



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

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на научна и образователна степен “доктор”

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”

Професионално направление: „Медицина”

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.

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|-----|
| I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР | 6 |
| 1. Въведение..... | 6 |
| 2. Особенности на бронхиалната астма в детската възраст..... | 7 |
| 3. Фенотипове на бронхиалната астма в детската възраст..... | 13 |
| 4. Коморбидни състояния влошаващи клиничния ход на бронхиалната астма..... | 27 |
| 5. Тежка бронхиална астма..... | 32 |
| 6. Генетични основи на бронхиалната астма..... | 38 |
| 7. ADAM 33..... | 41 |
| II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ | 49 |
| 1. Цел..... | 49 |
| 2. Задачи..... | 49 |
| III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 50 |
| 1. Пациенти..... | 50 |
| 2. Методи..... | 50 |
| 2.1. Ретроспективна част от проучването..... | 50 |
| 2.2. RT-PCR на единични полиморфизми на ADAM33..... | 52 |
| 2.3. Методи използвани за пациентите включени в генетичното (проспективно) изследване..... | 58 |
| 2.4. Проследяване на пациентите след 5 години..... | 66 |
| 2.5. Статистически методи..... | 66 |
| IV. РЕЗУЛТАТИ | 69 |
| 1. По задача 1 | 69 |
| 2. По задача 2 | 72 |
| 3. По задача 3 | 86 |
| 4. По задача 4 | 92 |
| 5. По задача 5 | 93 |
| 6. По задача 6 | 99 |
| 7. По задача 7 | 106 |
| 8. По задача 8 | 109 |
| V. ОБСЪЖДАНЕ | 115 |
| VI. ИЗВОДИ | 131 |
| VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 132 |
| VIII. ФИНАНСИРАНЕ | 134 |
| IX. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 135 |
| X. БИБЛИОГРАФИЯ | 137 |
| XI. ПРИЛОЖЕНИЯ | 160 |
| 1. Приложение 1 – Информирано съгласие..... | 160 |
| 2. Приложение 2 – Въпросник за контрола на астмата..... | 163 |

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

АСQ – Въпросник за контрола на астмата

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

АСТ – Asthma control test (Тест за контрол на астмата)

ADAM33 – A Disintegrin And Metalloprotease - цинк-зависима металопротеиназа

АТС – American Thoracic Society (Американско респираторно дружество)

ВМІ – Индекс на телесната маса

ВТС – British Thoracic Society (Британско респираторно общество)

ССD - Cross-reactive carbohydrate determinant (Кръстосано реагиращ въглехидратен детерминант)

ИНПР – Изоставане в нервно-психическото 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

CD – Cluster of differentiation (Клъстер 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 – Имуноглобулин 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 биосинтезазен 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. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Въведение

Бронхиалната астма (БА) засяга около 15% от всички деца, което я обуславя като най-честото хронично заболяване в детската възраст (36, 298). Съществува афористично определение, “че не любовта, а астмата е това нещо което те изненадва и те оставя без дъх” (302). Остарялото схващане, че наличие на „свиркане” означава астма води до погрешно свръхдиагностициране, а от друга страна нетипично протичащи случаи могат да бъдат пропуснати (20, 64).

Само за 10 години от 1980 г. до 1990 г. честотата на астмата е нараснала трикратно и този темп не намалява в последващите години (42). През 2016 година БА засяга около 60 милиона души в Европа, като се счита, че до 2025 г. половината европейци ще страдат от БА (93). До настоящия момент са открити редица фактори, отговорни за тази тенденция, основно свързани с глобализацията, урбанизацията и съвременният начин на живот. Важна е ролята и на замърсеният въздух, глобалното затопляне, промяната на хранителните навици и затлъстяването, дефицитът на витамин Д, рецидивиращите инфекции на дихателните пътища, увеличаването на алергичните заболявания, свръхупотребата на медикаменти, стресът и физическото натоварване (113).

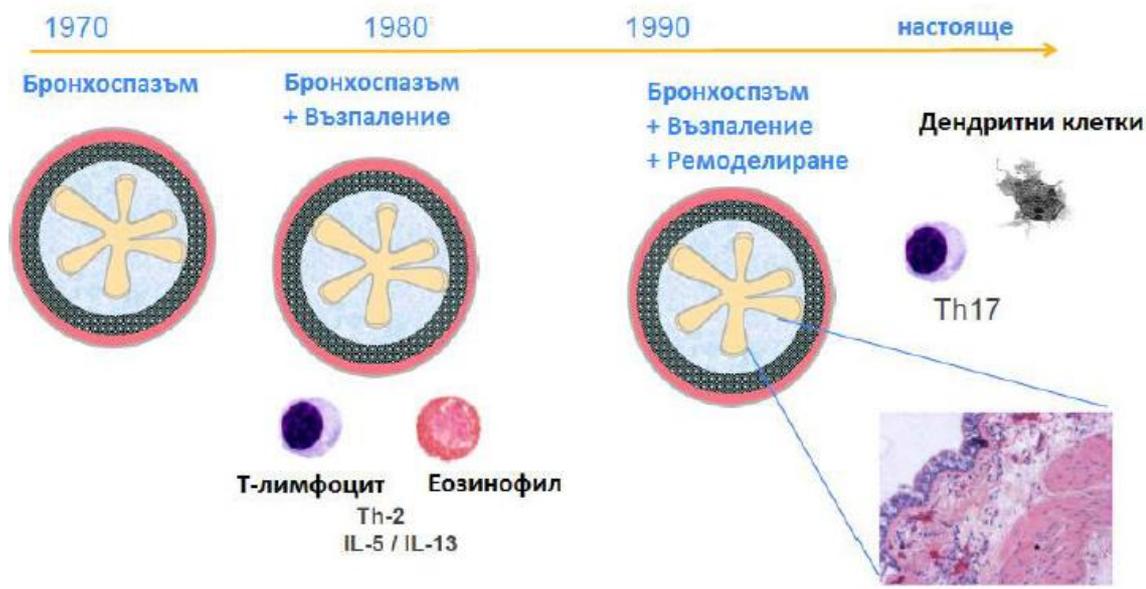
В последното обновяване на ръководството на Глобалната стратегия за превенция и лечение на астмата (113) е записано, че астмата е хетерогенно заболяване, обикновено характеризиращо се с хронично възпаление на дихателните пътища. Тя се дефинира на базата на анамнеза за респираторни симптоми като свиркане, задух, стягане на гърдите и променлива кашлица (по честота и интензитет), протичащи с обратима обструкция на дихателните пътища (113). Около 15-20% от астматиците по света са с тежко клинично протичане.

2. Особенности на бронхиалната астма в детската възраст

Деца с БА в страните с висок социално-икономически статус от 4% през 1955 г. достигат до 15% през 2000 г. (42). Този показател не е променен през последните години - за 2012 г. се докладват също 15% деца с БА (69). Положителното в тази обезпокояваща статистика е значителното намаляване на смъртните случаи от астма в детска възраст до 1-2 на милион/годишно (за разлика от регистрираните пикове през 60-те и 80-те години на миналия век съответно от по 6 и 8 деца на милион), както и намаляване на броя на хоспитализациите по спешност заради екзацербация на БА при децата. Този прогрес е свързан най-вероятно с по-доброто лечение и правилно обучение на пациентите и техните родители (69).

През 60-те години на миналия век е направено заключение, че детската астма **може да се лекува ефективно** и е възможно в 10 до 70% да се постигне ремисия (161, 239). По-добрите терапевтични резултати са достигнати и благодарение на разширяване на познанията ни за патогенетичните механизми за заболяването. През 70-те години на миналия век като основен патогенетичен механизъм е приет бронхоспазмът, за преодоляването на който са въведени бронходилататори с краткотрайно и дълготрайно действие. В последващите десетилетия широко се застъпват цитологични методи на изследване и се обективизира ролята на възпалението, а по-късно и на ремоделирането на дихателните пътища като водещи в патогенезата на хроничните белодробни заболявания (126) фигура 1 (фиг.1). Благодарение на редица научни открития днес палитрата на медикаментите за контролиращо лечение на БА се разширява с кортикостероиди, антилевкотирени, специфични моноклонални антитела. При добре контролираната астма пациентите не страдат от симптомите на астмата през деня и нощта; не използват или използват облекчаващи медикаменти до 2 пъти седмично; поддържат нормална физическа активност; поддържат

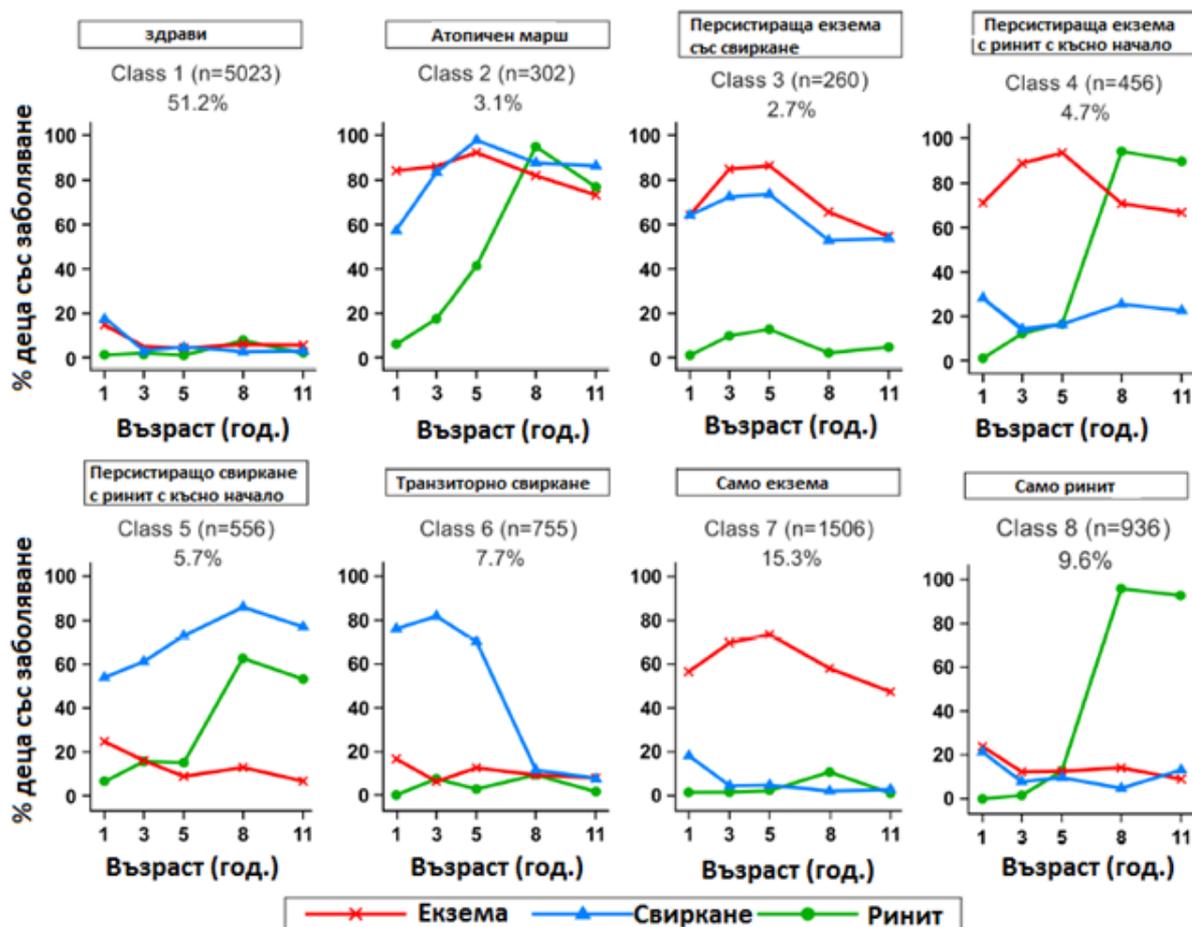
белодробна функция, максимално близка до нормалната и нямат екзацербации (113, 161).



Фигура 1. Разширяване на познанията за бронхиалната астма през годините (по Hirota N, 2013)

Клиничната изява на БА включва кашлица (до 92% от случаите), стягане в гърдите, недостиг на въздух (83%), свиркане (90%). Анамнестичните данни и физикалното изследване до 60% от случаите са достатъчно точен ориентир за астма (113). На първо ниво (лични лекари) е възможно допълнително извършване на рентгенографии на бял дроб и синуси, определяне на еозинофили в периферна кръв и ВЕД-метрия (определяне на върхов експираторен дебит). Специалистите допълнително провеждат спирометрия (функционално изследване на дишането - ФИД) с бронходилататорен отговор (БДО) и кожно-алергични проби (КАП) (за определяне на тригериращ пристъпите алерген). На най-високо ниво – специализирани лечебни заведения, допълнително се извършват бронхопровокационни проби, определяне на специфични и общи IgE, фибробронхоскопия с вземане на лаважна течност и други.

В края на миналия век учените, работещи в областта на детската астма, създават уникалната концепция „алергичен марш“, базирана на клинично установеното развитие на алергичното заболяване (57). Алергичният марш представлява еволюция на атопичния дерматит в ранна детска възраст през алергичен ринит до БА (57). На базата на първоначалните клинични резултати (57, 191, 241) се провеждат две големи популационно-базирани кохортни изследвания във Великобритания, обхващащи 9796 деца, проследявани от преди раждането им до 11-тата им година - Manchester Asthma and Allergy Study (MAAS) и Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) (45). Според клиничният ход и степента на изява на алергичен дерматит, алергичен ринит и бронхиална обструкция децата са разпределени в осем групи – деца без симптоми (51%), деца с атопичен марш (алергичен марш), деца с персистиращ дерматит и свиркане (астма), деца с персистиращ дерматит и алергичен ринит с късно начало, деца със свиркане и алергичен ринит с късно начало, временни свиркачи, деца само с атопичен дерматит и деца само с алергичен ринит. От събраните данни се установява, че само около 7% от децата със симптоми или около 3% от общата популация клинично се изявяват с атопичен марш (45). Данните за изявата на алергичните прояви от двете кохорти обединено са представени на фигура 2 (фиг.2).



Фигура 2. Класифициране на пациентите в отделни групи според клиничната изява на алергичен дерматит (екзема), алергичен ринит и бронхиална обструкция (свиркане) (по Belgrave DCM, 2014)

Данните от двете кохорти не подкрепят класическата концепция за алергичен марш при всички деца, но е установено, че степента на сенсibiliзация към различни алергени се изразява с характерна тенденция, а именно през годините намалява сенсibiliзацията към хранителни алергени (основно яйца, краве мляко и фъстъци) от 58 на 34%, за сметка на сенсibiliзация към инхалаторни алергени (домашен прах, тревни полени), която нараства от 17 до 67% (149).

Поради спецификата на заболяването в детска възраст през 2016 г. Британското торакално общество (BTS) и Шотландската мрежа за ръководства (SIGN) обединяват усилия и осъвременяват примерен модел

за поведение при тези пациенти (59) (фиг.3). Моделът е предимно клинично ориентиран).



Фигура 3. Диагностичен алгоритъм при деца с астма – обновление от 2016 г. (BTS/SIGN)

Предизвикателствата в диагнозата и лечението на детската астма са много. На първо място – много широката **диференциална диагноза** (113, 216) (табл.1), последвано от промяната на клиничната картина с възрастта (43, 282), трудно прогнозиране кои деца със свиркане ще имат и астматични симптоми по-късно (2, 3, 215, 270), почти невъзможно правилно изпълнение на спирометрия от малки деца (11, 113), проблем с комплайънса към инхалаторното устройство (15, 113, 123, 248) и не на последно място трудно предвиждане на отговора към лечението (56, 171).

Таблица 1. Диференциална диагноза на бронхиалната астма в детска възраст (по Papadopoulos NG, 2012)

Диференциална диагноза

Инфекциозни и имунологични заболявания

Алергична бронхопулмонална аспергилоза

Анафилаксия

Бронхиолит

Имунен дефицит

Повтарящи се респираторни инфекции

Ринит

Синуит

Саркоидоза

Туберкулоза

Бронхиална патология

Бронхиектазии

Бронхопулмонална дисплазия

Муковисцидоза

Първична цилиарна дискинезия

Механична обструкция

Вродени малформации

Увеличени лимфни възли или тумор

Аспирация на чужно тяло

Ларингомалация/трахеомалация

Дисфункция на гласните връзки

Вродено сърдечно заболяване

Гастроезофагеална рефлуксна болест

Невромускулно заболяване

Психогенна кашлица

3. Фенотипове на бронхиалната астма в детска възраст

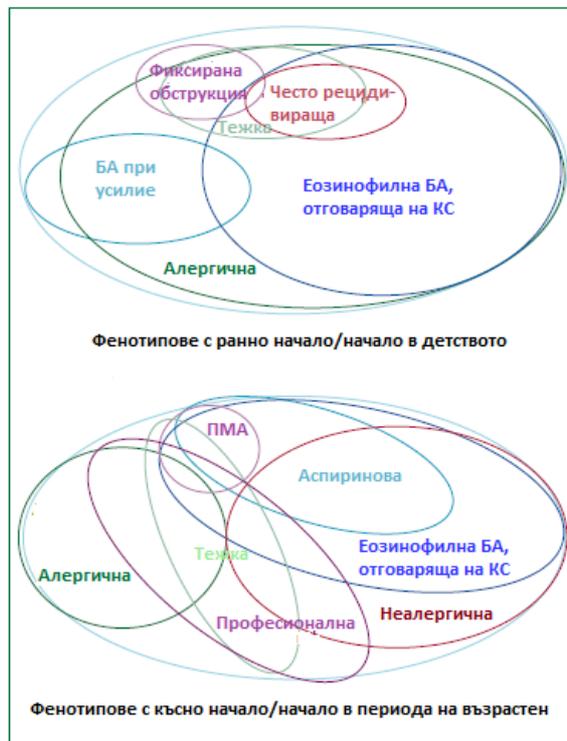
Фенотипът представлява съвкупност от видими структурни и функционални характеристики (или поведение) на един организъм, детерминирани от неговия генотип и модулирани от околната среда. Фенотипът се дефинира по клинични характеристики, които може да включват биохимични и други лабораторни показатели, както и физически белези, които не са свързани с патогенезата на заболяването. Отделните фенотипи на заболяването по принцип се категоризират като астма, тъй като всички те покриват стандартните критерии за диагностициране на БА: клинични симптоми („свиркане“, тежест в гърдите и задух) придружени с обратим бронхоспазм. През последните години все по-често се акцентира и на ендотиповете за групово разпределяне на пациентите с БА. Чрез термина „ендотип“ се определят подтиповете на даденото заболяване, класифицирани според различните патогенетични механизми. Трябва да се отбележи, че даден фенотип може да е резултат от различни ендотипове и обратно конкретен ендотип, например еознофилно възпаление, може да е в основата на различни фенотипове (30).

Определенията за астма - фенотипове постоянно се развиват. По-старите дефиниции са разчитали основно на определена клинична изява, но появата на сложни статистически клъстерни анализи, Th2 биомаркери и развитието на насочени терапии за определени молекулярни пътища, допринасят за по-отчетливо молекулярно фенотипизиране и до известна степен дори ендотипизиране на заболяването. Активна интеграция на големи клинични, молекулярни и терапевтични бази данни биха могли в крайна сметка да спомогнат в идентификацията на няколко различни заболявания, които в момента пребивават под шапката на термина астма.

От стотици изследвания върху въпроса за фенотипизиране на БА, публикувани ежегодно, са разработени няколко подхода за фенотипизиране, основаващи се на:

1. профила на клетките, участващи във възпалението на дихателните пътища - **възпалителни фенотипове**: еозинофилна, неутрофилна или олигогранулоцитна астма
2. провокиращи фактори - **фенотипове според тригерните фактори**: алерген-индуцирана астма (алергени от околната среда или професионални алергени и иританти), астма при физически усилия, аспиринова астма, астма свързана с менструалния цикъл
3. клиничната изява – **клинични или физиологични фенотипове**: дефинирани според тежест на заболяването, възраст на дебют или отговор към лечението (тежка астма, често рецидивираща, с фиксирана обструкция на дихателните пътища, кортикорезистентна астма)

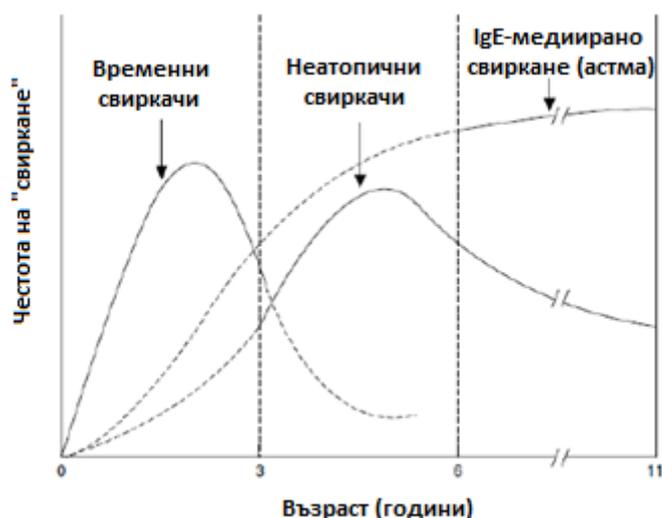
Различните фенотипове могат да се припокриват (284) (фиг.4).



Фигура 4. Диаграма на Вен за фенотипизиране на БА според възрастта на начална изява. БА – бронхиална астма, КС-кортикостероиди, ПМА-перименструална астма (no Wentzel SE, 2006)

През 1995 година е публикувано TUCSON проучването, където са добре определени три астматични фенотпа на БА в детска възраст (191, 251) (фиг.5). От изследваните деца 51.5% никога не са имали епизод на „свиркане“. Останалите 48,5% се разпределят като следва:

1. Временни „свиркачи“ (19.9%) – симптомите персистират до 3 годишна възраст, нямат фамилна обремененост за астма или атопия, но имат намалена белодробна функция при раждането. С израстване на детето белодробните показатели се нормализират (174).
2. Персистиращи „свиркачи“ (13.6%) - „свиркат“ и на 3, и на 6 годишна възраст. При раждането белодробната им функция не се отличава от контролната популация от деца, които не са имали епизоди на „свирене“. При по-голямата част може да е налице фамилна обремененост за атопия. Тези деца имат по-високи нива на IgE в сравнение с децата от контролната група и временните „свиркачи“. 40% от тях са **неатопични „свиркачи“**, при които симптомите персистират и след 3 годишна възраст. Често имат анамнеза за вирусна инфекция на долните дихателни пътища (предимно RSV) в ранна кърмаческа възраст (191). По-вероятно е да развият бронхоспазъм при вирусна инфекция. Към 13 годишна възраст са безсимптомни, без риск за развитие на астма. Останалите 60% от тях са атопични и се числят към групата на **IgE-медирано „свиркане“ (астма)**, те съставляват около 37% от децата, които „свиркат“ в ранна детска възраст (166).
3. „Свиркане“ с късно начало (15%) – атопици, част от групата на **IgE-медирано свиркане**, 1/3 от които развиват астма и в периода на възрастни (251).

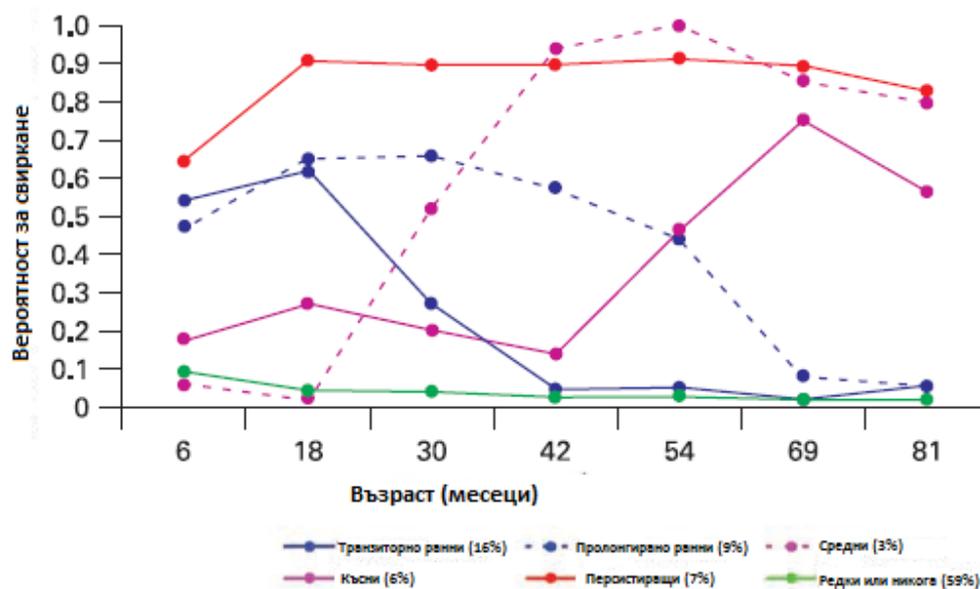


Фигура 5. Хипотетични годишни пикове на честотата на „свиркане“ при трите фенотипа в детството. Пунктираните линии показват вероятността припокриване на отделните фенотипове под влиянието на различни фактори (по Stein RT, 1997)

Европейското респираторно дружество предлага разделяне на ранните „свиркачи“ в зависимост от тригерите на: епизодично „свиркане“ в хода на вирусни инфекции и „свиркане“, провокирано от много фактори (алергени, вируси и други) (58, 249).

През 2008 година в резултат на AVON проучването е предложен нов модел на разделяне на ранните „свиркачи“ съобразно траекторията на „свиркане“ през годините: **транзиторни ранни „свиркачи“**, **пролонгирани ранни „свиркачи“**, **късни „свиркачи“**, **персистиращи „свиркачи“**, **интермедиерни (средни)** и **редки „свиркачи“** (124) (фиг.6). Допълнителният, за разлика от предходните класификации, пети тип – интермедиерни свиркачи, включва деца с начална изява на симптомите около 18-месечна възраст, при които е налична силна асоциация с БА, алергична предиспозиция и повишена реактивност на дихателните пътища в по-късните периоди на детството. Един от основните изводи, който правят авторите е, че „свиркане“ след 18-месечна възраст е силно асоциирано с развитие на астма и атопия. Тези резултати са реплицирани и

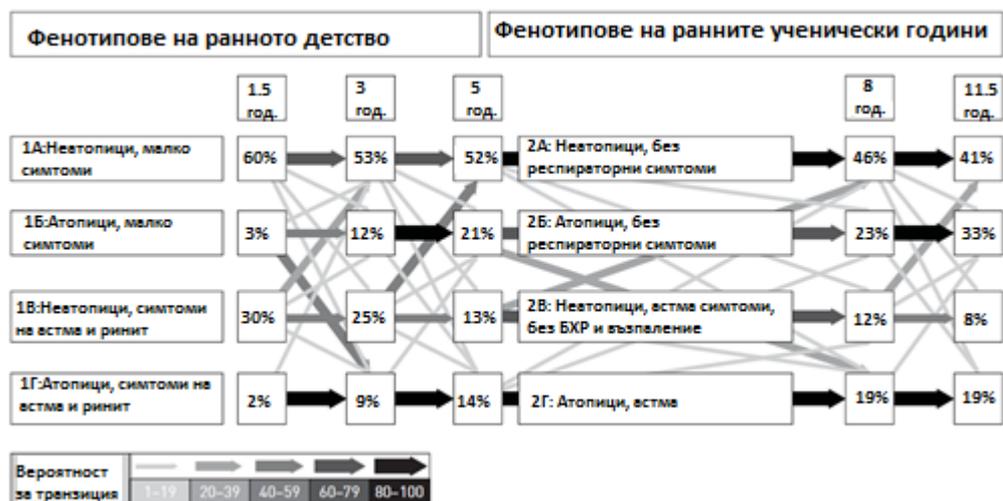
публикувани от изследванията и на други независими кохорти PIAMA (241), Southampton Women's Survey (78) и PASTURE (90).



Фигура 6. Разпределение на „свиркане“ от раждането до 81-месечна възраст за всеки един от определените фенотипове на свиркане (по Hendersen J, 2008)

През последното десетилетие се заговори и за допълнителен фенотип - **детска астма с късно начало**. Началните симптоми са по време или след пубертета, засягайки предимно момичета. Тази група е с много нисък процент на достигане на ремисия (88, 98).

Персистиреща астма от детството до възрастен индивид. През 2013 година Novland и сътрудници публикуват своите наблюдения, доказващи че само 1/3 от децата с рецидивиреща бронхиална обструкция до 2 годишна възраст имат БА на 16 години (133). На фигура 7 е представен транзиторния модел (с процентите на вероятност за преминаване от един фенотип в друг) между различните фенотипове на детска астма в две възрастови групи (до 5 години и до 11 години) (107).



Фигура 7. Транзиторен модел между различните фенотипове на детска астма в две възрастови групи – ранно детство и ранни ученически години (no Garden FL, 2015)

Интересно е изследването, при което деца в ремисия може да развият по-късно БА в младежките си години поради доказано персистиращо възпаление на дихателните пътища при тях (132). Рискови фактори за перистиране на БА са: ранно начало, атопия, женски пол, екзема, намалени белодробни показатели и бронхиална хиперреактивност.

В детската възраст основните три групи БА съобразно тригерния механизъм са: вирус-индуцирана астма, астма при усилие и алерген-индуцирана.

Вирус-индуцирана астма – най-честата изява на БА в ранна детска възраст и обхваща около 90% от „свиркачите“ в кърмаческа възраст (258). Най-често свързваният с БА вирус е респираторно-синцитиалния вирус. Асоциацията е доказана в над 15 проучвания, всички с еднозначни резултати (235). Други вируси със съществен принос към тази патология са риновирусите, метапневмовирусите и вирусът на грипа. Рискът за развитие на астма в ранна детска възраст след вирусна инфекция се повишава при наличие на алергична предиспозиция или много тежка инфекция. Най-

вероятно атопията също има роля в механизмите, водещи до екзацербации при този фенотип (245).

Астма при усилие - симптомите се проявяват при усилие и засягат около 90% от децата с БА. Загубата на вода и топлина от дихателните пътища при физическо усилие най-вероятно инициира патологичния отговор. Поддържането на възпалението се дължи на цистениллевкотриени и други ейкозаноиди, отделени от мастоцитите и еозинофилите.

Алерген-индуцирана астма - по данни на едно голямо мултицентрово немско изследване 90% от децата, които „свиркат“, но нямат атопия в ранна детска възраст, в училищна възраст и през пубертета са с нормална белодробна функция, докато сенсibiliзация към целогодишни алергени (домашен прах, котка, куче) през първите 3 години от живота е свързана с понижени белодробни показатели в училищна възраст (137). Сенсibiliзацията към сезонни алергени е асоциирана с риск за развитие на алергичен ринит (253).

Счита се, че вирус-асоциирано „свиркане“ в ранна детска възраст е свързано с високи нива на ремисия (над 60%), докато наличие на алергенна провокация при децата се свързва с развитие на тежка астма и с по-висок риск заболяването да персистира и в периода след 18 години (148). Пациентите с астма имат 12,5 пъти по-висок риск да развият ХОББ (дори след контрол на рисковите фактори, например спиране на тютюнопушенето) (150).

През 2014 година Nowgylak и колектив публикуват клъстерен анализ, фенотипизирайки децата с БА според отговора на провежданата терапия (135). Те разделят децата на следните фенотипове:

1. Лека астма с редки екзацербации, слабо изразена обструкция и минимални данни за атопия. Това е най-голямата група деца (28,8%). Те са със запазена белодробна функция (най-висок коефициент на Тифно), най-нисък бронходилататорен отговор, без данни за

атопичен дерматит, най-ниски IgE нива. Тази група е с най-нисък риск за екзацербация

2. Атопична астма със средно ниво на екзацербации и слабо изразена обструкция. Тези деца са почти всички с атопичен дерматит, често с алергичен ринит и положителни кожно-алергични проби, със запазена белодробна функция (най-висок FEV1), положителен бронходилататорен отговор. Рискът за екзацербация при тях е нисък до среден.
3. Атопична астма със средно ниво на екзацербации и силно изразена обструкция. Тези деца рядко имат атопичен дерматит, но са с най-високата честота на алергичен ринит и положителни кожно-алергични проби, с намалена белодробна функция (най-ниски FEV1 и коефициент на Тифно), силно положителен бронходилататорен отговор. Рискът за екзацербация при тях е среден.
4. Умерено атопична астма с високо ниво на екзацербации и силно изразена обструкция. Тези деца са без атопичен дерматит, но при 52.9% се наблюдава полиноза, ниски IgE, намалена белодробна функция (с коефициент на Тифно подобен на предходната група), силно положителен бронходилататорен отговор и среден до висок риск за екзацербации.
5. Силно атопична астма с високо ниво на екзацербации и силно изразена обструкция. Това е най-малката група пациенти (9.3%), почти всички с атопичен дерматит, много висок процент на положителни кожно-алергични проби, половината са с алергичен ринит. Те са с най-високи нива на IgE и еозинофилия. Почти всички са с намалена белодробна функция (с коефициент на Тифно подобен на предходната група), силно положителен бронходилататорен отговор (БДО) и са с най-високия риск за екзацербации.

Интересното на това проучване е, че авторите демонстрират дълготрайна последователност на предложените фенотипове и

терапевтичните опции за различните групи деца. Например децата от 4-ти клъстер под влияние на инхалаторни кортикостероиди и недокромил понижават риска за екзацербации, докато тези от 5-ти клъстер нямат ефект от тази комбинирана терапия. Данните от този клъстерен анализ са подобни на получени от предходни кохортни изследвания (55, 103, 121, 205).

Установените разлики между данните за атопия и бронхиална обструкция с кохортите при възрастни още веднъж потвърждава хипотезата за етиологични разлики между БА при деца и при възрастни.

С развитието на неинвазивни процедури за оценка на възпалението на дихателните пътища се изграждат и класификации за **фенотипизиране на БА според патологичната находка**.

В детската възраст обективизиране на вида на възпалението чрез биопсия, лаваж или индуцирана хращка поради методологични и етични причини е възможно само за най-тежките случаи. Чрез бронхо-алвеоларен лаваж е доказано наличие на еозинофилия и мастоцитоза при възпалението на дихателните пътища при деца с вирус-индуцирана и атопична астма, но липса на такава находка при пациенти само с вирус-индуцирано свиркане или само налична атопия (252). При ретроспективен анализ на бронхоскопски материали от деца под 3 годишна възраст е установено неутрофил-доминирано възпаление (подобно на картината при възрастни с ХОББ) в пробите на пациентите с тежки рекурентни епизоди на бронхиална обструкция, както и на деца с кортикостероид-резистентна астма (176). Всички тези проучвания отхвърлят старата догма за еозинофилната инфилтрация като основен белег за БА. Нееозинофилно възпаление е доказано при пациенти с по-леко протичане на заболяването (114).

