	3 (3,44%)	2 (3,12%)	2 (3,12%)	2 (3,03%)	2 (3,03%)	p=0,170
общ брой	10 (3,82%)	17 (6,48%)	9 (4,18%)	15 (6,97%)	8 (3,79%)	11 (5,21%)	8 (4,16%)	10 (5,20%)	7 (3,58%)	12 (6,15%)	p=0,026
p, t-Test	p=0,58 (НТ); p=0,004 (ЗТ)										

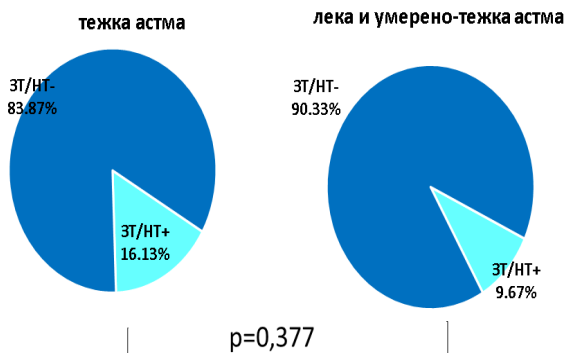
НТ - наднормено тегло, ЗТ - затлъстяване

По отношение на другите придружаващи заболявания 87,5% от пациентите с наднормено тегло (НТ+ЗТ) имат и ГЕР (91 деца) и 85,58% са с АР (89 деца). Има статистическа значима разлика в честотата на АР при децата съобразно теглото, като АР е по-рядък при децата с наднормено тегло ($p < 0,00001$, Chi-Square Test). Значителна разлика се наблюдава и по отношение на ГЕР, който е много по-чест в групата с наднормено тегло (НТ+ЗТ) ($p < 0,00001$, Chi-Square Test).

От групата деца с тежка астма 3 момичета и 2 момчета са с наднормено тегло, но нито едно от децата не е със затлъстяване (фигура 11). Въпреки, че изглежда НТ е по-често в групата с тежка астма, не се откри статистически значима разлика ($p = 0,377$, Chi-Square Test, Yates correction) (фигура 12).



Фигура 11. Процентно разпределение на децата с тежка астма съобразно BMI SDS за съответния пол



Фигура 12. Процент на децата с наднормено тегло (HT+ЗТ) разпределени в две групи - тежка астма и лека до умерено-тежка астма

2.3. Гастро-езофагеален рефлукс

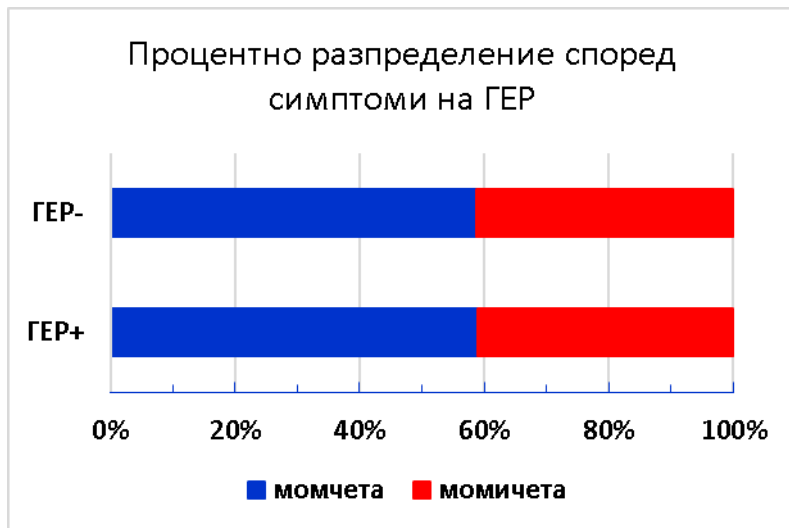
От анализираните 1075 деца с БА 19,06% (205 деца) са с клинични симптоми на ГЕР (коремна болка, „парене“ зад гръдната кост, регургитации, кашлица след хранене, кашлица засилваща се в легнало положение, рецидивиращи ларинггеални кашлици, афония, облекчаване на симптомите след приложение на антирефлуксна терапия). Честотата на децата със симптоми е сравнително постоянна през годините (табл.10) и няма статистически значими разлики (p=0,83, t-Test).

Таблица 10. Брой пациенти с клинични симптоми на ГЕР и процентната им честота спрямо общата бойка, разпределени по пол и година.

	2010 година		2011 година		2012 година		2013 година		2014 година		
	ГЕР +	ГЕР -	ГЕР +	ГЕР -	ГЕР +	ГЕР -	ГЕР +	ГЕР -	ГЕР +	ГЕР -	
момчета	26 (19,25%)	109	23 (18,54%)	101	23(18,54%)	101	24 (18,75%)	104	25 (19,37%)	103	p>0,05
момичета	25 (19,68%)	102	18 (19,78%)	74	17(19,54%)	70	12 (18,75%)	52	12 (18,18%)	55	p>0,05
общ брой	51 (19,46%)	211	41 (19,06%)	175	40 (18,95%)	171	36(18,75%)	156	37 (18,97%)	158	p>0,05
p>0,05											

От децата с ГЕР 121 са момчета и 84 са момичета. Процентното им разпределение по групи е 19,31% за момичетата и 18,9% за момчетата. Няма

статистически значима разлика в това разпределение ($p=0,9961$, Chi-Square Test).
 Както и по отношение на половото разпределение в групите с и без симптоми на ГЕР ($p=0,9123$, Chi-Square Test) (фиг.13).



Фигура 13. Полово разпределение на децата със симптоми на ГЕР

Не се откри статистически значима разлика по отношение на възрастта и наличието на ГЕР симптоми ($p>0,05$, Kruskal-WallisTest) таблица 11.

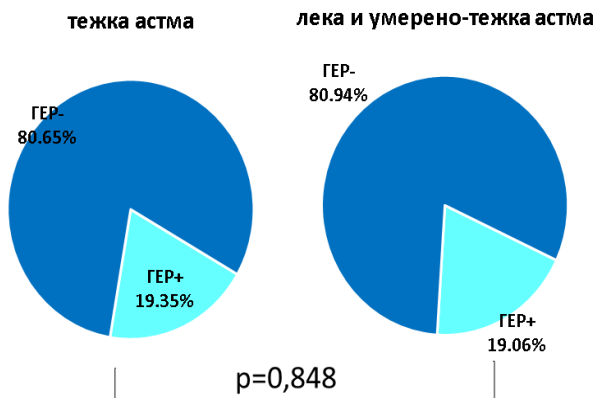
Таблица 11. Средна възраст (месеци) на пациентите с ГЕР и без симптоми на ГЕР разпределени по пол

	ГЕР+	ГЕР-	
момчета	89,62±19,51	91,58±25,46	p>0,05
момичета	98,54±24,74	97,29±26,67	
общо	93,45±28,29	94,08±29,16	

По отношение на другите придружаващи заболявания 92,7% от пациентите със симптоми на ГЕР имат и АР (190 деца). Има статистическа значима разлика в честотата на АР при децата съобразно наличие на ГЕР симптоми, като АР е по-чест при симптоматичните деца ($p<0,00001$, Chi-Square

Test). Значителна разлика се наблюдава и по отношение на наднорменото тегло, което е много по-често в групата с ГЕР ($p < 0,00001$, Chi-Square Test).

От групата деца с тежка астма 6 деца са с ГЕР. Макар и наличието на ГЕР по литературни данни да влошава контрола и съответно да се очаква по-висока честота на ГЕР при тежки астматици, подобна зависимост не се откри ($p = 0,848$, Chi-Square Test, Yates correction) (фиг.14).



Фигура 14. Процент на децата с ГЕР разпределени в две групи - тежка астма и лека до умерено-тежка астма

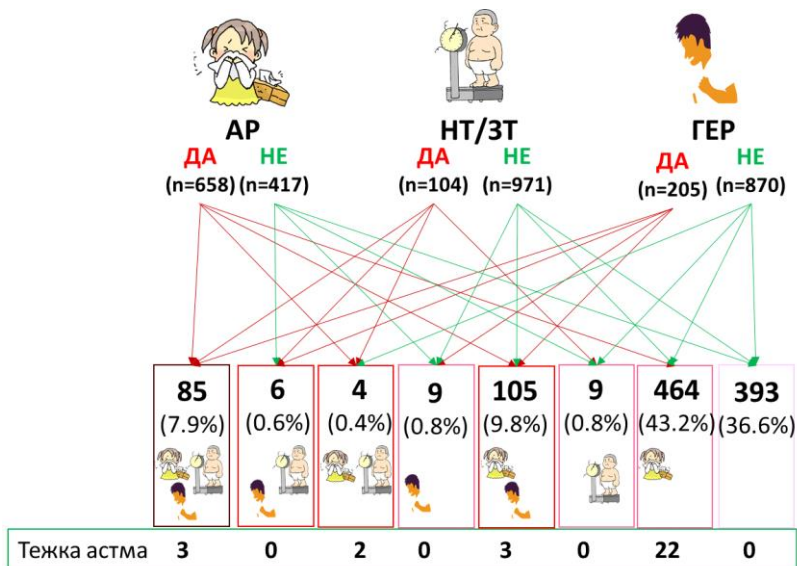
2.4 Обобщение

Всички данни на децата по отношение на БА, наличие на АР, НТ/ЗТ и ГЕР се анализираха чрез логистическа мултиноминална регресия и се установи, че АР е силно свързан с наличие или отсъствие на тежка астма (таблица 12).

Таблица 12. Относителна вероятност и регресионен коефициент спрямо наличие на тежка астма по отношение на АР, ГЕР, пол и НТ/ЗТ

Характеристика	OR (95% CI) регресионен коефициент при пациентите с тежка астма спрямо тези без тежка астма	p
Мъжки пол	-0,601 (0,265-1,134)	0,106
Алергичен ринит	-3,155 (0,006-0,317)	0,002
ГЕР	1,270 (0,893-14,2)	0,072
НТ/ЗТ	-1,311 (0,06-1,206)	0,086

Обобщена графична фигура на децата разпределени по придружаващите заболявания е представена на фигура 15.



Фигура 15. Брой деца (и процент от общия брой) разпределени в 8 групи съобразно наличие на ГЕР, АР и НТ/ЗТ. В зеления правоъгълник отдолу са отбелязани децата с тежка астма

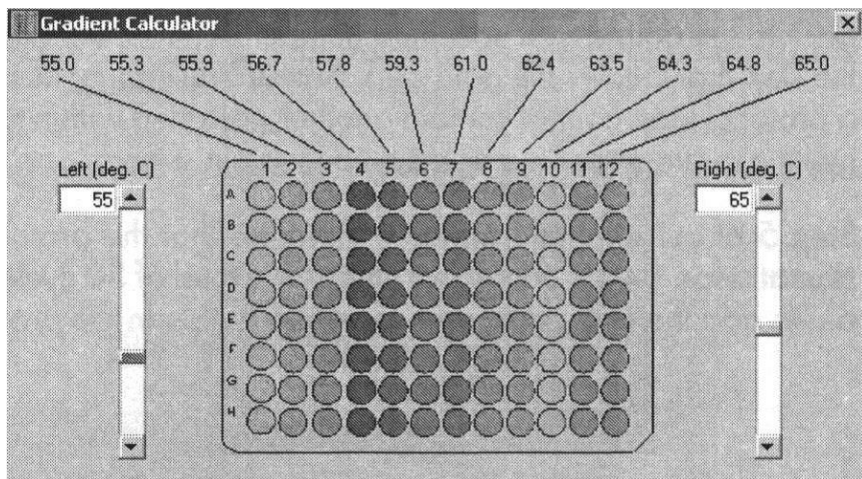
3. Задача 3. Да се оптимизират избрани праймери за T1 (rs2280091, C/T), T2 (2280090, T/C), V4 (rs2787094, C/G) и S2 (rs528557, G/C) от единичните полиморфизми на ADAM33 за RT-PCR и изработване на протокол за работа с тях

Първоначално за оптимизиране на протокола за RT-PCR бе използван стандартен протокол за PCR (табл 13).

Въз основа на теоретично определените на T annealing (T_m) на праймерните двойки, се проведеха експерименти за определяне на оптималната температура на хибридизация на праймерите. За целта беше използван термоциклер (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA), снабден с градиентен термоблок и позволява програмирането и едновременното инкубиране на различни проби при различни температури, вместо провеждането на отделни експерименти за всяка T_m . Началната температура бе програмирана с 5°C по-ниска от изчислената по формулата на Wallace и постепенно се увеличаваше през 1.5-5°C (фиг.16).