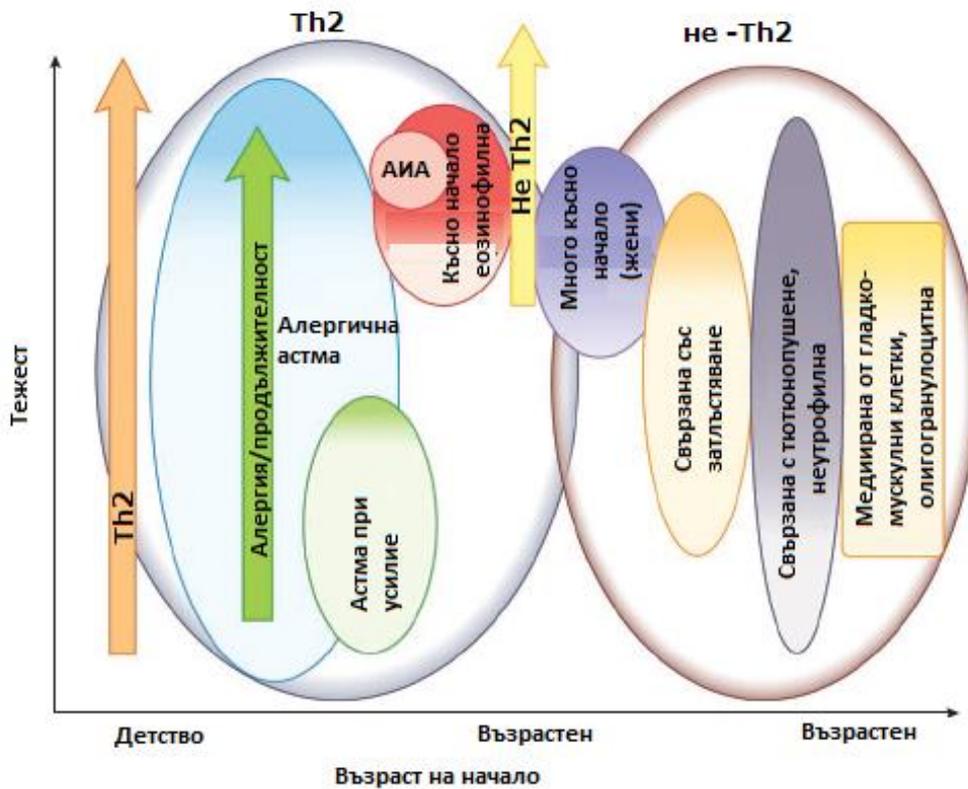
Използвайки ендотипите от класификацията при възрастни пациенти – еозинофилни и нееозинофилни форми Fleming и сътрудници установяват, че при висок процент (41%) от децата има наличие на

еозинофили (покривайки критериите за еозинофилна астма) в един момент и цитологична находка характерна за нееозинофилна астма в друг момент, несвързано с данните за издишан NO и провежданата терапия (105). Това откритие може би ограничава използването на индуцирана хрчка при класификация на ендотипите на БА при деца, освен ако не се повтаря в динамика. Алтернативен подход в ендотипизирането на БА е използване на биомаркери в издишан въздух, серум или урина като индикатори на специфично възпаление на дихателните пътища. Като системни маркери на Th2 медирано възпаление се проучват периостин, ейкозаноиди в урина, серумен еозинофилен катионен протеин, но нито един от тях не е демонстрирал убедителни данни за фенотипизиране на децата с астма, подходящи са за отделяне на определен ендотип спрямо възпалението, но е възможно едно и също подлежащо възпаление да е в основата на различни клинични фенотипове.

За детската БА класическото схващане е, че то е Th2 - медирано заболяване, което има силна асоциация с алергенната сенсибилизация и други алергични прояви, изграждайки гореспоменатата хипотеза за алергичен марш. Много деца обаче с една алергична изява не прогресират до друга. Знае се, че деца с дефицит на филагрин са с висок риск за развитие на астма, но само в присъствие на екзема. Това е пример за алергенна сенсибилизация чрез бариерата на кожата, което подпомага алергично възпаление на дихателните пътища (197). Макар и изяснена връзка между атопия и децата с персистиращ бронхоспазъм, това не трябва да се приема за догма и да се очаква, че всички атопици ще „свиркат“ в ранна детска възраст.

Raedler и колектив през 2015 г. разделят децата на 3 големи групи (алергични астматици, неалергични астматици и здрави контроли), чрез имунологични и генетични анализи. Те откриват, че алергичните астматици имат повишени нива на T-регулаторни клетки в сравнение със здрави контроли, но не и в сравнение с неалергични астматици. Също така

те са с понижена експресия на гените свързани с вродения имунитет (CLIC4, TSC1). За децата с неалергична астма са характерни повишени проинфламаторни нива на IL-1b, IL-17–изместено към неутрофили възпаление и недостатъчна супресия на IL-5, IL-13 и IFN-γ от T-регулаторните клетки. Допълнително за тази група деца е установена повишена експресия на PSTPIP2, неутрофилно-асоциираните гени CD93, както и на TREM1 и RGS13. И за двата астматични фенотипа е доказано превалиране на Th2 имунитет (229).



Фигура 8. Теоритично групиране на астматичните фенотипове съобразно типа на превалиращия имунен отговор. АИА – аспирин индуцирана астма. Интензитета на цвета на всяка елипса отговаря на тежестта, докато размера на елипсите представя относителния дял на засегнати пациенти (no Wentzel SE, 2006)

В края на миналия век чрез много изследвания с миши модели е доказана критичната роля на Т-хелперните клетки (и по-специално Th2) в имунния отговор при възпалението и хиперреактивността при БА (118,

288, 297). Благодарение на това откритие е въведена и фенотипизация на астмата съобразно типа имунен отговор - Th2 астма и не-Th2 астма (284) (фиг.8).

Th2 астмата може да има както ранен, така и късен дебют, с различна тежест на заболяването. Не-Th2 астмата включва астма с много късно начало, асоциирана със затлъстяване, астма, свързана с тютюнопушене и неутрофилия, както и астма при пациенти с минимални възпалителни изменения.

Th2-свързана астма – характерно е наличие на атопия, еозинофилно възпаление и добър отговор към кортикостероиди.

1. Алергична астма с ранно начало – често с дебют в детска възраст, в голяма част е лека до средно-тежка като изява. Пациентите са фамилно обременени за астма, с положителни кожно-алергични тестове повишени специфични IgE и еозинофили. Доказани са мутации в Th2-свързани гени (IL4, IL13, IL4R α) асоциирани с по-тежко протичане на заболяването. Повишени нива на IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 и периостин в храчка, бронхоалвеоларен лаваж, биопсия и серум. Пациентите отговарят много добре на кортикостероиди. За тази група пациенти са разработени Th2 терапия: анти-IgE (Omalizumab) за тежка алергична астма; анти-IL-13 (Lebrikizumab) за алергична астма с доминираща активация на IL-13 (както и при пациенти с високи нива на периостин, който в случая служи като сурогатен маркер); инхалаторен IL-4R α антагонист (по-добър отговор при пациенти с доказан полиморфизъм на IL-4 рецептор).

2. Еозинофилна астма с късно начало - развива се в края на 20-те до 40-те години. Характеризира се с много тежки екзацербации и персистираща еозинофилия в храчка (>2%), независимо от кортикостероидната терапия. Често има и алергичен риносинуит. Рядко има фамилна обремененост за БА, което затруднява търсене на

генетична предиспозиция. Класифицира се към Th2 астмата поради доказано наличие на IL-13 и IL-5 в долните дихателни пътища. При някои пациенти е налична неутрофилия в храчка, което най-вероятно се дължи на допълнителни взаимодействия в имунния Th2 отговор, чрез активиране на каскадните пътища свързани с IL-33 и IL-17. Персистиращата еозинофилия се преодолява с много високи дози системни кортикостероиди. Добър терапевтичен отговор би се очаквал от IL-5, IL-4 и IL-13 таргетните терапии.

Аспирин индуцирана астма е субендотип на този тип БА. Тя е придобито състояние, често прогресиращо и тежко, асоциирано с еозинофилия и синусна полипоза. Доказва се чрез аспиринова провокация и високи нива на цистениллевкотирени. Установена е субрегулация на периостин и полиморфизми на левкотриеновите гени. Лечението се провежда с инхалаторни кортикостероиди и левкотриенови модификатори. При нормализиране на нивата на периостин се достига много добър контрол, което може да служи за бъдеща периостин-насочена терапия.

3. Астма при усилие – симптомите се наблюдават след физическо натоварване. Клинично се характеризира като лека, интермитентна, честа при атопични атлети с висок процент на мастоцити и еозинофили. Поддържането на възпалението се дължи на цистениллевкотирени и други ейкозаноиди отделени от мастоцитите и еозинофилите. За сурогатен маркер в оценката на терапевтичния отговор може да се използват фракциите на издишан азотен окис. Лечение с левкотриенови модификатори или IL-9 насочена терапия показва висока ефективност.

Не-Th2-свързана астма – характерно е липса на ефект от Th2-насочената терапия. Все още слабо проучен дял на молекулярно ниво.

1. Астма, свързана със затлъстяване. Все още е дискутабилен въпроса дали затлъстяването е основен фактор за развитието ѝ, или е

случаен коморбидитет. Засяга предимно жени с наднормено тегло, рядко алергични. Началото на симптомите е късно след 40 години. Повишени нива на TNF- α , IL-6, адипонектин, лептин, резистин (повишен оксидативен стрес), ниски стойности на издишания азотен оксид, единични еозинофили. Пациентите са с лош отговор към кортикостероиди, но при оперативни процедури за намаляване на теглото и диети, симптомите значително намаляват.

2. Неутрофилна астма. Все още не е изяснено дали неутрофилията е израз на този специфичен подтип астма или е израз на персистираща бактериална колонизация при еозинофилна астма. Пациентите са с фиксирана обструкция, много задържан въздух и подебели стени на дихателните пътища (измерени с КАТ). Хипотезира се ролята на Th17 и на имунния отговор към бактерии и вируси в развитието на астмата. В най-тежките случаи освен неутрофилия е налична и еозинофилия. Използвани биомаркери - IL-8, IL-17A, LTB₄, IL-32 и ниски нива на фракциите на издишан NO. Кортикостероидите са слабоефективни за лечение при тези пациенти, но е възможен добър отговор към макролидни антибиотици (чрез намаляване експресия на неутрофилни маркери), анти-TNF- α (Infliximab) и медикаменти с насоченост към IL-17 (все още в етап на клинично проучване).

3. Астма при тютюнопушение - неутрофилия в белите дробове, при активни и пасивни пушачи. Слабо проучена е ролята на генетични фактори и биомаркери. Установени са ниски нива в издишан NO. Терапевтична опция с много добра ефикасност е спиране излагането на тютюнев дим, както и частичен отговор при лечение с теофилин.

4. Коморбидни състояния влошаващи клиничния ход на bronхиалната астма

4.1 Алергичен ринит

Взаимодействието между горните и долните дихателни пътища е добре проучено през последните 30 години. Добре установен факт е и тясната връзката между заболяванията астма, алергичен ринит и риносинусит (17, 18, 24, 79, 111). През последните години научната общност все по-често ги разглежда като различни клинични прояви на общ патогенетичен феномен. Единството на дихателните пътища се потвърждава както от морфологична, така и от функционална точка гледна точка. При дете с алергичен ринит (АР) често е необходимо да се оцени и наличието на бронхиална астма. Обратно, пациентите с астма трябва винаги да се оценяват за придружаваща назална симптоматика, особено тези, които страдат от трудно лечима и/или тежка астма при които е възможна коморбидност с окуларен синусит (79, 111, 210).

Клиничната изява на АР може да предшества тази на астмата и се счита за рисков фактор за развитие на астма (119, 246). Документът на СЗО ARIA (“The Impact of Allergic Rhinitis on Asthma“) ясно подчертава ролята на АР като рисков фактор за развитието на астма и препоръчва изключване на бронхиално засягане при пациентите с АР (210). Според проучването на Rochat et al. (Rochat MKIS, 2010), атопичната сенсibiliзация на двегодишна възраст, а не проявите на ринит, е предиктор за риска от астма, докато след навършване на петгодишна възраст, тази зависимост се обръща (236). От друга страна АР се счита като причина за лош контрол на астмата (44). Има данни, че децата с астма и съпътстващ АР показват по-лош контрол на астмата, намалено качество на живот, повишен риск от посещение на СМП или хоспитализация и по-висока цена на разходите за лечение (17, 18, 19, 27, 70, 87, 152, 160). Спирометричният индекс MMEF₂₅₋₇₅ се счита за маркер за начално засягане на белодробната функция при

пациенти с АР (28, 190, 278). Ciprandi et al. демонстрират намаление на $MMEF_{25-75}$ при възрастни пациенти дори с кратка давност на сезонна АР симптоматика (76). Същият екип демонстрира позитивен БДО (при нормален изходен FEV_1 и FEV_1/FVC) при повече от 60% от пациентите с АР, а при 18% от тях намаление на FEF_{25-75} ($MMEF_{25-75}$). Почти всички пациенти с нисък FEF_{25-75} ($\leq 65\%$ pred.) показват позитивен БДО (77). Capasso et al. изследват ефекта на АР върху астмата при деца, оценявайки влиянието му върху БДО (62). Те установяват позитивен БДО ($\Delta FEV_1\%init. \geq 12\%$) при 20% от децата с АР, при които се установява по-нисък изходен FEV_1 , по-голяма давност на АР и сенсibiliзация към целогодишни алергени (микроакари) (62). Licari et al. установяват връзка между заболяването на малките дихателни пътища (small airway disease), дефиниран като намален FEF_{25-75} при нормална спирометрия (FEV_1 , FVC/FEV_1 и FVC), и наличието на назални симптоми и еозинофилия при пациенти с АР, без бронхиална астма, с което предполагат наличие на ранно алергично или възпалително засягане на малките дихателни пътища (181).

4.2 Наднормено тегло

Наднорменото тегло се счита за рисков фактор за развитието на астма, по същия начин, както се набеждават инхалаторните кортикостероиди (ICS) за повишено тегло (184). Над 500 публикации (за последните 20 години) третират проблема астма и наднормено тегло, но данните не са еднопосочни. Вероятните механизми за връзката между затлъстяването и астмата включват възпаление на дихателните пътища, механични промени свързани с наднорменото тегло, промяна в свръхчувствителността на дихателните пътища и изменение на физическата активност и хранителен режим. Затлъстяването се характеризира с лекостепенно системно възпаление и повишени инфламаторни цитокини, адипокини и острофазови протеини като лептин, И-6, $TNF-\alpha$ и С-рекативен

протеин. Подозира се връзка между повишено ниво на NO (белег на възпаление на дихателните пътища) и ВМІ при възрастни не астматици, но не се доказва такава и при деца или при астматици. Много проучвания изказват хипотезата, че затлъстяването увеличава клиничната тежест на астмата и влошава качеството на живот на децата астматици. Дискутабилен е все още и въпроса доколко лечението на БА с високи дози ICS допринася за наднорменото тегло. От наблюдения при над 100 български деца не се намира връзка между повишеното тегло на пациентите с БА и дълготрайността и дозата на ICS лечение (22). В повечето случаи се установява връзка между теглото и неатоичната астма, което може да се обясни и физиологично – по-висок стоеж на диафрагмата, което ограничава респираторните движения и може да е предпоставка за задух и неатоично обусловени пристъпи. Затлъстяването води и до намаление на функционалният остатъчен капацитет и намаление и на FEV1 и на FVC със запазено съотношение FEV1/FVC, в резултат на което дишането се учестява и е по-повърхностно (5). Намалението на белодробните обеми се приема, че води до повишение на хиперреактивността на дихателните пътища. Matricardi и Flaherman доказват обаче, че при деца с БА и затлъстяване бронхиалната хиперреактивност е по-слабо изразена отколкото при деца с БА без затлъстяване, което е в контраст с данните на Ulger и Jang, които намират правопрпорционална връзка между ВМІ и бронхиалната хиперреактивност (104, 144, 195, 266).

Затлъстяването оказва влияние и на кръвотока в белите дробове, което влошава ефективността на кислородообмена. Маснатата 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 (21, 217).

Изследване на Pianosì при 64 деца с БА доказва подобни резултати от функционалното изследване на дишането и физическата активност при деца с нормално и деца с наднормено тегло, последните се оплакват повече от ограничения във физическата активност, което е причина за по-висока стъпка при предписваните контролиращи медикаменти (222). Според авторите на това проучване децата с наднормено тегло субективно индикират астмата си като по-тежка, без това да е обективно доказано.

Характерно за астмата в детска възраст е поддържането на нормална белодробна функция при провеждане на адекватно контролиращо лечение. Най-изразеният и постоянен функционален ефект на затлъстяването е намалението на показателите ERV (експираторен резервен обем) и FRC (функционален остатъчен капацитет). В проучването CAMP (Childhood Asthma Management Program) Tantisira et al. установяват много слабо клинично влияние на наднорменото тегло/затлъстяването върху контрола и тежестта на астмата в детска възраст, а от спирометрията съобщават за намалено съотношение FEV₁/FVC (коефициент на Tiffneau) предимно при момичета. Намалението обаче е свързано с увеличение, както на FEV₁, така и на FVC, но с превес на FVC (260). В тразверзалното проучване Mahut B et al. също намират негативна корелация между BMI и съотношението FEV₁/FVC, която не показва асоциация със загубата на контрол или с ограничение на въздушния дебит (187). Липсват сигурни доказателства за асоциацията между BMI и загубата на белодробна функция при децата с астма, извън обичайните ефекти, които оказва затлъстяването върху белодробните обеми (47). През последните години се налага становището, че именно наднорменото тегло е рисков фактор за астма, а не лечението за астма е рисков фактор за наднормено тегло.

.Според данните на западни автори редукцията на свръхтегло намалява симптоматиката с 48-100% и намалява нуждата от терапия, като се изтъква обаче липса на ефект върху еозинофилното възпаление и се препоръчва оптимална доза ICS за контрол на заболяването (147).

4.3. Гастроезофагеален рефлукс (ГЕР)

Интересно съобщение от 2006 г. на Stordal et al. акцентира на връзката астма-гастроезофагеален рефлукс-затлъстяване, като порочен кръг, който, ако не се спре, би утежнил и двете състояния (254). Счита се, че около 60-80% от възрастните астматици и около 50-60% от децата с астма имат и ГЕР (247). Поради голямата честота на двете заболявания и общата симптоматика – кашлицата, поставянето на точна диагноза може да бъде затруднено и понякога пациентите са свръхдиагностицирани или недооценени. Класическите симптоми, характерни за ГЕР, включват: повръщане (72%), коремна болка (36%), проблеми с храненето (29%), невяреене (28%), раздразнителност (19%), болка зад стернума (1%). Все повече се докладват случаи с атипично представяне на ГЕР, като най-често се касае за респираторна симптоматика - синусити, ларингити, дрезгав глас, хронична кашлица, астма, апнея, стридор, рекурентни пневмонии, рекурентни отити (20).

Наличните данни до настоящия момент определят ГЕР като рядка единствена причина за изолирана кашлица, особено при деца над 1 годишна възраст (122) . ГЕР се среща често в кърмаческа възраст (с пик в 4–5 месец) и отшумява при повечето деца около 12–24-я месец. Това е причината за по-високата честота на ГЕР-асоцирана кашлица при кърмачетата (240). За обща патогенеза между ГЕР и респираторни заболявания може да се набеди общия ембриологичен произход, и съответно анатомична близост, позволяваща аспирация на стомашно съдържание от хранопровода, като по този начин механично и химично се дразни епитела на респираторния тракт. Другата хипотеза се базира на данни за връзка между бронхиална констрикция и механичното разширение на хранопровода в неестествена посока отдолу нагоре което отключва кашличен отговор поради интраезофагеална провокация от солната киселина чрез стимулация на вагуса (139, 140). Доказано е, че от 43 до 75% от случаите на кашлица, свързана с ГЕР, нямат симптоми на

рефлукс; кашлицата отговаря на антирефлуксна терапия и до 40% от случаите с хронична кашлица се дължат на ГЕР (151, 208, 247). При възрастни пациенти е доказано, че ГЕР се асоциира с повишен риск за екзацербации при ХОББ, но само при пациенти, които не приемат антиацидни медикаменти (139).

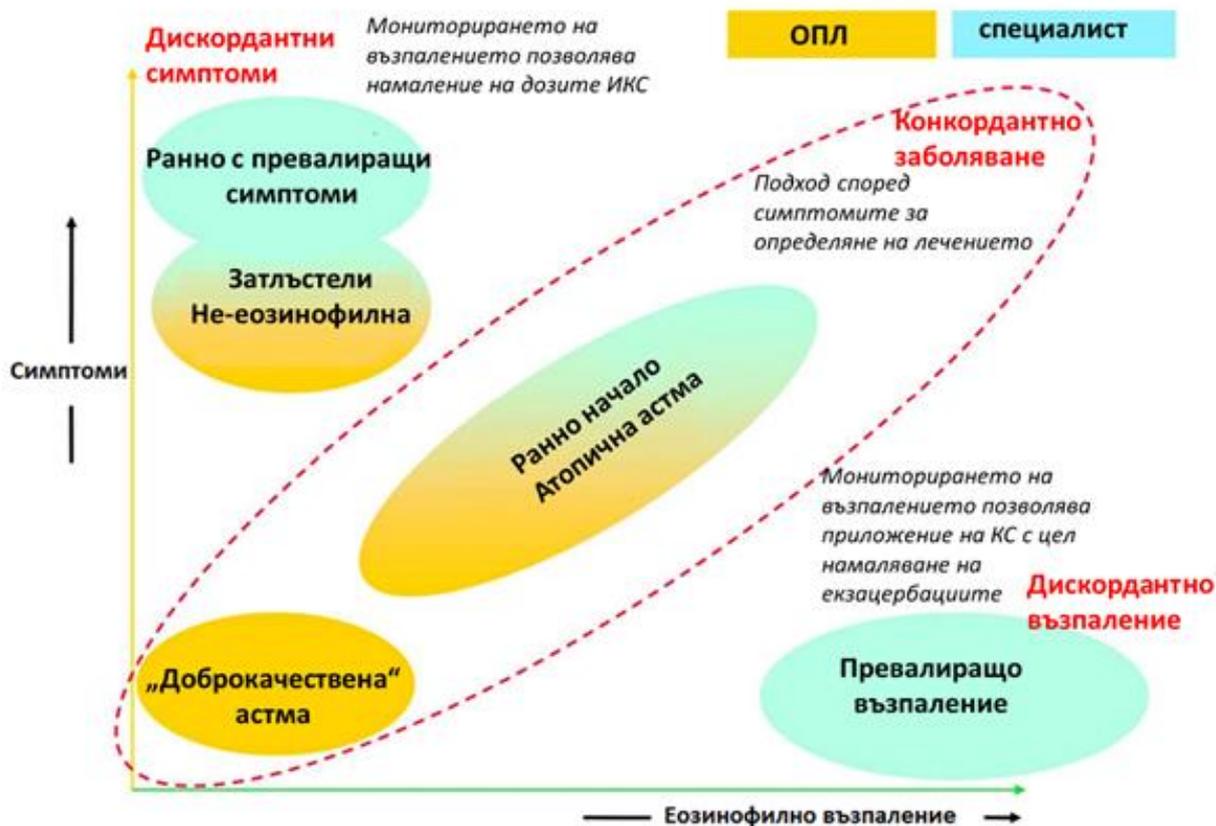
Италианско проучване открива повишена реактивност към метахолин при пациенти с ГЕР, които нямат данни за наличие на бронхиална астма (153). Това откритие се доказва и в скорошни публикации за неутрофилно възпаление в резултат на киселинен рефлукс, което е причина за повишена реактивност на дихателните пътища (БХР) (293). Наличието на езофагит, дължащ се на ГЕР, повишава реактивността на дихателните пътища и насоченото лечение с пантопразол намалява БХР при пациенти без астма (142).

Наличието на ГЕР при астматици може да попречи за постигане на оптимален контрол на астмата дори при пациенти, които стриктно следват правилен терапевтичен план (220). В същото време редица автори подчертават сигнификантно по-ниски нужди от орални кортикостероиди и подобрение в данните за контрол на астмата (66, 138, 159). Липсата на отговор към медикаментозното лечение за астма може да е белег за наличие на ГЕР (151, 250).

5. Тежка бронхиална астма

Класифицирането според тежестта се отнася основно за отделяне на пациентите с **тежка астма**, която може да възникне и през детството, и на по-късен етап от живота (90). Този тип може да се асоциира с алергични и неалергични провокиращи фактори, както може да е с доминиращо еозинофилно или неутрофилно възпаление на дихателните пътища (285). Позиционирането на различните типове астма съобразно нивото на еозинофилно възпаление и клиничните симптоми е представено на фигура 9.

Активна интеграция на големи клинични, молекулярни и терапевтични бази данни биха могли в крайна сметка да спомогнат в идентификацията на няколко различни заболявания, които в момента пребивават под шапката на термина астма.



Фигура 9. Позициониране на различните типове астма съобразно нивото на еозинофилно възпаление и клиничните симптоми (по Haldar P, 2008)

Преди 2000 година не е имало ясна дефиниция за тежка БА, този пропуск е коригиран през 2014 г. от съвместна работна група на European Respiratory Society (ERS) и American Thoracic Society (ATS). Като тежка астма се дефинира 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 (75, 113).

Неконтролирана е тази астма, при която е налице едно от следните условия:

- Лош клиничен контрол: Въпросник за контрола на астмата (ACQ) постоянно над 1.5, тест за контрол на астмата (ACT) над 20 (или “недобре контролирана астма“ според ръководствата NAEPF/GINA)
- Чести тежки екзацербации: два или повече бустера от системни КС (по три дни всеки) през последната година
- Сериозни екзацербации: поне една хоспитализация, престой в интензивен сектор или необходимост от механична вентилация през последната година
- Бронхиална обструкция: FEV1 под 80% от предвиденото (намален FEV1/FVC дефиниран като стойност под долната граница на нормата)

Неконтролираната астма, при която са изключени лош комплайънс, придружаваци заболявания (ринит, ГЕР, затлъстяване) и е постигнато оптимално придържане към терапията и ограничение на тригериращите алергени, но въпреки това остава неконтролирана се определя като тежка астма (261).

Децата с тежка астма в сравнение с децата с лека към умерена астма имат повече симптоми, по-тежка бронхиална обструкция, по-изразена хиперинфлация и повишена реактивност спрямо метахолин. Пациентите с тежка астма имат повишени концентрации на ексхалиран FENO и сигнификантно по-изразена сенсibiliзация към аероалергени. Въпреки повишаването на дозата на ICS, честотата на екзацербациите е значително по-висока при пациентите с тежка астма (83%) в сравнение с тези с лека към умерена (43%) (75, 102). Клинично при тежка БА се наблюдава: почти

фатална астма, астма с фиксирана бронхиална обструкция или кортикостероид-резистентна астма. Хипотетично развитие на тежка астма при децата е представено на фигура 10 (103).



Фигура 10. Хипотетично развитие на тежка астма при деца (по Fitzpatrick AM, 2011)

Почти фатална астма

Основните рискови фактори за този фенотип са чести тежки хоспитализации и психосоциални причини. Пациентите прогресивно се влошават преди екзацербация, но късно търсят помощ (146, 201). През последните години полиморфизми на гена промотор за IL12 и RANTES–28C/G полиморфизъм са набеждавани за генетична предиспозиция за този астма фенотип (207, 290).

Астма с фиксирана бронхиална обструкция

Въпреки, че един от основните дефиниращи критерии за БА е обратима бронхиална обструкция, някои пациенти постепенно развиват фиксирана, необратима обструкция (162), вероятно поради персистиращото възпаление и ремоделиране на дихателните пътища (272). Рисковите

фактори за това са мъжки пол, липса на атопия, персистираща еозинофилия независимо от лечението и по-късен дебют на БА (276). За разлика от фиксираната обструкция при ХОББ при пациентите с БА има еозинофилия в периферна кръв и стената на дихателните пътища, по-нисък брой неутрофили и високо съотношение CD4+/CD8+ Т-лимфоцити; по-дебел ретикуларен слой на епителната базална мембрана, акумулация на фибробласти и хипертрофия на гладкомускулните клетки. През последните години задълбочени генетични проучвания подчертават ролята на полиморфизмите на ADAM33 за бронхиалната обструкция и ремодулацията (82, 99, 256).

Стероид-резистентна астма

Налично е персистиращо възпаление независимо от лечението с кортикостероиди (включително орални). В 95% от случаите тази резистентност е придобита и различните подтипове зависят от тригериращи фактори и генетична предиспозиция (178). В тази група също има фенотипни варианти разпределение по нивата на издишан азотен окис (NO). Стероид-резистентен фенотип с персистиращи симптоми и висок издишан NO и фенотип с персистиращи симптоми и нисък издишан NO (219).

Съществуват значителни различия в докладваните проценти за разпространението на тежка астма. Например за Швеция, като тежки астматици са определени 4,2% от възрастните пациенти с БА (173). В Дания описват по-висок дял от около 8% (275), а някои проучвания съобщават, че дори повече от 30% от астматичните пациенти имат поне някои характеристики на тежка астма (200). Делът на децата с тежка астма се счита, че е по-малък от този при възрастни (237), например в кохорта от Швеция, само седем от 329 астматични деца на 12 години са имали тежка астма, което предполага честота от 2,1% (214), но в Норвегия подобна кохорта от 616 деца 67 са имали БА, от които само три са дефинирани с тежка астма, което означава 4,5% сред астматичните деца (168). Около

3,2% са тежките астматици деца във Великобритания от мащабно кохортно проучване (46). Вероятно различните данни се базират на различни критерии и различна възрастова група, която обхващат. След прецизиране на дефинициите може грубо да се приеме, че около 24% от астматиците имат неконтролирана БА според критериите на GINA, 17% са тези с трудна за лечение БА (поради лош комплайънс, наличие на коморбидни състояния, социални и психологични причини) и само 4% са истински тежките астматици (169) (фиг.11).



Фигура 11. Процентно разпределение на проблемните астматици (по Lang D, 2015)

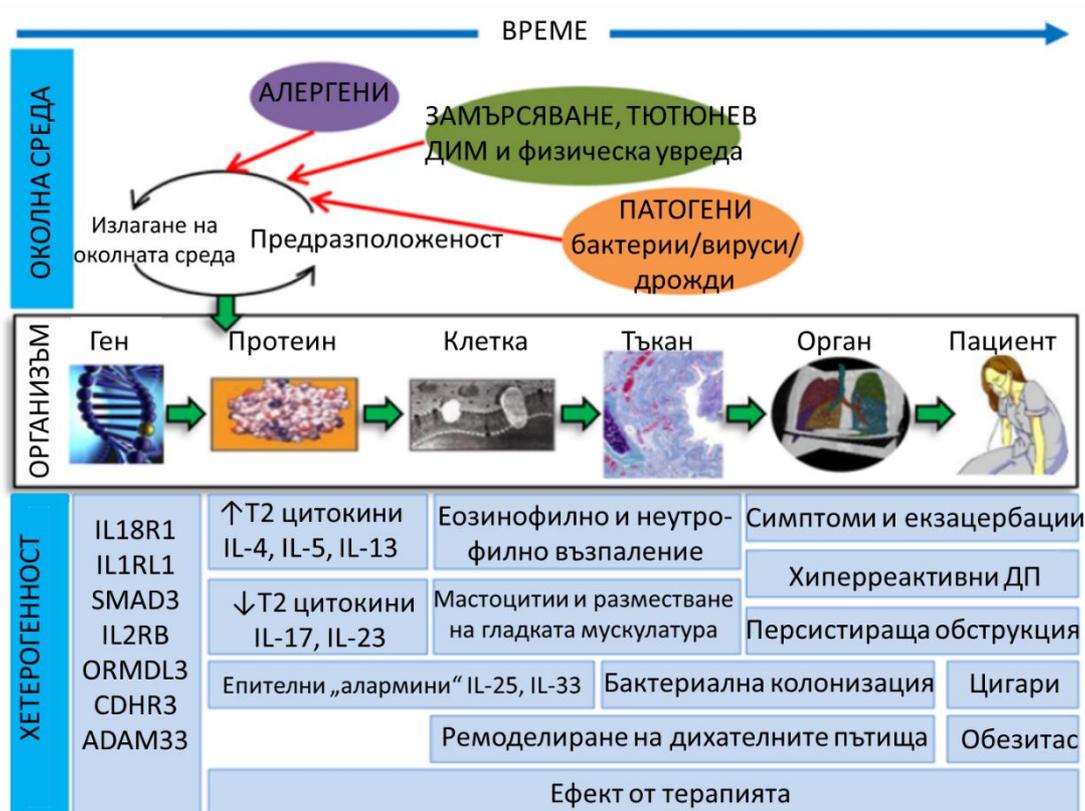
Според повечето публикувани данни при тежката астмата, възпалението на дихателните пътища не е само движено от Th2, но и от Th17 лимфоцити (175). Това допринася за голямата неутрофилна инфилтрация, както и за стероидната резистентност. Без да се изключва хетерогенността на заболяването, разкриването на нови механизми би могло да подпомогне терапията именно на пациентите с най-тежки симптоми. От друга страна таргетирането на Th17 клетките и техните цитокини трябва да бъде обмисляно с голямо внимание поради есенциалните им физиологични функции, които те изпълняват в организма (28, 39, 213).

Всички механизми на участието на Th17 в патогенезата на БА не са изучени, но е установена увеличена експресия (генна и протеинова) на IL-17 в белите дробове, бронхо-алвеоларен лаваж, серум, храчка (Irvin C, 2014). Има данни и, че тежестта на хиперреактивността корелира с нивата на IL-17 (28, 140). Проучванията на Irvin et al. (2014) са в подкрепа на хипотезата, че пациентите с преобладаващо едновременно присъствие на Th2 и Th17 лимфоцити по-трудно се поддават на лечение, имат по-тежка дихателна обструкция и хиперреактивност на пътищата (39, 140). Th17/IL-23 оста още се включва и към увеличаване на Th2 медирано еозинофилно възпаление и хиперреактивност (163). Има данни, че повишеното ниво на IL-17 се асоциира с обостряне на астмата, с намален отговор към терапията, натрупването на гранулоцити, продукцията на фибротични медиатори и ремоделирането на дихателните пътища (206), изразена еозинофилия (213). Увеличеният серумен IL-17 – маркер и независим рисков фактор за тежка астма (31, 281). Броят на Th17 клетки е значително повишен при пациенти с лошо контролирана бронхиална астма (175). Тези пациенти биха били кандидати за бъдеща таргетна терапия.

6. Генетични основи на бронхиалната астма

Благодарение на редица научни открития комплексната връзка между генна предизпозиция и околната среда е все по-актуална. Развитието на астма зависи от множество различни фактори от околната среда (16), но генетичното предразположение на индивида играе **изключително важна роля, тъй като** ефектът от излагането на фактори от околната среда е **различен** при индивидите с различна генетична предизпозиция (189, 243). Ключово предизвикателство на високотехнологичните медицински изследвания в областта на генетиката е изясняване произхода на atopичните болести чрез идентифициране на гени определящи предразположение към болестта и механизмите на влияние

върху нейното развитие (28). Онагледена схема на този подход при бронхиална астма е показан на фигура 12 (238).



Фигура 12. Скала на заболяването с примери за разнородност на всички нива от гена до пациента (по Russell RJ, 2017)

Наличието на генетична предразположеност към астма е доказана от много години чрез данните за фамилни изследвания за наследственост по отношение на астма и други атопични заболявания. Проведени са редица големи геном-асоциирани изследвания, за да се идентифицират специфични набори от свързани с астмата гени и да се характеризират връзките между генетичните и клиничните характеристики на заболяването.

Броят на гените, които допринасят за риска от астма може би е над 100, но всеки един може да има индивидуален ефект с различна проява. До момента над 100 кандидат-гена са проучвани, но само 10 от тях имат позитивна асоциация при повече от 10 независими проучвания (193).

Промените в последователността на ДНК се определят като полиморфизми и тези от тях, които са резултат от промяна на 1 база се наричат единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) (28).

Идентифицирани са множество генни асоциации за астма, включително SNPs на хромозома 2 (IL18R1 и IL1RL1), хромозома 6 (HLA-DQ), хромозома 9 (IL33), хромозома 15 (SMAD3), хромозома 20 (ADAM33) и хромозома 22 (IL2RB) (202, 230, 256).

IL-33 генът кодира производството на интерлевкин 33 (IL-33), който присъства в увредените епителни клетки на дихателните пътища (Moffatt MF, 2010). IL-33 стимулира производството на Th2-свързаните възпалителни цитокини IL-4, IL-5 и IL-13, които играят многобройни важни роли в патогенезата на астмата. Локусите на IL18R1 и IL1RL1 вероятно също са функционално свързани с активността на IL-33, тъй като IL1RL1 кодира ST2 рецептора, към който се свързва IL-33 за да прояви различните си провъзпалителни ефекти (202). SMAD3 и IL2RB могат да имат регулаторни роли във възстановяването и поради това са потенциално важни за ремоделирането на дихателните пътища. Няколко SNPs на хромозома 17q21 показват различни асоциации между астмата в ранна детска възраст (14, 202). Ген, показващ силни корелации с развитието на детска астма е и ORMDL3 (14, 203). ORM гените могат да имат роля във възпалението на дихателните пътища, въпреки че това все още не е показано при хората. Генът CDHR3 се свързва с наличието на астма при деца на възраст между 2 и 6-годишна възраст (52). Участва в ремоделирането на дихателните пътища и по-специално при регулирането на целостта на епитела и следователно, може да е един от основните във взаимодействието на дихателните пътища с факторите от околната среда. Променливата експресия на CDHR3 гена в тази група от малки деца подчертава ранната възраст на която може да възникне ремоделирането на дихателните пътища (52). Доказано е, че ADAM33 полиморфизмите са свързани с намалена белодробна функция на 3-5 годишна възраст и

намалено FEV1, подкрепяйки теорията, че намалената функция на белия дроб в ранна детска възраст е частично генетично детерминирана (227).

ORMDL3 и IL1RL1/IL18R1 са валидирани като значими генни асоциации в кохортата от тежки астматици, въпреки че досега не са идентифицирани гени, специфични за тежка астма (127, 279). Въпреки това, някои от генните SNPs описани тук, корелират с риска от хоспитализация поради тежка екзацербация на астмата (227), поради което потенциално включване на генетичните фактори при преценката за терапия би довело до по-точно прогнозиране на клиничното протичане и отговора на лечението. Констататирано е, че комбинации от рискови SNPs (срещу само 1 рисков SNPs) идентифицират по-обективно астматици с по-голям спад на белодробната функция и това аргументира допълнителни генетични подходи при определяне тежестта на астмата (128, 218).

Възможността за персонализирани терапии при астма в бъдеще е изключително привлекателна с теоретичният потенциал за лечение или дори предотвратяване на астма при генетично податливи индивиди. Но генетичната predisпозиция не трябва да се разглежда изолирано. Естественият ход на астмата може да се повлияе от ранното излагане на определени вируси (риновирус, респираторно-синцитален вирус), на домашни алергени и съответно ранна сензибилизация, което може да доведе до нарушена белодробна функция в детска възраст. Атопичната сензибилизация към домашни алергени в предучилищна възраст е рисков фактор за персистиране на астмата. Бъдещите инициативи за астма-превенция трябва да се фокусират на вирусните-тригери и въвеждане на толеранс към домашните алергени (61).

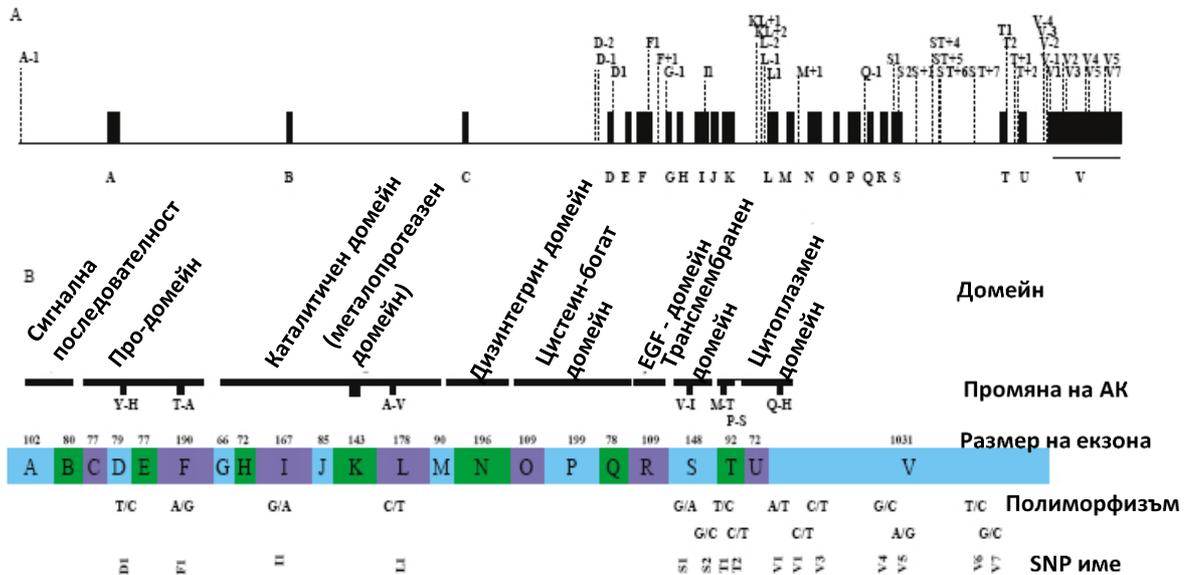
7. ADAM 33

ADAM е абревиатура за трансмембранен протеин (цинк-зависима металопротеиназа - **A** **D**isintegrin **A**nd **M**etalloprotease) с потенциално протеазни и адхезионни свойства. Семейството на ADAM-протеините се

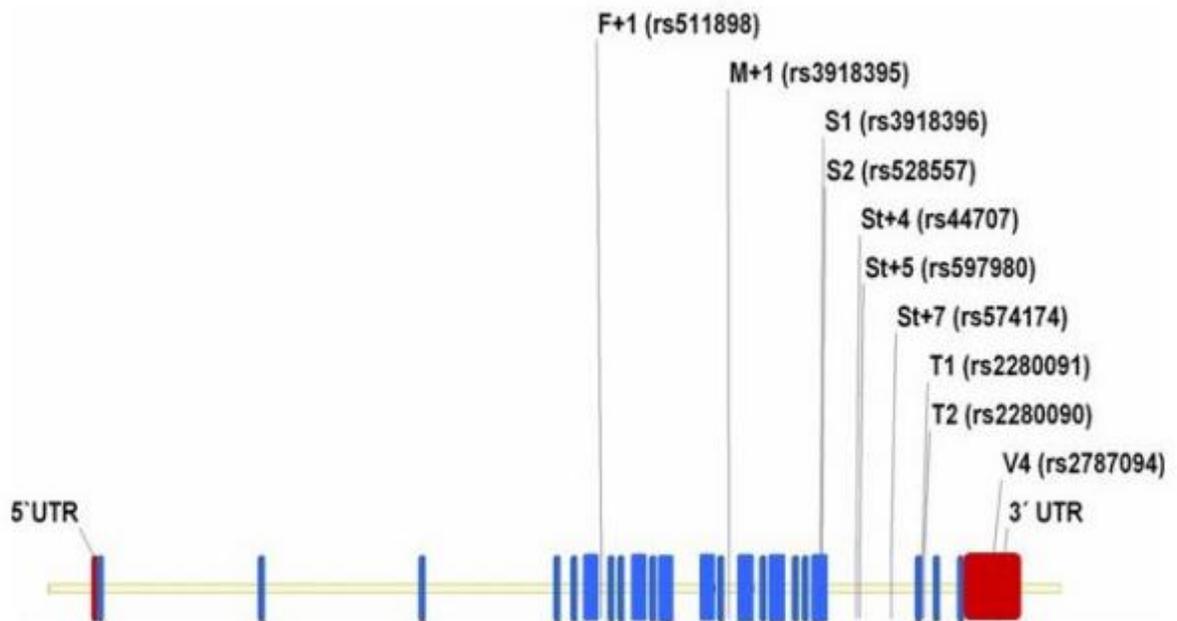
състои от 35 белтъка, от които подсемействата ADAM12, 15 и 19 проявяват протеолитична активност. ADAM-протеините са структурно свързани с дезинтегрините в змийската отрова и участват в редица биологични процеси включващи междуклетъчни и клетъчно-екстрацелуларни взаимодействия като оплождане, мускулно развитие и неврогенеза. Белтъкът ADAM33 се експресира във всички тъкани с изключение на черния дроб, предимно в гладко-мускулни клетки, миофибробласти, фибробласти (112). Генът кодиращ ADAM33 е първият ген за предразположеност към развитие на БА и бронхиална хиперреактивност (БХР), който е открит чрез позиционално клониране през 2002 г. и е определен за ген на ремодулирането на дихателните пътища (100, 221, 255, 291). Потвърден е в над 20 независими изследвания за връзка между генотип и фенотип. Генният локус на ADAM33 се намира в късото рамо на 20 хромозома – 20p13. С наличните данни до момента може да се предположи, че ADAM33 е много важен за специфични форми на астма; може би е по-важен при неатопичната в сравнение с атопичната астма; може би засяга белодробните функции повече от атопичния статус; някои фактори от околната среда като пасивно тютюнопушене може потенциално да взаимодействат с ADAM33 при ремодуляцията в белите дробове (154, 179, 265, 286).

Идентифицирани са 37 SNPs на ADAM33, някои от които са с разнопосочни асоциации между фенотиповете на астмата и БХР, което се дължи вероятно на хетерогенността на изследваните групи или различни дефиниции за астма използвани при изследванията (60, 125) (фиг.13).

Най-често изследваните и с най-голямо отражение върху развитието и прогреса на бронхиалната астма полиморфизми на ADAM33 са дадени на фигура 14 (242).



Фигура 13. Структура на ADAM33, с дадени характеристики на по-значими SNPs (по Holgate ST, 2006)



Фигура 14. Позиция на най-често изследваните SNPs на ADAM33 - 22 ексона (сини) и нетранслируеми региони (червено) (по Schedel M, 2006)

SNPs на ADAM33 (Q-1, S2) са асоциирани с ускорен спад в белодробната функция на пациенти с бронхиална астма проследявани за повече от 20 години (180, 268). Освен това са свързани с понижени белодробни функции в проспективно кохортно проучване при новородени (242), както и с еволюцията на бронхиалната ремодуляция в ранното

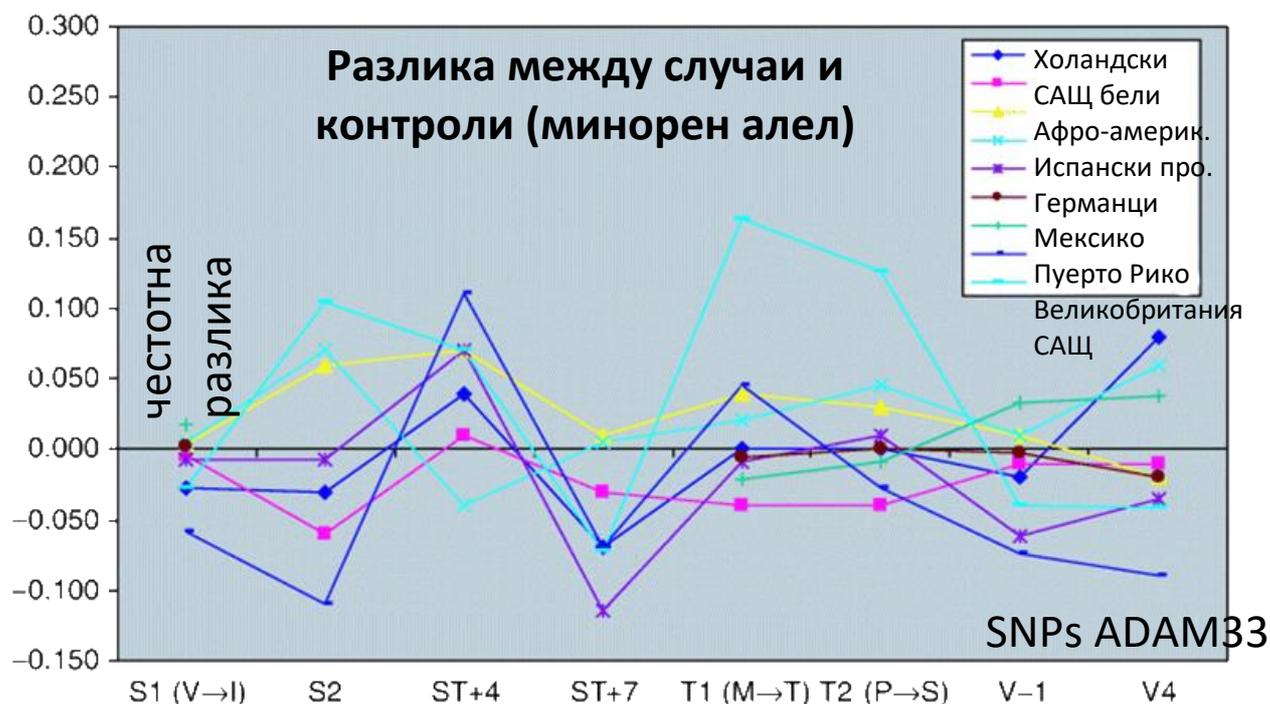
детство (83). Алелите на S+1, ST+4, и T2 с по-ниска честота т.н. минорни алели, се предават на засегнатото от астма поколение ($p < 0.05$), подкрепяйки унаследяването на астмата и отчитането на наследствената обремененост за заболяването (60, 255, 268).

Доказано е, че ADAM33 полиморфизмите са свързани с намалена белодробна функция на 3-5 годишна възраст (F+1) и намален FEV1 (F+1, M+1, T1 и T2), подкрепяйки теорията, че намалената функция на белия дроб в ранна детска възраст е частично генетично детерминирана (180, 227). Полиморфизмите Q-1, S1, ST+4, ST+7, V-1, V4 и хаплотиповете им са асоциирани с астма в Кавказките семейства, докато например в популациите на Турция и на Пуерто Рико – нямат връзка между развитие на астма и ADAM33 (53, 126, 182, 242, 268). В обширен метаанализ на 11 проучвания е доказано, че за азиатците T1 е свързан тясно с предразположение за астма, докато такава асоциация не може да се потвърди с T2 и ST+7 (177). В различните популации са доказани различни генетични комбинации (89, 179, 225) (фиг.15).

На базата на публикуваната информация (табл.2), може да се приеме, че четири са най-често изследваните полиморфизми на ADAM33 при деца с БА в света – а именно T1 (rs2280091, A/G), T2 (2280090, G/A), V4 (rs2787094, C/G) и S2 (rs528557, G/C).

S2 при деца с астма заедно с ранното излагане на тютюнев дим са свързани с броя на хоспитализациите като носителите на G алела са хоспитализират 2 или повече пъти по-често ($p = 0.002$) (60, 255).

За V4 полиморфизма има доказателства за корелация с еозинофилното възпаление, спада във функционалното изследване на дишането, както и отговор към бронходилататори (221, 256, 296). Този полиморфизъм е свързан с повишен риск за бронхиална астма при кавказката раса (G vs. C: OR = 1.12, 95% CI = 1.00–1.26, $P = 0.04$; GG + CG vs. CC: OR = 1.17, 95% CI = 1.01–1.36, $P = 0.04$) (Li, HF, 2019).



Фигура 15. Различна генетична характеристика при случаи с астма и контролна популация при различни етнически групи (по Postma DS, 2004)

T1 се свързва с по-бързото намаляване на FEV1 при децата с астма (224). За T1 е доказано, че G алелът се среща по-рядко при пациентите с лека астма (G vs. A: OR = 1.52, 95% CI = 1.02–2.25, P = 0.04) и по-често при тези с тежка (G vs. A: OR = 1.70, 95% CI = 1.05–2.77, P = 0.03) (179).

T2 полиморфизмите във вариант AA и AG са асоциирани с повишен риск за БА в азиатската популация (A vs. G: OR = 1.44, 95% CI = 1.13–1.85, P = 0.004; AA+AG vs. GG: OR = 1.45, 95% CI = 1.11–1.88, P = 0.006), а същевременно и за децата (A vs. G: OR = 1.45, 95% CI = 1.11–1.89, P = 0.006; AA+AG vs. GG: OR = 1.43, 95% CI = 1.07–1.92, P = 0.02), но не и за възрастните (A vs. G: OR = 1.04, 95% CI = 0.83–1.29, P = 0.75; AA+AG vs. GG: OR = 1.03, 95% CI = 0.81–1.32, P = 0.79) (179).

Подробният метаанализ на Li et al. показва, че и при четирите генетични модела на ADAM33 полиморфизмът T1 е свързан с повишен риск от детска астма (179).

Таблица 2. Полиморфизми асоциирани с астма публикувани за различни популации и разнородни групи пациенти (с акцент върху педиатрични популации).

| Публикация | Изследвана популация/място | SNPs – асоциирани с астма |
|-----------------------|--|--|
| Howard TD, 2006 | Американци (черни) Американци (бели) Американци (испански произход) Американци (нидерландско потекло) | S2, STC4, V4 S2, T1, T2 S2, STC4, T1, T2, VK1 S1, S2, STC7, V4 |
| Van Eerdewege P, 2002 | Великобритания САЩ Великобритания/САЩ | FC1, QK1, S1, S2, STC4, VK1, V4 I1, LK1, MC1, T1, T2, TC1 QK1, S1, STC4, STC7, VK1, V4 |
| Werner M, 2004 | Германия | FC1, STC4, STC5, STC7 |
| Simpson A, 2005 | деца (нидерландски произход) | FC1, QK1, MC1, T1, T2, STC5, STC5, VK1 |
| Jongepier H, 2004 | Нидерландия | QK1, S2 |
| Hirota T, 2006 | Япония | V4, S2, T1, T2 |
| Lee YH, 2012 | Корея | T1 |
| Ghani MU, 2019 | Пакистан | S2, T1, T2 |
| Zeinaly I, 2017 | Иран | V4, T1 |
| Zihlif M, 2014 | Йордания (само деца) | T1, T2, T + 1, V4, S1, S2, F + 1, Q1 |

| | | |
|---------------------|------------------------------|---------------------------|
| Lv J, 2017 | Китай (само деца) | V4 |
| Yu S, 2017 | Китай (само деца) | T2 |
| Zhang L, 2016 | Китай (само деца) | T2, V4, F + 1, S2, ST + 4 |
| Wang JR, 2016 | Китай (само деца) | V4, T2 |
| Zhao B, 2012 | Китай (само деца) | V4, T2 |
| El-Falaki MM, 2013 | Египет (само деца) | T1, T2, V4 |
| Godava M, 2012 | Чехия (само деца) | F + 1, S1, S2 |
| Bora E, 2012 | Турция | T1, T2, T + 1 |
| Al-Khayyat AI, 2012 | Суадитска Арабия (само деца) | T1, T2, ST + 4, S1 |
| Awasthi S, 2011 | Индия (само деца) | F + 1, S2, V4, ST + 4 |
| de Faria ICJ, 2008 | Бразилия (само деца) | S2 |

(Таблица 2 продължение)

До момента за българската популация деца с БА няма публикувани резултати от изследвания на ADAM33, с изключение на няколко съобщения, направени по повод настоящата дисертация. Има няколко публикувани генетични изследвания на деца с рецидивираща бронхиална обструкция и полиморфизъм на 17q21 (14) и полиморфизми на $\beta 2$ адренергичен рецептор при възрастни атопици с алергичен ринит и рецидивиращи обструкции (28).

Детската астма все още представлява значимо бреме за пациента, неговото семейство и обществото. Тя е най-честото хронично заболяване

сред децата в развитите страни, засягайки 5 до 20% от децата в училищна възраст в Европа. Независимо от голямата си честота все още поставянето на диагнозата и класифицирането на тежестта и контрола в детска възраст са изключително трудни. Въпреки, че познанието за астмата и свързаните с нея механизми значително се е разширило през последните десетилетия, остават все още неяснени показатели по отношение на детерминантите на тежката астма при децата. Не е ясно как различните фенотипове на тежка астма се променят с течение на времето, както и дали тези промени могат да се променят с подходяща терапия. Важно е да се идентифицират генетичните фактори, които се асоциират с развите на тежката астма, или други причини, които затрудняват контрола на астмата, включително преоценка на диагнозата и отстраняване на пускови или утежняващи фактори. Необходимо е по-нататъшно проучване на сложните механизми, обуславящи взаимовръзката между околната среда и генетичните фактори, за да се идентифицират групите с висок генетичен риск. Като се има предвид дългосрочното въздействие на детската астма върху белодробните показатели, насочеността към намаляване на здравната тежест на астмата трябва да бъде не само върху подобряването на краткосрочните симптоми, но и на дългосрочните здравни резултати при пациентите. По-доброто дефиниране на фенотипите и по-доброто насочване на терапията въз основа на отделните фенотипове на пациента вероятно ще улесни подобреното индивидуализирано и прецизно лечение на астмата в бъдеще (257).

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

1. 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)
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)
3. 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
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 за проспективно проучване
5. Да се анализира как тежестта на астмата при пациентите от проспективната кохорта се отразява и на резултатите от функционално изследване на дишането и лабораторните показатели (диференциална кръвна картина, назална еозинофилия, общи и специфични IgE и Th17)
6. Да се определи разпределението на посочените полиморфизми в българските пациенти
7. Да се установи влиянието на откритите полиморфизми за клиничния ход и контрола на бронхиалната астма при изследваните деца
8. 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 набиране 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

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 (братя 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/инсекталергия 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 гастрезофагеален рефлукс; антропометрични данни (като абсолютни стойности и преизчислени като СДС по таблиците за българската популация публикувани през 2007 година (25);

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 3).

Таблица 3. 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. 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

След подписване на информирано съгласие се взема венозната кръв в епруветка с обем 5 ml, съдържаща K3EDTA (етилен диамин тетраацетат) на BD. В рамките на 24 часа цялото количество кръв се прехвърля в пластмасова епруветка от 50 ml и се прибавя 40 ml лизис буфер, за лизиране на еритроцитите. Готовата смес се разбърква и поставя за 30 до 60 минути на лед, след което се центрифугира за 10 мин на ≥ 3000 rpm при

4°C (за утаяване на ядрата на левкоцитите). Получената супернатанта се отстранява и се прибавя 20 ml студен лизис буфер, разбърква се и по този начин утайката се разтваря. Повторно се центрифугира за 10 мин на ≥ 3000 rpm при 4°C, като отново се отстранява супернатантата. Към получената утайка се добавя 5 ml SE-буфер и отново се разбърква до разтваряне на утайката. Прибавя се 30 μ l протеиназа K (10 mg/ml) и 400 μ l 10% SDS (подпомагащ дисоциирането на протеините от ДНК) за лизиране на клетъчните ядра. Получената смес се разбърква внимателно и инкубира за 12 часа на 37°C във водна баня (възможно е при липса на време да се инкубира на 55°C за 5 часа), след което ако разтворът не се е избистрил достатъчно се добавя допълнително 30 μ l протеиназа K.

След инкубацията към бистрия разтвор се прибавя 2,0 ml 6M NaCl (или 3M CH₃COONa, pH 5.2), вортексира се за 15 сек за премахване на протеините и протеиназата, след което се центрифугира за 15 мин на ≥ 3000 rpm при стайна температура, за да не преципитира SDS. Супернатантата се прехвърля в нова епруветка и към нея се прибавят 2 обема студен абсолютен етанол. Разбърква се внимателно докато ДНК не преципитира. С чиста запоена пастъорова пипета се изважда ДНК и се прехвърля в нова епруветка съдържаща 1 ml етанол с чистота 80%. Отново със същата пипета се изважда ДНК и се оставя да изсъхне на въздух. Получената ДНК се разтваря с ротиращ шейкър за 12 часа (до пълно разтваряне) в 300 μ l до 1,5ml TE Буфер. Чрез NanoDrop 1000D се измерва концентрацията и абсорбцията на ДНК срещу Елуиращ Буфер. Получената ДНК се съхранява в микроцентрофужни епруветки – 20°C в ДНК банка към Молекулярен медицински център (НГЛ) МУ - София.

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. Реакцията е изобретена през 1983 г. от Kary Mullis (за което

получава Нобелова награда през 1993 г.) (209). Благодарение на въвеждането на Taq-полимеразата на пазара (полимераза устойчива на високи температури) реакцията набира популярност, като през 1991 г. се въвеждат първите хидролизни сонди в комбинация с PCR. Година по-късно методиката се подобрява с използването на етидиевият бромид (EtBr), интеркалиращо съединение, реагиращо с нуклеиновите киселини, спомагащо за визуализиране на ДНК/РНК посредством агарозна електрофореза. При облъчване с ултравиолетова светлина EtBr има оранжева флуоресценция. Кинетиката на флуоресцентно натрупване по време на термоциклите е правопрпорционално свързано с първоначалния брой на ДНК копия. Днес повече от 30 години след откритието на Mullis, PCR е най-широко използваната молекулярна технология. Принципа на реакцията се състои в *in vitro* ензимна амплификация на избрани нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции. Целта е да се увеличи значително количеството на специален прицелен участък, който в началото е изключително малък и труден за анализ. След първоначална продължителна денатурация, която цели разделяне на двойно-спиралната верига на геномната ДНК, амплифицирането на желания участък се осъществява при многократно повтаряне на серия от цикли с определена температура, всеки от които включва следните три стъпки: термична денатурация, хибридизация и нарастване.

При изработването на сондите за настоящия проект е използван гасител ВНQ1 и флорофори FAM и HEX и използвахме PCR-апарат за извършване на амплификационната реакция. Rotor-Gene 3000 (Corbett Research).

Важно е да се отбележи, че ензима Taq полимераза не е активен докато цялата ДНК не се денатурира. Активността на ензима се блокира химично напълно и при 60°C с цел да се избягне формирането на неспецифична амплификация. Готовите китове със стандартни праймери

за Taqman RT-PCR са с доста висока цена, поради което за настоящия проект се изработиха собствени праймери и сонди.

За направата на праймерите по проекта бе използвана наличната световна база данни и специфичен софтуер - PrimerDesign, Primer3 (304), база данни за човешки праймери и сонди (308), специализирани сайтове за тест на вторични структури (309, 310). Праймерни и SNP база данни OMIM (from the NCBI), SNPedia, Huge Navigator и RT Primer DB. Проверка на получените праймери и сонди бе извършена, чрез <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (303).

При дизайна на праймерите и сондите се спазваха следните принципи:

- 1) Ампликоните бяха максимално къси, с 5'-край на сондата максимално близо до 3'-край на предния праймер (forward) (в случай, че сондата е на същата верига) или до 3'-края на обратния праймер в случай, че сондата е на обратната верига.
- 2) Първо се изработиха сондите, след което праймерите.
- 3) За сондите: Дължина 18-30 бази, оптимално 20. При случаите когато се налага използването на по-дълги сонди – тогава позицията на гасителя трябва да е не на 3'-края, а по протежението на 18-25 бази от 5'-края (най-често свързан с Т-нуклеотид). Съдържание на GC-нуклеотиди: 30-80%; Температурата на топене трябва да е 8-10°C по-висока от тази на праймерите. Желателно е да има повече С отколкото G нуклеотиди; Сондата трябва да е максимално близо до праймера без да го застъпва. Избягва се несъответствие между сондата и таргетната зона. Избягва се натрупване на идентични нуклеотиди, особено на 4 или повече G. Избягва се на 5'-края да е G (тъй като това може да угаси няколко флуорофори, включително FAM). И двете сонди (при мултиплексно изследване) трябва да са с еднаква температура на топене.
- 4) За праймерите: Дължина 18-30 бази. Съдържание на GC-нуклеотиди: 30-80% (най-добре 40-60%). Температурата на топене – 63-67°C, разликата

в температурите на топене между двата праймера да не е повече от 4°C. Избягва се несъответствие между праймера и таргетната зона особено в 3'-края. Избягва се натрупване на идентични нуклеотиди, особено на 3 или повече G или C особено на 3'-края; Избягва се на 3'-края да е T.

Изработените и използвани за настоящето изследване праймери и сонди, сравненени с подобни от други автори (71) са показани на таблица 4.

Таблица 4. Олигонуклеотидна последователност на използваните при RT-PCR анализ праймери и сонди за съответните SNPs в ADAM33.

| NCBI rs | Праймери | Сонди |
|-----------|--------------------------|-------------------------------------|
| rs 528557 | F: CTCAACCCACGAGATCTTTCG | G allele: FAM-CCTGGAAAGGAGCCT-BHQ1 |
| | R: GGTCATGCCCGCTTTGTT | C allele: HEX-CCTGGAAAGGAACC-BHQ1 |
| rs2280091 | F: CCCAAAGATGGCCCACACA | C allele: FAM-CACCCCACGGAGTT-BHQ1 |
| | R: GGCATGAGCCCTTCCCTTCT | T allele: HEX- ACCCCATGGAGTTGG-BHQ1 |
| rs2280090 | F: CCCAAAGATGGCCCACACA | C allele: FAM-TGGACAGCCCTGGC-BHQ1 |
| | R: GGCATGAGCCCTTCCCTTCT | T allele: HEX-TGGACAGTCCTGGC-BHQ1 |
| rs2787094 | F: TGGCCAGAAGCTAGTGGTCCT | C allele: FAM-CTCCCCTGCAGCCT-BHQ1 |
| | R: CAGGAAGGAAGGTCCCCAAA | G allele: HEX-CTCCCCTGGAGCCT-BHQ1 |

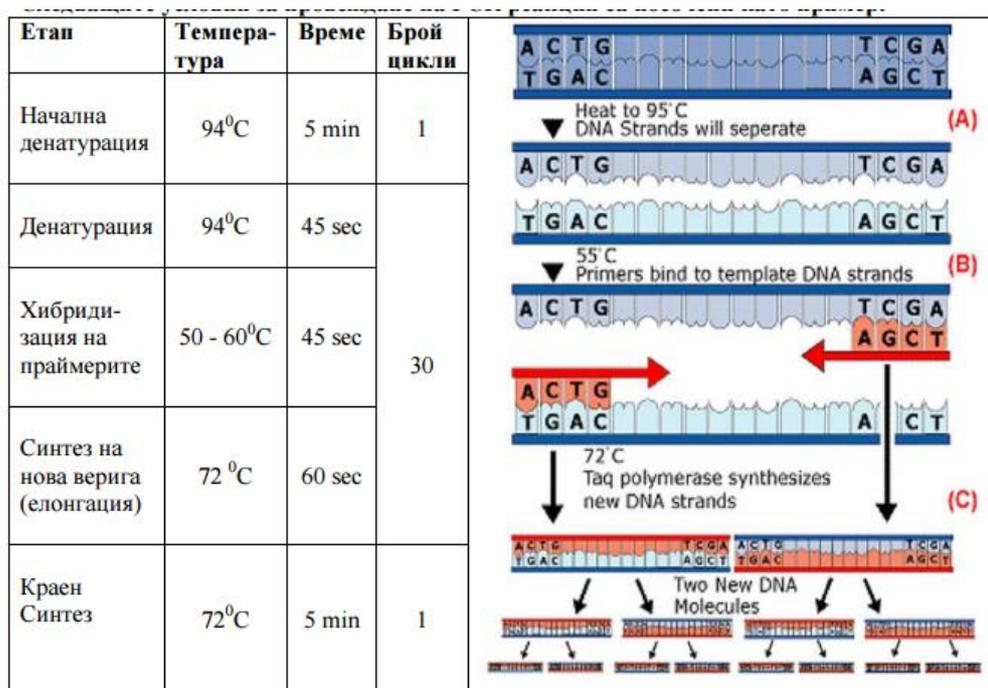
Процедура на RT-PCR:

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. Съотношението за всеки SNPs е индивидуално и е показано в раздела – резултати.

Прибавяне на ДНК пробите – по 2 µl на епруветка, като добре се пипетира след добавянето за оптимално размесване на сместа.

Пробите се покриват с 1-2 капки течен парафин за да не се изпарят, затварят се епруветките и се поставят в апарата, след което се стартира програмата за амплификация. Първоначално се темперират, след което се

провежда термична денатурация при 94-95°C за пълното разделяне на ДНК веригите и получаване на едноверижни фрагменти последвано от хибридизация (анийлинг) между праймерите и комплементарните им секвенции от матричната ДНК. Температурата на хибридизация е изчислена индивидуално за всеки един SNPs чрез предварителна оптимизация (индивидуално са отразени в раздела – резултати), съгласно формулата: $T_{annealing}^{\circ C} = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 5 (277)$ за 15 секунди последвано от елонгация – синтез в посока 5'- 3' на нова ДНК верига, комплементарна на матричната за 1 минута. След всеки цикъл количеството на матрицата ДНК нараства в геометрична прогресия. В резултат на 30 такива цикъла се получава около 106-108 копия от избрания участък. Пример на реакцията е представен на фигура 16.



Фигура 16. 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 АДАМ33 и са изследвани 108 деца (79 с астма и 29 контроли).

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

3.1 Клинични методи:

1) *Детайлна фамилна анамнеза* (бронхиална 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/инсекталергия), 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 осъществи 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 (8, 37).

Въпросникът за контрола на астмата (Asthma Control Questionnaire - ACQ) е предоставен с изричното писмено разрешение на Professor Elizabeth Juniper и QOL TECHNOLOGIES Ltd 2003, притежаващи авторските права на теста. 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) (38). Пост-бронходилататорната спирометрия се провежда съгласно утвърдения в Клиниката по педитория 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 $\Delta FEV_1 \geq 12\%$ и/или 200 ml (113).

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:

1. Включване на апарата, загряване – 20 мин.
2. Смяна на ситото на MASTERSCREEN PNEUMO.
3. Настройката на пневмотахографския преобразувател се извършва с еднолитрова помпа, след предварително вкарване в паметта на апарата данните за околната температура, относителна влажност (%), барометрично налягане (кРа). Максимално допустимите отклонения за коригиращия фактор са между 0.9-1.1, а за стандартното отклонение – до 3%. Периодично (минимум веднъж седмично) се прилага и биологичен вътрелабораторен контрол от здрав член на колектива.
4. При спиране на електрическия ток, апаратът се изключва от мрежата, за да се предпази от токов удар при неговото идване.

Спирометърът MASTERSCREEN PNEUMO е устройство, измерващо дебит въздух, посредством пневмотахограф, тип Lilly.

Изследването се извършва в следната последователност:

- а/ бавна спирометрия;
- б/ форсирана експирация;
- в/ 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.

Основни изисквания към бавната спирометрия:

- а/ осъществяване на устойчиво ниво на спокойно дишане;
 - б/ максимално разгръщане на ВК;
3. Изисквания за провеждане на форсирана експирация:

а/ издишване на ОО се извършва бавна и дълбока инспирация до нормално разгръщане на ВК;

б/ максимално рязко и енергично издишване с максимална продължителност;

Повтаряне на дихателните маневри 4-5 пъти (минимум 3, максимум 8) като за всеки се изисква максимално участие от страна на пациента.

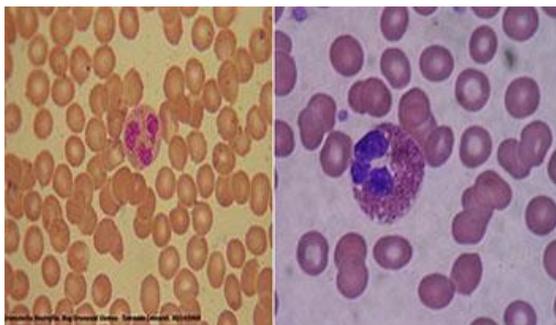
4. Бронходилататорът (Салбутамол) се прилага в доза две до четири впръсквания (от 100 mcg), приложени с обемна камера или чрез компресионен небулизатор в доза 0.02 ml/kg.