Таблица 13. Първоначален протокол за PCR

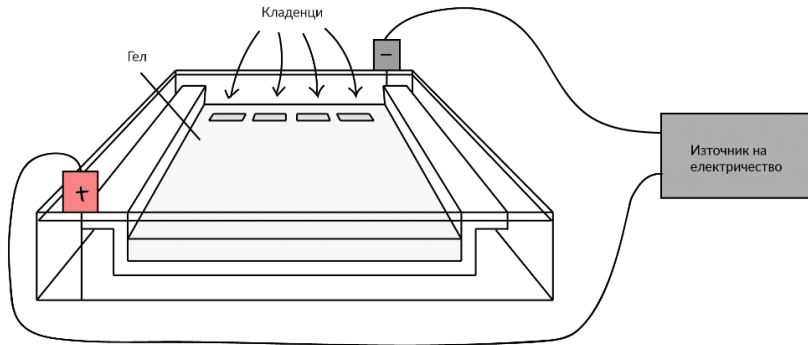
ДНК	2 μ l
R- праймер	0,3 μ l
F- праймер	0,3 μ l
DNTP	0,4 μ l
Taqman	0,05 μ l
Буфер	1 μ l
Вода чиста от нуклеаза	15,95 μ l



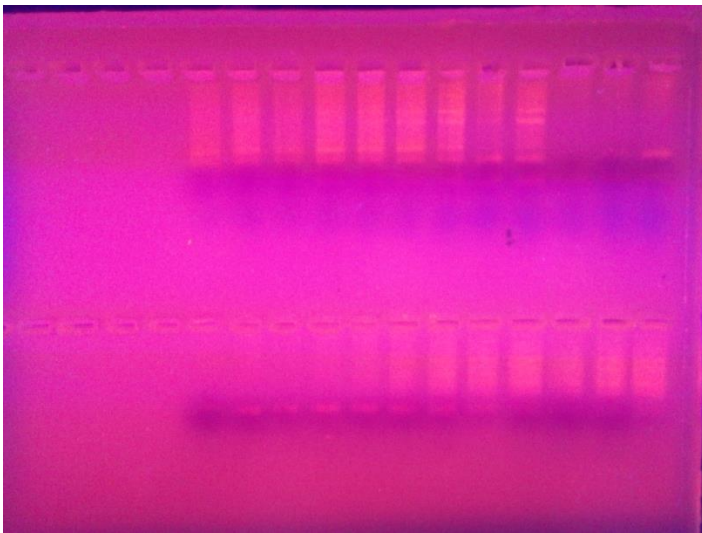
Фигура 16. Градиентен калкулатор за определяне на температурите за хибридизация на праймерите

Резултатите от експерименталното установяване на температурите на спояване бяха визуализирани и отчитани с помощта на 2% агарозна гел-електрофореза. Готовите продукти се натоварват с loading buffer (багрило бромфенол блау) 3 μ l и се накапват върху 2% агарозен гел. За целта се приготви 2% агарозен гел по следния протокол: 2 g агароза + 20 мл TAE буфер + 80 мл дестилирана вода се загряват до напълно разтваряне на агарозата, след което сместа се охлажда до 50°C и се добавя 6 ml етидиев бромид, хубаво се разбърква и се излива в гел-кувета. Чрез специални гребени се правят в единият край на гела вдлъбнатини, подобни на джобове, които се наричат кладенци, които са местата, където се поставят в последствие ДНК пробите. След охлаждане и стягане на гелът – той се поставя в специална гелна кутия (фиг.17) (Gel Electrophoresis apparatus GNP-200, Pharmacia Fine Chemicals Inc, Canada). Единият край на кутията е свързан към един положителен електрод, докато другият край е свързан с отрицателен електрод. Основната част на кутията, където е поставен гелът, е запълнена с буферен разтвор. Буферът запълва гелната кутия до ниво, при което едва покрива гела. Краят на гела с кладенците е поставен към отрицателния

електрод, тъй като ДНК фрагментите се придвижат към положителния електрод. Приложено бе електричество от около 150 mV и резултата бе отчитан след 20 минути чрез UV светлина (Gibco Brc UV Trasilluminator, Vite Technologies Ltd, France). На фигури 18 е представена снимка на две от 4-те електрофорези.



Фигура 17. Схематично представяне на гел-електрофореза



Фигура 18. Резултат от гел електрофореза на T1 (горен ред) и T2 (долен ред)

В резултат на гел-електрофореза след градиентен PCR се определиха подходящите температури за извършване на RT-PCR. Преди изследването на пациентските проби, отделно се оптимизираха протоколите за всеки един SNPs – количество реактиви, *Tm* и брой цикли, чрез оптимизационни RT-PCR реакции (Rotor Gene Q, Qiagen, Germany) на 3 стандартни ДНК (предоставени от Национална Генетична Лаборатория, отбелязани като 911, 912, 913). За тях установихме следният генотип представен е таблица 14 и фигура 19. Тези проби впоследствие са използвани за контроли при изследването на пациентите.

Таблица 14. Получени резултати за трите стандартни ДНК-профила

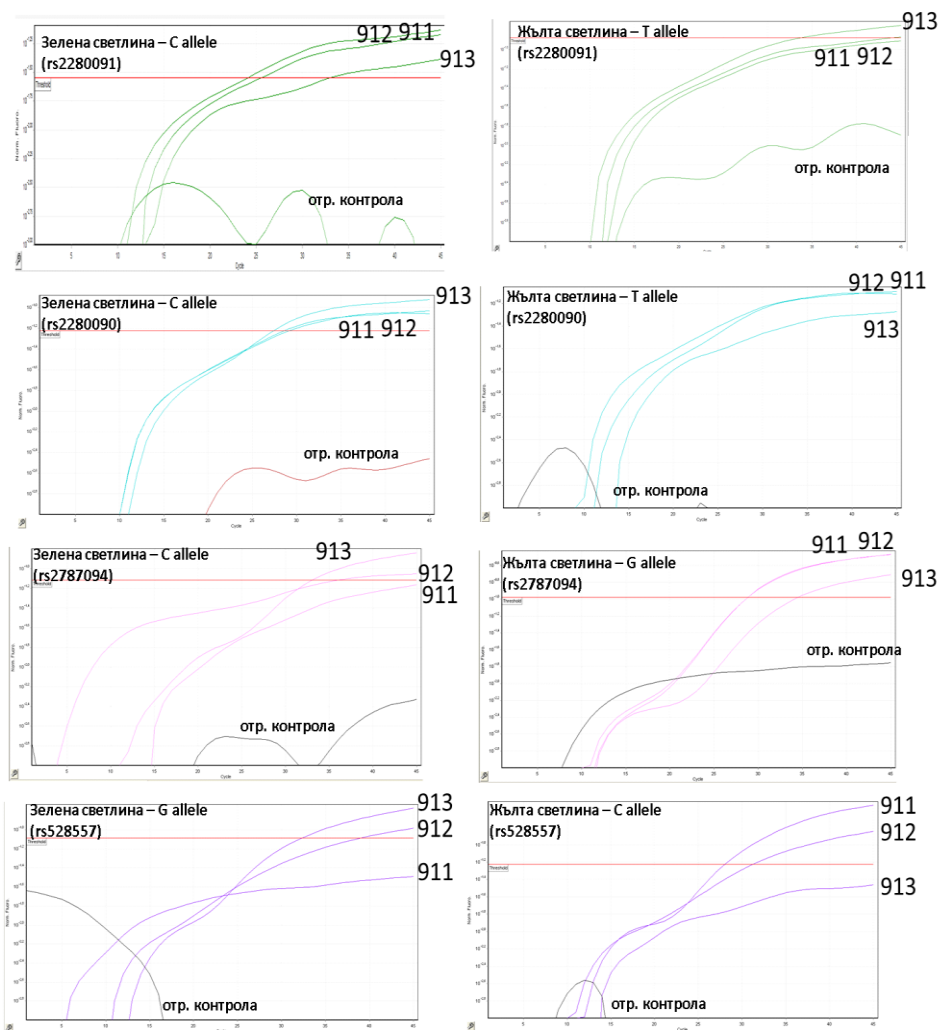
	T1 (rs2280091)	T2 (rs2280090)	S2 (rs2787094)	V4 (rs528557)
ДНК1 (911)	CC	TT	GG	CC
ДНК2 (912)	CC	TT	GG	CG
ДНК3 (913)	TT	CC	CC	GG

На таблица 15 са представени окончателните параметри за извършване на RT-PCR за всеки един от изследваните 4 SNPs.

Таблица 15. Протокол за RT-PCR на изследваните SNPs. Представено е количество за една проба

	указания на производителя	T1 rs2280091	T2 rs2280090	S2 rs2787094	V4 rs528557
F- праймер (μ l)	0,5-0,9	0,8	0,8	0,8	0,8
R- праймер (μ l)	0,5-0,9	0,8	0,8	0,8	0,8
FAM- репортер (μ l)	0,4-0,8	0,8	0,8	0,4	0,4
HEX- репортер (μ l)	0,4-0,8	0,8	0,4	0,7	0,4
TaqMan ® Master Mix (μ l)	10	10	10	10	10
ДНК(μ l)	2	2	2	2	2
вода*(μ l)	aa 20,0	4,8	5,2	5,3	6,6
общо (μ l)	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Tm (° C)	50-70	55	55	55	60
брой цикли	50-70	50	45	50	50

* вода без нуклеази

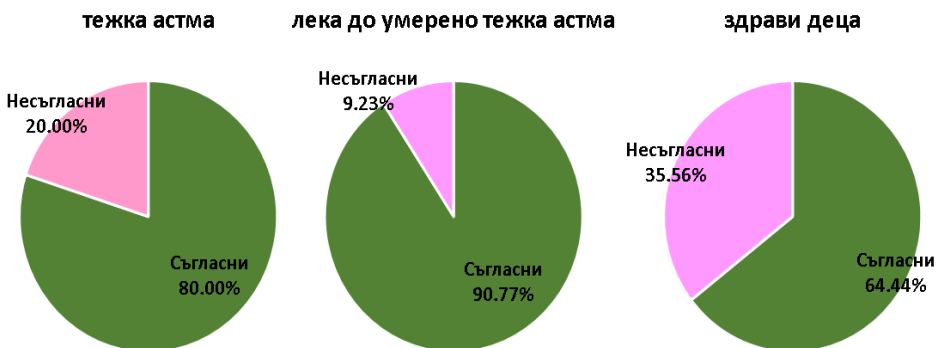


Фигура 19. Резултати от PCR за трите стандартни ДНК, заедно с негативни контроли, лява колона - анализ на зелена флуоресценция; дясна - на жълта. Анализите са направени по отделно за всяка светлина, и заедно за всеки един SNPs, чрез използване на специализираният софтуер на Qiagen - към RT-PCR циклера, версия 2011 година

При всички тестове са залагани отрицателна контрола (без ДНК, липсващият обем беше заместван от дейонизирана вода) и три положителни (на трите стандартни определени при оптимизирането на протокола) за изследване.

4. Задача 4. Да се подберат пациенти с бронхиална астма, както и съответна контролна група пациенти, при които да се извърши генетично изследване след получаване на информирано съгласие от родителите

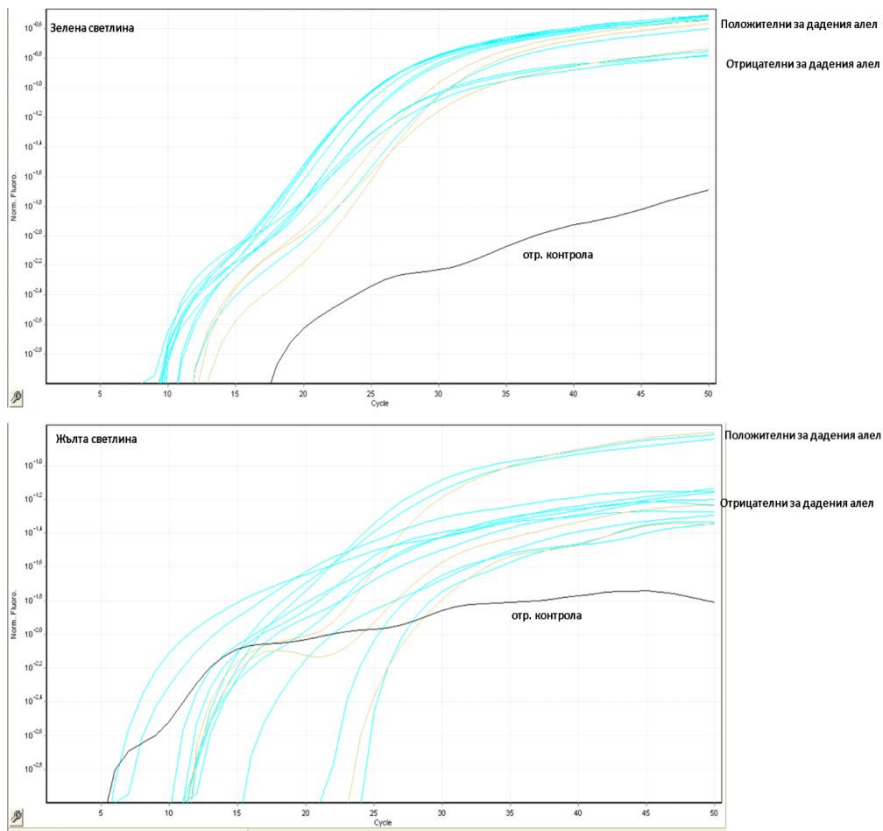
През 2013 година всички пациенти с тежка астма (25 идентифицирани към този момент) и техните родители бяха поканени за извършване на генетично изследване. Родителите на 20 от тях (80%) подписаха информираното съгласие. Съгласно възрастовата им и полова характеристика се подбраха още 59 деца с астма и 29 здрави деца, без фамилна анамнеза за алергия и без собствен атопичен терен. От запитаните родители на деца без тежка астма в над 90% беше получено съгласие за участие в изследването (запитани бяха 65 семейства), докато при групата от здрави деца този процент беше по-малък - 64% (от поканени 45 семейства) (фиг.20).