5. Форсирана експирация се извършва между 15 и 20 минута след впръскването на бронходилататора.

6. Противопоказания за провеждане на спирометрия: много тежък астматичен пристъп (животозастрашаващ), пневмоторакс, хемоптиза, скорошна гръдна/коремна оперативна интервенция, фебрилитет, скорошна очна хирургична интервенция, тежка глаукома, ИНПР, злоупотреба с алкохолни и психоактивни средства, активна туберкулоза.

3.2.2 Лабораторни методи - биомаркери на алергичното възпаление

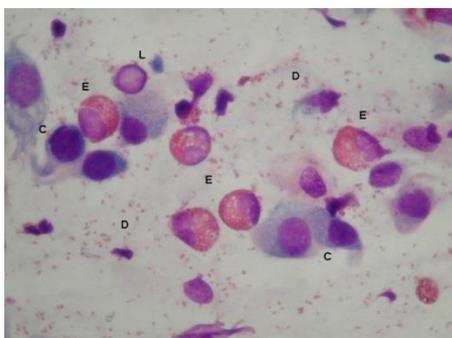
Периферна еозинофилия – автоматично (от хемоанализатор) и микроскопско броене на еозинофилен брой в натривка от кръв на предметно стъкло, оцветена по Giemsa. Определя се според броя на еозинофилите в периферна кръв. За положителни се приемат стойности от 450–500 клетки/мм³; изразена еозинофилия – над 1500 клетки/мм³. Изброявани бяха и неутрофилите, при които за норма са приети стойностите 1 500–8 000 клетки/мм³ (фиг.17).



Фигура 17. Микроскопски образ на неутрофил (в ляво) и еозинофил (в дясно) в кръвна натривка (по хистологичен атлас на Лийдс (307))

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 (24) (фиг.18).

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 (198).



Фигура 18. Микроскопски образ от назална натривка (еозинофили (e), дегранулация (D), лимфоцити (l) и епителни клетки (c); оцветяване по Giemsa (no Gelardi M, 2016)

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

реакция, 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 (116). 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 5).

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

Таблица 5. Референтни стойности за серумно ниво на специфични IgE

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.

| 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 |

Таблица 6. EAST скала за отчитане на резултата

Алергени, заложенi 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 Cladispodium 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 -Lactalbumin, 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.

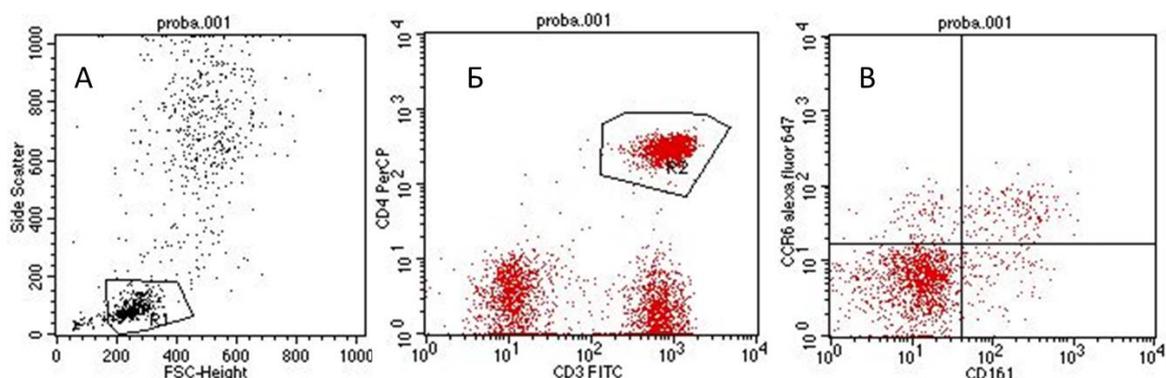
Алергени, заложен в тест-лентите EUROLINE Pediatric Inhalation (20 аероалергена и CCD маркер): g6 Timothy grass (тимотейка), g12 Cultivated rye (култивирана ръж), t2 Alder (елша), t3 Birch (бреза), t4 Hasel (лешник), w6 Mugwort (див пелин), w8 Dandelion (глухарче), w9 English plantain (английски живовляк), 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 Penicillium 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 дву-лазерен флоуцитометър FACSCalibur. Лимфоцитите бяха маркирани с моноклонални антитела, насочени срещу повърхностни маркери, характерни за Th17 лимфоцитната субпопулация. За Th17 се използва комбинацията от 4 моноклонални антитела: anti-CD3-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD161-Alexa, anti-CCR6-PE (157). Първоначално лимфоцитите

бяха гейтирани на база FSC и SSC (големина и гранулираност) в електронен облак R1 (фиг.19А). Т-хелперните лимфоцити бяха гейтирани по повърхностите маркери CD3 и CD4 в електронен облак R2 (фиг.19Б), след което Th17 лимфоцитната субпопулация беше определена на база едновременна експресия на CD3, CD4, CD161, CCR6 върху лимфоцити от двата електронни облака (R1+R2) (фиг.19В).



Фигура 19. 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.

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

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.

4.1 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 категорийни данни са използвани абсолютен брой и относителен дял, докато качествените са представени чрез показателите на централната тенденция и разсейването.

4.2 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.

4.3 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.

4.4 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.

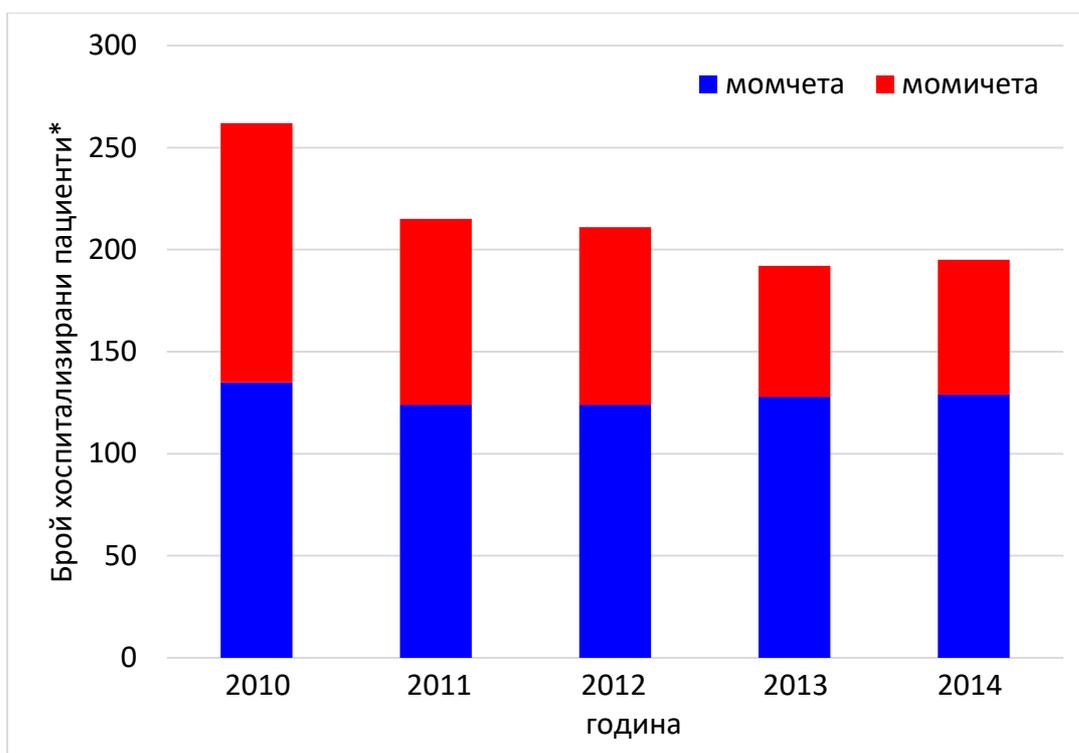
IV. РЕЗУЛТАТИ

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 година, а от друга – поради изваждането от общия брой на пациенти с повторна и следваща хоспитализация след 2010 година (таблица 7 и фиг.20).

Таблица 7. Брой и разпределение по пол на хоспитализираните деца през отделнието 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 |



Фигура 20. Брой и разпределение по пол на хоспитализираните деца през отделните години на посочения период. (* не са включени последващи хоспитализации след първата на пациентите)

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.21).



Фигура 21. Брой на рехоспитализациите през годините

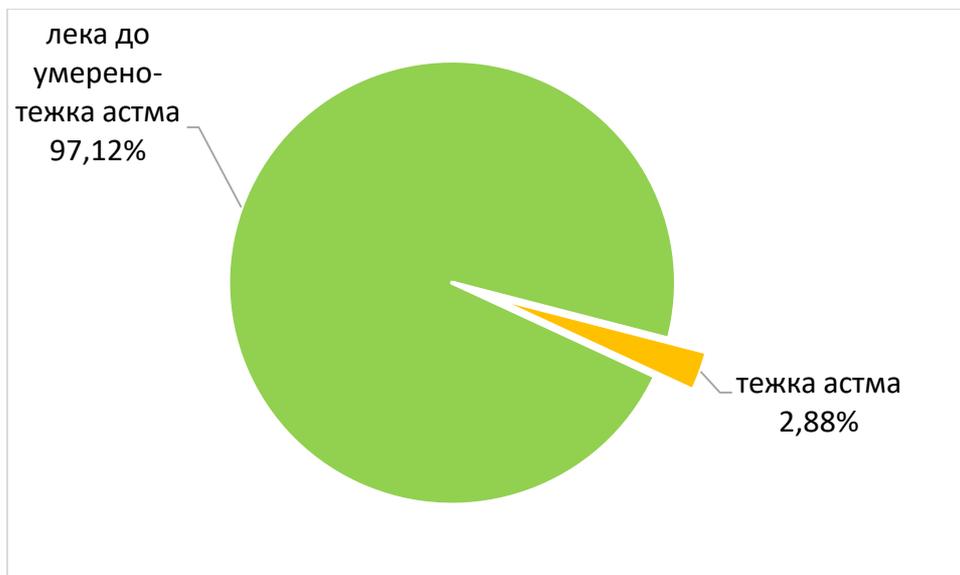
От пациентите, хоспитализирани за посочения период, 31 от децата отговаряха на критериите за тежка астма (Chung KF, 2014; GINA, 2019) (табл.8). Стойностите са приблизително еднакви - около 2,9% (фиг.22), не се установи статистически значима разлика през отделните години ($p=0,99$, Chi-Square Test).

Таблица 8. 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 22. 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

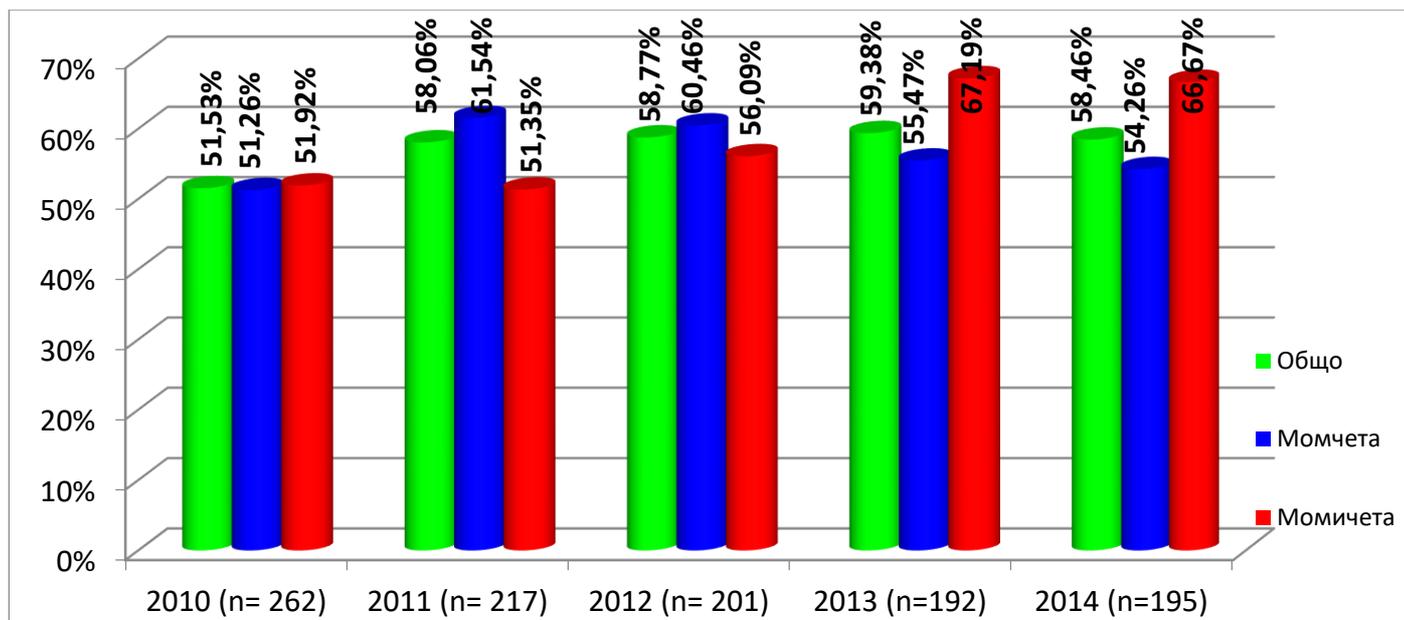
Близо 60% от децата за посочения период са имали и алергичен ринит – 658 пациента. Разпределението по пол на пациентите през годините е представено на таблица 9. Процентното разпределение на децата с АР общо и по пол по години е графично представено на фигура 23.

Таблица 9. 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 - | |
| 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 момичетата с АР спрямо тези без АР през последните години, като през 2013 и 2014 години процента при момичетата превишава този при момчетата ($p=0,04$, Chi-Square Test).



Фигура 23. Процент на децата AP и БА в изследваната популация през различните години

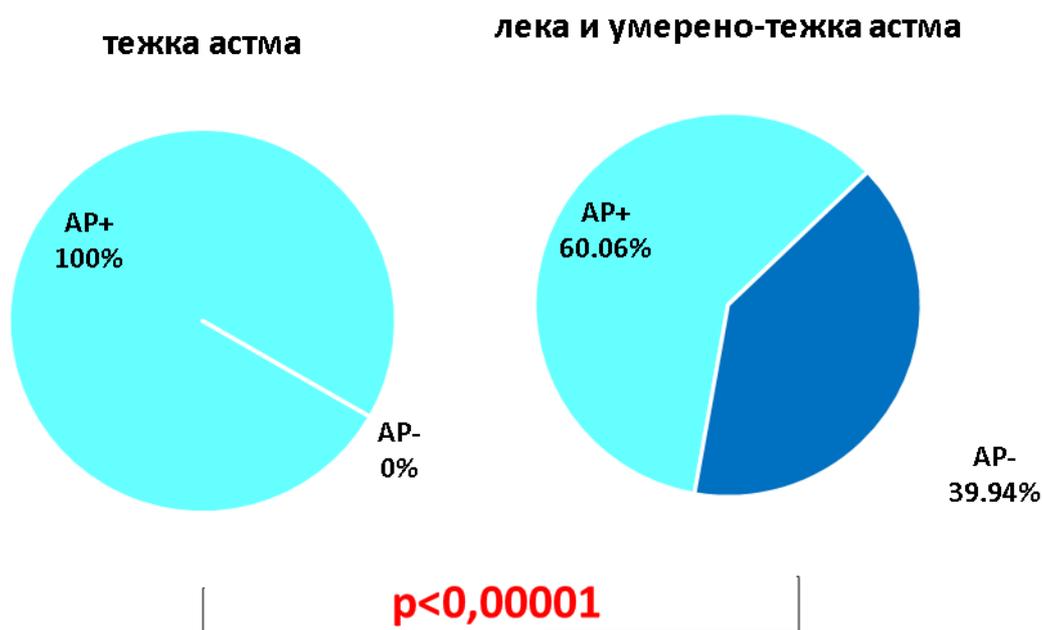
Възрастта (изчислена в месеци) на пациентите с AP е статистически по-голяма от тази на пациентите без AP, отнесено към всяка отделна година ($p < 0,05$, ANOVA) с изключение на 2011 година, когато се наблюдава същата тенденция, но статистически несигнификантна ($p = 0,07$ за момчетата, $p = 0,06$ за момичетата, ANOVA). Подробно данните са представени на таблица 10. 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 отделните години ($p = 0,259$, Kruskal-Wallis Test), както и при пациентите без AP ($p = 0,291$, Kruskal-Wallis Test).

Таблица 10. 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 | $p > 0,05$ |
| | $p = 0,0018$ | $p = 0,0009$ | $p = 0,07$ | $p = 0,06$ | $p = 0,0006$ | $p = 0,012$ | $p = 0,014$ | $p = 0,04$ | $p = 0,049$ | $p = 0,013$ | |

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

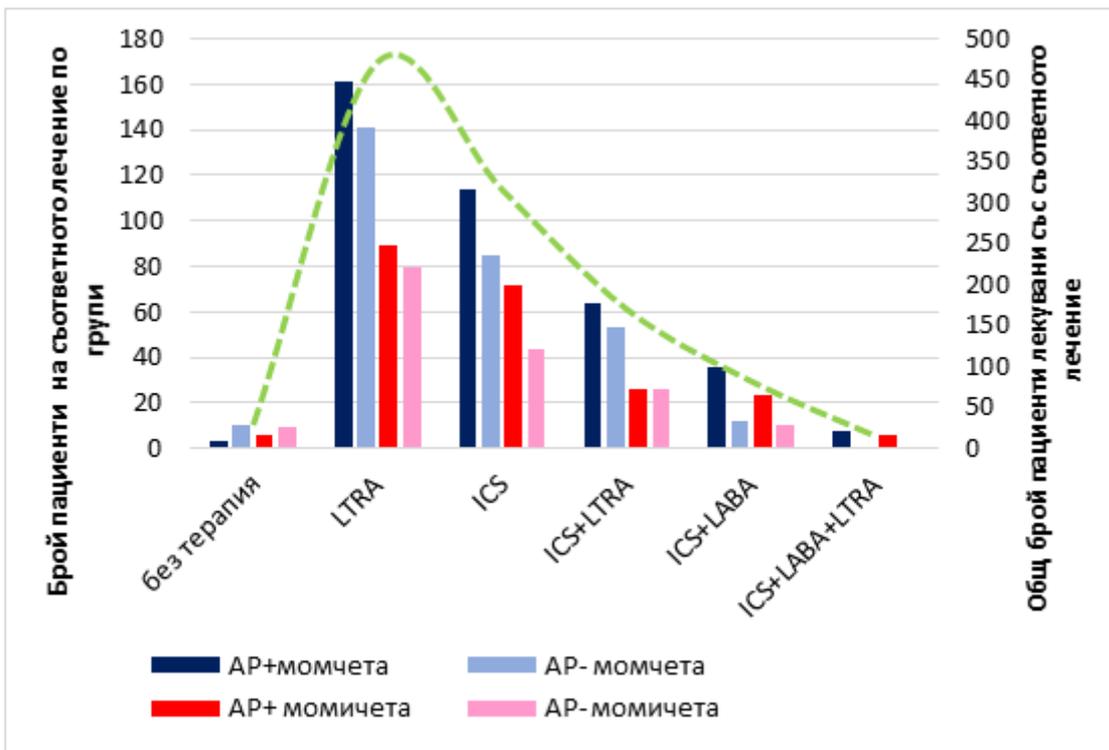
Всички деца, идентифицирани като пациенти с тежка астма (31), имат и придружаващ АР 100%. В същото време общата честота на АР при другите деца е 60,06% ($p < 0,00001$, Chi-Square Test) (фиг.24).



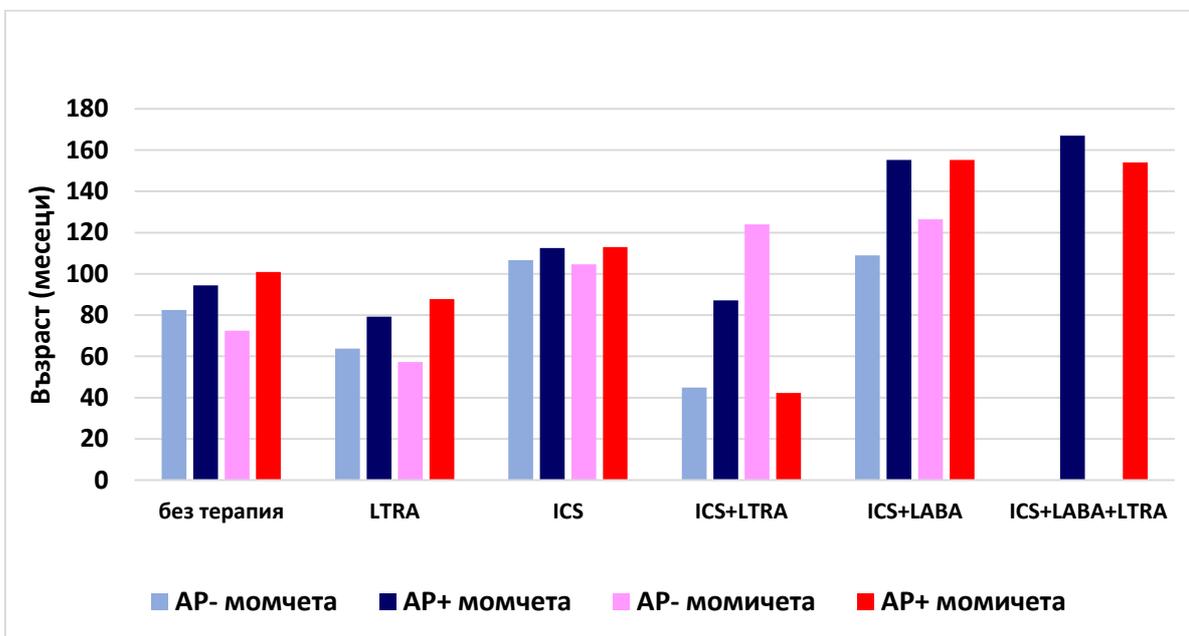
Фигура 24. Процент на децата с АР разпределени в две групи - тежка астма и лека до умерено-тежка астма

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.25). Пациентите на комбинирани медикаменти са с най-голяма възраст (в месеци) (фиг.26).

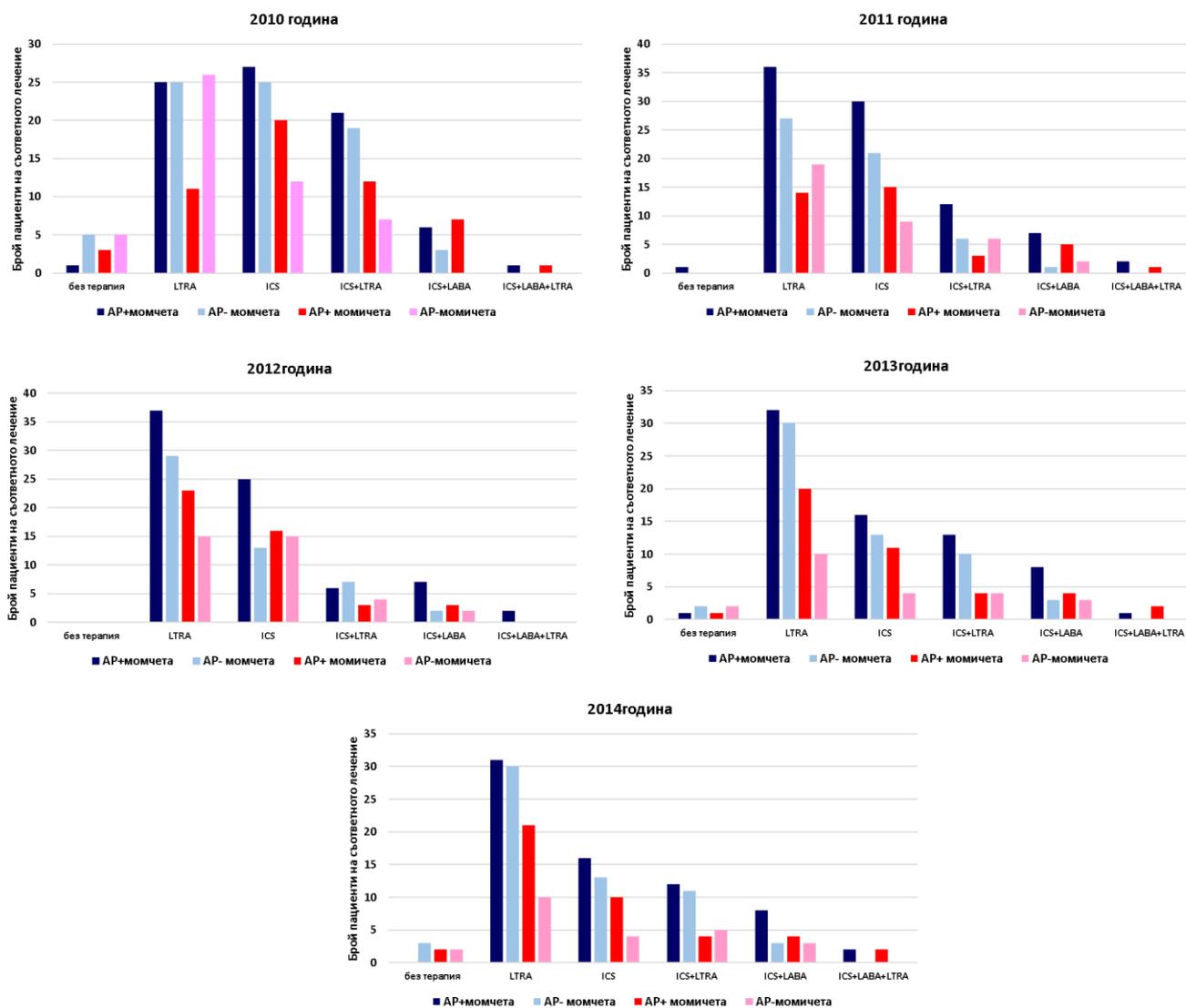


Фигура 25. Брой пациенти на съответната терапия разпределени по пол и по наличие или отсъствие на AP (LTRA - левкотриен рецепторен антагонист; ICS - инхалаторен кортикостероид; LABA - дългодействащ бета-2 агонист)



Фигура 26. Средна възраст на пациентите на съответната контролираща терапия, разпределени по пол и по наличие или отсъствие на AP

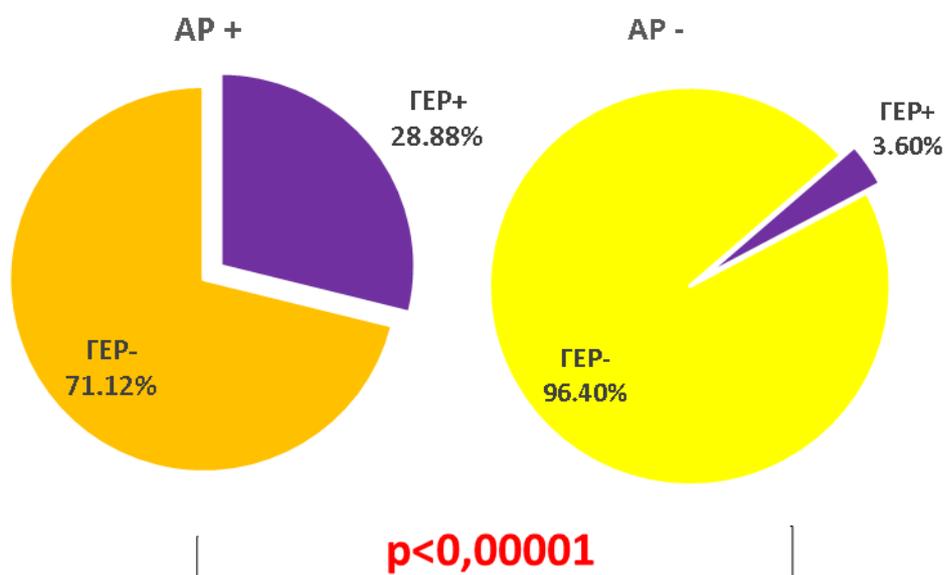
Интересен е паралелът през годините на различните терапии спрямо наличието на АР и LTRA - през 2010 година децата на които е изписван такъв медикамент повечето са без АР, но това се променя през следващите години (фиг.27 а-д).



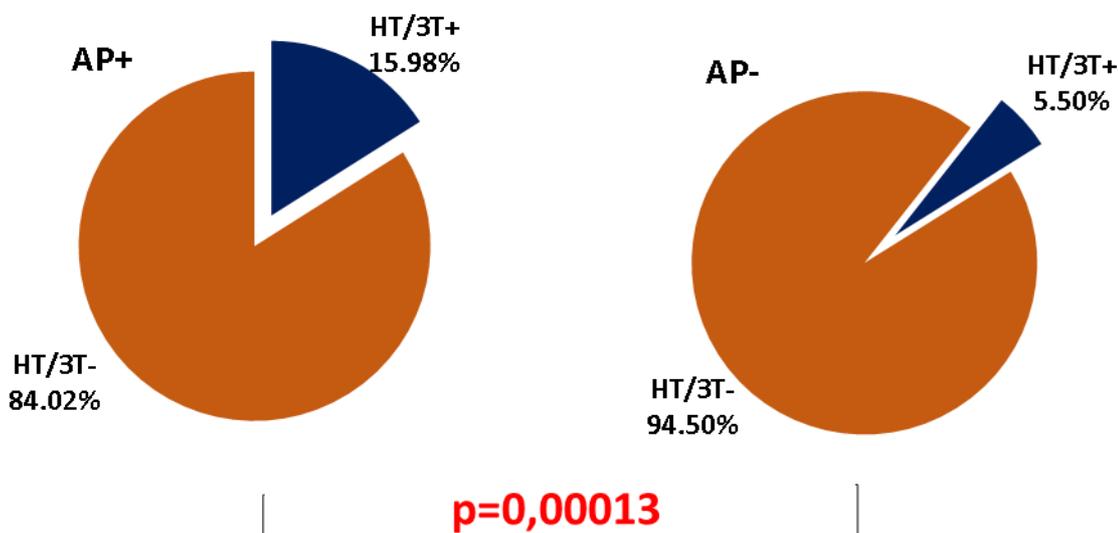
Фигура 27. Брой пациенти на съответната контролираща терапия разпределени по пол и по наличие или отсъствие на АР за всяка една година. А - 2010 година; Б - 2011 година; В - 2012 година; Г - 2013 година; Д - 2014 година

По отношение на другите придружаващи заболявания 28,8% от пациентите с АР 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). (фиг.28 и фиг.29).



Фигура 28. Процент на децата с клинични данни за GER в зависимост от наличие на AP

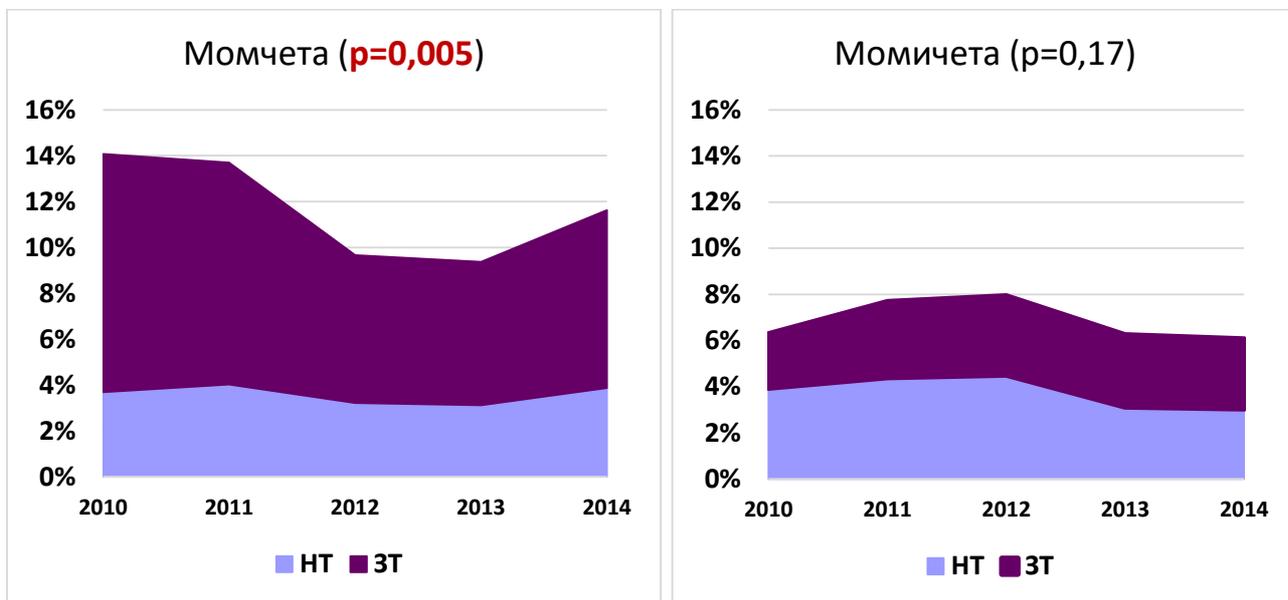


Фигура 29. Процент на децата с наднормено тегло в зависимост от наличие на AP (HT/ЗТ + наднормено тегло и затлъстяване; HT/ЗТ- оптимално или ниско тегло)

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 56 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 момчетата 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 11 и фигура 30.



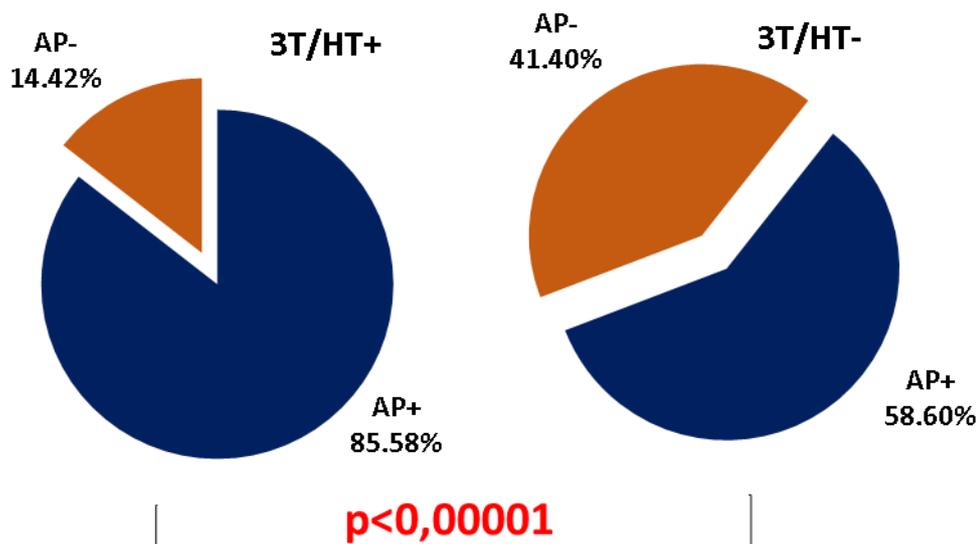
Фигура 30. Процентно разпределение на децата със ЗТ и НТ в изследваната популация през различните години за съответния пол

Таблица 11. 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 | |
| момчета | 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 |
| момичета | 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) | | | | | | | | | | |

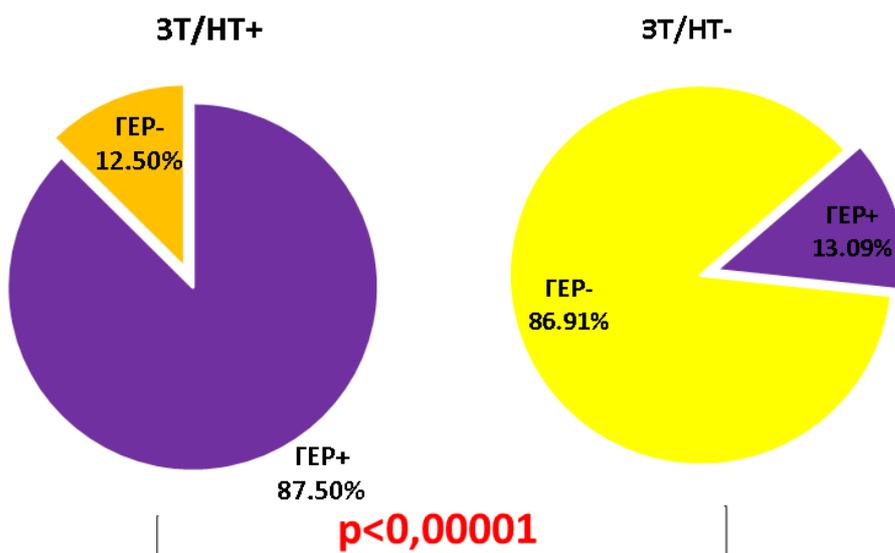
НТ - наднормено тегло, ЗТ - затлъстяване

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) (фиг.31).