Фигура 20. Процент на съгласиите се в участието пациенти и родители съобразно групата в която попадат

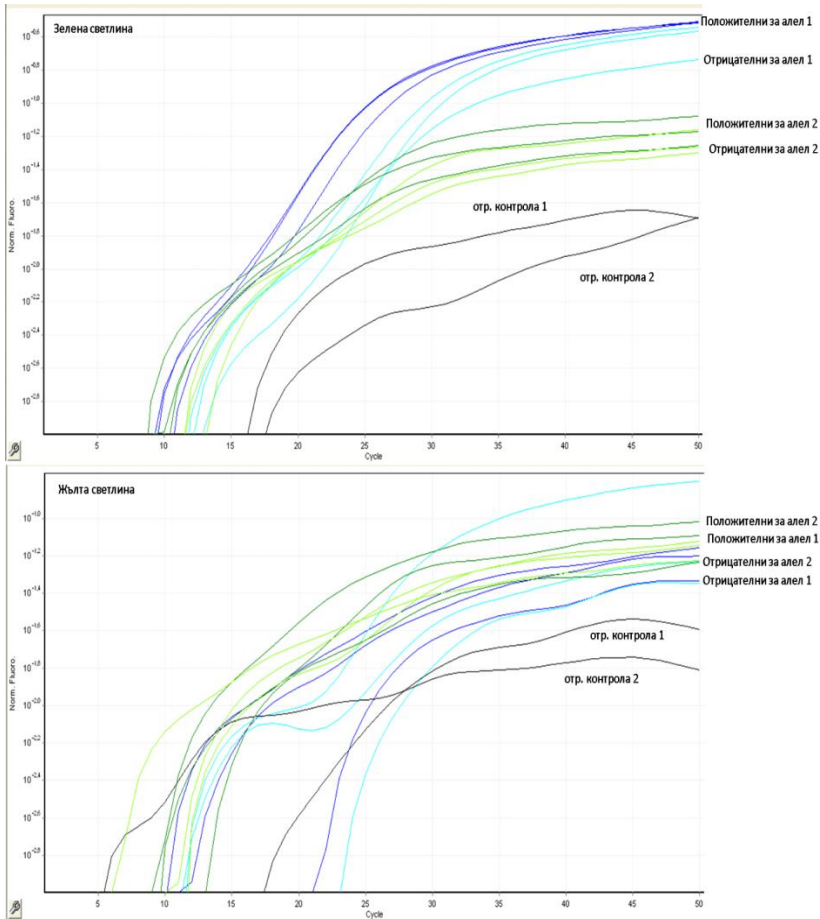
5. Задача 5. Да се определи разпределнието на посочените полиморфизми в българските пациенти

Бяха събрани проби на 109 деца. При едно от децата с тежка астма не се получи хибридизация при изследваните снипове и то отпадна от генетичния анализ. На фигури 21 и 22 са показани два примера от анализа на резултатите от изследването.



Фигура 21. Резултат от PCR тест за един полиморфизъм. Светлосините са амплификации на пробите на пациентите, а бежовите линии са на контролните ДНК. Черната линия е на отрицателната контрола.

Добре се отграничава групата от проби, които експресират дадения алел, от групата, в която няма такъв (софтуер на Qiagen - към RT-PCR циклера, версия 2011 година)



Фигура 22. Резултат от PCR тест за два независими полиморфизма (син и зелен). Тъмните цветове са амплификациите на пробите на пациентите, а светлите линии са на контролните ДНК. Черната линия е на отрицателната контрола. Добре се отграничават групата от проби, които експресират дадения алел от тази където няма такъв по отношение на зелената светлина.

Отграничението при жълтата светлина е много добро, когато се отчитат поотделно двата цвата, но когато са заедно поради наслагването им е леко затруднено (софтуер на Qiagen - към RT-PCR циклера, версия 2011 година)

5.1 Полиморфизъм T1 (rs2280091)

Междуалелното разпределение се оказа не в равновесие по закона на Хайди-Вайнберг, с по-малко от очакваните хетерозиготи. По-редкият в популацията алел или т.нар. минорен алел е Т, а по-честият или майорен алел е С (таблица 16).

Таблица 16. Резултати за разпределението на T1 SNPs ADAM33 в изследваната група

	Общо	Контролна група	Деца с астма	р (контрола vs. астма)	Деца с тежка астма	р (астма vs. тежка астма)*
T	162 (75,7%)	43 (74.13%)	119 (76.23%)	0,8915	23 (60,52%)	0,279
C	52 (23,29%)	15 (25.86%)	37 (23,7%)	0,8145	15 (39,47%)	0,083
TT	71 (66,35%)	18 (62%)	53 (67.94%)	0,9605	10 (52,63%)	0,5705
CT	20 (18.69%)	7 (24.1%)	13(16.6%)	0,635	3 (15.78%)	0,82211
CC	16 (14.95%)	4 (13.8%)	12 (15.38%)	0,7149	6 (31.5%)	0,124

* спрямо децата с лека до умерено-тежка астма

5.2 Полиморфизъм T2 (rs2280090)

Установи се равновесие според закона на Харди-Вайнберг за този SNPs. Минорният алел е С, а майорният е Т (таблица 17).

Таблица 17. Резултати за разпределението на T2SNPs ADAM33 в изследваната група.

	Общо	Контролна група	Деца с астма	р (контрола vs. астма)	Деца с тежка астма	р (астма vs. тежка астма)*
С	136 (62,96%)	36 (62.06%)	100 (64.10%)	0,9914	23 (60,52%)	0,9214
Т	78 (36,11%)	22 (37.2%)	56 (35,89%)	0,9692	15 (39,47%)	0,9295
СС	43 (40,1%)	12 (41.4%)	31 (39.74%)	0,9436	9 (47 %)	0,8643
СТ	50 (46.6%)	12 (41.4%)	38 (48.7%)	08530	5 (26%)	02481
ТТ	14 (13.3%)	5 (17.2%)	9 (11.53%)	0,7046	5 (26%)	0,1120

* спрямо децата с лека до умерено-тежка астма

5.3 Полиморфизъм S2 (rs2787094)

Междуалелното разпределение се оказа не в равновесие по закона на Хайди-Вайнберг с почти липсващи хетерозиготи. Минорният алел е G, а майорният е C (таблица 18).

Таблица 18. Резултати за разпределението на S2 SNPs ADAM33 в изследваната група

	Общо	Контролна група	Деца с астма	р (контрола vs. астма)	Деца с тежка астма	р (астма vs. тежка астма)*
C	162 (59,34%)	36 (62.05%)	91 (58.33%)	0,471	22 (57.89%)	0,9033
G	89 (41,58%)	22 (37.93%)	67 (42,94%)	0,725	16 (42,10%)	0,9250
CC	63 (58,87%)	18 (62%)	45 (56.96%)	0,848	11 (57,89%)	0,8886
CG	1 (0.93%)	0 (--)	1 (1.26%)		0 (--)	
GG	44 (41.12%)	11 (13.8%)	33 (41.77%)	0,974	8 (42,10%)	0,8189

* спрямо децата с лека до умерено-тежка астма

5.4 Полиморфизъм V4 (rs528557)

Установи се равновесие според закона на Харди-Вайнберг за този SNPs. Минорният алел е С, а майорният е G (таблица 19).

Таблица 19. Резултати за разпределението на V4 SNPs ADAM33 в изследваната група

	Общо	Контролна група	Деца с астма	p (контрола vs. астма)	Деца с тежка астма	p (астма vs. тежка астма)*
G	152 (71,02%)	40 (68.96%)	112 (52.33%)	0,9615	27 (71,05%)	0,9226
C	62 (28,97%)	18 (25.86%)	44 (28,20%)	0,8902	11 (28,94%)	0,9115
GG	57 (53,27%)	16 (55.17%)	41 (51.89%)	0,9866	10 (52.63%)	0,8251
CG	38 (35.51%)	8 (27.58%)	30 (37.97%)	0,642	7 (36.84%)	0,8889
CC	12 (11.21%)	5 (17.24%)	7 (8.86%)	0,457	2 (10,52%)	0,8337

* спрямо децата с лека до умерено-тежка астма

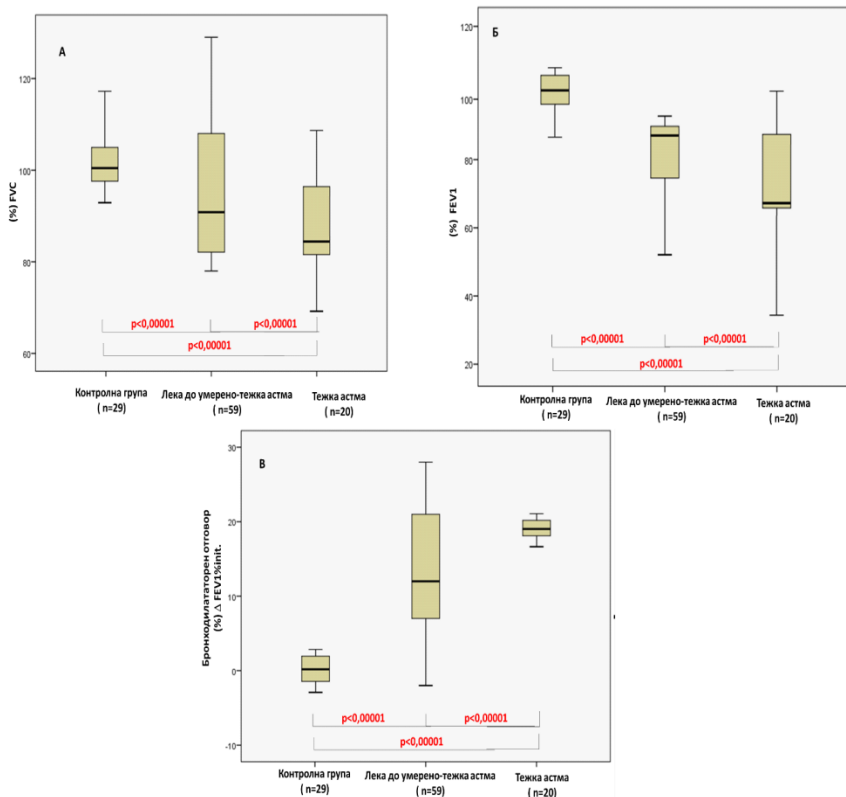
6. Задача 6. Да се анализира доколко тежестта на астмата при пациентите се отразява на резултатите от функционалното изследване на дишането и на лабораторните показатели (диференциална кръвна картина, назална еозинофилия, общи и специфични IgE и TH17)

6.1 Функционално изследване на дишането (ФИД)

Параметрите от ФИД се определят съгласно пол, възраст и ръст. При изследваните пациенти не се установи разлика (табл.21) по отношение на половото разпределение ($p=0,956$, Chi-Square Test, Yates correction). В групата здрави контроли 29-те деца са с нормални показатели от ФИД ($FEV_1 > 95\%$, $FVC > 95\%$, $MMEF_{25/75} > 90\%$) и отрицателен БДО (ΔFEV_1). Налице е статистически значима разлика по отношение на средните стойности и в трите групи ($p < 0,05$, ANOVA, post-hoc analysis. (табл.20 и фиг.23).

Таблица 20. Резултати демографски, антропометрични и ФИД данни на изследваните деца, разпределени в отделните групи

	здравни контроли (n=29)	лежа до умерено-тежка астма (n=59)	тежка астма (n=20)	p
Мъжки пол (%)	17 (58.62%)	34 (58.62%)	11 (57.89%)	$p=0,956$
Женски пол (%)	12 (41.38%)	25 (41.38%)	9 (42.11%)	$p=0,984$
Възраст в години, Средно (SD)	11,18±3,27	10,42±4,26	10,64±4,43	$p=0,574$
Височина, cm средно (SD)	140,0±5,53	145,28±2,93	143,35±4,53	$p=0,342$
Тегло, kg Средно (SD)	39,4±4,82	41,06±2,62	41,4±4,05	$p=0,897$
ВМI средно (SD)	20,1±1,2	19,52±1,7	20,24±0,8	$p=0,937$
Резултати от спирометрията (средни стойности)				
FVC	96%	91%	86,45%	$p < 0,0001$
FEV1	98,5%	85,4%	76,15%	$p < 0,0001$
FEV1/FVC	91,5%	92,1%	86,15%	$p < 0,0001$
PEFR	91,0%	81,7%	70,00%	$p < 0,0001$
MMEF25/75	99,5%	52,3%	40,25%	$p < 0,0001$
$\Delta FEV_1\%init$	3,00%	14,50%	17,16%	$p < 0,0001$
$\Delta FEV_1\%abs, I$	0,050	0,216	0,356	$p=0,004$



Фигура 23. Бокс-плот на резултатите от ФИД при трите групи А - FVC%; Б - FEV1%; В - Бронходилаторен отговор (Δ FEV1%) в трите групи

6.2 Еозинофилия - назална и /или кръвна

За кръвна еозинофилия се приема всяка стойност на еозинофилите с абсолютен брой над 450-550 клетки/ mm^3 или над 5% от общия брой левкоцити. Възприето е, че повечето алергични заболявания са съпроводени с кръвна еозинофилия, която може да е лека <1500 клетки/микролитър (до 15%) или изразена - над 1500 клетки/ mm^3 (над 15%).

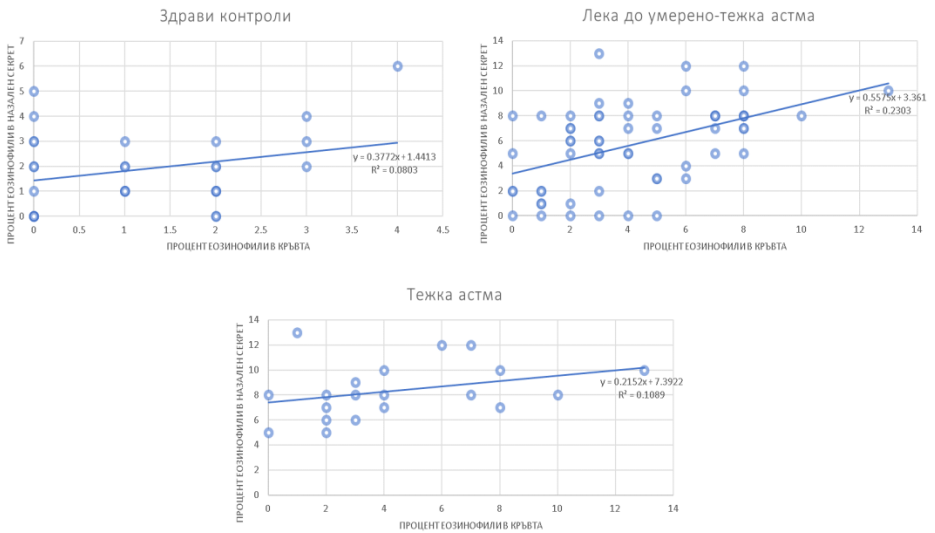
Децата от групата на здравите контроли имат значително по-ниска средна стойност на еознофили в кръвта за разлика от тези с астма, броят на еозинофилите варира от 0 до 4% ($p < 0.001$, F-test). Не се установи статистически значима разлика по отношение на еозинофилният брой в кръвта при децата с тежка астма и другите астматици. В двете групи еозинофилният процент варира от 0 до 8% ($p = 0.871$, F-test).

За назална еозинофилия е приета граница от 5%, въпреки, че в литературата се срещат стойности от 3 до 10% за разделяне. Подобно на еозинофилите в кръвта, здравите деца имаха най-ниски стойности, а децата с тежка астма - най-високи. Тези разлики са статистически значими ($p = 0.0028$, ANOVA, post hoc) (табл.21). Очаквано почти всички пациенти с тежка астма са с назална еознофилия, най- вероятно и поради поради наличие на придружаващ АР.

Таблица 21. Резултати за процент еозинофили в кръв и в назален секрет в различните групи изследвани пациенти

	зdravi контроли (n=29)	лека до умерено-тежка астма (n=59)	тежка астма (n=20)	p
Еозинофили в кръвта (%)	1,2 ± 1,17%	4,18 ± 2,89%	4,45 ± 3,45%	p<0.0001*
Назална еозинофилия (%)	2,17 ± 1,58%	5,69%±2,65%	8,5%±2,11%	p=0.0028

Съществува умерено силна зависимост между процентите еозинофили в кръвта и тези в назален секрет (Spearman's rho=0.57, $p = 0.0001$) фигура 24.



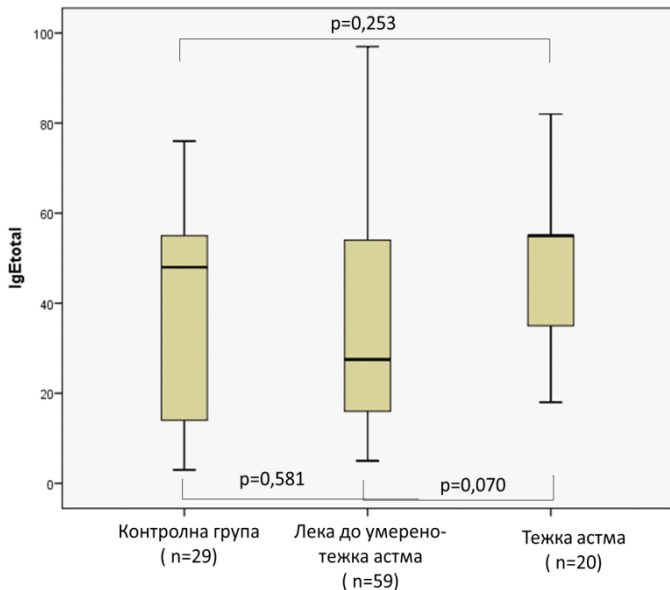
Фигура 24. Зависимост кръвна и назална еозинофилия в отделните групи

6.3 Общи и специфични IgE

Не се установиха сигнификатни различия по отношение на нивото на общи IgE в серума на изследваните деца. При здравите деца се отчете средно $39,5 \pm 24,5$ UI/ml, за децата от групата на лека до умерено-тежка астма - $35,19 \pm 25,07$ UI/ml и очаквано най-високи стойности – при децата с тежка астма - $49,82 \pm 18,2$ UI/ml ($p > 0,05$ ANOVA, post-hoc, Bonferoni correction) (фиг.25).

По отношение на специфичните IgE при 18 деца от групата с тежка астма (90%), при 28 деца от групата с лека до умерено-тежка астма (47,45%) и едва при 8 деца от здравите (27,5%) е отчетен минимум един повишен титър на специфичен IgE (поне 0,7 kU/l). Висок и много висок титър антитела (с клинично значение) бе установен при 11 от децата с тежка астма, при 10 от децата с умерено-тежка астма и при 2 от контролната група. Най-често доказваните алергени са Dermatophagoides pteronyssinus и Dermatophagoides farina – d1,d2 (9 пациенти),

тревен микс - тимотейка и култивирана ръж – gx (6 пациенти) и котка – e1 (5 пациенти), алтернория – *Alternaria alt.* – m6 и бреза – birch t3 също са открити съответно при трима и двама от пациентите от децата с бронхиална астма. От здравите деца едното е с висок титър срещу котка, а другото - срещу тревен микс.

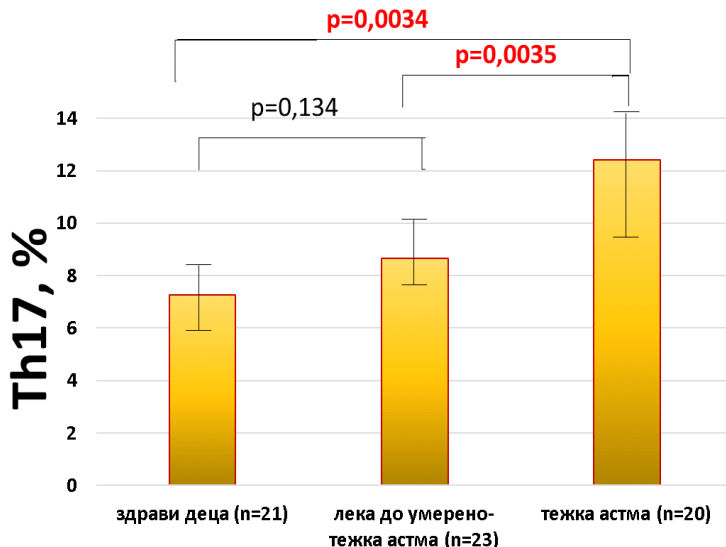


Фигура 25. Резултати от количеството на общ IgE UI/ml в различните групи изследвани пациенти и статистическа значимост (ANOVA, post-hoc, Bonferroni correction)

6.4 Th17

При част от децата се изследваха нивата на Th17 лимфоцити. Изследванията се извършиха чрез финансиран само за 64 деца проект към МУ-София. Включени бяха всички деца с тежка астма, 21 деца здрави контроли и 23 деца с лека до умерено тежка бронхиална астма. Не беше установена зависимост между нивата на Th17 и началната възраст на изява на астмата, продължителността на заболяването и контролираща терапия.

Децата с тежка астма имат значимо по-висок процент Th17 лимфоцити $12,40 \pm 1,16$ в сравнение с децата с лека до умерено-тежка астма $8,65 \pm 0,96$ ($p=0,035$ Man Whitney, ANOVA) и спрямо здравите деца $7,25 \pm 0,45$ ($p=0,034$ Man Whitney, ANOVA) (фиг.26).



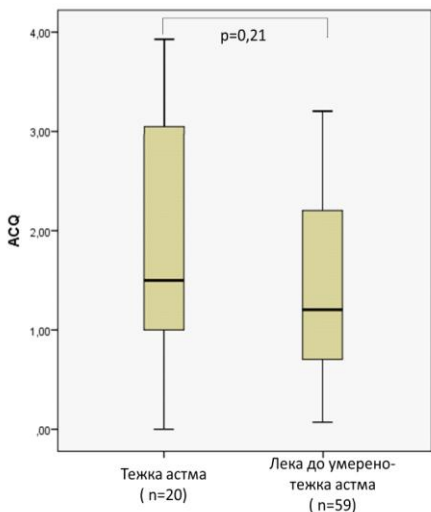
Фигура 26. Резултати за процента Th17 в различните групи изследвани пациенти и статистическа значимост (ANOVA)

Значими разлики се установиха по отношение на броя пристъпи за последните 12 месеца при децата с ниски Th17 – средно $2,1 \pm 1,5$ срещу $3,2 \pm 2,1$ за децата с високи Th17 ($p=0.028$ ANOVA). Очаквано децата с по-ниски показатели от ФИД имат и по-високи стойности на Th17 и обратно. Това е налице и при трите изследвани групи, без да има статистически значима зависимост.

6.5 Въпросник за контрола на астмата (ACQ)

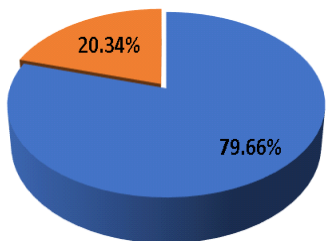
Въпросникът е попълван само от пациентите с бронхиална астма. Очаквано, децата с тежка астма са с по-лош контрол и по-висока средна стойност на ACQ $1,64 \pm 1,17$, докато тези с лека до умерено-тежка астма са с по-ниски

стойности $1,16 \pm 0,87$. Тези разлики не са сигнификантни ($p=0,21$, ANOVA) (фиг.27). Само 7 от децата с тежка астма са с ACQ под 1,5, което означава, че 65% от тежките астматици имат лошо контролирана астма. За разлика от тях в групата с лека до умерено-тежка астма резултат над 1,5 имат само 20, 33% или 12 деца. Тази разлика е статистически значима ($p= 0,024331$, Chi-Square Test) (фиг.28).

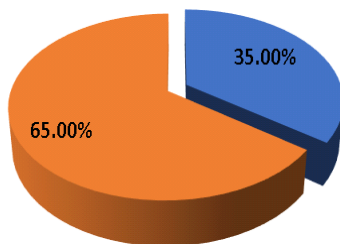


Фигура 27. Бокс-плот на резултатите от ACQ при децата с астма

лека до умерено-тежка астма (n=20)



тежка астма (n=20)



■ добър контрол (ACQ < 1,5) ■ лош контрол (ACQ > 1,5) ■ добър контрол (ACQ < 1,5) ■ лош контрол (ACQ > 1,5)

Фигура 28. Разпределение на децата според контрола на бронхиалната астма

7. Задача 7. Да се установи влиянието на откритите полиморфизми за клиничния ход и контрола на бронхиалната астма при изследваните деца

7.1 Анализ по отделни полиморфизми по отношение на фамилна обремененост за бронхиална астма и брой хоспитализации за предходната година.

Не се установи статистически значима зависимост по отношение на броя на хоспитализациите за предходната година и генетичните резултати на децата с бронхиална астма. Резултатите за отделните полиморфизми са за T1 OR 0,92 (CI95% 0,43-1,94), $p=0,803$; за T2 OR 0,085 (CI95% 0,47-1,52), $p=0,551$; за V4 OR 0,84 (CI 95% 0,47-1,51), $p=0,5412$ и за S2 OR 0,68 (0,23-1,98), $p=0,443$.

При анализиране на фамилната обремененост за бронхиална астма съобразно генетичните резултати се установи зависимост по отношение на минорният алел на T2 и на V4, които са по-чести при тези с фамилна обремененост. За останалите 2 полиморфизма не се установиха значими зависимости. За T1 OR 0,32 (CI95% 0,73-2,26), $p=0,314$; за T2 OR 1,385 (CI95% 1,02-1,82), $p=0,035$; за V4 OR 1,84 (CI 95% 1,01-3,51), $p=0,014$ и за S2 OR 0,32 (0,77-2,26), $p=0,310$.

7.2 Хаплотипен анализ

Направи се хаплотипен анализ на резултатите на пациентите и се установиха различия в разпределението на възможните комбинации в трите групи (фиг.29 и таблица 22).