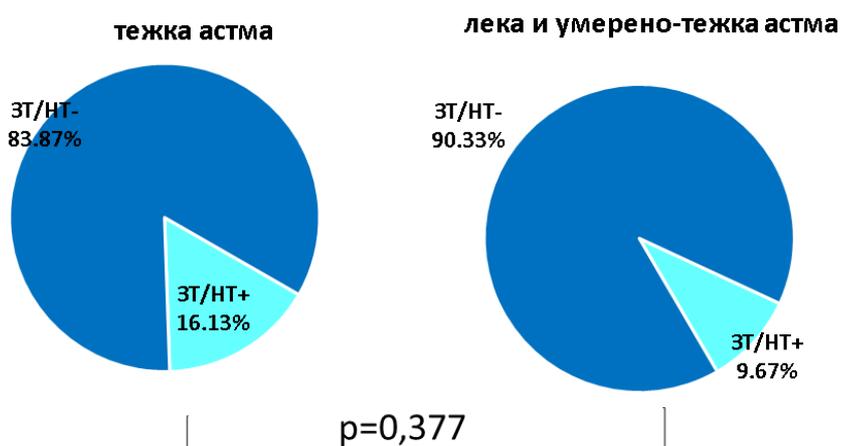
Фигура 31. Процент на децата АР в зависимост от теглото

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) (фиг.32).

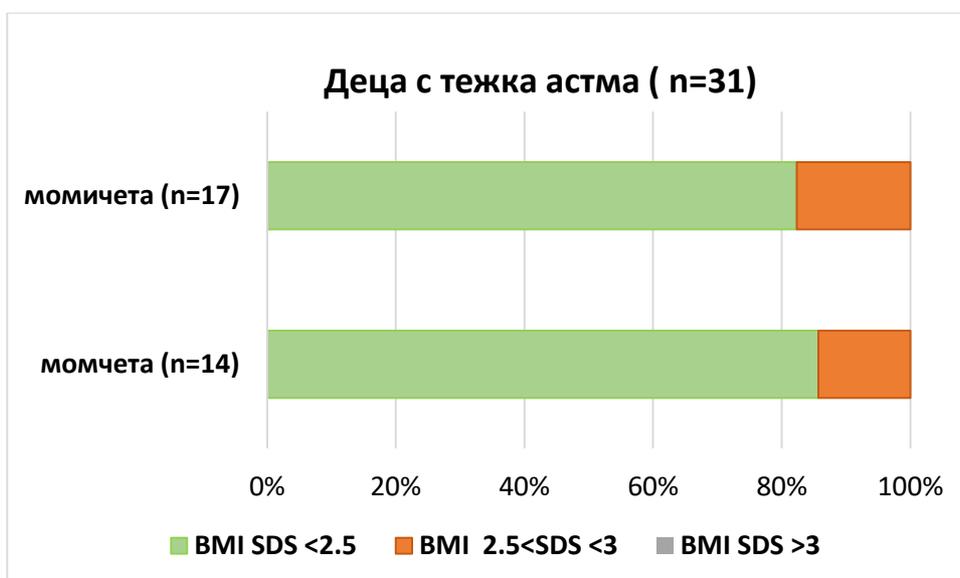


Фигура 32. Процент на децата с клинични данни за ГЕР в зависимост от теглото

От групата деца с тежка астма 3 момичета и 2 момчета са с наднормено тегло, но нито едно от децата не е със затлъстяване. Въпреки, че изглежда наднорменото тегло е по-често в групата с тежка астма, не се откри статистически значима разлика ($p=0,377$, Chi-Square Test, Yates correction) (фиг.33). Графично разпределението по BMI на децата с тежка астма е представено на фигура 34.



Фигура 33. Процент на децата с наднормено тегло (НТ+ЗТ) разпределени в две групи - тежка астма и лека до умерено-тежка астма



Фигура 34. Процентно разпределение на децата с тежка астма съобразно BMI SDS за съответния пол

2.3. Гастро-езофагеален рефлукс

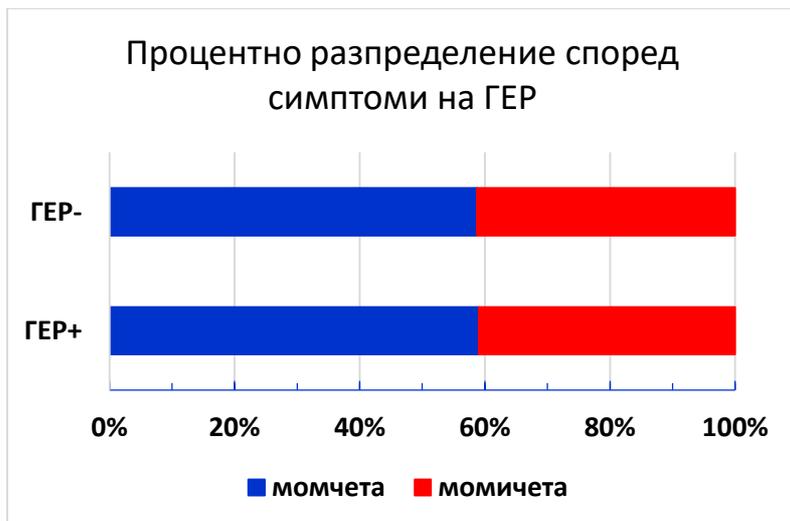
От анализираните 1075 деца с БА 19,06% (205 деца) са с клинични симптоми на ГЕР (коремна болка, „парене“ зад гръдната кост, регургитации, кашлица след хранене, кашлица засилваща се в легнало положение, рецидивираща ларингеална кашлица, афония, облекчаване на симптомите след приложение на антирефлуксна терапия). Честотата на децата със симптоми е сравнително постоянна през годините (табл.12) и няма статистически значими разлики ($p=0,83$, t-Test).

Таблица 12. Брой пациенти със симптоми на ГЕР и процентната им честота спрямо общата бройка, разпределени по пол и година

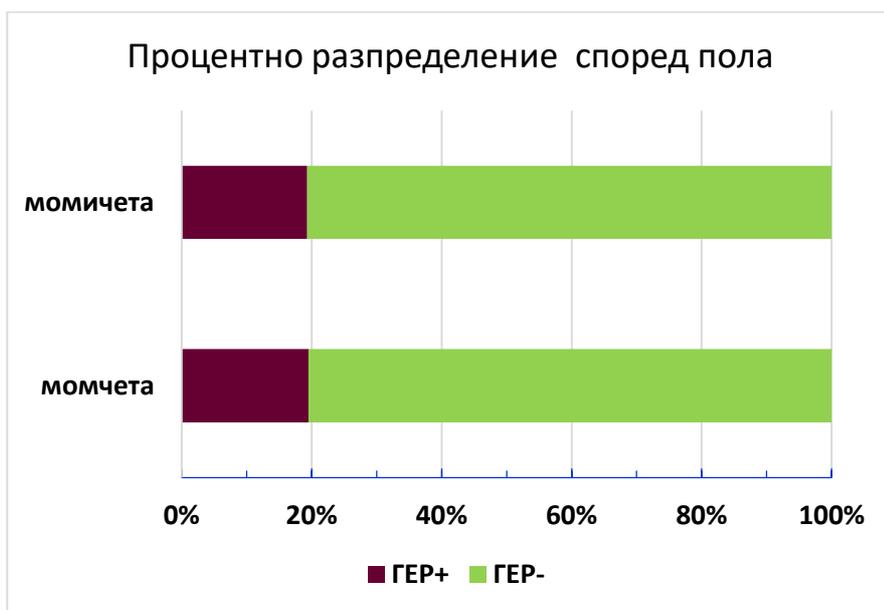
| | 2010 година | | 2011 година | | 2012 година | | 2013 година | | 2014 година | | |
|----------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|----------|
| | ГЕР + | ГЕР - | |
| момчета | 26 (19,25%) | 109 | 23 (18,54%) | 101 | 23 (18,54%) | 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.35 и фиг.36).



Фигура 35. Полово разпределение на децата със симптоми на ГЕР



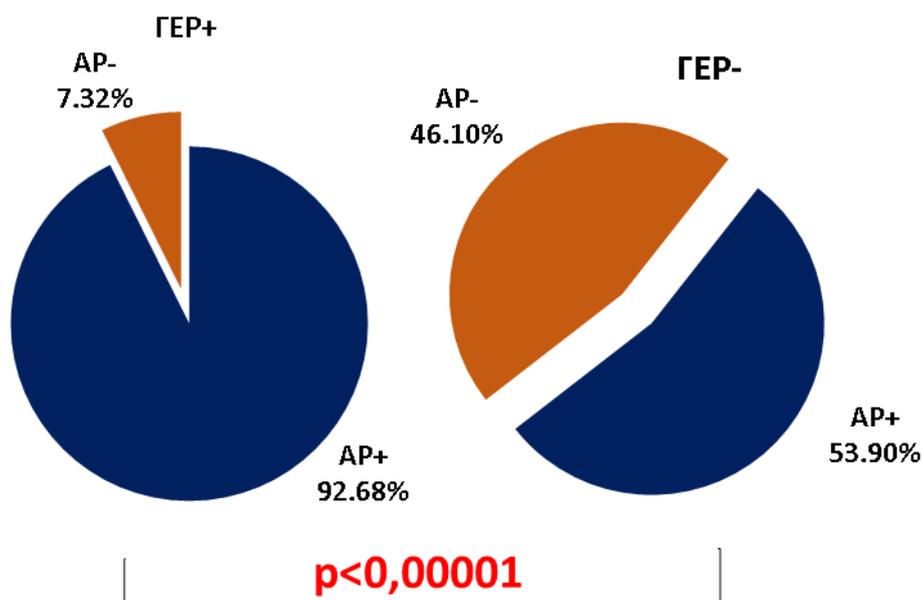
Фигура 36. Процентно разпределение на децата със симптоми на ГЕР разделени по пол

Не се откри статистически значима разлика по отношение на възрастта и наличието на ГЕР симптоми ($p>0,05$, Kruskal-WallisTest) таблица 13.

Таблица 13. Средна възраст (месеци) на пациентите с ГЕР и без симптоми на ГЕР разпределени по пол

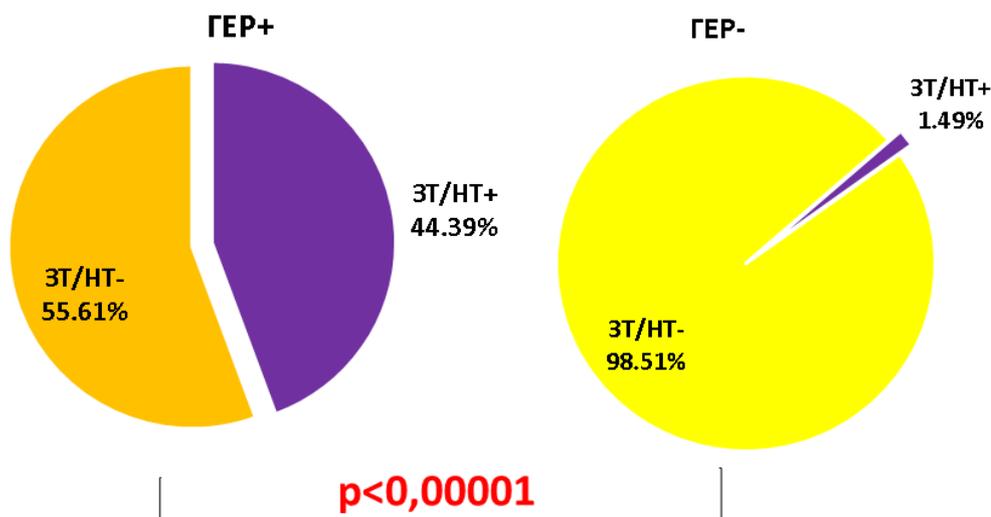
| | ГЕР+ | ГЕР- | |
|----------|-------------|-------------|--------|
| момчета | 89,62±19,51 | 91,58±25,46 | p>0,05 |
| момичета | 98,54±24,74 | 97,29±26,67 | |
| общо | 93,45±28,29 | 94,08±29,16 | |

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) (фиг.37).



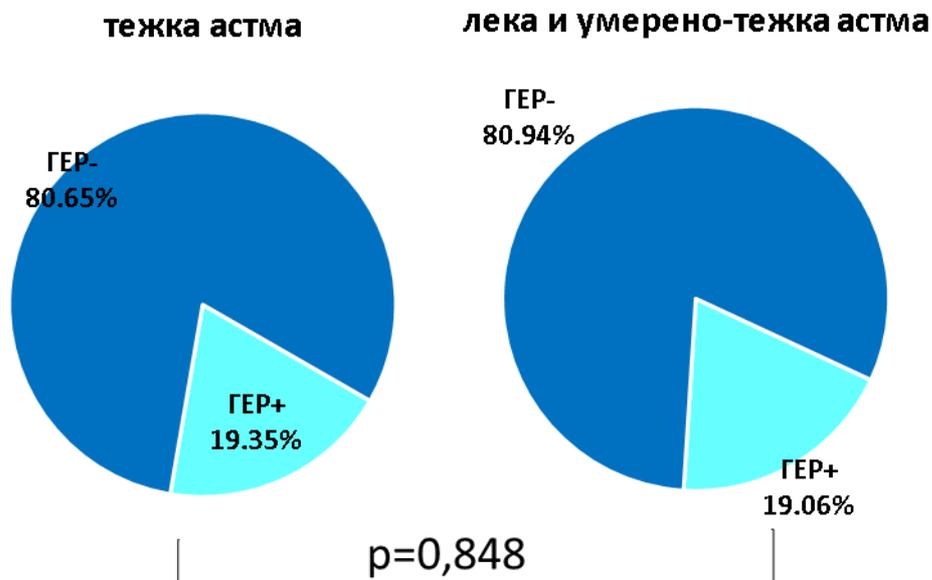
Фигура 37. Процент на децата с АР в зависимост от наличие на ГЕР

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) (фиг.38).



Фигура 38. Процент на децата с наднормено тегло в зависимост от наличие на GER

От групата деца с тежка астма 6 деца са с GER. Макар и наличието на GER по литературни данни да влошава контрола и съответно да се очаква по-висока честота на GER при тежки астматици, подобна зависимост не се откри ($p=0,848$, Chi-Square Test, Yates correction) (фиг.39).



Фигура 39. Процент на децата с GER 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. На фигура 40 е показано, че използваният регресионен анализ е правилен, а резултатите му са представени на таблица 14.

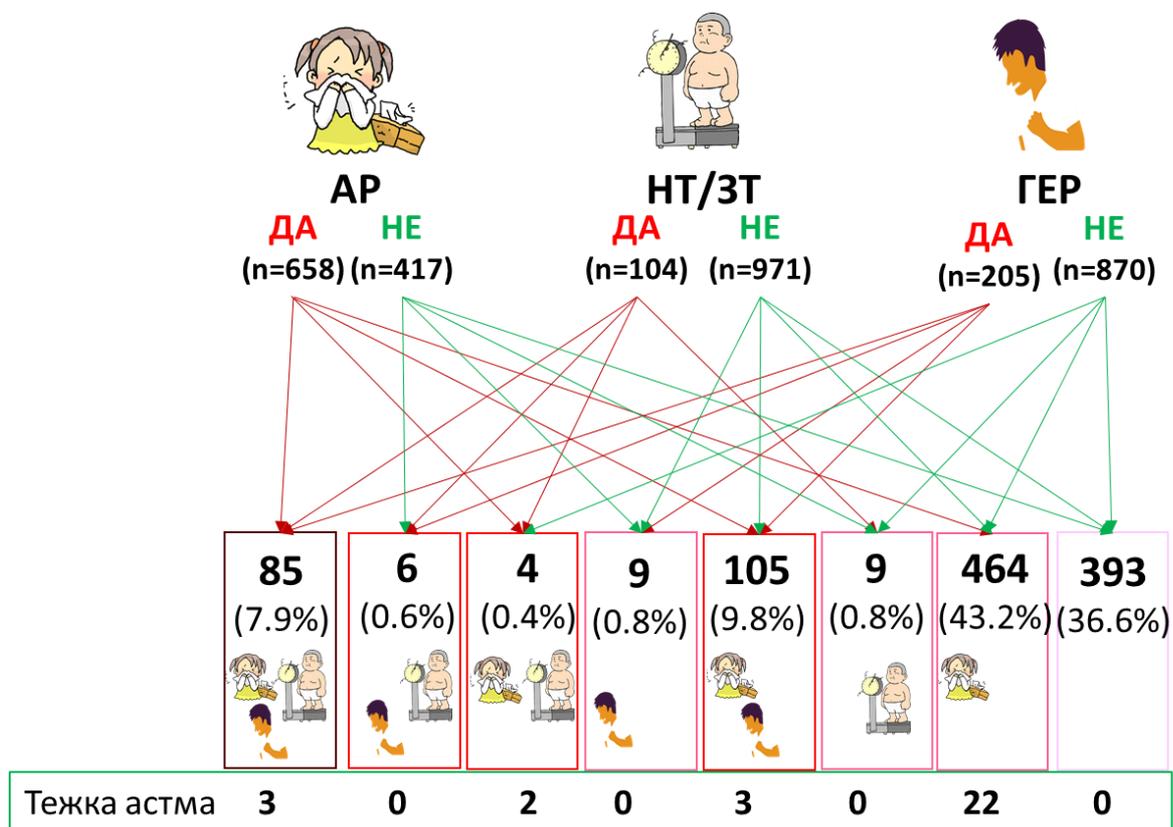
| Model Fitting Information | | | | |
|---------------------------|-------------------|------------|------------------------|------|
| Model | Model Fitting | | Likelihood Ratio Tests | |
| | Criteria | | | |
| | -2 Log Likelihood | Chi-Square | df | Sig. |
| Intercept Only | 71,658 | | | |
| Final | 42,099 | 29,560 | 4 | ,000 |

Фигура 40. Резултати от определянето на регресионния модел

Таблица 14. 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 41.



Фигура 41. Брой деца (и процент от общия брой) разпределени в 8 групи съобразно наличие на GER, AP и HT/ST. 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

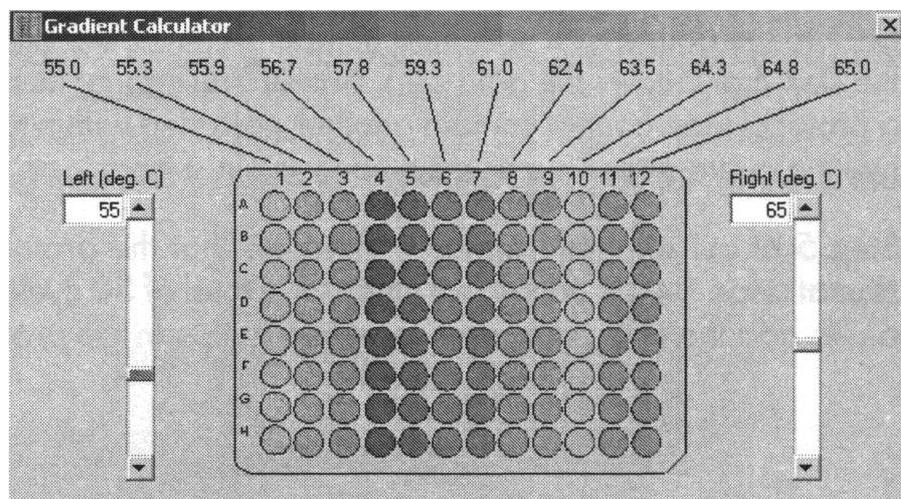
Първоначално за оптимизиране на протокола за RT-PCR бе използван стандартен протокол за PCR (табл 15).

Въз основа на теоретично определените на T annealing (T_m) на праймерните двойки, се проведеха експерименти за определяне на оптималната температура на хибризация 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 $1.5\text{-}5^{\circ}\text{C}$ (фиг.42).

Таблица 15. Първоначален протокол за PCR

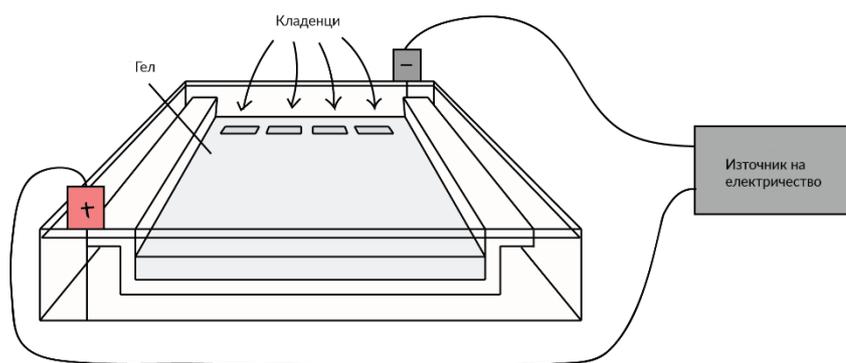
| | |
|------------------------|---------------------|
| ДНК | 2 μl |
| R- праймер | 0,3 μl |
| F- праймер | 0,3 μl |
| DNTP | 0,4 μl |
| Taqman | 0,05 μl |
| Буфер | 1 μl |
| Вода чиста от нуклеаза | 15,95 μl |



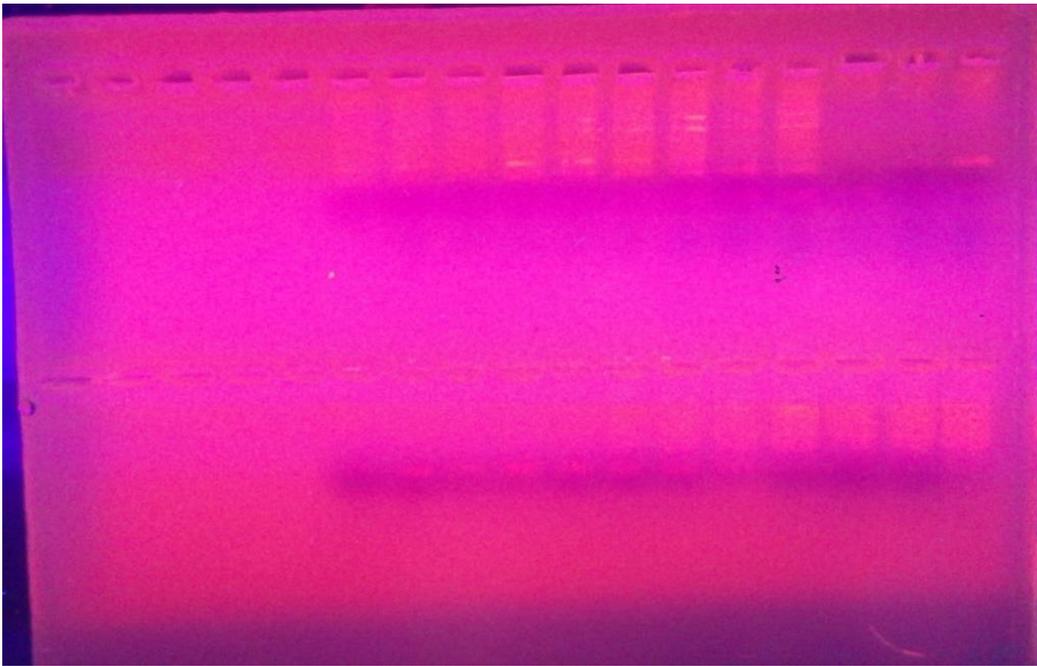
Фигура 42. Градиентен калкулатор за определяне на температурите за хибридизация на праймерите

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

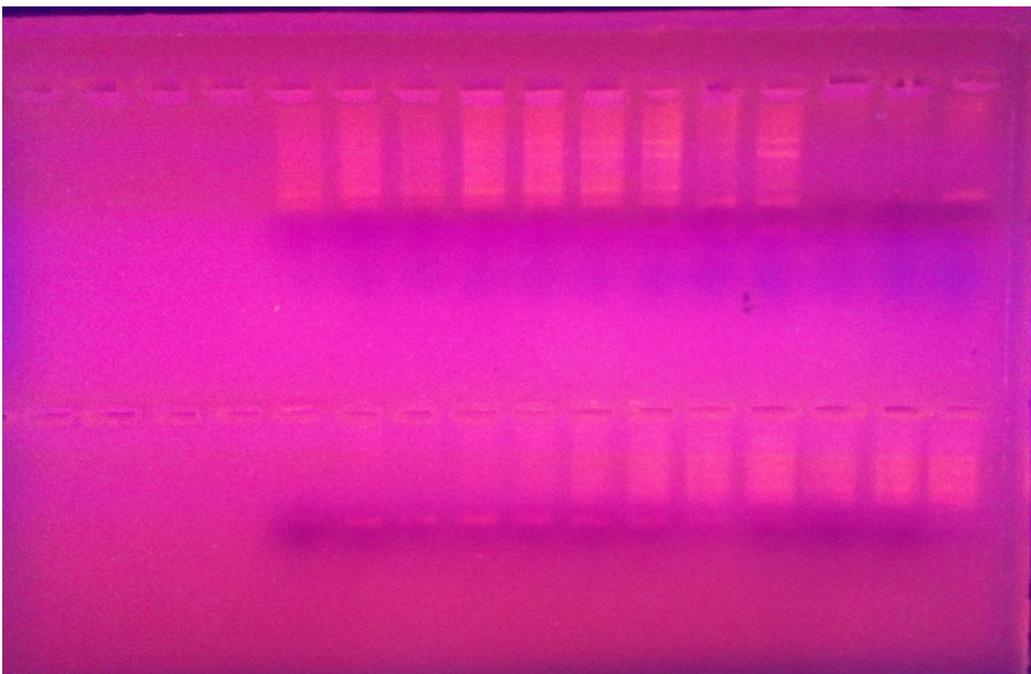
бромфенол блау) 3 μ l и се накапват върху 2% агарозен гел. За целта се приготви 2% агарозен гел по следния протокол: 2 g агароза + 20 мл TAE буфер + 80 мл дестилирана вода се загряват до напълно разтваряне на агарозата, след което сместа се охлажда до 50°C и се добавя 6 ml етидиев бромид, хубаво се разбърква 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.43) (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 Trasilluminate, Vite Technologies Ltd, France). На фигури 44 и 45 са представени снимки на 4-те електрофорези.



Фигура 43. Схематично представяне на гел-електрофореза



Фигура 44. Резултат от гел електрофореза на T1 (горен ред) и T2 (долен ред)



Фигура 45. Резултат от гел електрофореза на S2 (горен ред) и V4 (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, T_m 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 в таблица 16 и фигура 46. Тези проби впоследствие са използвани за контроли при изследването на пациентите.

Таблица 16. Получени резултати за трите стандартни ДНК-профила

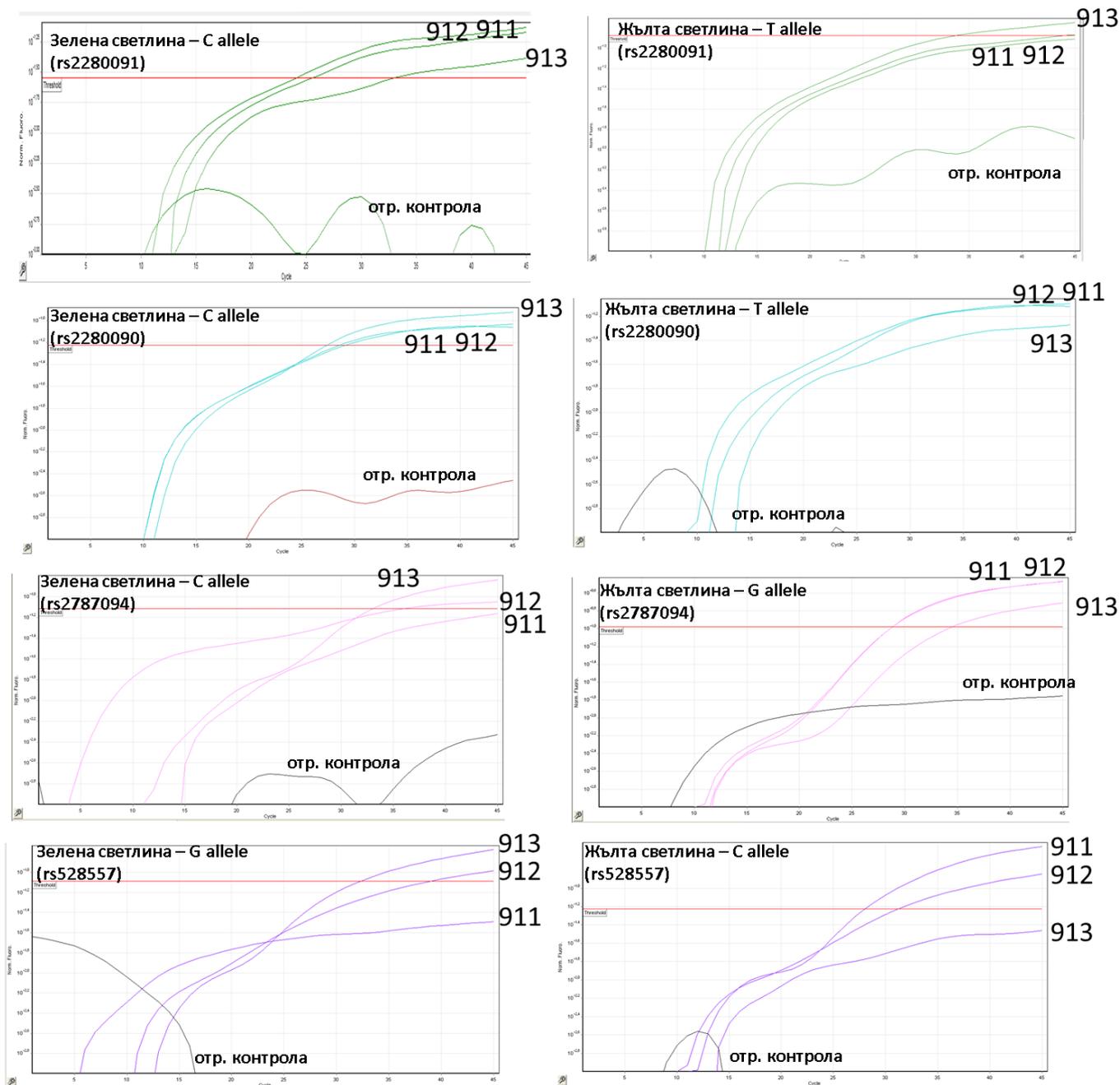
| | T1 (rs2280091) | T2 (rs2280090) | S2 (rs2787094) | V4 (rs528557) |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| ДНК1 (911) | CC | TT | GG | CC |
| ДНК2 (912) | CC | TT | GG | CG |
| ДНК3 (913) | TT | CC | CC | GG |

На таблица 17 са представени окончателните параметри за извършване на RT-PCR за всеки един от изследваните 4 SNPs.

Таблица 17. 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 (µl) | 0,5-0,9 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| R-праймер (µl) | 0,5-0,9 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| FAM-репортер (µl) | 0,4-0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,4 | 0,4 |
| HEX-репортер (µl) | 0,4-0,8 | 0,8 | 0,4 | 0,7 | 0,4 |
| TaqMan® Master Mix (µl) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| ДНК(µl) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| вода*(µl) | aa 20,0 | 4,8 | 5,2 | 5,3 | 6,6 |
| общо (µl) | 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 46. 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

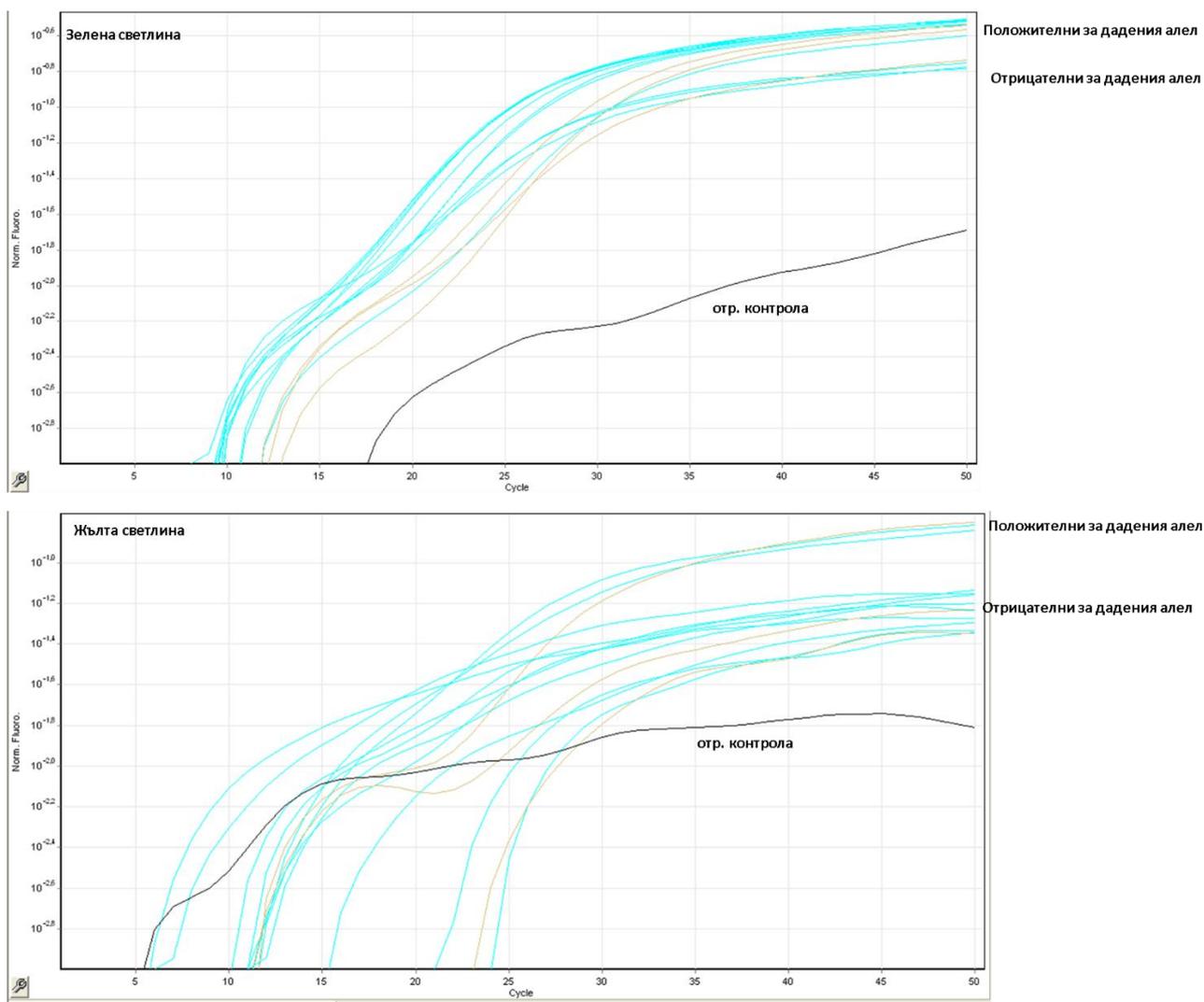
През 2013 година всички пациенти с тежка астма (25 идентифицирани към този момент) и техните родители бяха поканени за извършване на генетично изследване. Родителите на 20 от тях (80%) подписаха информираното съгласие. Съгласно възрастовата им и полова характеристика се подбраха още 59 деца с астма и 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.47).