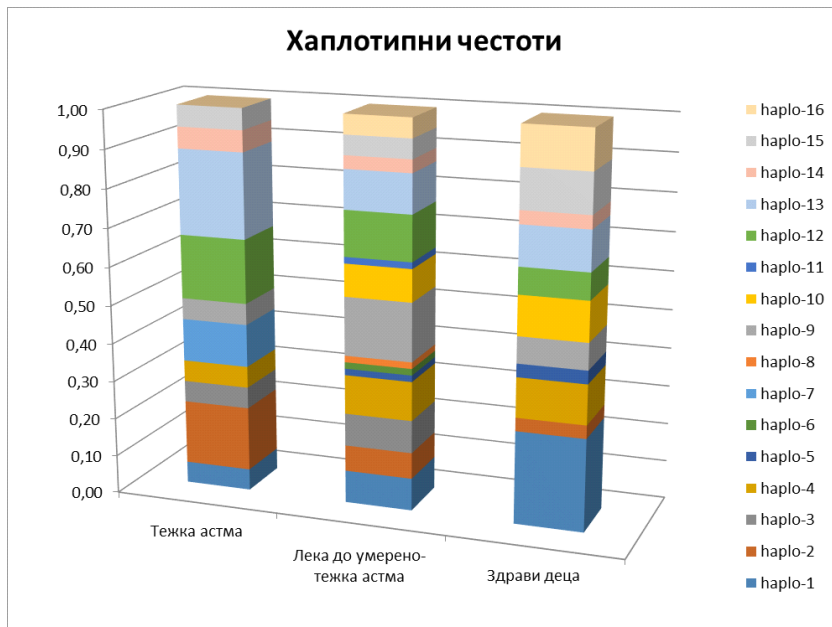
За групата на деца с тежка астма най-честият хаплотип е с 4 минорни алела CTGC (rs2280091/rs2280090/rs2787094/rs528557), което може да се подозира като рисков фактор за тежка астма. Единствено в тази група се среща и хаплотипа CCGG (rs2280091/rs2280090/rs2787094/rs528557). За децата с лека до умерена астма най-честият хаплотип е TTCG

(rs2280091/rs2280090/rs2787094/rs528557). При здравите деца най-чест хаплотип е TCCG (rs2280091/rs2280090/rs2787094/rs528557) или четири майорни алела, което показва протективна асоциация за бронхиална астма.

Таблица 22. Разпределение на честотите на хаплотиповете по групи

Хаплотип	Тежка астма	Лека до умерено-тежка астма	Здрави деца	p-value	OR (CI 95%)
CTGC	22,2	10,2	10,3	<0,001	6,23(2,9–14,80)
TCCC	16,7	6,8	3,4	<0,001	3,66 (1,88–29,17)
TTGC	16,7	11,9	6,9	0,501	0,93(0,46–1,88)
CCGG	11,1	-	-		
TCCG	5,6	8,5	24,1	0,019	1,38 (0,63–3,07)
TCGG	5,6	8,5	-	0,391*	1,01(0,40–2,57)
TCGC	5,6	10,2	10,3	0,019	1,71 (0,27–1,82)
TTCG	5,6	15,3	6,9	0,038	2,10 (1,04–16,47)
CTCC	5,6	3,4	3,4	0,981	0,78 (0,21–2,96)
CTGG	5,6	5,1	10,3	0,208	1,63(0,28–12,21)
CCCC	-	1,7	3,4	0,28*	1,75 (0,42–8,37)
CCCC	-	1,7	-		
CCGC	-	1,7	-		
TTCC	-	8,5	10,3	0,501*	1,63 (0,28–12,21)
TTGG	-	1,7	-		
CTCG	-	5,1	10,3	0,132*	1,44 (0,46–4,81)

* изчислено спрямо само две групи.



Фигура 29. Разпределение на хаплотипните честоти в различните групи

Няма значителна зависимост между пациентите с определен хаплотип, фамилна обремененост за астма и излагане на цигарен дим - активно или пасивно (OR=1,72, 95% CI 0,95–3,11, p=0,2531). Установи се, че децата с 4 минорни алела по-често са с майки тютюнопушачки (OR=1,77 95%, CI: 0,98–3,19; p=0.04), което може да е свързано и с факта, че това е и групата с най-много тежки астматици.

7.3 Анализ на двойки сиблинги

От изследваните деца 4 двойки са сиблинги и се отглеждат в еднакви условия на живот. И четирите двойки са разнополови - момче и момиче. В две от двойките момчетата са по-големи по възраст от момичетата, а другите две двойки са разнояйчни близнаци.

На тази малка бройка няма как да се направи достоверна статистическа обработка, но прави впечатление, че децата с повече минорни алели са в групата на тежка астма и очаквано са с по-ниски стойности от показателите на ФИД (табл. 23).

Таблица 23. Генетични резултати, възраст, FEV1 % и група на сиблингите

Семейство		възраст (години)	T1	T2	S2	V4	FEV1%	
1	момче	5,4	ТТ	СС	СС	GG	97%	лека до умерена астма
	момиче	5,4	ТТ	СС	СС	GG	98%	лека до умерена астма
2	момче	12,08	СТ	СТ	СС	GC	88%	тежка астма
	момиче	10,3	ТТ	СТ	GG	GC	85%	тежка астма
3	момче	11,5	СТ	ТТ	GG	GC	87%	тежка астма
	момиче	7,8	ТТ	СС	GG	GG	95%	лека до умерена астма
4	момче	7,6	ТТ	СС	СС	GG	96%	лека до умерена астма
	момиче	7,6	ТТ	СТ	СС	GC	95%	лека до умерена астма

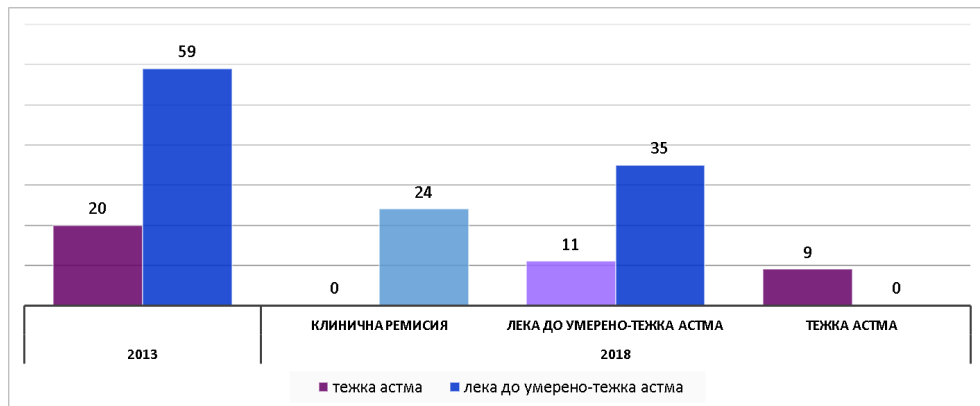
* минорите алели са отбелязани с червено.

8. Задача 8. Да се определи генетичният профил на пациентите, които остават с клинична тежка астма и след 5-годишно проследяване (януари 2014-декември 2019)

8.1. Сравняване на изходните данни

При преценка на изследваните деца 5 години по-късно (през 2018-2019 година) се установи, че от 59-те деца с лека до умерено-тежка астма при нито едно

астмата не е прогресирала до тежка и 24 са в клинична ремисия над една година (без пристъпи и постоянна контролираща терапия). От останалите 35 деца, които не са в клинична ремисия над 75% (24 деца) поддържат добър контрол на бронхиалната си астма. В групата на децата с тежка астма при нито едно дете не се наблюдава клинична ремисия за повече от 6 месеца, но 11 деца (55%) вече не покриват критериите за тежка астма. Останалите 9 деца са все още тежки астматици (фиг.30).



Фигура 30. Разпределение на децата спрямо групата в която попадат през различните години. В лилаво са показани деца с тежка астма през 2013 година, а в синьо тези с изходна лека до умерено-тежка астма. Децата с позитивна еволюция през 2018 година са отбелязани в по-блед нюанс

Не се отчете статистически значима разлика между изходните резултати от ФИД, ACQ тест, еозинофилия периферна и назална, нива на IgE, Th17% или възрастово и полово разпределение по отношение на децата, които преминават в клинична ремисия и тези които остават астматици (табл.24), както и при сравняване на децата с тежка астма, при които заболяването персистира по тежест (табл. 25) (Chi-Square Test, ANOVA, Man-Whitney, $p > 0,05$).

Според нас това означава, че няма възможност да се използва който и да е от посочените показатели като предиктивен фактор за клиничният ход и еволюцията на астма при децата.

Таблица 24. Изходни стойности на пациентите с лека до умерено-тежка астма разпределени според групата в която попадат след 5-годишно проследяване

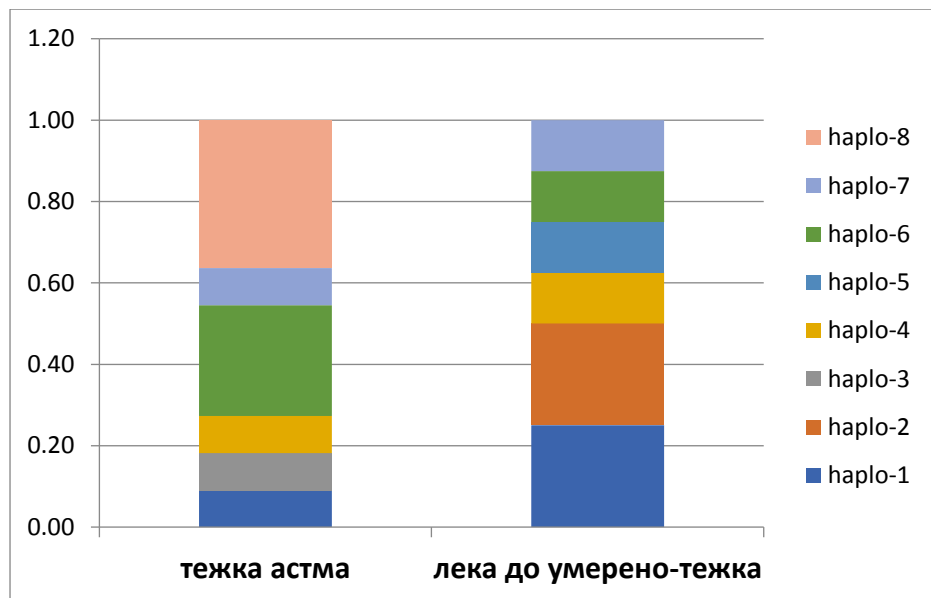
Показател	В клинична ремисия (n=24)	С персистираща астма (n=35)	p
Възраст (год.)	10,02±4,58	10,54±3,99	p=0,524
Пол (м:ж)	14:10	20:15	p=0,653
FVC (%), SD	92,45 %± 9,8%	89,24%±10,15%	p=0,303
FEV1 (%), SD	84,98 %± 10,1%	85,52%±9,25%	p=0,427
ACQ	1,15 ± 0,97	1,19 ± 0,57	p=0,470
IgE (UI/ml)	36,12±20,24	35,51±17,64	p=0,804
Ео в кръвта (%)	4,18% ± 2,89%	4,18% ± 2,89%	p=0,637
Назални Ео (%)	5,69%±2,65%	5,69%±2,65%	p=0,578
Th17%	8,71 ± 0,26	8,45 ± 1,36	p=0,615

Таблица 25. Изходни стойности на пациентите с тежка астма разпределени според групата в която попадат след 5-годишно проследяване

Показател	С умерено-тежка астма (n=11)	С персистираща тежка астма (n=9)	p
Възраст (год.)	10,18±4,18	10,74±3,84	p=0,524
Пол (м:ж)	6:5	5:4	p=0,823
FVC (%), SD	88,45 %± 13,4%	85,94%±12,45%	p=0,603
FEV1 (%), SD	77,18 %± 9,1%	75,72%±10,25%	p=0,327
ACQ	1,59 ± 1,27	1,69 ± 1,06	p=0,304
IgE (UI/ml)	47,12±19,2	50,25±18,24	p=0,751
Ео в кръвта (%)	4,48% ± 2,68%	4,42% ± 3,19%	p=0,514
Назални Ео (%)	7,99%±2,65%	8,79%±2,05%	p=0,422
Th17%	12,51 ± 0,96	12,25 ± 1,06	p=0,532

8.2 Алелен и хаплотипен анализ

При регресионен анализ по отношение на генетичните резултати и еволюцията на заболяването се откриха значими разлики по отношение на минорните алели на T2, S2 и V4, които са по-чести в групата с персистиращо протичане съответно за T2 (OR=2,52, 95% CI 0,021–0,31, $p < 0,0001$), S2 (OR 15,52, 95% CI 0,001–0,42, $p < 0,0001$) и V4 (OR=2,42, 95% CI 0,97–6,04, $p = 0,045$).



Фигура 31. Разпределение на хаплотипните честоти при децата с изходна тежка астма през 2013 година

Още по-ясно е това различие при разглеждане на групата деца с тежка астма през 2013 година. Всички деца с 4 минорни алела (CTGC) остават тежки астматици и през 2018 (хаплотип 8 от фиг.31). С 4 минорни алела са почти $\frac{1}{4}$ от децата с персистираща тежка астма, докато всички деца с 4 майорни алела не са с тежка астма през 2018 година (хаплотип 2 от фиг.31).