Фигура 47. Процент на съгласиите се в участието пациенти и родители съобразно групата в която попадат

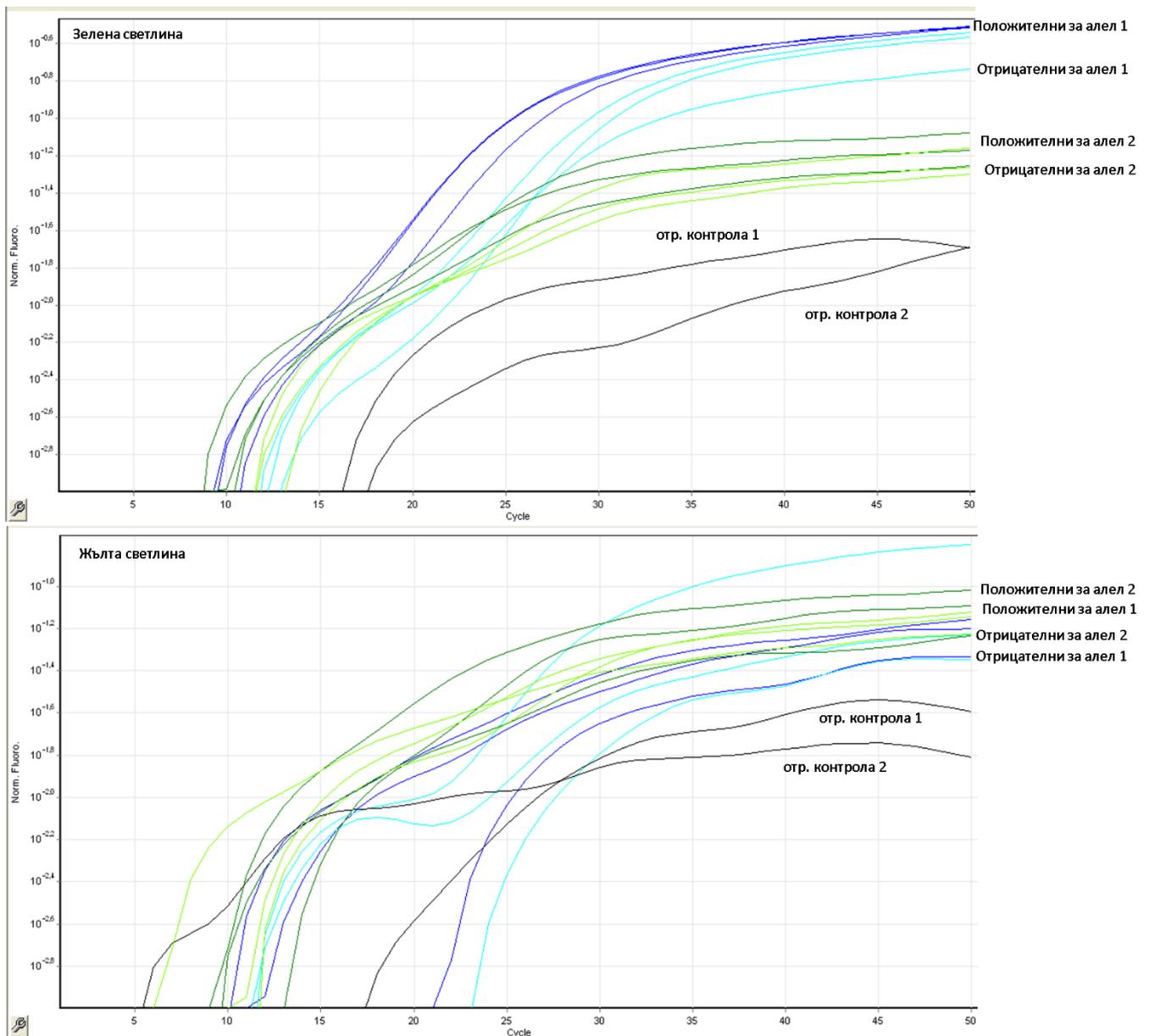
5. Задача 5. Да се определи разпределението на посочените полиморфизми в българските пациенти

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 48 и 49 са показани два примера от анализа на резултатите от изследването.



Фигура 48. Резултат от PCR тест за един полиморфизъм. Светло сините са амплификациите на пробите на пациентите, а бежовите линии са на контролните ДНК. Черната линия е на отрицателната контрола.

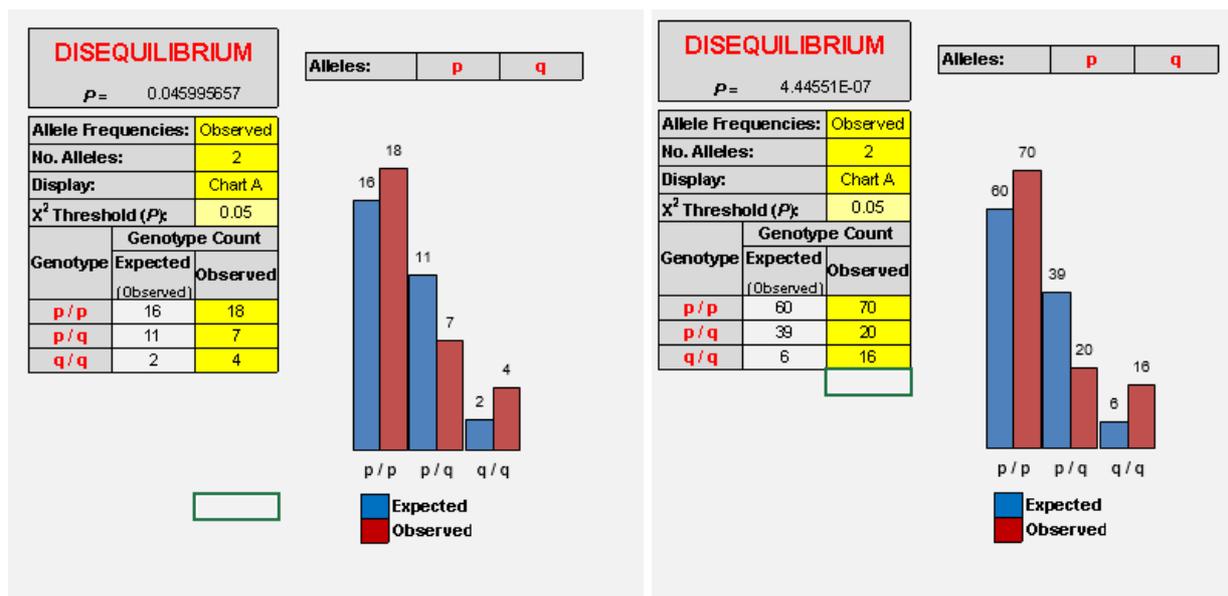
Добре се отграничава групата от проби, които експресират дадения алел, от групата, в която няма такъв (софтуер на Qiagen - към RT-PCR циклера, версия 2011 година)



Фигура 49. Резултат от PCR тест за два независими полиморфизма (син и зелен). Тъмните цветове са амплификациите на пробите на пациентите, а светлите линии са на контролините 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 (софтуерер на Qiagen - към RT-PCR циклера, версия 2011 година)

5.1 Полиморфизъм T1 (rs2280091)

Междуалелното разпределение се оказва 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 T, а по-честият или майорен алел е C (фиг.50, таблица 18).



Фигура 50. Резултат от проверка за популационно равновесие на T1 SNPs в контролната група (ляво) и в цялата изследвана група (дясно)

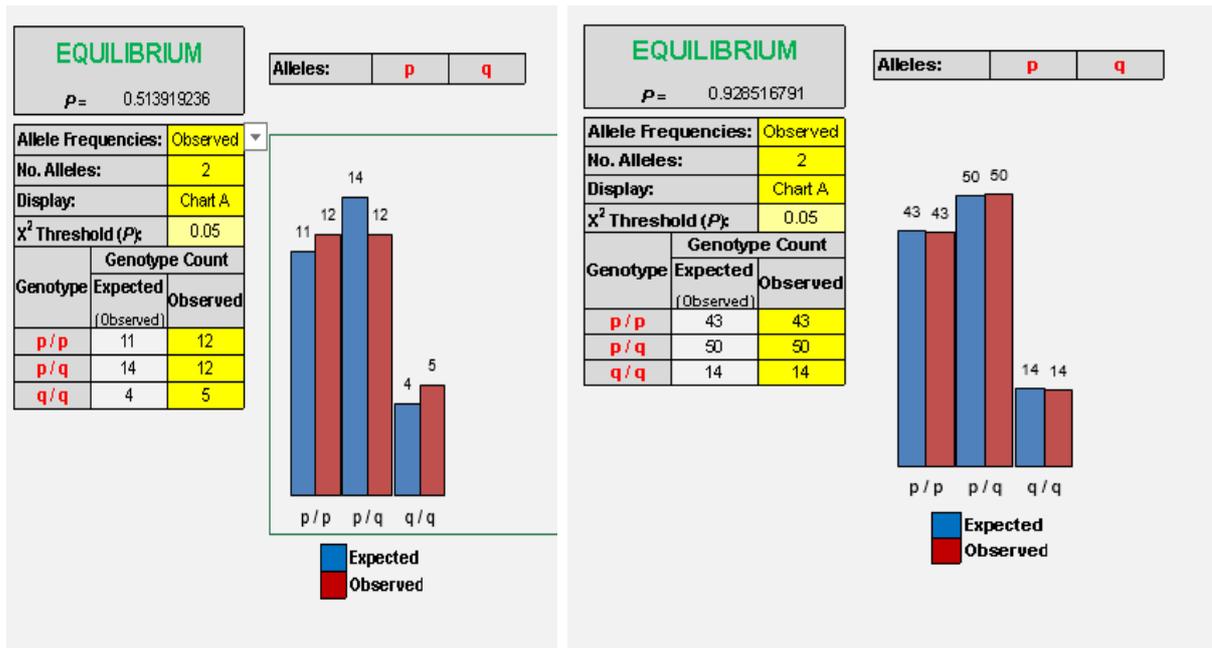
Таблица 18. Резултати за разпредението на T1 SNPs ADAM33 в изследваната група

| | Общо | Контролна група | Деца с астма | p (контрола vs. астма) | Деца с тежка астма | p (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 (фиг.51, таблица 19).



Фигура 51. Резултат от проверка за популационно равновесие на T2 SNPs в контролната група (ляво) и в цялата изследвана група (дясно)

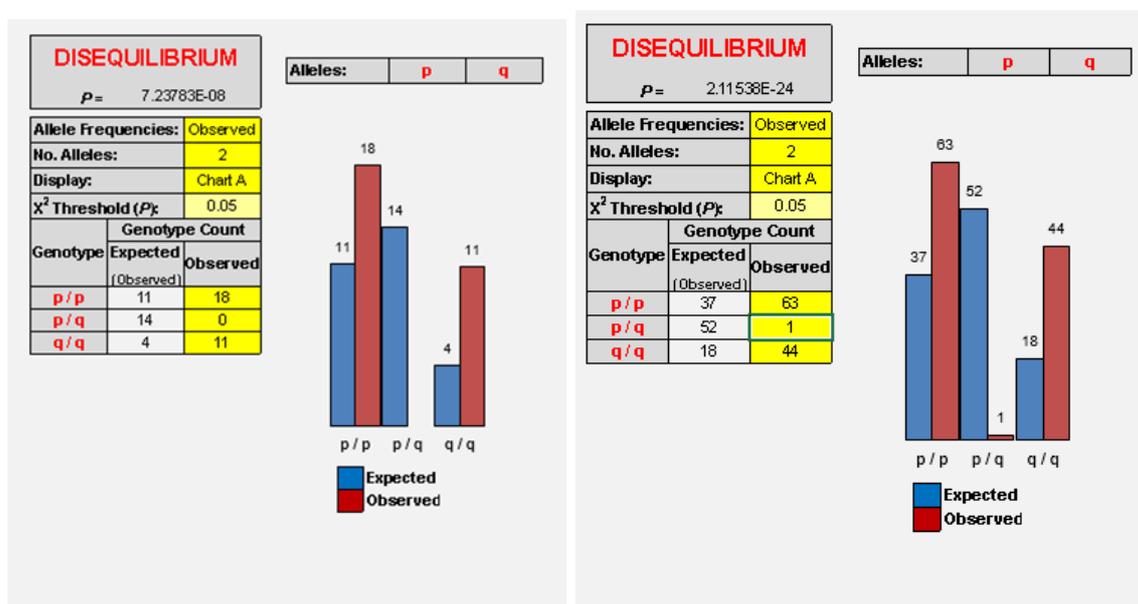
Таблица 19. Резултати за разпределението на T2SNPs ADAM33 в изследваната група

| | Общо | Контролна група | Деца с астма | p (контрола vs. астма) | Деца с тежка астма | p (астма vs. тежка астма)* |
|----|--------------|-----------------|--------------|------------------------|--------------------|----------------------------|
| C | 136 (62,96%) | 36 (62.06%) | 100 (64.10%) | 0,9914 | 23 (60,52%) | 0,9214 |
| T | 78 (36,11%) | 22 (37.2%) | 56 (35,89%) | 0,9692 | 15 (39,47%) | 0,9295 |
| CC | 43 (40,1%) | 12 (41.4%) | 31 (39.74%) | 0,9436 | 9 (47 %) | 0,8643 |
| CT | 50 (46.6%) | 12 (41.4%) | 38 (48.7%) | 08530 | 5 (26%) | 02481 |
| TT | 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 оказва не в равновесие по закона на Хайди-Вайнберг с почти липсващи хетерозиготи. Минорният алел е G, а майорният е C (фиг.52, таблица 20).



Фигура 52. Резултат от проверка за популационно равновесие на S2 SNPs в контролната група (ляво) и в цялата изследвана група (дясно)

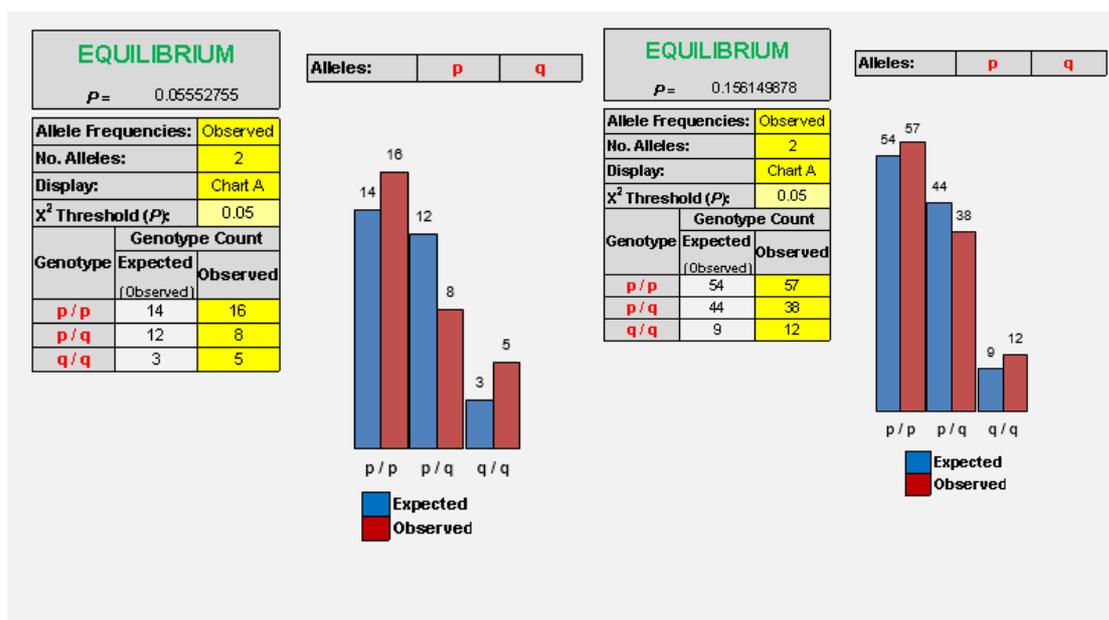
Таблица 20. Резултати за разпределението на S2 SNPs ADAM33 в изследваната група

| | Общо | Контролна група | Деца с астма | p (контрола vs. астма) | Деца с тежка астма | p (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 C, а майорният е G (фиг.53, таблица 21).



Фигура 53. Резултат от проверка за популационно равновесие на V4 SNPs в контролната група (ляво) и в цялата изследвана група (дясно)

Таблица 21. 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)

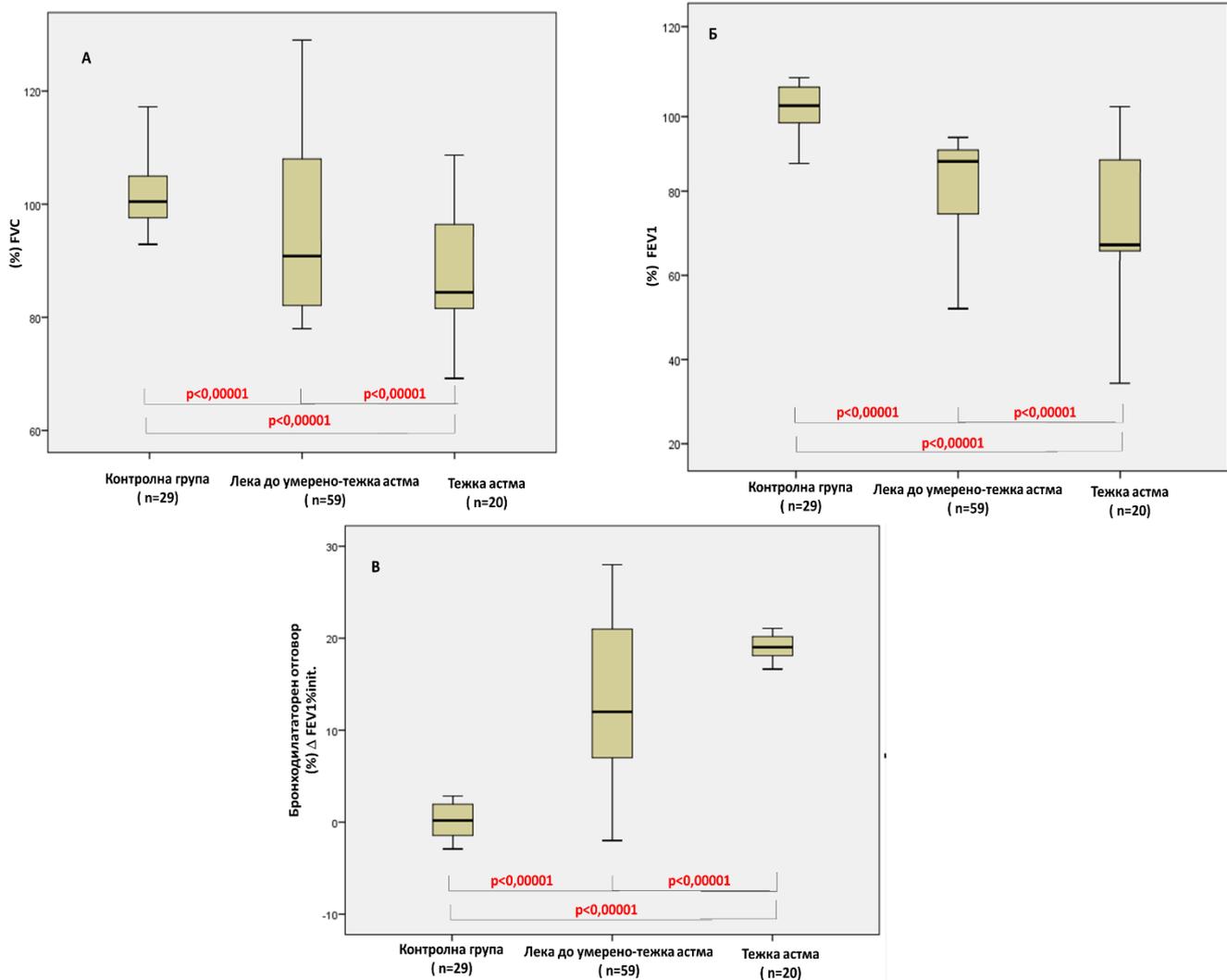
Параметрите от ФИД се определят съгласно пол, възраст и ръст. При изследваните пациенти не се установи разлика (табл.22) по отношение на полово разпределение ($p=0,956$, Chi-Square Test, Yates correction).

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.22 и фиг.54).

Таблица 22. Резултати демографски, антропометрични и ФИД данни на изследваните деца, разпределени в отделните групи

| | здрави контроли (n=29) | лека 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 | $p=0,897$ |
| ВМІ 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% | $p < 0,0001$ |
| $\Delta FEV1\%init.$ | 3,00% | 14,50% | 17,16% | $p < 0,0001$ |
| $\Delta FEV1\ abs., l$ | 0,050 | 0,216 | 0,356 | $p=0.004$ |



Фигура 54. Бокс-плот на резултатите от ФИД при трите групи А - FVC%; Б - FEV1%; В - Бронходилататорен 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%).

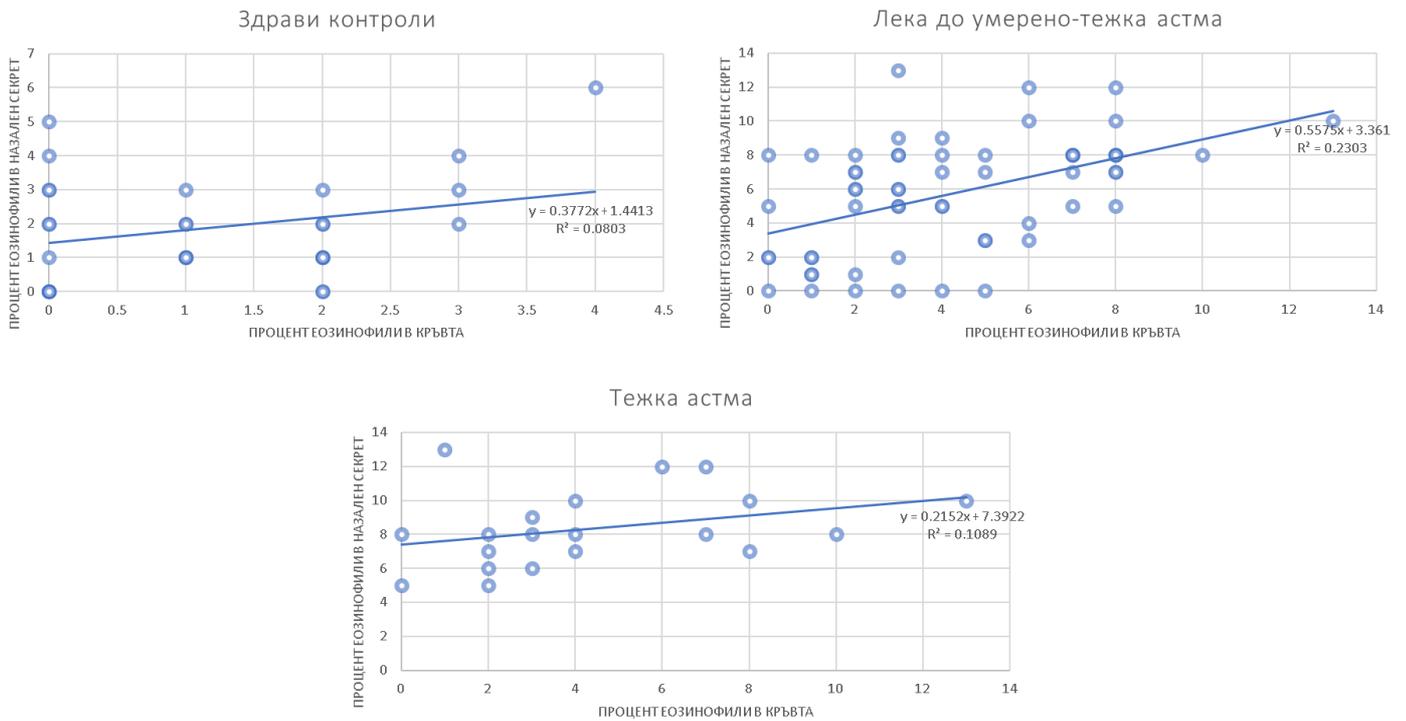
Децата от групата на здравите контроли имат значително по-ниска средна стойност на еозинофили в кръвта за разлика от тези с астма, броят на еозинофилите варира от 0 до 4% ($p < 0.001$, F-test). Не се установи статистически значима разлика по отношение на еозинофилният брой в кръвта при децата с тежка 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.23). Очаквано почти всички пациенти с тежка астма са с назална еозинофилия, най-вероятно и поради поради наличие на придружаващ АР.

Таблица 23. 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 $\rho = 0.57$, $p = 0.0001$) (фиг.55).



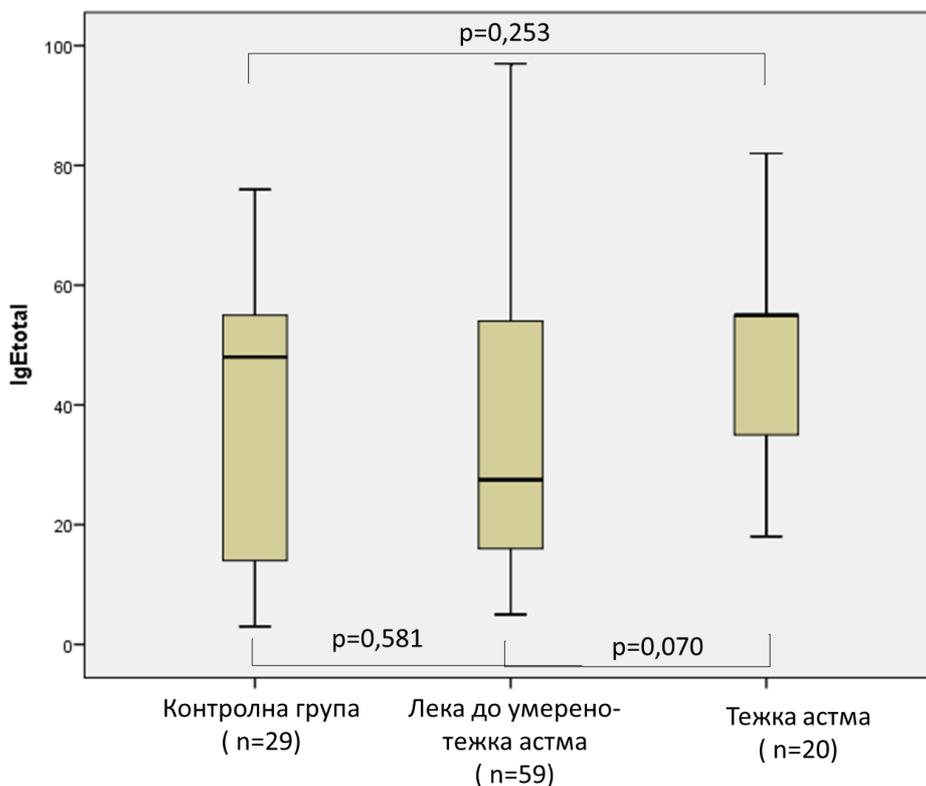
Фигура 55. Зависимост кръвна и назална еозинофилия в отделните групи

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.56).

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 – gх (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.

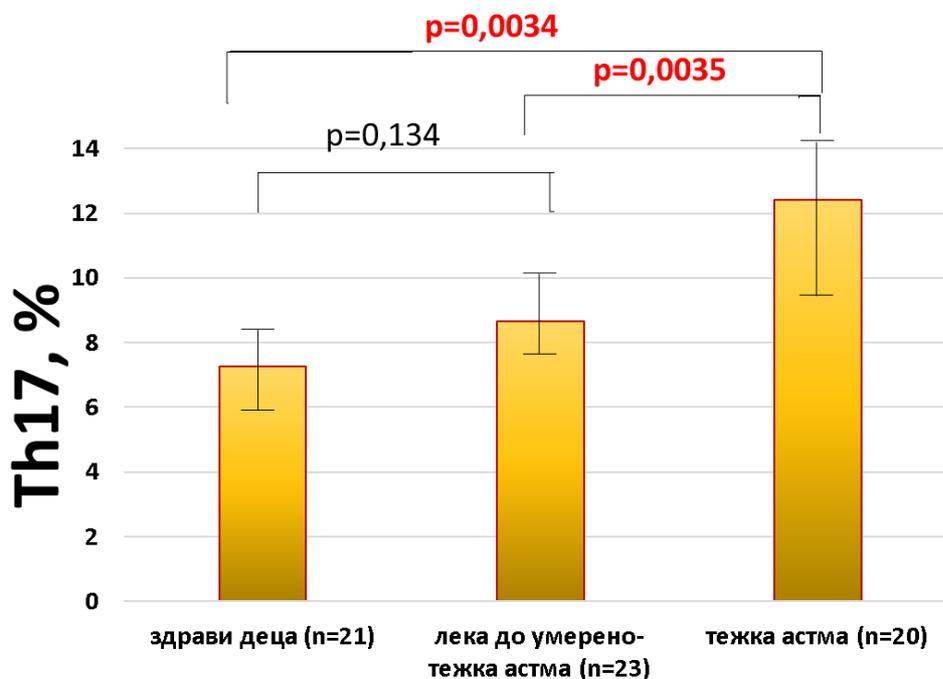


Фигура 56. Резултати от количеството на общ IgE UI/ml в различните групи изследвани пациенти и статистическа значимост (ANOVA, *post-hoc*, Bonferroni correction)

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, 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.57).



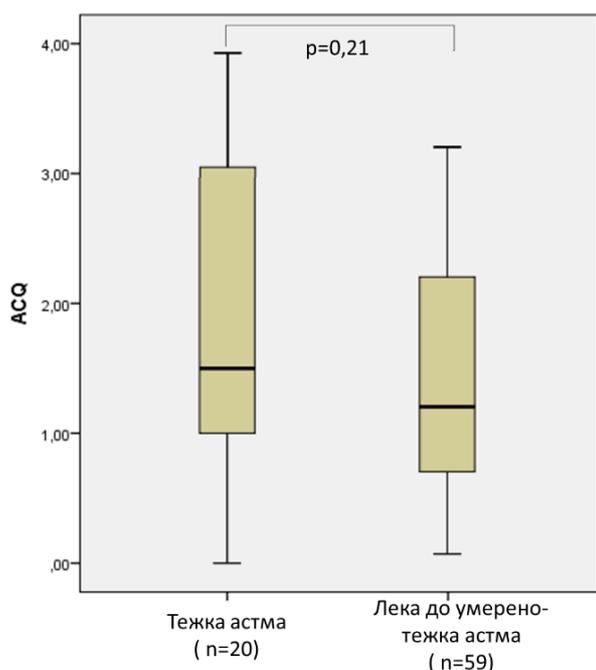
Фигура 57. Резултати за процента Th17 в различните групи изследвани пациенти и статистическа значимост (ANOVA)

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 пониски 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)

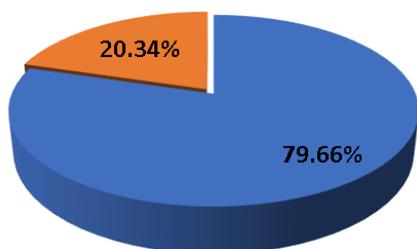
Въпросникът е попълван само от пациентите с бронхиална астма. Очаквано, децата с тежка астма са с по-лош контрол и по-висока средна стойност на ACQ $1,64 \pm 1,17$, докато тези с лека до умерно-тежка астма са с

по-ниски стойности $1,16 \pm 0,87$. Тези разлики не са сигнификантни ($p=0,21$, ANOVA) (фиг.58). 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 59).

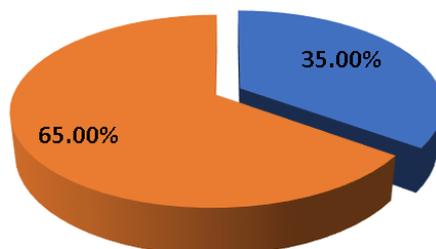


Фигура 58. Бокс-плот на резултатите от ACQ при децата с астма

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 59. Разпределение на децата според контрола на бронхиалната астма

7. Задача 7. Да се определи доколко резултатът от генетичния анализ има отношение към бронхиалната астма при изследваните деца

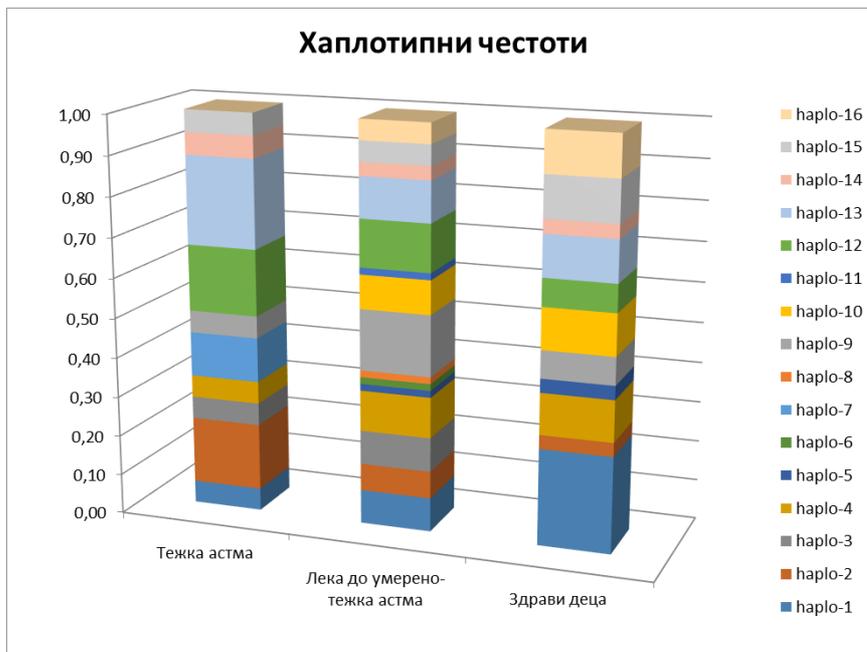
7.1 Анализ по отделни полиморфизми по отношение на фамилна обремененост за бронхиална астма и брой хоспитализации за предходната година.

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.60).



Фигура 60. Разпределение на хаплотипните честоти в различните групи

Таблица 24. Разпределение на честотите на хаплотиповете по групи

| Хаплотип | Тежка астма | Лека до умерено-тежка астма | Здрави деца | <i>p</i> -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) |

| | | | | | |
|------|---|-----|------|--------|-------------------|
| CCCG | - | 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

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 TTCC (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 (табл.24).

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 разнотипни 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.25).

Таблица 25. Генетични резултати, възраст, FEV1 % и група на сиблингите

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

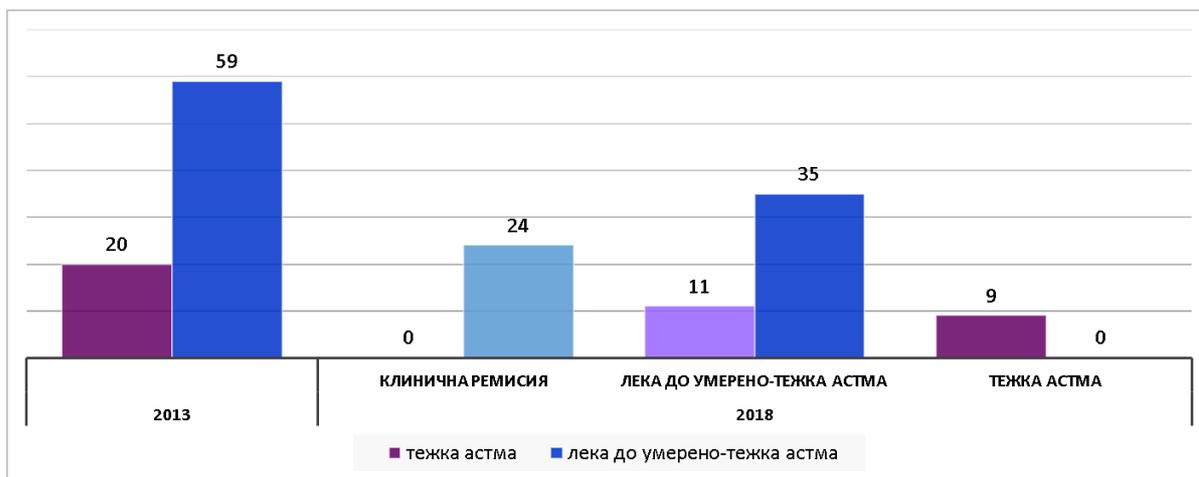
* минорите алели са отбелязани с червено

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 преоценка 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) подържат 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.61).



Фигура 61. 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.26), както и при сравняване на децата с тежка астма, при които заболяването персистира по тежест (табл.27) (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 клиничния ход и еволюцията на астмата при децата.

Таблица 26. Изходни стойности на пациентите с лека до умерено-тежка астма разпределени според групата в която попадат след 5-годишно проследяване

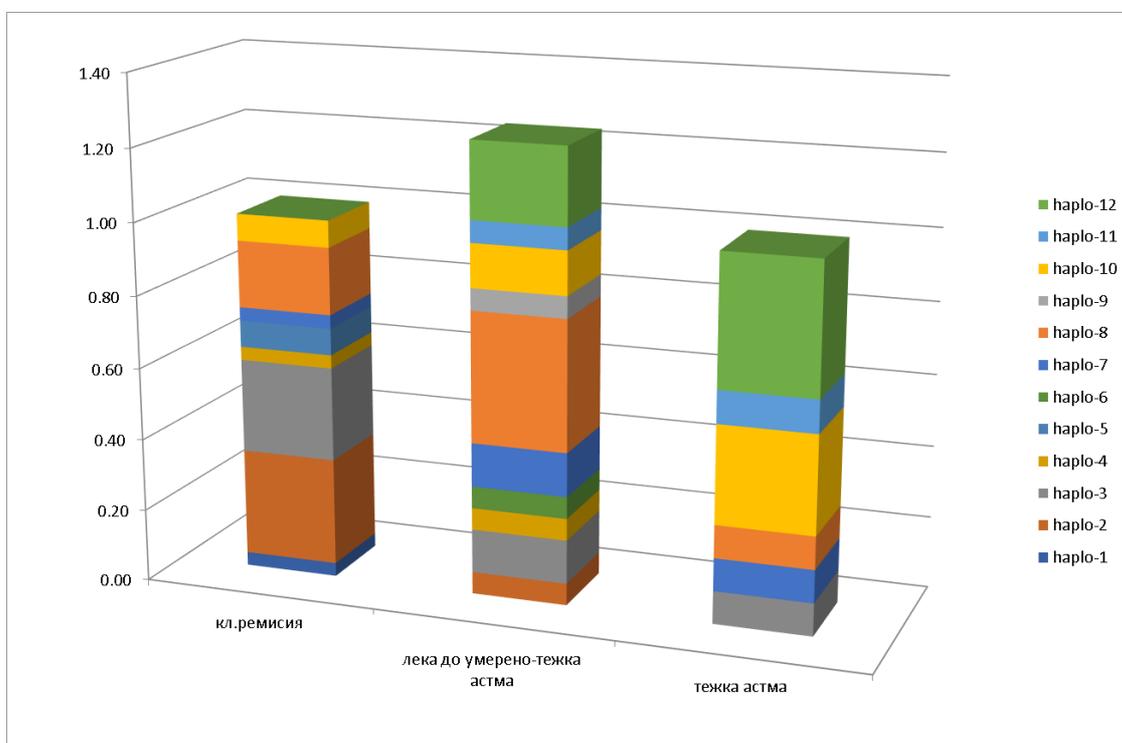
| Показател | В клинична ремисия (n=24) | С персистираща астма (n=35) | p |
|------------------|---------------------------|-----------------------------|---------|
| Възраст (години) | 10,02±4,58 | 10,54±3,99 | p=0,524 |
| Пол (м:ж) | 14:10 | 20:15 | p=0,653 |
| FVC (%), SD | 92,45 %± 9,8% | 89,24%±10,15% | 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 27. 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 (години) | 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

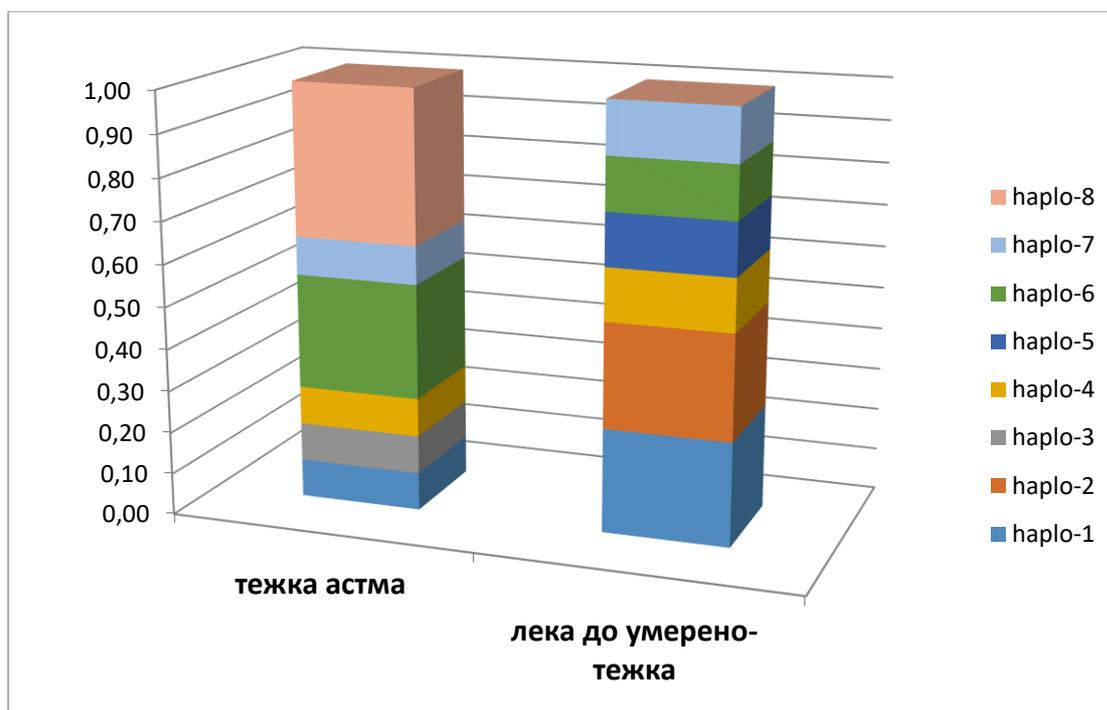
При регресионен анализ по отношение на генетичните резултати и еволюцията на заболяването се откриха значими разлики по отношение на минорните алели на T2, S2 и V4 които са по-чести в групата с персистиращо протичане съответно за T2 (OR=2,52, 95% CI 0,021–0,31, $p < 0,0001$), S2 (OR 15,52, 95% CI 0,001–0,42,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



Фигура 62. Разпределение на хаплотипните честоти в различните групи спрямо клиничната тежест на астмата през 2018 година

Още по-ясно е това различие при разглеждане на групата деца с тежка астма през 2013 година. Всички деца с 4 минорни алела (СТГС) остават тежки астматици и през 2018 (хаплотип 8 от фиг. 62). 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.63).



Фигура 63. Разпределение на хаплотипните честоти при децата с изходна тежка астма през 2013 година

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 (1, 287). 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 (35).

В настоящият дисертационен труд са включени деца с БА (обективизирана от лекар специалист по критериите на GINA) (113). 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 албулаторно лечение в доболнични здравни центрове (4, 13). 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 (42, 69).

Подобно и на други изследвания в областта на детската астма по света и у нас и в настоящият труд преобладава мъжкият пол (2, 8, 26, 106, 155, 167). 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 (232). Например: естрадиолът повишава секрецията на мукусни протеини (Muc5AC и Muc5B) от бронхиалните епителни клетки (259), а прогестеронът намалява цилиарното биене (143), 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 (1). 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 (96).

Поради липсата на прецизно определение за тежка астма при децата преди 2014 година (75, 113) 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%) (46), като са по-високи от тези в Швеция (2,1%) (214), и значително по-ниски от докладваните от 5 до 10% за САЩ (262) и средна 6,7% за Южна Европа (96). 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) (204). За усреднена се приема стойността около 4% за „истински“ тежки астматици (97, 169). 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 (101). Глобализацията,

индустриализацията и замърсената околна среда са приети като важни причини за посочените резултати (267). Не трябва да се 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) (96).

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 (4). 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% (17, 24, 26, 264) до 73-75% (73, 158). 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 (1, 246, 253). 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 (18, 57, 253), подобен риск е открит и за неатопичен ринит (19, 63, 70). Това е важно, тъй като алергичният ринит при децата с БА нерядко остава недиагностициран и нелекуван (18, 24, 26, 57, 61). 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 овладяването на симптомите на АР доказано подобрява нивото на астма-контрола (32, 50, 264). 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% (48), което се обяснява с по-прецизното определяне на тежка астма след 2014 г. и вероятността в проучването на Visaccioni 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 (48, 264). 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 (68, 113, 211). 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 (24, 32, 264).

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 (165, 186). До настоящия момента 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 (228, 290). 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 потискат регулаторните Т клетки (7). Това може да доведе до дисбаланс на Т клетките в посока към алергична изява (129). От друга страна антихистамините са основна група медикаменти за лечение на АР, поради което е проследявана тяхната връзка с наднорменото тегло.

Свръхупотребата на фексофенадин и цетиризин се асоциира със затлъстяване (234). 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 (81). Вероятна причина за тези нежелани ефекти е блокирането на действието на хистамина, който потиска апетита (194). 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 (6, 7). 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 (5, 19, 29).

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 (6). 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 набеждават ICS за повишено тегло (19, 72, 147, 273). В повечето случаи се установява връзка между теглото и неатопичната астма твърде вероятно по-висок стоеж на диафрагмата с ограничаване на респираторните движения (234). Затлъстяването оказва влияние и върху кръвотока в белите дробове, което влошава ефективността на кислородообмена (7). Маснатия тъкан компресира белодробната, повишавайки кръвотока, но компресирайки диаметъра на дихателните пътища. Допълнително лошо контролирана астма (с неправилна техника) и чести пристъпи ограничават физическата активност, което може да е предпоставка за повишаване на теглото (170). 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 (80, 263). Ефектът е по-силно изразен сред женския пол – при момчетата с наднормено тегло или затлъстяване между 6 и 11 години се наблюдава 7 пъти по-висок риск от астма (91). 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 (183, 188). 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 (115, 117). 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 (61). При много тежки астматици с морбидно затлъстяване, е доказано добър ефект от бариатрични процедури (271). Фенотипа 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 (61, 233).

Очаквано децата с наднормено тегло са с по-голяма честота на ГЕР, както е описано и от други автори в България и чужбина (29, 120). 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 (120), 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% (5, 223). Различни автори докладват и по-високи стойности при деца (до 82%), но те включват и кърмачета, които имат физиологичен рефлукс (29). 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 (51). 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 (156). На практика става дума за порочен кръг, в който астмата може да доведе

до GER, а GER да влоши контрола на заболяването (84). Доказано е, че честотата на GER при деца с БА е по-висока от честотата му при други деца (67, 164). В настоящето изследване 20% от децата са с клинични белези на GER, 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 GER срещу само 2,3% за тези, които нямат БА (85). Автори от Турция посочват, че 41% от децата с БА имат симптоми на GER (41), вероятно поради различния диетичен режим и различната възрастова група, обхваната в изследването. Авторите асоциират GER предимно с по-голяма възраст, по-висок BMI и женски пол. В настоящето изследване превалят момчетата, 10% са и с наднормено тегло.

Не се установи по-висока честота на GER сред децата с тежка астма (19,5%), вероятно поради сравнително малкия брой. От друга страна, докладваните 30% GER при тежки астматици през 2009 година 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 (48). Неслучайно са описани (включително и в България), случаи на деца с „трудна за контрол БА“, за които се оказва, че дори нямат астма (23, 212, 293). Съвременните терапевтични препоръки в случай на астма-съпътстващ GER е внимателно и индивидуално оптимизиране на контролиращите медикаменти и допълнително антирефлуксно лечение (26, 67, 113, 159).

От направеният цялостен анализ на децата с тежка астма и трите коморбидни заболявания, с най-голямо прогностично значение се оказва наличието на AP. Най-голям брой деца с тежка БА попадат в групата с придружаващ AP, 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 (48, 84,

156). 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 (283) 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 (109). 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 (177, 256, 274, 294, 295). 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-чест 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 несигнификантни в холандска популация (49, 83). Един скорошен обширен метаанализ на Li и сътрудници отхвърля вероятността наличие на минорен алел по S2 да повишава риска за развитие на астма (179), въпреки че част от анализиранияте изследвания показват силна зависимост (49). 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 (60, 255). 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 година категорично повърждава, че този полиморфизъм е свързан с повишен риск за развитие на астма при хората от бялата раса (179), 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 (40, 221, 256, 296). 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 (177), особено в детската възраст, но за другите раси няма такова потвърждение (179). Доказано е, че T1 минорният алел е свързан с по-бързото намаляване в показателите от ФИД (224) и с тежестта на бронхиалната астма (227). 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 (179), 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 (60) 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 (179). При анализиране на фамилната обремененост за БА се установи зависимост по отношение на минорния алел на T2 и на V4, които са по-чести при тези с фамилна обремененост, в унисон с данните за унаследяване на T2 (179).

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 (9, 12, 26). 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 (261).

В многобройни публикации е обсъждана връзката между еозинофилията и бронхиалната астма (79, 82, 102). 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 (26), но тази еозинофилия не корелира с тежестта на астмата. Доказана е по-висока стойност на еознофили при новодиагностицирани астматици (150). 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 (18, 24) така и при изледваните 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 еозинофилия 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 (10, 130). Противно на това според големи епидемиологични проучвания тежката астма се асоциира в по-малка степен с атопия/алергия в сравнение с по-леките форми, с по-нисък процент пациенти с положителни кожни тестове (205). Асоциацията между алергия и тежест на астмата, обаче е по-изразена в детската възраст (103). Счита се, че перистиращото излагане на аероалергени увеличава бронхиалното възпаление и риска от екзацербации при тежка астма (75).

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 (54). 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 сенсibiliзирани 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 хрантелен 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 здават основание да се приеме, че при бронхиалната астма, особено при тежката, възпалението на дихателните пътища се обуславя от Th2 и Th17 лимфоцитите (141, 175, 213). 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 (141). 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 (92, 213). Увеличеният серумен IL-17 маркер е независим рисков фактор за тежка астма (30, 157, 281). 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 (61).

При разглеждане на генетичните резултати при тежките астматици прави впечатление, че за T2 носителите на минорен алел (ТТ+СТ) 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 (179).

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 (289). Общите честоти на хаплотипа могат да бъдат оценени въз основа на известните маркерни фенотипове при несвързани индивиди от популацията (196).

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 (226). Експозицията на цигарен дим сигнификантно обостря БА, а пушенето на майката по време на бременността значимо увеличава риска за развитие на БА (136, 172). 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 (199). 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 (33, 274 2019). Подобна асоциация е открита и за анализ на T1 (rs2280091) и F+1 (280). 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 (148). 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 (113), 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 клиничния 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 взаимосвързката 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 по-леките 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 с нея поради повишения риск за по-тежко протичане на заболяването при тях.

VIII. ФИНАНСИРАНЕ

Изследванията, представени в дисертационния труд, са финансирани от следните проекти:

“Th17 лимфоцитна субпопулация и витамин Д при детска астма” МУ-2015г.;

“Генотип-фенотип асоциация на бронхиалната астма в детска възраст” МУ-2014г.;

“Определяне атопичния статус на деца с астма и измерване температурата на издишания въздух за мониториране на възпалението на дихателните пътища и нивото на контрол” МУ-2013г.;

Генетичните изследвания са проведени в Националната генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом“, София; МУ-София

Имунологичните изследвания са осъществени в Имунологичната лаборатория на УМБАЛ "Свети Иван Рилски", София; МУ-София

Изследването на дихателната функция, проследяването на пациентите и попълването на анкетите са извършени в Клиниката по педиатрия, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, София; МУ-София

IX. ПУБЛИКАЦИИ

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

1. 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
- T. 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 a in Bulgarian population Allergy 2016, 6(Suppl 101), 290-392

2. Участия в конференции и конгреси

1. Г. Петрова, **Д. Митева**, Сн. Лазова, П. Переновска, С. Андонова, А. Савов, Л.Зафировски, Полиморфизми на АДАМ33 при деца с бронхиална астма – кн. с абстр. стр. 34, XVI-та Национална Конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие. Правец, 9 - 11 октомври 2015
2. **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
3. **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
4. 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

Х. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Бошева М, Някои мисли за бронхиалната астма в детската възраст, сп. Наука пулмология, 2009; 4: 122-123
2. Димитрова СМ, Клинико-лабораторни показатели, определящи вероятен риск за астма в ранна детска възраст, Дисертационен труд, МУ София, 2009
3. Исаев В, Рецидивиращо свиркащо дишане в ранна детска възраст – диагностични и терапевтични предизвикателства, сп. Наука пулмология, 2013;1:6-12
4. Калайков Д, Детското здравеопазване в България: състояние, проблеми, перспективи, сп. Практическа педиатрия, 2019; 1-2: 6-9
5. Коларова-Янева Н, Недкова В, Гастроезофагеален рефлукс в детска възраст, Медицинфо, 2018; 6:12-16
6. Константинова М, Тенденции в разпространението на поднормено, наднормено тегло и затлъстяване сред детското население в България през последните 40 години. Антропометрични, метаболитни и хормонални характеристики на клиничните типове затлъстяване в детската възраст, Докторски дисертационен труд, МУ София, 2015
7. Кръстева Н, Клинична характеристика, белодробна функция и цитокинов профил при деца с бронхиална астма и затлъстяване, Дисертационен труд, МУ Плевен, 2018
8. Лазова С, Клинично значение на функционалното изследване на дишането и atopичния статус при деца с астма, Дисертационен труд, МУ София, 2017
9. Лазова С, Переновска П, Петрова Г, Клинично значение на спирометрията при деца с астма, GP news Педиатрия, 2017; 2:16-19
10. Лазова С, Петрова Г, Митева Д, Папочиева В, Переновска П, Тежка астма и атопия - значение на алергените, сп. Наука пулмология, 2014; 4:9-15
11. Мандаджиева С, Костянев С, Нормални белодробни показатели при деца на възраст от 7-18 години: възрастови промени и полови различия. Сборник резюмета: "Юбилейна научна сесия 60г МУ - Пловдив", 2005; стр. 75
12. Мандаджиева С, Физиологични и патофизиологични аспекти на газовата обмяна при здрави български деца на възраст 7-18 години, Дисертационен труд, МУ Пловдив, 2013
13. Маркова Р, Роля на дневния стационар в амбулаторната педиатрия. Възможности за терапия при т.нар. „еднодневна медицина“, сп. Практическа педиатрия 2015; 8: 4-7

14. Милева С, Галева И, Янкова М, Андонова С, Янева Н, Савов, А. Честота на полиморфизми в локус 17q21 при бронхообструктивни състояния в ранна детска възраст, сп. Педиатрия, 2015; 55(2): 21-24
15. Митева Д, Переновска П, Петрова Г, Грешки и неудачи при използването на инхалаторни устройства от деца, сп. Наука пулмология, 2018; 2; 13-18
16. Недкова В, Миланова В, Стоянова В, Коларова Н, Янев Н, Божинова А Тютюнопушене при деца с астма, сп. Наука пулмология, 2011; 147-150
17. Переновска П, Алергичен ринит и бронхиална астма в детската възраст, MedInfo, 2012(8)
18. Переновска П, Алергичният ринит - рисков фактор за астма (II част), сп. Наука пулмология, 2013; 1: 30-34
19. Переновска П, За някои рискови фактори при детската астма. MedInfo, 2013(13)
20. Петрова Г, Митева Д, Папочиева В, Переновска П, Не всяка бронхиална обструкция в детска възраст е астма, сп. InSpiro 2019; 5(53):23-26
21. Петрова Г, Митева Д, Папочиева В, Переновска П, Отражение на затлъстяването върху контрола на бронхиалната астма в детската възраст, сп. InSpiro, 2015; 8 (4): 39-42
22. Петрова Г, Папочиева В, Лазова С, Митева Д, Переновска П, Влияние на лечението с инхалаторни кортикостероиди при деца върху растежа и теглото, сп. Педиатрия, 2015; 55(1): 34-36
23. Петрова Г, Лазова С, Митева Д, Переновска П, Гастроезофагеален рефлукс – подценявана причина за хронична кашлица при тийнейджърите, сп. Наука пулмология, 2016; 39 (2): 26-31
24. Спасова А. Място и значение на алергичния риносинусит в патогенезата на бронхиалната астма в детска възраст. Дисертационен труд, 2016, София
25. Станимирова Н, Пенева Л, Балтова Ц Физическо и пубертетно развитие на българските деца, Норми и Стандартни криви – норма и стандартни криви, София 2007
26. Стоева Т, Клинико-функционална характеристика, неинвазивни маркери на белодробно възпаление и контрол при деца с бронхиална астма, Дисертационен труд, МУ Варна, 2017
27. Стоева Т, Бронхиална астма и съпътстващи заболявания, сп. Практическа педиатрия 2016; 6: 18-20
28. Цветкова-Вичева ВМ, Генетични и имунологични изследвания на пациенти с алергичен ринит и бронхиална хиперреактивност, Дисертационен труд. 2011

29. Янева П, Гастроэзофагеална рефлуксна болест при децата, *Мединфо*, 2019,2: 26-30
30. Agache I, Akdis C, Jutel M, et al. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy* 2012; 67: 835–846
31. Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respiratory medicine* 2010; 104(8): 1131-1137
32. Aguilar D, Pinart M, Koppelman GH, et al. Computational analysis of multimorbidity between asthma, eczema and rhinitis. *PLoS One* 2017;12(6):e0179125
33. Al-Khayyat AI, Al-Anazi M, Warsy A, Vazquez-Tello A, Alamri AM, Halwani R, Alangari A, Al-Frayh A, Hamid Q, Al-Muhsen S. T1 and T2 ADAM33 single nucleotide polymorphisms and the risk of childhood asthma in a Saudi Arabian population: a pilot study. *Annals Saudi Med.* 2012;32:479–86
34. Amorim MM, Araruna A, Caetano LB, Cruz AC, Santoro LL, Fernandes AL Nasal eosinophilia: an indicator of eosinophilic inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40(6):867-74.
35. Akinbami LJ, Moorman JE, Bailey C et al. Trends in asthma prevalence, health care use, and mortality in the United States, 2001–2010. *NCHS Data Brief.* 2012:1–8
36. Anderson HR, Kapetanakis V, et al. International correlations between indicators of prevalence, hospital admissions and mortality for asthma in children *Int J Epidemiol.* 2008;37:573-82.
37. Asthma control questionnaire (QOL TECHNOLOGIES Ltd 2003, Professor Elizabeth Juniper www.qoltech.co.uk)
38. ATS/ERS TASK FORCE: STANDARDISATION OF LUNG FUNCTION TESTING Standardisation of spirometry *Eur Respir J* 2005; 26: 319–338
39. Aujla SJ, Alcorn JF. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochimica et biophysica acta* 2008; 1810(11): 1066-1079
40. Awasthi S, Tripathi P, Ganesh S, Husain N. Association of ADAM33 gene polymorphisms with asthma in Indian children. *J Hum Genet.* 2011;56:188–95
41. Ay M, Sivasli E, Bayraktaroglu Z, Ceylan H, Coskun Y Association of asthma with gastroesophageal reflux disease in children. *J Chin Med Assoc.* 2004; 67(2):63-6
42. Bach JF, The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases *N Engl J Med* 2002; 347:911-920
43. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA et al. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy*, 2008, 63: 5–34

44. Bart L, Rottier EE, Hedlin G, Turner S, Wooler E, Force EM, Kobot ET, Children MAI. Monitoring asthma in childhood: management-related issues. *Eur Respir J*. 2015;45:906-25
45. Belgrave DCM, Granell R, Simpson A, et al. Developmental Profiles of Eczema, Wheeze, and Rhinitis: Two Population-Based Birth Cohort Studies. Lanphear BP, ed. *PLoS Medicine*. 2014;11(10):e1001748
46. Belgrave DCM, Simpson A, Semic-Jusufagic A, Murray CS, Buchan I, Pickles A, et al. Joint modeling of parentally reported and physician-confirmed wheeze identifies children with persistent troublesome wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132:575–83.e12
47. Beydon N, Delclaux C. BMI as a comorbidity factor in childhood asthma. *Expert Rev Respir Med*. 2012;6(6):569-71
48. Bisaccioni C, Aun MV, Cajuela E, et al. Comorbidities in severe asthma: frequency of rhinitis, nasal polyposis, gastroesophageal reflux disease, vocal cord dysfunction and bronchiectasis. *Clinics*. 2009;64(8):769–773
49. Blakey JD, Sayers I, Ring SM, Strachan DP, Hall IP. Positionally cloned asthma susceptibility gene polymorphisms and disease risk in the British 1958 Birth cohort. *Thorax*. 2009;64:381–7
50. Blöndal V, Sundbom F, Borres MP, et al. Study of atopic multimorbidity in subjects with rhinitis using multiplex allergen component analysis. *Clin Transl Allergy*. 2020;10:6
51. Bongiovanni A, Parisi GF, Scuderi MG, Licari A, Brambilla I, Marseglia GL, et al. Gastroesophageal reflux and respiratory diseases: does a real link exist? *Minerva Pediatr* 2019;71:515-23.
52. Bonnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Moller E, Mercader JM, Belgrave D et al. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nat Genet*. 2014 Jan;46(1):51-5
53. Bora E, Arıkan-Ayyıldız Z, Firinci F, Çankaya T, Giray-Bozkaya Ö, Uzun N, Ülgenalp A. ADAM33 gene polymorphisms are not associated with asthma in Turkish children. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 2012;25:97–100
54. Borres MP, Ebisawa M, Eigenmann PA. Use of allergen components begins a new era in pediatric allergology. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22: 454–461
55. Borish L. The immunology of asthma: Asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016; 117(2):108-14
56. Bossley CJ, Fleming L, Ullmann N et al. Assessment of corticosteroid response in pediatric patients with severe asthma by using a multidomain approach. *J Allergy Clin Immunol*, 2016(138), 2: 413-420

57. Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108 (suppl), 147–334
58. Brand PL, Baraldi E, Bisgaard H, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J* 2008; 32: 1096–1110
59. BTS/SIGN Guideline for the management of asthma 2016, <https://www.brit-thoracic.org.uk/quality-improvement/guidelines/asthma/>
60. Bucovic BK, Blekic M, Simpson A, Marinho S, Curtin JA, Hankinson J, Aberle N, Custovic A. Asthma severity, polymorphisms in 20p13 and their interaction with tobacco smoke exposure, *Ped All & Immunology* 2013; 24:10-18
61. Bush A, Fleming L, Saglani S. Severe asthma in children. *Respirology* . 2017;22(5):886–897
62. Capasso M, Varricchio A, Ciprandi G. Impact of allergic rhinitis on asthma in children: effects on bronchodilation test. *Allergy*. 2010;65(2):264-8.
63. Carr TF, Stern DA, Halonen M, Wright AL, Martinez FD. Non-atopic rhinitis at age 6 is associated with subsequent development of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(1):35–43
64. Cave AJ, Sharpe H, Anselmo M, et al. Primary Care Pathway for Childhood Asthma: Protocol for a Randomized Cluster-Controlled Trial. Eysenbach G, ed. *JMIR Research Protocols*. 2016;5(1):e37
65. Chang A, Cough: are children really different to adults? *Cough*. 2005, 1:7
66. Chang A, Widdicombe J, Cough throughout life: children, adults and the senile. *Pulm Pharmacol Ther* 2007, 20:371-382.
67. Chang AB, Oppenheimer JJ, Kahrilas PJ, Kantar A, Rubin BK, Weinberger M, Irwin RS; CHEST Expert Cough Panel. Chronic Cough and Gastroesophageal Reflux in Children: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2019;156(1):131-140.
68. Chauhan BF, Jeyaraman MM, Singh Mann A, et al. Addition of anti-leukotriene agents to inhaled corticosteroids for adults and adolescents with persistent asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;3(3):CD010347.
69. Chawla J, Seear M, Zhang T, Smith A and Carleton B. , Fifty years of pediatric asthma in developed countries: How reliable are the basic data sources?. *Pediatr. Pulmonol.*,2012, 47: 211–219
70. Chawes BL, Kreiner-Møller E, Bisgaard H. Children with allergic and nonallergic rhinitis have a similar risk of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(3):567-73

71. Chen RX, Lu WM, Zhu LP, et al. Association study on ADAM33 polymorphisms in mite-sensitized persistent allergic rhinitis in a Chinese population. *PLoS One*. 2014;9(4):e95033
72. Chen YC, Dong GH, Lin KC and Lee YL, Obesity and incident asthma in children. *Obes Rev*, 2013, 14: 222-231
73. Chinnakkannan SK, Singh M, Das RR, Mathew JL, Saxena AK. Association of allergic rhinitis and sinusitis with childhood asthma. *Indian Pediatr*. 2017;54(1):21–4
74. Choi Y, Jeon H, Yang EA, Yoon JS, Kim HH. Nasal eosinophilia and eosinophil peroxidase in children and adolescents with rhinitis. *Korean J Pediatr*. 2019;62(9):353–359
75. Chung KF et al International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma *Eur Respir J* 2014; 43: 343–373
76. Ciprandi G , Klersy C, Marseglia GL, Vizzaccaro A, Pallesstrini E, Tosca M. Role of FEF25-75 as an early marker of bronchial impairment in patients with seasonal allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 2006;20(6):641-7.
77. Ciprandi G, Signori A, Tosca MA, Cirillo I. Bronchodilation test in patients with allergic rhinitis. *Allergy*. 2011;66(5):694-8
78. Collins SA, Pike KC, Inskip HM, et al. Validation of novel wheeze phenotypes using longitudinal airway function and atopic sensitization data in the first 6 years of life: evidence from the Southampton Women’s survey. *Pediatr Pulmonol* 2013; 48: 683–692
79. Compalati E, Ridolo E, Passalacqua G, Braido F, Villa E, Canonica GW. The link between allergic rhinitis and asthma: the united airways disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010 May;6(3):413-23
80. Contreras ZA, Chen Z, Roumeliotaki T, et al. Does early onset asthma increase childhood obesity risk? A pooled analysis of 16 European cohorts. *Eur Respir J*. 2018;52(3):1800504.
81. Dabaghzadeh F, Khalili H, Ghaeli P, Dashti-Khavidaki S. Potential benefits of cyproheptadine in HIV-positive patients under treatment with antiretroviral drugs including efavirenz. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13(18):2613-24
82. Davies DE, Wicks J, Powell RM, et al. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:215–225
83. Davies ER, Kelly JF, Howarth PH, et al. Soluble ADAM33 initiates airway remodeling to promote susceptibility for allergic asthma in early life. *JCI Insight*. 2016;1(11):e87632
84. Deeb AS, Al-Hakeem A, Dib GS. Gastroesophageal reflux in children with refractory asthma. *Oman Med J*. 2010;25(3):218–221

85. Debley JS, Carter ER, Redding GJ. Prevalence and impact of gastroesophageal reflux in adolescents with asthma: a population-based study. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41(5):475-81
86. de Faria IC, de Faria EJ, Toro AA, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. Association of TGFbeta1, CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. *J Pediatr.* 2008;84:203–10
87. de Groot EP, Duiverman EJ, Brand PL. Allergic rhinitis is associated with poor asthma control in children with asthma. *Thorax.* 2012 Jul;67(6):582-7
88. De Marco R, Locatelli F, Cerveri I, et al. Incidence and remission of asthma: a retrospective study on the natural history of asthma in Italy. *J Allergy Clin Immunol* 2002, 110:228–235.
89. Deng R, Zhao F, Zhong X. T1 polymorphism in a disintegrin and metalloproteinase 33 (ADAM33) gene may contribute to the risk of childhood asthma in Asians. *Inflamm Res.* 2017;66:1–12
90. Depner M, Fuchs O, Genuneit J, et al. Clinical and epidemiologic phenotypes of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 129–138
91. Di Genova L, Penta L, Biscarini A, Di Cara G, Esposito S. Children with Obesity and Asthma: Which Are the Best Options for Their Management?. *Nutrients.* 2018;10(11):1634
92. Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P, McCormick M, Woods J, May R, Sleeman MA, Anderson IK, Brightling CE. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest* 2010; 138(5): 1140-1147.
93. EAACI_Advocacy_Manifesto 2016, https://www.eaaci.org/documents/EAACI_Advocacy_Manifesto.pdf
94. El-Falaki MM, Wilson MM, Ezzat GM, Mokhtar DA, Baz MSE, Hamed DH. A disintegrin and metalloproteinase 33 (ADAM33) gene polymorphism association with asthma in Egyptian children. *Egypt J Med Human Genet.* 2013;14:55–62.
95. Eliades N-G, Eliades DG (2009). HAPLOTYPE ANALYSIS: software for analysis of haplotypes data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-Augst University Goettingen, Germany
96. Engelkes M, Baan EJ, de Ridder MAJ, et al. Incidence, risk factors and re-exacerbation rate of severe asthma exacerbations in a multinational, multidatabase pediatric cohort study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2020; 00: 1– 10
97. Engelkes M, Janssens HM, de Ridder MA, Sturkenboom MC, de Jongste JC, Verhamme KM. Real life data on incidence and risk factors of severe asthma exacerbations in children in primary care. *Respir Med.* 2016 Oct;119:48-54