8.3 Резултати след 5 годишно проследяване на сиблингите от т.7.3

От изследваните осем деца в таблица 24 - трите деца с 4 майорни алела (близнаците от първо семейство и момчето от четвъртото семейство) са в клинична ремисия през 2018 година. Момчето от четвъртото семейство (с 2 минорни алела за T2 и V4) е с лека персистираща астма, за която провежда контролиращо лечение с минимална доза ICS и при него не се е налагало болнично лечение за последните 24 месеца, но е имало няколко пристъпа овладяни амбулаторно. Почти в същото положение е и момчето от третото семейство (хомозигот по минорният алел за S2), което е с един пристъп наложил болнично лечение за последните 2 години и контролиращо лечение с ниска доза ICS. От трите деца с тежка астма, момчето от 2-рото семейство (с 3 минорни алела T1, T2 и V4) е вече с умерно-тежка астма и е на средно висока доза ICS, за последните 2 години трикратно се е налагало стационарно лечение. Останалите две деца си остават с тежка астма, налагаща многократни хоспитализации на максимална доза ICS в комбинация с LABA (общото при тези две деца са наличие на минорни алели по T2 и V4 в комбинация с хомозиготно състояние на минорния алел по S2).

Въз основа на тази малка бройка няма как да се направи достоверна статистическа обработка, но резултатите им са в унисон с общата тенденция за значимостта на минорните алели по T2, V4 и S2 за изява и персистиране на тежка астма при деца в България.

V. ОБСЪЖДАНЕ

Проблемът бронхиална астма в детската възраст се коментира непрекъснато, защото е най-честото хронично белодробно заболяване при децата, а от 2002 г. болестта е обявена и за социално-значима. Епидемиолози и клинични

изследователи забелязват, че през последните 20 години е налице по-тежко протичане на заболяването особено в урбанизираните райони, свързано с повече хоспитализации или смърт.

В настоящият дисертационен труд са включени деца с БА (обективизирана от лекар специалист по критериите на GINA). Броят на хоспитализациите на децата в клиниката по повод екзацербация на астмата през наблюдавания петгодишен период е сравнително постоянен. По тази причина приемаме тези деца като репрезентативна извадка за децата с БА в България за последното десетилетие. Малките флуктуации през годините, които се откриват, могат да се обяснят от една страна с увеличаване на лечебните заведения на територията на страната, които предлагат диагностика, лечение и проследяване за деца с бронхиална астма, а от друга - с предпочитаното от родителите амбулаторно лечение в доболнични здравни центрове. Относително постоянен се запазва и броят на рехоспитализираните деца през годините. Тези почти постоянни цифри предполагат, че като държава, член на Европейският съюз, България е достигнала до плато, подобно на развитите страни, с постоянен процент деца с БА след 2000 година.

Подобно и на други изследвания в областта на детската астма по света и у нас и в настоящият труд преобладава мъжкия пол. При разпределяне на пациентите според тежестта на бронхиалната астма честотата на тежка астма при момчетата е по-висока от тази при момчетата, макар и несигнификантно. (2,34% за момчетата спрямо 3,67% при момчетата). Редица учени изследват влиянието на половите хормони по отношение на тежестта на астмата, особено преди и по време на пубертета, и отчитат негативно влияние на женските полови хормони. Например: естрадиолът повишава секрецията на мукусни протеини (Muc5AC и Muc5B) от бронхиалните епителни клетки, а прогестеронът намалява цилиарното биене, което влошава мукоцилиарния транспорт и потенцира хронично възпаление в дихателните пътища. Ето защо се смяташе, че във възрастта преди пубертета преобладават момчета, с по-добра прогноза. При изследваните от нас

деца с тежка астма, проследени през годините, не беше установена подобна полова предилекция. Големите кохортни проучвания за тежка астма при деца през последните години също не откриват значима полова разлика.

Поради липсата на прецизно определение за тежка астма при децата преди 2014 година няма много публикации относно честотата ѝ при детската популация в България. Според достъпната ни литература, това е първото проучване, насочено към определяне на честотата на тежка БА в детската възраст у нас. Определената честота е 2,9% за общата популация деца с БА. Международните данни също са сравнително нови от последните 7 години. Българските резултати се доближават най-много до данните от Великобритания (3,2%), като са по-високи от тези в Швеция (2,1%), и значително по-ниски от докладваните от 5 до 10% за САЩ и средна 6,7% за Южна Европа. Тези широки граници се дължат на социално-икономически, етнически, географски, психологически и медицински разлики (различни налични медикаменти и терапевтични схеми) в отделните континенти и страни и в нееднаквите критерии на докладване в отделните проучвания (напр. от само амбулаторно проследявани пациенти до само хоспитализирани такива). За усреднена се приема стойността около 4% за „истински“ тежки астматици. Според честотата на детската астма за различните Европейски държави, тя е най-голяма във Великобритания същевременно е по-ниска в Източна Европа отколкото в Западна. Глобализацията, индустриализацията и замърсената околна среда са приети като важни причини за посочените резултати. Не трябва да се и пропуска и включването на различни възрастови групи (включване на деца под 5 годишна възраст например или изследване само на деца над 12 години). Същевременно все по-чести тежки екзацербации, налагащи болнично лечение, се докладват в Южна Европа (Италия и Испания), вероятно поради различния подход на контрол на астмата в домашни условия, методите на изследване на дихателната функция, организацията на здравната помощ и социално-културни особености (напр. по-лесен достъп до

специалист в Южна Европа в сравнение със Северна и по-често подценяване на симптомите от страна на пациентите в дадени региони).

В България достъпът до специалист и до болнично лечение е лесен, дори понякога в стационар се обслужват пациенти, които могат да бъдат обслужени и амбулаторно. Поради наличието на тези фактори считаме, че 2,9% е достоверна цифра за честотата на тежка астма сред всички деца в България с доказана БА.

Както е видно от получените резултати, придружаващите заболявания също могат да се отразят на тежестта на астмата. Резултатите за АР при децата с БА потвърждават предходни изследвания по света и у нас за много високият процент на АР, който варира от 60% до 73-75%. Вариациите в резултатите се свързват с различия в начина на живот, с фактори от заобикалящата ни среда, диагностични и терапевтични подходи. Причините за високата честота на АР при БА са сходните анатомични, физиологични и имунологични механизми на двете заболявания, както и наличието на атопия. Известен факт е, че при децата с един атопичен компонент (БА, АР, атопичен дерматит) се наблюдава 3 пъти по-висок риск от възникване на второ атопично заболяване. Благодарение на множество наблюдения е и разработена хипотезата за „единен дихателен път” и концепцията, че и БА и АР са клинична изява на един и същи възпалителен процес. АР не само съпътства БА, но и повишава риска от възникване на БА, подобен риск е открит и за неатопичен ринит. Това е важно, тъй като алергичният ринит при децата с БА нерядко остава недиагностициран и нелекуван. Наличието на съпътстващ АР е една от най-честите причини за незадоволителен контрол на БА и по-тежкото ѝ протичане, а в болшинството от случаите ерадикацията на симптомите на АР доказано подобрява нивото на астма-контрола. Не случайно всички деца с тежка астма от настоящото изследване са с АР, но това е по-висок процент от докладваното в Италия за 91,4%, което се обяснява с по-прецизното определяне на тежка астма след 2014 г. и вероятността в проучването на Bisaccioni и колектив да са попаднали деца с трудна за контрол, но не тежка астма. Очаквано по-големите деца са тези с АР, както и при други автори. Най-интересният резултат

от настоящето проучване е промяната на терапиите през годините на изследване. Тази промяна следва световните тенденции и ръководства за приложение на LTRA предимно при пациенти с придружаващ АР. Установи се, че през 2010 година повечето от децата на които е изписван LTRA са без АР, но това се променя през следващите години, когато над 95% от прескрипциите на децата с LTRA са на деца с БА и придружаващ АР. Друг момент е и повишаване на предписанията за перорални и локални антихистамини за оптимално дълъг период при децата с БА и АР с цел намаляване и симптомите на АР и респективно подобряване контрола на БА. Подобен позитивен ефект на допълнителна антихистаминова терапия към контролиращото лечение за БА е описан и от други автори.

Установеният по-висок процент на ГЕР при децата с АР е в унисон с наскоро публикуваните данни, че АР е рисков фактор за ГЕР независимо от наличие или отсъствие на астма. До настоящия момент не са ни известни публикувани данни за подобни проучвания в България.

Децата с АР в по-голям процент са с наднормено тегло или затлъстяване. Подобни резултати са публикувани и от други автори, които са провеждани предимно при юноши. Дали алергичният ринит е рисков фактор за наднормено тегло или е налице обратна причинно-следствена връзка, все още не е изяснено. Известно е, че при хората със затлъстяване се намират повишени нива на лептин, TNF- α и IL-6, които от своя страна подтискат регулаторните Т клетки. Това може да доведе до дисбаланс на Т клетките в посока към алергична изява. От друга страна антихистамините са основна група медикаменти за лечение на АР, поради което е проследявана тяхната връзка с наднорменото тегло.

Свърхупотребата на фексофенадин и цетиризин се асоциира със затлъстяване. При някои групи пациенти, със силно редуцирано телесно тегло са предлагани като терапевтична опция за повишаване на тегло - напр. за ципрохептадин е доказано желано напълняване при HIV-позитивни пациенти. Вероятна причина за тези нежелани ефекти е блокирането на действието на

хистамина, който подтиска апетита. Доказаният висок процент АР сред децата с тежка астма е предпоставка за преоценка и включване на локален или перорален антихистамин към контролиращата терапия за БА, но в съчетание с подходящ спорт (напр. плуване или каране на велосипед), за да се избегне евентуална възможност за затлъстяване. При децата с БА (особено с придружаващ АР) за подържане на оптимално тегло е необходим оптимален хранителен режим, по възможност с ограничаване на цитруси, какао, ядки и други потенциални релаксатори на долния езофагеален сфинктер с цел понижаване на риска за развитие на ГЕР.

През 2015 година на база мащабно национално проучване се доказва, че епидемията от НТ и ЗТ сред децата от училищна възраст в България има възходящ ход през последните 4 десетилетия. В същото проучване се съобщава, че затлъстяването започва все по-рано в живота на българските деца, за да достигне над 10% още на 7-годишна възраст при двата пола с лек превес на момчетата. В настоящия труд в изследваната група деца ЗТ е 6%, но при добавяне на децата с НТ този процент се приближава до цитираните по-горе 10%. Което означава, че наднорменото тегло не се среща по-често при пациентите с БА в сравнение от другите деца в България. Подобно на общонационалното проучване и в резултатите от наблюдаваните от нас деца момчетата са по-затлъстели от момичетата. Наднорменото тегло се счита за рисков фактор за развитието на астма, по същия начин, както се набещават ICS за повишено тегло. В повечето случаи се установява връзка между теглото и неатопичната астма твърде вероятно по-висок стоеж на диафрагмата с ограничаване на респираторните движения. Затлъстяването оказва влияние и върху кръвотока в белите дробове, което влошава ефективността на кислородообмена. Мастната тъкан компресира белодробната, повишавайки кръвотока, но компресирайки диаметъра на дихателните пътища. Допълнително лошо контролирана астма (с неправилна техника) и чести пристъпи ограничава физическата активност, което може да е предпоставка за повишаване на теглото. Известно е, че високите стойности на

ВМІ между 1- и 2-годишна възраст се асоциират със значително по-висока честота на астма-симптоми на 3 години, а тези между 3- и 5-годишна възраст – с персистиране на симптомите след 6-тата година. Ефектът е по-силно изразен сред женския пол – при момичетата с наднормено тегло или затлъстяване между 6 и 11 години се наблюдава 7 пъти по-висок риск от астма. Вероятно и поради тази причина, интензивната физическата активност е пряко свързана с по-добър контрол на БА при момчетата отколкото момичетата, независимо от теглото им. Наскоро проведени проучвания при деца с наднормено тегло и БА доказват, че намаляването на телесното тегло дори само с 2 кг значително подобрява честотата на симптомите, белодробната функция и контрола на заболяването. В изследваните деца по настоящият труд наднорменото тегло е по-често в групата с тежка астма, но разликите не достигнаха до нива на статистическа значимост. Взаимовръзката между контрол на теглото и тежка астма е по-рядко изследвана в детска възраст поради по-малките терапевтични опции. При много тежки астматици с морбидно затлъстяване, е доказано добър ефект от бариатрични процедури. Фенотипът на БА със затлъстяване е по-рядък в детска възраст поради факта, че той е от групата на неатопичните астми, а при децата над 90% от БА е атопична.

Очаквано децата с наднормено тегло са с по-голяма честота на ГЕР, както е описано и от други автори в България и чужбина. Същевременно сред децата с ГЕР има по-голям процент от деца с наднормено тегло в сравнение с деца без ГЕР. При децата с ГЕР в по-голям процент се открива и АР. Последното може да се обясни с ГЕР-индуцираното възпаление на дихателните пътища, което се обуславя с инфилтриране на неутрофили, лимфоцити, еозинофили и макрофаги и отделяне на проинфламаторни Th2 цитокини и интерлевкини свързани с освобождаването на TNF α , т.е. насочване към алергичен отговор.

Данни от епидемиологични проучвания установяват по клинични белези честота на ГЕР от 2-8% във възрастта между 3-17 години, но при прецизиране с 24-часовата рН-метрия този процент се повишава до 30-52%. Различни автори

докладват и по-високи стойности при деца (до 82%), но те включват и кърмачета, които имат физиологичен рефлукс. Предполага се, че ГЕР води до по-тежко протичане на БА, като повишава бронхиалната хиперреактивност посредством вагус-индуцирана бронхоконстрикция в хода на характерните за заболяването микроаспирации, но ясна връзка не е доказана. От друга страна, бронхообструктивните епизоди по време на астма екзацербации и медикаментите, използвани за лечение на БА, предразполагат за развитието на ГЕР чрез релаксация на долния-езофагеален сфинктер. На практика става дума за порочен кръг, в който астмата може да доведе до ГЕР, а ГЕР да влоши контрола на заболяването. Доказано е, че честотата на ГЕР при деца с БА е по-висока от честотата му при други деца. В настоящето изследване 20% от децата са с клинични белези на ГЕР, което е по-високо от цитираната популационна честота (възможно е реалната цифра да е по-голяма, тъй като не е извършвана рН-метрия, а някои деца могат да са с по-висок праг на болка и симптомите да се negliжират). Подобен резултат докладват и от САЩ - 19,3% от учениците с БА имат ГЕР срещу само 2,3% за тези, които нямат БА. Авторите от Турция посочват, че 41% от децата с БА имат симптоми на ГЕР, вероятно поради различния диетичен режим и различната възрастова група, обхваната в изследването. Авторите асоциират ГЕР предимно с по-голяма възраст, по-висок ВМІ и женски пол. В настоящето изследване преваляват момчетата, 10% са и с наднормено тегло.

Не се установи по-висока честота на ГЕР сред децата с тежка астма (19,5%), вероятно поради сравнително малкия брой. От друга страна, докладваните 30% ГЕР при тежки астматици през 2009 г. са изчислени преди да се въведе официалната дефиниция за тежка астма, което може да доведе до включване и на пациенти, които не покриват възприетите критерии за тежка астма. Неслучайно са описани (включително и в България), случаи на деца с „трудна за контрол БА“, за които се оказва, че дори нямат астма. Съвременните терапевтични препоръки в случай на астма-съпътстващ ГЕР е внимателно и

индивидуално оптимизиране на контролиращите медикаменти и допълнително антирефлуксно лечение.

От направеният цялостен анализ на децата с тежка астма и трите коморбидни заболявания, с най-голямо прогностично значение се оказва наличието на АР. Най-голям брой деца с тежка БА попадат в групата с придружаващ АР, последван от броя деца в групата с трите съпровождащи заболявания. Всички деца с тежка БА бяха с поне едно подлежащо заболяване, което е в унисон с докладваните литературни данни. Ето защо, децата с тежка астма, трябва бъдат насочено проследяване за наличие на придружаващи заболявания, което определя и подходи към комплексния терапевтичен подход.

За провеждането на генетичното изследване по настоящият труд бе необходимо изпълнението на две важни условия - създаване на работещ протокол и съгласие на родителите и пациентите за включване в генетично изследване. Оказа се, че по-трудно е изпълнението на второто условие. В съвременни условия изработването на сондите и праймерите за генетичното изследване е улеснено благодарение на разчитането на човешкия геном и създаването на помощен софтуер за базичната им последователност, проверката за уникалността на дадената сонда (няма да се отчете фалшиво положителен резултат) и високата ѝ специфичност (няма да се отчете отрицателен резултат). Веднъж прецизно уточнена, процедурата може успешно да бъде приложена и от други изследователи при други пациенти.

От друга страна най-висок процент на съгласие от семействата, на които бе предложено генетично изследване, се получи от родители на децата с лека до умерено-тежка астма (91%) и очаквано най-нисък - при здравите деца (65%). Този резултат не е необичаен - поради възможен страх за получаване на „рискови“ резултати при иначе здраво дете, „конспиративни идеи“ за генетичните тестове, които са налице и в други генетични изследвания. Изненадващ беше по-ниският процент на съгласие от страна на семействата с тежка астма (80%). При насоченото интервю повечето от отказалите се споделят, че искат да „спестят

още едно болезнено изследване“ на детето си, тъй като не очакват бърза полза от този резултат.

От изследваните четири полиморфизма и при българските деца минорните и майорните алели съответстват по очакваното разпределение, подобно на други публикации в чужбина. За два от четирите полиморфизма се установи равновесие според закона на Харди-Вайнберг, което показва, че популацията е в равновесие и честотите на алелите и генотиповете не се променят в следващите поколения.

Като единичен полиморфизъм, минорният алел (G) на S2 е доказано по-често при пациенти с бронхиална астма в популации от афро-американци ($p=0,003$), испански потомци ($p=0,04$), с тенденция за по-голяма честота при бели американци ($p=0,052$) и незначителни в холандска популация. Един скорошен обширен метаанализ на Li и сътрудници отхвърля вероятността наличие на минорен алел по S2 да повишава риска за развитие на астма, въпреки че част от анализирания изследвания показват силна зависимост. И в настоящето изследване минорният алел G при децата с БА се установява по-често, но разликата със здравите контроли не достига статистическа зависимост (42% от децата с БА и 38% при здравите деца). Възможна причина е и липсата на хетерозиготи в изследваната популация, което обяснява неравновесието при този полиморфизъм. Доказаното по-често хоспитализиране на носители на минорен алел не се потвърди в изследването, включително и при разделяне на пациентите според тежестта на астмата. Вероятно тези данни могат да се обяснят с наличие на атопия при контролната група, тъй като минорният алел е характерен и за пациенти с алергичен ринит.

По отношение на V4 също има противоречиви публикации, но метаанализът от 2019 г. категорично повърждава, че този полиморфизъм е свързан с повишен риск за развитие на астма при хората от бялата раса, както и че има отношение към астмата при възрастните. Допълнително е доказано, че V4 корелира и с еозинофилното възпаление, намалението в показателите от

функционалното изследване на дишането във времето, както и отговор към бронходилататори. В настоящето изследване категорична разлика между групите не се потвърди, но децата с тежка астма в по-малко по-висок процент (47%) са носители на минорния алел.

По отношение на T1 е доказано, особено за азиатската популация, че е свързан с предразположение към астма, особено в детската възраст, но за другите раси няма такова потвърждение. Доказано е, че T1 минорният алел е свързан с по-бързото намаляване в показателите от ФИД и с тежестта на бронхиалната астма. Подобни резултати получихме и в настоящето изследване: 47% от децата с тежка астма са носители на минорния алел, за разлика от здравите деца, при които този процент е 35, но без статистическа значимост. От друга страна е доказано, че минорният алел се среща по-често при тежките астматици, което се потвърди и статистически в настоящия труд ($p=0,0309$ Chi-Square Test).

Подобни са и резултатите за T2, който се унаследява в поколението с астма при намалени показатели от ФИД. Най-висок процент на хомозиготите по минорния алел установихме в групата на тежка астма (26%) в сравнение с другите 2 групи. Алелният анализ обаче не показва статистическа значима зависимост между минорния алел и тежестта на астмата, поради сравнително високия брой на хетерозиготи във всяка група. Тези данни са в унисон с метаанализът на Li от 2019 в който не се потвърждава връзка между тежестта на астмата и полиморфизма T2. При анализиране на фамилната обремененост за БА се установи зависимост по отношение на минорния алел на T2 и на V4, които са почети при тези с фамилна обремененост, в унисон с данните за унаследяване на T2.

При анализиране на децата според тежестта на астмата, очаквано се установиха по-ниски резултати от ФИД при децата с тежка астма, както и нормални параметри при здравите деца. Потвърдиха се данните за значително по-ниски резултати на децата с тежка астма в сравнение с другите астматици, което съвпада с данните и на други изследователи.

В многобройни публикации е обсъждана връзката между еозинофилията и бронхиалната астма. Подобно и на тези изследвания се установиха сигнификантно по-високи стойности на периферната кръвна еозинофилия при пациентите с астма в сравнение със здравите контроли без полова пределекция, но тази еозинофилия не корелира с тежестта на астмата. Доказана е по-висока стойност на еознофили при новодиагностицирани астматици. Включените деца в изследването са с давност на заболяването над една година, за да може достоверно да се определи тежестта на астмата при извършване на статистическия анализ. Ето защо вероятно поради провежданото контролиращо лечение за БА (което потиска еозинофилното възпаление) не установихме значима разлика между нивата на периферните еозинофили при децата разделени според тежестта на астмата. Това показва, че стойностите на еозинофилните клетки в периферната кръвна картина не могат категорично да се използва за оценка на тежестта на заболяването.

Както в предходно публикувани данни за назална еозинофилия така и при изследваните от нас деца, резултатите следваха тенденцията на кръвната еознофилия - най-ниски стойности при здравите деца. Поради данните за повишена назална еозинофилия при АР пациентите с тежка астма са с най-високи резултати от трите групи. Поради установената само умерена корелация между кръвна и назална еознофилия трябва да се извършва и назално изследване, не да се анализират само кръвни данни, особено при децата с АР.

Атопията и алергията отдавна се асоциират с астма, в известна степен и с тежката астма. Противно на това според големи епидемиологични проучвания тежката астма се асоциира в по-малка степен с атопия/алергия в сравнение с полеките форми, с по-нисък процент пациенти с положителни кожни тестове. Асоциацията между алергия и тежест на астмата, обаче е по-изразена в детската възраст. Счита се, че перистиращото излагане на аероалергени увеличава бронхиалното възпаление и риска от екзацербации при тежка астма.

Количеството на общите IgE и наличието на алерген специфични IgE антитела в серума са важни биомаркери за дефиниране фенотипа на пациентите със симптоми на бронхиална астма. В нашето изследване не се установиха сигнификатни различия по отношение на нивото на общите IgE в серума на изследваните деца. От получените резултати при изследване за специфични алергени обаче, стана ясно, че децата с тежка астма са сенсабилизирани предимно към домашен прах, тревен микс, алтернария, бреза и котка. Препоръките за избягване на алергени за пациентите с тежка астма е нужно да включват тези 5 компонента. Не е необходимо да се избягват голям брой храни (освен при анамнестични данни за провокация от даден хранителен алерген) и други домашни любимци. Това би могло да доведе до стрес и допълнително влошаване на контрола на заболяването.

Все още не са изучени всички механизми на участието на Th17 в патогенезата на БА, но повечето данни в литературата дават основание да се приеме, че при бронхиалната астма, особено при тежката, възпалението на дихателните пътища се обуславя от Th2 и Th17 лимфоцитите. В бронхо-алвеоларен лаваж, серум и хрчка са установени високи нива на IL-17. Проучванията на Irvin и сътрудници (2014) са в подкрепа на хипотезата, че пациентите с преобладаващо едновременно присъствие на Th2 и Th17 лимфоцити по-трудно отговарят на лечение, имат по-тежка дихателна обструкция и хиперреактивност на пътищата. Други изследователи посочват, че повишеното ниво на IL-17 се асоциира с тежестта на хиперреактивност, неутрофилна инфилтрация, обостряне на астмата, със слаб отговор към терапията, особено към стероидната, продукция на фибротични медиатори и ремоделиране на дихателните пътища, при изразена еозинофилия. Увеличеният серумен IL-17 маркер е независим рисков фактор за тежка астма. И в настоящият труд се установи, че процентът на Th17 лимфоцитите е сигнификантно по-висок при децата с тежка астма в сравнение със здравите деца и с децата с лека до умерено-тежка астма. По този начин може да приемем, че пациентите с лошо контролирана

бронхиална астма, при които броят на Th17 клетки е значително повишен, биха били кандидати за бъдеща таргетна терапия.

Всички горепосочени разлики се отразяват и на значително по-лошия контрол при децата с тежка астма според резултатите от въпросник за контрола на астмата. Това също е очакван резултат.

При разглеждане на генетичните резултати при тежките астматици прави впечатление, че за T2 носителите на минорен алел (TT+CT) са повече от половината от децата с тежка астма, а за другите полиморфизми почти половината (48%) от тежките астматици са носители на минорни алели, което се различава от данните за здравите деца и децата с лека до умерена-астма, т.е. от четирите полиморфизма, T2 е с най-висока степен свързан с тежката астма. Подобни резултати са докладвани и от скорошен метаанализ, при който с регресионен анализ е доказано, че T2 се свързва с по-тежка астма в детската възраст .

За да не се фокусират данните само към конкретен алел се направи хаплотипен анализ. Този анализ се счита за по-точен при стесняване на позицията на локуси за болестна предразположеност, сложно картографиране на генетични заболявания и проучвания за асоцииране в целия геном и реконструкция на историята на човешката популация. Общите честоти на хаплотипа могат да бъдат оценени въз основа на известните маркерни фенотипове при несвързани индивиди от популацията.

Установи се, че най-честият хаплотип при децата с тежка астма е с 4 минорни алела CTGC (rs2280091/rs2280090/rs2787094/rs528557), за този хаплотип се установи и най-голяма честота при майки тютюнопушачки. Родителското тютюнопушене се асоциира в голяма степен с експозиция на децата на цигарен дим, което често е свързано с нисък социално-икономически статус и депресивни симптоми при родителите. Въпреки доброто познание за възможните вредни ефекти от цигарения дим, родителите не показват тенденция за предпазване на децата от дълготрайна тютюнева експозиция. Експозицията на цигарен дим

сигнификантно обостря БА, а пушенето на майката по време на бременността значимо увеличава риска за развитие на БА. Не може да се твърди, че тютюнопушенето по време на бременността променя някои алели, но вероятно откритата зависимост се обяснява с факта, че това са деца тежки астматици, при които родителите продължават да пушат, а постнаталното излагане на цигарен дим също е свързано с персистиране на епизодите на бронхиална обструкция. Здравите деца са с най-чест хаплотип TCCG (rs2280091/rs2280090/rs2787094/rs528557) или четири майорни алела, което показва протективна асоциация за бронхиална астма. Тези данни са подобни на данните от други автори, които чрез хаплотипен анализ на двата полиморфизма rs2280091 и rs2280090, откриват, че минорните им алели са свързани с повишена предразположеност към астма. Подобна асоциация е открита и за анализ на T1 (rs2280091) и F+1. Не открихме публикувани данни за връзка между тежестта на астмата и генетичните резултати, установени в настоящият труд. Допълнително за първи път се анализират резултати при пациенти с дългогодишно проследяване с оглед еволюцията на бронхиалната астма, която в различните периоди на детството може да се класифицира в един момент като епизодична, а в друг момент като тежка, дори животозастрашаваща. Трябва да се отбележи, че в различните публикувани данни има и различно ниво на неравновесие на дадени полиморфизми, което също може да е причина за разнопосочни резултати. Няма как да се направи точна статистика на 8 деца, но по клиничен ход и собствени наблюдения, генетичните резултати на децата се покриха с очакванията - по-тежко протичащата БА в семейството (където се предполага еднаква околна среда и еднаква фамилност) е на детето с повече минорни алела.

При проследяването на пациентите се потвърди, че близо 40% от децата с лека до умерено-тежка астма влизат в клинична ремисия при спазване на препоръките за поведение при бронхиална астма, но при нито едно дете с тежка астма не се постига пълен контрол на заболяването до ремисия.

Не беше установена статистически значима разлика между изходните резултати от ФИД, ACQ тест, периферната и назална еозинофилия, нивата на IgE, Th17 или възрастово и полово разпределение по отношение на децата, които преминават в клинична ремисия и тези които остават астматици. Статистическа разлика не се установява и при сравняване на същите параметри и при децата с тежка астма, съобразно клиничната им тежест след 5 години. Това означава, че няма как да се използва който и да е от посочените показатели като сигурен предиктивен фактор за клиничният ход и прогнозата на бронхиалната астма в детската възраст.

Възможно е обаче да се прогнозира кои деца с тежка астма са с по-голям риск от персистиране на тежестта на астмата - това са носителите на минорните алели на T2, S2 и V4.

В заключение:

Настоящото проучване за пръв път насочва вниманието на педиатрите, детските пулмолози и алерголози към честотата и характеристиките на тежката астма сред децата в България. Допълнително то изяснява значението и подчертава ролята на минорните алели на полиморфизмите на ADAM33 за персистирането на тежестта на бронхиалната астма в детската възраст.

VI. ИЗВОДИ

1. През последното десетилетие е установена тенденция за сравнително постоянен брой на хоспитализирани деца с БА.
2. Установена е честотата на деца с тежка БА – 2,9% от децата с БА в България.
3. Придружаващ АР и/или ГЕР имат по-голямо значение за тежестта на БА в сравнение с наднорменото тегло.
4. Не се установи разлика в честотата на деца с наднормено тегло и БА, спрямо общата популация от деца с наднормено тегло в България.
5. LTRA намира приложение към контролиращата терапия на БА предимно при деца с БА и придружаващ АР.
6. Установи се, че 20% от децата с БА в България са с клиника на ГЕР.
7. При децата с тежка форма на БА статистически по-често се откриват хомозиготи по минорния алел за T2 (rs2280090) на ADAM33 в сравнение с по-леките форми.
8. Минорният алел за T1 (rs2280091) на ADAM33 е по-чест при децата с тежка астма в сравнение с другите деца с астма.
9. Наблюдава се по-висока честота на минорните алели за S2 (rs2787094) и V4 (rs528557) при децата с астма в сравнение със здрави деца.
10. Минорните алели T2 и V4 са по-чести при децата с фамилна обремененост за астма.
11. Процентът на Th17 клетки е по-висок при децата с тежка БА.
12. За 5 годишен период на проследяване 40% от децата с лека до умерено-тежка астма влизат в клинична ремисия. Такава не е установено при децата с тежка астма.
13. Не е установена прогностична стойност за персистирането на бронхиалната астма на изходните стойности на ФИД, ACQ тест, еозинофилия - периферна и назална, нива на IgE и Th17.
14. Рисков фактор за тежка и персистираща астма е наличие на 4 минорни алела от изследваните полиморфизми, а четири майорни алела показват протективна асоциация за БА.

VII. ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. За пръв път в България е определена честотата на тежка астма при деца с БА.
2. За пръв път в България са изследвани полиморфизми на ADAM33 сред деца с БА, като е проведен хаплотипен анализ на 4 полиморфизма за ADAM33.
3. За пръв път е анализирана взаимовръзката на БА с АР, ГЕР и наднормено тегло.
4. Доказани са повишени Th17 за българските деца с тежка астма.

Приноси с потвърдителен характер

С потвърдителен характер са изследванията, анализите и доказателствата за:

1. Ролята на полиморфизмите в ADAM33 гена за по-тежкото протичане на БА.
2. Минорният алел на T1 е по-чест при деца с тежка астма и АР.
3. Наличието на коморбидни заболявания при всички деца с тежка астма.
4. Високата честота на АР сред деца с БА.
5. По-висока честота на ГЕР сред децата с АР.
6. По-висока честота на ГЕР сред децата с БА.
7. По-високата честота на ГЕР и АР сред децата с тежка БА.
8. По-ниските показатели от ФИД при деца с тежка астма в сравнение с полеките форми на БА.
9. Сравнително по-голяма честота на назална и периферна еозинофилия при деца с БА спрямо здрави контроли.

Приноси с приложен характер

1. Създадени са двойки праймери и сонди и е оптимизиран протокол за RT-PCR за 4 полиморфизма на ADAM33
2. Доказване на повече от един минорен алел по T2, S2 и/или V4 е рисков маркер за персистиране на тежка БА.
3. По-високата честота на АР при деца с тежка астма предполага преценка на лечението и включване на локален или перорален антихистамин към контролиращата им терапия.
4. По-високата честота на ГЕР при деца с БА е предпоставка да се подозира такъв при трудни за терапевтичен контрол деца с БА.
5. В бъдеще при наличие на прицелни терапии децата с повишени Th17 клетки могат да са избирани кандидати за лечение, поради повишения риск за по-тежко протичане на заболяването при тях.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ

Публикации и участия в медицински форуми Във връзка с настоящата дисертация :

• Статии

- **Д. Митева**, Г. Петрова, П. Переновска, Генетични аспекти на някои белодробни заболявания, сп. Наука пулмология 2019, бр.1 (50); 21-28
- **Д. Митева**, Г. Петрова, П. Переновска, Генетика и тежка астма при деца. Клиничен случай, сп. Практическа педиатрия 2019, бр.9; 24-25
- Т. Velikova, S. Lazova, P. Perenovska, K. Tumangelova-Yuzeir, **D. Miteva**, P. Velikov, E. Ivanova-Todorova, D. Kyurkchiev, G. Petrova Th17 cells in Bulgarian children with chronic obstructive lung diseases, Allergol Immunopathol (Madr). 2019 May - Jun;47(3):227-233. doi: 10.1016/j.aller.2018.07.004. Epub 2018 Sep 2 (**IF 1.640**)
- Г. Петрова, **Д. Митева**, П. Переновска, Полиморфизми на единични нуклеотиди при ADAM33, Наука пулмология, 8, 2013, N 4, 24-29
- G. Petrova, **D. Miteva**, S. Lazova, T. Kralimarkova, P. Perenovska, S. Andonova, A. Savov Some ADAM33 single nucleotide polymorphisms and the risk of childhood asthma in a Bulgarian population Allergy 2015, 70 (Suppl. 101), 290–392

• Участия в конференции и конгреси

- Г. Петрова, **Д. Митева**, Сн. Лазова, П. Переновска, С. Андонова, А. Савов, Л.Зафировски, Полиморфизми на АДAM33 при деца с бронхиална астма – кн. с абстр. стр. 34, XVI-та Национална Конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие. Пранец, 9 - 11 октомври 2015
- **D. Miteva**, S. Lazova, P. Perenovska, S. Andonova, S. Bichev, A. Savov, G. Petrova, The genes Oh the genes do they play some role in asthma? 4th International Severe Asthma Forum (ISAF), Madrid, Spain, 8 - 10 Nov, 2018

- **D. Miteva**, P. Perenovska, P. Shahid, S. Bichev, S. Andonova, A. Savov, G. Petrova ADAM33 in Bulgarian children with severe asthma - World Allergy Congress 2019, Lyon, France 12-14 Dec, 2019
- G. Petrova, **D. Miteva**, S. Lazova, P. Perenovska, S. Andonova, A. Savov ADAM33 in Bulgarian children with asthma, Pediatric Allergy and Asthma Meeting 2015, Berlin, Germany 15-17 Oct, 2015

SUMMARY

Bronchial asthma (BA) affects about 15% of all children, which makes it the most common chronic lung disease in childhood, about 15-20% of asthmatics in the world have a severe clinical course. The aim of this PhD thesis is to describe the characteristics of severe asthma in Bulgarian children and to establish the role of the main four of the single polymorphisms for ADAM33. ADAM33 is the first one of the many genes connected with asthma predisposition.

There are two parts of the study – retrospective and prospective. In retrospective study 1075 children (640 boys and 435 girls with average age 9,23 years) hospitalized in the ward for chronic lung diseases of the Clinic of Pediatrics, University Hospital "Alexandrovska" EAD due to exacerbation of bronchial asthma for the period from January 1, 2010 to December 31, 2014 are included. In cases with more than one hospitalization of the same patient for this period, his/her data are reported once. Retrospectively we found out that in the last decade there is a tendency for a relatively constant number of children with BA requiring hospital treatment in Bulgaria. We calculated the rate of severe bronchial asthma as 2.88% of children with asthma, requiring hospital treatment. Children with BA in Bulgaria in 20% have clinical symptoms of gastroesophageal reflux (GER). All children with severe asthma have additionally allergic rhinitis (AR). The use of LTRA as a control drug in asthma in children is prescribed mainly in children with concomitant AR. Children with BA are not in a higher percentage of overweight compared to the general population of children in Bulgaria. Additionally we have found that also accompanying AR and / or GER are more important for the severity of BA compared to overweight. Therefore, in cases with severe, non-controlled asthma sometimes adding therapy for AR and/or GER could be beneficial. Out of the children identified as one with severe asthma 20 children and their families agreed to participate in a prospective genetic study. Additionally, 59 children with bronchial asthma (not severe one) and 29 healthy children and their families were included after obtaining signed informed consent. The control group is smaller due to more difficult recruitment of children with signed informed consent, when the information obtained does not contribute directly to the children themselves. All groups are similar in sex and age distribution. For the genetic study we designed primers and probes for the 4 SNPs of ADAM33 (T1 (rs2280091, T/C), T2 (2280090, C/T), V4 (rs2787094, C/G) and S2 (rs528557, G/C)). During execution of this PhD thesis a protocol for each SNPs was optimized. There is a higher frequency of minor alleles for S2 (rs2787094) and V4 (rs528557) in children with asthma compared to healthy children in Bulgaria. The homozygotes on the minor allele for T2 (rs2280090) are found more in children with severe asthma than in other asthmatics. The same was noted for the minor T1 allele (rs2280091) of ADAM33. Minor alleles T2 and V4 are more common in children with a family history of asthma. Children with severe asthma

have lower results in lung function test (FEV1, FVC, MMEF), higher numbers of peripheral and nasal eosinophilia, higher IgE levels and percentage of Th17, but none of these markers can serve as a prognostic factor for the persistence of the severity of bronchial asthma in children. About 40% of the children with mild to moderate asthma enter clinical remission within 5 years of follow-up, while children with severe asthma do not achieve complete clinical remission. The presence of 4 minor alleles of the studied polymorphisms is a risk factor for severe and persistent severe asthma, and four major alleles show a protective association for BA. All children with four major alleles on the studied SNPs in 5 years either enter in clinical remission or the severity of their asthma is extremely reduced.

This study for the first time draws the attention of pediatricians, pediatric pulmonologists and allergists to the frequency and characteristics of severe asthma among children in Bulgaria. It further clarifies the importance and emphasizes the role of the minor alleles of ADAM33 polymorphisms in the persistence of the severity of bronchial asthma in childhood.