98. Ernst P, Ghezzi H, Becklake MR: Risk factors for bronchial hyperresponsiveness in late childhood and early adolescence. *Eur Respir J* 2002, 20:635– 639
99. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, et al.: Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:418–424
100. Fang L, Chen M, Zhang F, Xin SU, Zhang P, Xin X, Shi Y. Expression of serum ADAM33 in patients with different severity of asthma and the relation to airway chronic inflammation. *J Med Postgraduates*. 2017;30:521–524
101. Ferrante G, La Grutta S. The Burden of Pediatric Asthma. *Front Pediatr*. 2018;6:186.
102. Frith J, Fleming L, Bossley C, Ullmann N, Bush A. The complexities of defining atopy in severe childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2011;41:948–953.
103. Fitzpatrick AM, Teague WG, Meyers DA, Peters SP, Li X, Li H, et al. Heterogeneity of severe asthma in childhood: confirmation by cluster analysis of children in the National Institutes of Health/ National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:382-9.e1-13;
104. Flaherman V, Rutherford GW. A meta-analysis of the effect of high weight on asthma. *Arch Dis Child* 2006; 91:334–339. ;
105. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, et al. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax* 2012; 67: 675–681
106. Fuseini H, Newcomb DC. Mechanisms Driving Gender Differences in Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(3):19
107. Garden FL, Simpson JM, Mellis CM, Marks GB for the CAPS Investigators Change in the manifestations of asthma and asthma-related traits in childhood: a latent transition analysis *ERJ Express*. doi: 10.1183/13993003.00284-2015
108. Gelardi M, Bosoni M, Morelli M, et al. In children allergic to ragweed pollen, nasal inflammation is not influenced by monosensitization or polysensitization. *J Inflamm Res*. 2016;9:21–25
109. Geller G, Tambor ES, Bernhardt BA, Fraser G, Wissow LS. Informed consent for enrolling minors in genetic susceptibility research: a qualitative study of at-risk children's and parents' views about children's role in decision-making. *J Adolesc Health*. 2003;32(4):260-71
110. Ghani MU, Sabar MF, Bano I, et al. Evaluation of ADAM33 gene's single nucleotide polymorphism variants against asthma and the unique pattern of inheritance in Northern and Central Punjab, Pakistan. *Saudi Med J*. 2019;40(8):774–780
111. Giavina-Bianchi P, Aun MV, Takejima P, Kalil J, Agondi RC United airway disease: current perspectives. *J Asthma Allergy*. 2016; 9: 93–100

112. Giebeler N, Zigrino P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins* 2016; 8(4):122
113. Global Initiative for Asthma (GINA) Guidelines 2019 - www.ginasthma.org
114. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, et al.: Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002, 57:875– 879
115. Greydanus DE , Agana M , Kamboj MK , et al. Pediatric obesity: current concepts. *Dis Mon* . 2018;64(4):98–156
116. Godava M, Kopriva F, Bohmova J, Vodicka R, Dusek L, Cvanova M, Muzik J, Markova M, Schneiderova E, Vrtel R. Association of STAT6 and ADAM33 single nucleotide polymorphisms with asthma bronchiale and IgE level and its possible epigenetic background. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012;156:236–47
117. Gross E, Lee DS, Hotz A, Ngo KC, Rastogi D. Impact of Obesity on Asthma Morbidity During a Hospitalization. *Hosp Pediatr*. 2018;8(9):538–546
118. Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998;282(5397):2261-3
119. Guerra SD, Martinez FD, Barbee RA. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(3):419-25
120. Gupta S , Lodha R , Kabra SK . Asthma, gerd and obesity: triangle of inflammation. *Indian J Pediatr*. 2018;85(10):887–892
121. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178: 218-24
122. Harding SM, Richter JE, Guzzo MR, Schan CA, Alexander RW, Bradley LA, et al. Asthma and gastroesophageal reflux: Acidsuppressive therapy improves asthma outcome. *Am J Med* 1996;100:395-405
123. Harrison P, Duggan W, Preddy J, Moline A, Asthmatic children from lower-income families are less likely to own an individualised asthma action plan. *J Paediatr Child Health*, 2020 56: 194-200
124. Henderson J, Granell R, Heron J, et al. Associations of wheezing phenotypes in the first 6 years of life with atopy, lung function and airway responsiveness in mid-childhood. *Thorax* 2008; 63: 974–980
125. Hirota N, Martin JG Mechanisms of airway remodeling, *Chest* 2013; 144: 1026–1032
126. Hirota T, Hasegawa K, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Shirakawa T, Doi S, Fujita K, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari Association between ADAM33

- polymorphisms and adult asthma in the Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(7):884–891
127. Hernandez-Pacheco N, Pino-Yanes M, Flores C. Genomic Predictors of Asthma Phenotypes and Treatment Response. *Front Pediatr* 2019;7:6
128. Herrera-Luis E, Hernandez-Pacheco N, Vijverberg SJ, Flores C, Pino-Yanes M. Role of genomics in asthma exacerbations. *Curr Opin Pulm Med.* 2019; 25:101–12. 10.1097/MCP.0000000000000533
129. Hersoug LG, Linneberg A. The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance? *Allergy.* 2007;62:1205–13
130. Holguin F The atopic march: IgE is not the only road, *The Lancet Respiratory Medicine*; 2014: 2(2) 88-90
131. Holgate ST, Davies DE, Powell RM, Holloway JW ADAM33: a newly identified protease involved in airway remodeling. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19(1):3-11.
132. Horak E, Lanigan A, Roberts M, et al.: Longitudinal study of childhood wheezy bronchitis and asthma: outcome at age 42. *BMJ* 2003, 326:422–423
133. Hovland V, Riiser A, Mowinckel P, Carlsen KH, Lødrup Carlsen KC The significance of early recurrent wheeze for asthma outcomes in late childhood *Eur Respir J* 2013; 41 (4): 838-845
134. Howard TD, Postma DS, Jongepier H, Moore WC, Koppelman GH, Zheng SL, Xu J, Bleecker ER, Meyers DA Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:717-722
135. Howrylak J, Fuhlbrigge AL, Strunk RC, Zeiger RS, Weiss ST et al Classification of childhood asthma phenotypes and long-term clinical responses to inhaled anti-inflammatory medications *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1289-300.
136. Hu FB, Persky V, Flay BR et al. Prevalence of asthma and wheezing in public schoolchildren: association with maternal smoking during pregnancy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997; 79:80–4.
137. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Grüber C et al Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study.*Lancet*, 2006; 368: 763–70
138. Ing A, Cough and gastro-oesophageal reflux disease. *Pulm Pharmacol Ther* 2004, 17:403-413.

139. Ingebrigtsen TS, Marott JL, Vestbo J, Nordestgaard BG, Hallas J, Lange P Gastroesophageal reflux disease and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease *Respirology* 2015; 20, 101–107
140. Irvin C, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska MM, Martin RJ, Alam R. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2014; 134(5): 1175-1186 e1177.
141. Irwin RS, Curley FJ, French CL. Difficult-to-control asthma. Contributing factors and outcome of a systematic management protocol. *Chest* 1993;103:1662-9
142. Irwin RS, Richter JE Gastroesophageal reflux and chronic cough *The American Journal of Gastroenterology* 2000; 95(8), Suppl 1: S9–S1
143. Jain R, Ray JM, Pan JH, Brody SL Sex hormone-dependent regulation of cilia beat frequency in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012; 46(4):446-53
144. Jang AS, Lee JH, Park SW, et al. Severe airway hyperresponsiveness in school-aged boys with a high body mass index. *Korean J Intern Med* 2006; 21:10–14
145. Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH, Zheng SL, Meyers DA, Bleeker ER, Postma DS. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:757-760
146. Jorgensen IM, Bulow S, Jensen VB, et al. Asthma mortality in Danish children and young adults, 1973–1994: epidemiology and validity of death certificates. *Eur Respir J*, 2000, 15:844–848;
147. Juel CT, Ali Z, Nilas L, Ulrik CS, Asthma and obesity: does weight loss improve asthma control? a systematic review. *J Asthma Allergy* 2012,5:21–26
148. Just J, Saint-Pierre P et al. Wheeze phenotypes in young children have different courses during the preschool period, *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013 Oct;111(4):256-261.e1
149. Just J, Deslandes-Boutmy E, Amat F, Desseaux K et al. Natural history of allergic sensitization in infants with early-onset atopic dermatitis: results from ORCA Study. *Pediatr Allergy Immunol* 2015; 25: 668–673
150. Just J, Clinical phenotypes, presented at symposium 24 A different approach to asthma phenotypes in children, EAACI 2016
151. Kanemitsu Y, Niimi A, Matsumoto H, Iwata T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Nagasaki T, Izuhara Y, Petrova G, Birring SS, Mishima M. Gastroesophageal dysmotility is

- associated with the impairment of cough-specific quality of life in patients with cough variant asthma. *Allergol Int.* 2016 Jul;65(3):320-6
152. Kang HY PC, Bang HR, Sazonov V, Kim CJ. Effect of allergic rhinitis on the use and cost of health services by children with asthma. *Yonsei Med J* 2008 Aug;49(4):521-9.;
153. Karbasi A, Ardestani ME, Ghanei M, Harandi AA. The association between reflux esophagitis and airway hyper-reactivity in patients with gastro-esophageal reflux. *J Res Med Sci* 2013;18:473-6
154. Karimi MR, Faridhosseini R, Abbaszadegan MR, Azad FJ, Shirvani A, Riyahi A, et al. Association of ADAM33 gene polymorphisms with allergic asthma. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17(9):716-21
155. Keller T, Hohmann C, Standl M, Wijga AH, Gehring U, Melén E, et al. The sex-shift in single disease and multimorbid asthma and rhinitis during puberty—a study by MeDALL. *Allergy.* 2018;73(3):602–14
156. Kercksmar CM , Shipp C . Management/comorbidities of school-aged children with asthma. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2019;39(2):191–204
157. Kerzel S, Dehne J, Rogosch T, Schaub B, Maier RF, Zemlin M. Th17 cell frequency in peripheral blood from children with allergic asthma correlates with the level of asthma control. *J Pediatr.* 2012;161(6):1172–1174
158. Kim C-W, Lee C-W, Hur G-Y, Ye Y-M, Park H-S, Group CS. Evaluation and control of allergic rhinitis in adult patients with asthma (CARINA) in Korea. *Korean J Asthma, Allergy Clin Immunol.* 2007;27(4):248–56
159. Kiljander TO. The role of proton pump inhibitors in the management of gastroesophageal reflux disease-related asthma and chronic cough. *Am J Med* 2003;115(Suppl3A):65S-71S.
160. Kiotseridis H CC, Bjermer L, Aurivillius M, Jacobsson H, Dahl Å, Tunsäter A. Quality of life in children and adolescents with respiratory allergy, assessed with a generic and disease-specific instrument. *Clin Respir J.* 2013 Apr;7(2):168-75
161. Kokkonen J, Linna O. The state of childhood asthma in young adulthood. *Eur Respir J* 1993;6:657-61
162. Konig P, Irreversible airway obstruction in childhood asthma? A clinician's viewpoint. *Pediatr Pulmonol* 2002, 33:307–310
163. Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, Wang Y, Bernstein X, Li JT, Atabai K, Huang X, Sheppard D. IL-17A produced by alpha T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nature medicine* 2012; 18(4): 547-554

164. Kumar P, Singh G, Goyal JP, Khera D, Singh K. Association of common comorbidities with asthma in children: a cross-sectional study. *Sudan J Paediatr.* 2019;19(2):88–92
165. Kung YM, Tsai PY, Chang YH, et al. Allergic rhinitis is a risk factor of gastro-esophageal reflux disease regardless of the presence of asthma. *Sci Rep.* 2019;9(1):15535
166. Kurukulaaratchy RJ, Fenn MH, Waterhouse LM, et al.: Characterization of wheezing phenotypes in the first 10 years of life. *Clin Exp Allergy* 2003, 33:573–578
167. Kynnyk JA, Mastronarde JG, McCallister JW Asthma, the sex difference. *Curr Opin Pulm Med.* 2011 Jan; 17(1):6-11
168. Lang A, Carlsen KH, Haaland G, Devulapalli CS, Munthe-Kaas M, Mowinckel P, et al. Severe asthma in childhood: assessed in 10 year olds in a birth cohort study. *Allergy.* (2008) 63:1054–60
169. Lang DM, Severe asthma: epidemiology, burden of illness, and heterogeneity. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(6):418-24
170. Lang JE, Hossain J, Smith K, Lima JJ: Asthma severity, exacerbation risk, and controller treatment burden in underweight and obese children. *J Asthma* 2012, 49(Suppl 5):456–463
171. Langmack EL, Martin RJ Heterogeneity of response to asthma controller therapy: clinical implications *Curr Opin Pulm Med.* 2010;16:13–18
172. Lannero E, Wickman M, Pershagen G, et al. Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life (BAMSE) *Respir Res.* 2006; 7:3
173. Larsson K, Stallberg B, Lisspers K, Telg G, Johansson G, Thuresson M, et al. . Prevalence and management of severe asthma in primary care: an observational cohort study in Sweden (PACEHR). *Respir Res.* 2018; 19:12. 10.1186/s12931-018-0719-x
174. Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Völkel K, Madloch C et al Transient early wheeze is not associated with impaired lung function in 7-yr-old children. *Eur Respir J.* 2003 May;21(5):834-41
175. Lazova S, Petrova G et Velikova Ts. Chapter 6. Th17 Cells in Childhood Asthma. In: Th17 Cells in Health and Disease. Ed. Tsvetelina Velikova, Nova Science Publishers 2020, USA, ISBN: 978-1-53617-152-5.
176. Le Bourgeois M, Goncalves M, Le Clainche L, et al. Bronchoalveolar cells in children ,3 years old with severe recurrent wheezing. *Chest* 2002; 122: 791–797
177. Lee YH, Song GG Association between ADAM33 T1 polymorphism and susceptibility to asthma in Asians. *Inflammation Research* 2012; 61(12): 1355-1362

178. Leung DY, Bloom JW: Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111:3–22
179. Li HF, Yan LP, Wang K, Li XT, Liu HX, Tan W. Association between ADAM33 polymorphisms and asthma risk: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res.* 2019;20(1):38
180. Liang S, Wei X, Gong C, Wei J, Chen Z, Deng J. A disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis. *Hum Immunol* 2013; 74(5):648-57
181. Licari A, Castagnoli R, Denicolò CF, Rossini L, Marseglia A, Marseglia GL. The Nose and the Lung: United Airway Disease? *Front Pediatr.* 2017;5:44
182. Lind D, Choudhry S, Ung N, Ziv E, Avila PC, Salari K, Ha C, Lovins EG, Coyle NE, Nazario S, et al. ADAM33 Is Not Associated with Asthma in Puerto Rican or Mexican Populations, *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(11): 1312-1316
183. Lu KD, Billimek J, Bar-Yoseph R, Radom-Aizik S, Cooper DM, Anton-Culver H. Sex differences in the relationship between fitness and obesity on risk for asthma in adolescents. *J Pediatr.* 2016;176:36-42.
184. Lucas SR, Platts-Mills TA. Paediatric asthma and obesity. *Paediatr Respir Rev* 2006; 7:233–238
185. Lv J. Correlation of ADAM33 V4 gene polymorphism、 vitamin D levels with asthma children in Urumqi [Master's degree]. Xinjiang Med Univ. 2017
186. Mahdavinia M, Bishehsari F, Hayat W, et al. Prevalence of allergic rhinitis and asthma in patients with chronic rhinosinusitis and gastroesophageal reflux disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;117(2):158–162.e1
187. Mahut B, Beydon N, Delclaux C. Overweight is not a comorbidity factor during childhood asthma: the GrowthOb study. *Eur Respir J.* 2012;39(5):1120-6
188. Maltz L, Matz EL, Gordish-Dressman H, et al. Sex differences in the association between neck circumference and asthma. *Pediatr Pulmonol.* 2016;51(9):893-900
189. March ME, Sleiman PM, Hakonarson H. “The genetics of asthma and allergic disorders”, *Discov Med* 2011; 11(56):35-45
190. Marseglia GL, Vizzaccaro A, Klersy C, Tosca MA, La Rosa M, Marseglia A, Licari A, Leone M, Ciprandi G. Role of forced expiratory flow at 25-75% as an early marker of small airways impairment in subjects with allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 2007;28(1):74-8

191. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Eng J Med* 1995; 332: 133–138
192. Martinez FD, Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2003, 22(suppl 2):S76–S82
193. Martinez FD, Vercelli D Asthma *Lancet* 2013;382(9901):1360-72
194. Masaki T, Yoshimatsu H. Neuronal histamine and its receptors: implication of the pharmacological treatment of obesity. *Curr Med Chem.* 2010;17(36):4587-92
195. Matricardi PM, Gru"ber C, Wahn U, Lau S. The asthma-obesity link in childhood: open questions, complex evidence and a few answers only. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:476–484
196. McKeigue PM. Efficiency of estimation of haplotype frequencies: Use of marker phenotypes of unrelated individuals versus counting of phase-known gametes. *Am J Hum Genet.* 2000;67:1626–7
197. McLean WH, Palmer CN, Henderson J, et al. Filaggrin variants confer susceptibility to asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1294–1295
198. Mierzejewska A, Jung A, Kalicki B. Nasal Cytology as a Marker of Atopy in Children. *Dis Markers.* 2017;2017:4159251
199. Miller RL, Garfinkel R, Horton M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke, and respiratory symptoms in an inner-city birth cohort. *Chest.* 2004; 126:1071–8
200. Mincheva R, Ekerljung L, Bossios A, Lundback B, Lotvall J. High prevalence of severe asthma in a large random population study. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141:2256–64.e2. 10.1016/j.jaci.2017.07.047
201. Mitchell I, Tough SC, Semple LK, et al.: Near-fatal asthma: a population-based study of risk factors. *Chest* 2002, 121:1407–1413
202. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med,* 2010; 363, 1211–1221
203. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S. et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 2007; 448, 470–473
204. Mommers M, Swaen GM, Weishoff-Houben M, et al. . Differences in asthma diagnosis and medication use in children living in Germany and the Netherlands. *Prim Care Respir J* 2005; 14: 31–37

205. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:315-23. 20-22
206. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2001; 108(3): 430-438
207. Morahan G, Huang D, Wu M, et al.: Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet* 2002; 360:455–459
208. Mormile M, Mormile I, Palladino F, Molino A, Ruggiero S, Telesca DA, Cappello C, Sivero L. Gastro-esophageal reflux disease influence on asthma symptoms: assessment of non-responder to the standard treatment *Minerva pneumol* 2015;54:157-9
209. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50
210. Mullol JVA, Alobid I, Bartra J, Navarro AM, Chivato T, Khaltaev N, Bousquet J. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma update (ARIA 2008). The perspective from Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2008;18(5):327-34
211. Nakaji H, Petrova G, Matsumoto H, Iwata T, Ito I, Oguma T, et al. Effects of 24-week add-on treatment with ciclesonide and montelukast on small airways inflammation in asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2013;110(3):198-203 e3
212. Nakagawa K, Tomikashi K, Takashima H, Kanemitsu D, Sugimoto K, Iwase A, Abe Y, Nozuchi S. Case of severely disabled child with refractive respiratory infection due to gastroesophageal reflux successfully controlled by using a button-shaped double lumen transgastric jejunal feeding tube *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi.* 2009;106(1):49-55.
213. Newcomb DC, Peebles RS Jr. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(6):755–760
214. Nordlund B, Melen E, Schultz ES, Gronlund H, Hedlin G, Kull I. Prevalence of severe childhood asthma according to the WHO. *Respir Med.* 2014;108:1234–7. 10.1016/j.rmed.2014.05.015
215. Oswald H, Phelan PD, Lanigan A, Hibbert M, Bowes G, Olinsky A. Outcome of childhood asthma in mid-adult life. *BMJ* 1994;309:95-96
216. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen K-H, et al. International Consensus On (ICON) Pediatric Asthma. *Allergy.* 2012;67(8):976-997. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02865.x.

217. Papoutsakis C et al Childhood overweight/obesity and asthma: is there a link? A systematic review of recent epidemiologic evidence. *J Acad Nutr Diet*. 2013;113(1):77-105
218. Park JS, Son JH, Park CS, Chang HS. Clinical Implications of Single Nucleotide Polymorphisms in Diagnosis of Asthma and its Subtypes. *Yonsei Med J*. 2019;60(1):1–9
219. Payne DN, Wilson NM, James A, et al. Evidence for different subgroups of difficult asthma in children. *Thorax* 2001; 56: 345–350
220. Pearson JP, Parikh S, Orlando RC, Johnston N, Allen J, et al. Review article: reflux and its consequences--the laryngeal, pulmonary and oesophageal manifestations. Conference held in conjunction with the 9th International Symposium on Human Pepsin (ISHP) Kingston-upon-Hull, UK, 21-23 April 2010. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011; 33: 1-71
221. Petrova G, H. Matsumoto et al Association between ADAM33 polymorphisms and asthma control, *Eur Resp Journal*, 2013; 42, S57: 298s, P1393
222. Pianosi PT, Davis HS. Determinates of physical fitness in children with asthma. *Pediatrics* 2004; 113:e225–e229
223. Pilic D, Frohlich T, Noh F et al. Detection of gastroesophageal reflux in children using combined multichannel intraluminal impedance and pH measurement: Data from the German Pediatric Impedance Group. *J. Pediatr* 2011;158:650-654
224. Poon AH, Houseman EA, Ryan L, Sparrow D, Vokonas PS, Litonjua AA. Variants of asthma and chronic obstructive pulmonary disease genes and lung function decline in aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69:907-13.
225. Postma DS, Howard T. ADAM33 gene: confirming a gene without linkage. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1-3
226. Priest N, Roseby R, Waters E, et al. Family and carer smoking control programmes for reducing children’s exposure to environmental tobacco smoke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008: CD001746
227. Raby BA, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Lange C, Lazarus R, Weiss ST. ADAM33 polymorphisms and phenotype associations in childhood asthma” *J Allergy Clin Immunol* 2004, 113:1071-1078
228. Radon K, Schulze A. Adult obesity, farm childhood, and their effect on allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:1279–83.
229. Raedler D, Ballenberger N, Klucker E, Beock A et al Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:81-91
230. Ramasamy A, Kuokkanen M, Vedantam S, Gajdos ZK, Couto Alves A, Lyon HN et al. Genome-wide association studies of asthma in population-based cohorts confirm known

and suggested loci and identify an additional association near HLA. *PLoS ONE* 2012; 7, e44008

231. Rao KS, Paul A, Kumar AS, et al. Allele and genotype distributions of DNA repair gene polymorphisms in South Indian healthy population. *Biomark Cancer*. 2014;6:29–35. Published 2014 Dec 7. doi:10.4137/BIC.S19681

232. Rao CK, Moore CG, Bleecker E, Busse WW, Calhoun W, Castro M, Chung KF, Erzurum SC, Israel E, Curran-Everett D, Wenzel SE Characteristics of perimenstrual asthma and its relation to asthma severity and control: data from the Severe Asthma Research Program., *Chest*. 2013 Apr; 143(4):984-992

233. Rastogi D, Pediatric obesity-related asthma: A prototype of pediatric severe non-T2 asthma *Pediatric Pulmonology*. 2020;1–9

234. Ratliff JC, Barber JA, Palmese LB, Reutenauer EL, Tek C. Association of prescription H1 antihistamine use with obesity: results from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Obesity* (Silver Spring). 2010;18(12):2398–2400. doi:10.1038/oby.2010.176

235. Régnier SA, Huels J. Association between respiratory syncytial virus hospitalizations in infants and respiratory sequelae: systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(8):820-6.

236. Rochat MKIS, Ege MJ, Lau S et al. Allergic rhinitis as a predictor for wheezing onset in school-aged children. *J Allergy Clin Immunol* 2010 Dec;126(6):1170-5.

237. Rusconi F, Fernandes RM, Pijnenburg MWH, Grigg J, Collaboration SCR. European Lung Foundation severe asthma patient advisory g. The Severe Paediatric Asthma Collaborative in Europe (SPACE) ERS Clinical Research Collaboration: enhancing participation of children with asthma in therapeutic trials of new biologics and receptor blockers. *Eur Resp J*. 2018; 52:1801665

238. Russell RJ, Brightling C. Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clin Sci (Lond)*. 2017 ;131(14):1723-1735

239. Ryssing E, Flensburg EW. Prognosis after puberty for 442 asthmatic children examined and treated on specific allergologic principles. *Acta Paediatr*. 1963 Jan;52:97–105

240. Sandur V, Muruges M, Banait V, Rathi PM, Bhatia SJ, Joshi JM, et al. Prevalence of gastro-esophageal reflux disease in patients with difficult to control asthma and effect of proton pump inhibitor therapy on asthma symptoms, reflux symptoms, pulmonary function and requirement for asthma medications. *J Postgrad Med* 2014;60:282-6

241. Savenije OE, Granell R, Caudri D, et al. Comparison of childhood wheezing phenotypes in 2 birth cohorts: ALSPAC and PIAMA. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1505–1512
242. Schedel M, Depner M, Schoen C, et al. The role of polymorphisms in ADAM33, a disintegrin and metalloprotease 33, in childhood asthma and lung function in two German populations. *Respir Res.* 2006;7(1):91
243. Schurman SH, Bravo MA, Innes CL, et al. Toll-like Receptor 4 Pathway Polymorphisms Interact with Pollution to Influence Asthma Diagnosis and Severity. *Scientific Reports.* 2018;8:12713
244. Simpson A, Maniatis N, Jury F, Cakebread JA, Lowe LA, Holgate ST, Woodcock A, Ollier WE, Collins A, Custovic A, Holloway JW, John SL. Polymorphisms in a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) predict impaired early-life lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:55–60
245. Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma? *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(6):1202-5
246. Shaaban R ZM, Soussan D, Neukirch C, Heinrich J, Sunyer J, Wjst M, Cerveri I, Pin I, Bousquet J, Jarvis D, Burney PG, Neukirch F, Leynaert B. Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study. *Lancet.* 2008;372(9643):1049-57
247. Shepherd R, Wren J, Evans S, Lander M, Ong T: Gastroesophageal reflux in children. Clinical profile, course and outcome with active therapy in 126 cases. *Clin Pediatr (Phila)* 1987, 26:55-60
248. Sinha R, Lahiry S, Ghosh S. Suboptimal compliance to aerosol therapy in pediatric asthma: A prospective cohort study from Eastern India. *Lung India.* 2019;36(6):512–518
249. Smith JA, Drake R, Simpson A, et al. Dimensions of respiratory symptoms in preschool children: population-based birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1358–1363
250. Sontag SJ, O’Connell S, Khandelwal S, Miller T, Nemchausky B, Schnell TG, et al. Most asthmatics have gastroesophageal reflux with or without bronchodilator therapy. *Gastroenterology* 1990;99:613-20
251. Stein RT, Holberg CJ, Morgan WJ, et al. Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood. *Thorax.* 1997;52(11):946–952
252. Stevenson EC, Turner G, Heaney LG, et al. Bronchoalveolar lavage findings suggest two different forms of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1027–1035

253. Stoltz DJ, Jackson DJ, Evans MD, Gangnon RE, Tisler CJ et al Specific patterns of allergic sensitization in early childhood and asthma & rhinitis risk. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(2):233-41
254. Stordal K et al Asthma and overweight are associated with symptoms of gastro-oesophageal reflux *Acta Paediatrica* 2006;95(10): 1197–1201
255. Sun FJ, Zou LY, Tong DM, Lu XY, Li J, Deng CB. Association between ADAM metalloproteinase domain 33 gene polymorphism and risk of childhood asthma: a meta-analysis. *Braz J Med Biol Res*. 2017;50(10):e6148
256. Sunadome H, Matsumoto H, Petrova G, Kanemitsu Y, Tohda Y et al. IL4R α and ADAM33 as genetic markers in asthma exacerbations and type-2 inflammatory endotype. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(8):998-100
257. Szeffler SJ, Chmiel JF, Fitzpatrick AM, Giacoia G, Green TP et al Asthma across the ages: knowledge gaps in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan;133(1):3-13; quiz 14
258. Szeffler SJ Asthma across the lifespan: Time for a paradigm shift. *J Allergy Clin Immunol*. 2018; 142(3):773-780
259. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD Estradiol increases mucus synthesis in bronchial epithelial cells. *PLoS One*. 2014; 9(6):e100633
260. Tantisira KG, Complex interactions In Complex traits: Obesity and Asthma. *Thorax*. 2001;56(Suppl II):ii64-ii74
261. Tay TR, Lee JWY, Hew M Diagnosis of severe asthma, *Med J Aust* 2018; 209 (2): S3-S10
262. Teague WG, Phillips BR, Fahy JV, et al. Baseline Features of the Severe Asthma Research Program (SARP III) Cohort: Differences with Age. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(2):545–554.e4.
263. Tsai HJ, Wang G, Hong X, et al. Early Life Weight Gain and Development of Childhood Asthma in a Prospective Birth Cohort. *Ann Am Thorac Soc*. 2018;15(10):1197–1204
264. Tsilochristou OA , Douladiris N , Makris M , et al. Pediatric allergic rhinitis and asthma: can the march be halted? *Paediatr Drugs* . 2013;15(6):431–440
265. Tripathi P, Awasthi S, Prasad R, Husain N, Ganesh S. Association of ADAM33 gene polymorphisms with adult-onset asthma and its severity in an Indian adult population. *J Genet* 2011; 90(2):265-73
266. Ulger Z, Demir E, Tanac R, et al. The effect of childhood obesity on respiratory function tests and airway hyperresponsiveness. *Turk J Pediatr* 2006; 48:43– 50

267. Uphoff EP, Bird PK, Antó JM, et al. Variations in the prevalence of childhood asthma and wheeze in MeDALL cohorts in Europe. *ERJ Open Res.* 2017;3(3):00150-2016
268. van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Schouten JP, Boezen HM. A disintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:329-333
269. van Eerdedewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418, 426-430
270. van Wonderen KE, Geskus RB, van Aalderen WMC, Mohrs J et al. Stability and predictiveness of multiple trigger and episodic viral wheeze in preschoolers *Clinical & Experimental Allergy*, 2016 ;46: 837–847
271. van Huisstede A , Rudolphus A , Castro Cabezas M , et al. Effect of bariatric surgery on asthma control, lung function and bronchial and systemic inflammation in morbidly obese subjects with asthma. *Thorax* . 2015;70(7): 659–667
272. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, et al. Airway remodeling in asthma. *Chest* 2003; 123(suppl 3):417S–422S
273. Vijayakanthi N, Greally JM, Rastogi D. Pediatric Obesity-Related Asthma: The Role of Metabolic Dysregulation. *Pediatrics*. 2016;137(5):e20150812
274. Vishweswaraiah S, Ramachandra NB, Jayaraj BS, et al. Haplotype analysis of ADAM33 polymorphisms in asthma: A pilot study. *Indian J Med Res.* 2019;150(3):272–281
275. von Bulow A, Kriegbaum M, Backer V, Porsbjerg C. The prevalence of severe asthma and low asthma control among Danish adults. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014; 2:759–67
276. Vonk JM, Jongepier H, Panhuysen CI, et al.: Risk factors associated with the presence of irreversible airflow limitation and reduced transfer coefficient in patients with asthma after 26 years of follow up. *Thorax* 2003, 58:322–327
277. Wallace BE, Salser W. Isolation of human germ-line DNA suitable for recombinant DNA studies. *Gene.* 1979;7(3-4):343-7.
278. Wallace DV, Bernstein DI et al. The diagnosis and management of rhinitis: an updated practice parameter. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(2 Suppl):S1-84.
279. Wan YI, Shrine NRG, Soler Artigas M, et al Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma *Thorax* 2012;67:762-768
280. Wang J, Wu Y, Duolikun M. Correlation of asthma with ADAM33 SNP in Uygur and Han children in Urumqi. *J Clin Pediatr.* 2016;34:926–9
281. Wang YH, Voo KS, Liu B, Chen CY, Uygungil B, Spoede W, Bernstein JA, Huston DP, Liu YJ. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce

- inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *The Journal of experimental medicine* 2010; 207(11): 2479-2491
282. Wardlaw AJ, Silverman M, Siva R, Pavord ID, Green R. Multidimensional phenotyping: towards a new taxonomy for airway disease. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1254–1262
283. Watson JD. The human genome revealed. *Genome Res*. 2001;11(11):1803-4.
284. Wentzel SE, Asthma: defining of the persistent adult phenotypes *Lancet* 2006; 368: 804–13
285. Wenzel SE, Severe/fatal asthma. *Chest* 2003, 123(suppl 3):405S–410S
286. Werner M, Herbon N, Gohlke H, Altmüller J, Knapp M, Heinrich J, Wjst M. Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(1):26-31
287. Williams DR, Sternthal M, Wright RJ. Social determinants: taking the social context of asthma seriously. *Pediatrics*. 2009;123 Suppl 3(Suppl 3):S174-S184
288. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998;282(5397):2258-61
289. Xu CF, Lewis K, Cantone KL, Khan P, Donnelly C, White N, et al. Effectiveness of computational methods in haplotype prediction. *Hum Genet*. 2002;110:148–56
290. Yao TC, Kuo ML, See LC, et al.: The RANTES promoter polymorphism: a genetic risk factor for near-fatal asthma in Chinese children. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111;1285–1292
291. Yoshinaka T, Nishii K, Yamada K, Sawada H, Nishiwaki E, Smith K, Yoshino K, Ishiguro H, Higashiyama S. Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. *Gene*. 2002;282(1-2):227-36.
292. Yoo S, Kim HB, Lee SY, Kim BS, Kim JH, Yu JH, et al. Association between obesity and the prevalence of allergic diseases, atopy, and bronchial hyperresponsiveness in Korean adolescents. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154:42–8
293. Yu L, Xu XC, Chen Q, Liang SW, Lv HJ, Qiu ZM Gastro-esophageal reflux induced cough with airway hyperresponsiveness *Int J Clin Exp Med* 2014;7(3):728-735
294. Yu S, Qu S. Relationship between T2 locus polymorphism of ADAM33 gene and bronchial asthma. *Chin J Biochem Pharm*. 2017;37:412–4 416
295. Zeinaly I, Sadeghi-Shabestrai M, Babaloo Z, Razavi A, Sajay-Asbaghi M, Sadigh-Eteghad S, Kazemi T. Investigating the association of ADAM33 single nucleotide polymorphisms (SNPs) with susceptibility to allergic asthma in Azerbaijan population of Iran: a case-control study. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2017;16:378–385

296. Zheng W, Wang L, Su X, Hu XF. Association between V4 polymorphism in the ADAM33 gene and asthma risk: a meta-analysis. *Genet Mol Res Gmr*. 2015;14:989–999
297. Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R al. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 1999 Oct;11(4):473-82
298. Zhang L, Axelsson I, Chung M, Lau J Dose response of inhaled corticosteroids in children with persistent asthma: a systematic review. *Pediatrics* 2011;127:129–138
299. Zhang L. Association between ADAM33, IL-4R genes polymorphisms and 153 childhoods with asthma in Guiyang [Master's degree]. Guizhou Med Univ. 2016. Retrieved from China National Knowledge Infrastructure (1016242357).
300. Zhao B, Li H, Zhang H, Liu Q. Association of polymorphism of V4 and T2 locus alleles in ADAM33 gene with asthma susceptibility. *J Chin Physician*. 2012;4:1596–9
301. Zihlif M, Zihlif N, Obeidat NM, Mahafza T, Froukh T, Ghanim MT, Al-Akhras FM, Naffa R. Association between ADAM33 polymorphisms and susceptibility with adult and childhood asthma among Jordanians. *Genet Testing Mol Biomarkers*. 2014;18:767–74
302. <http://www.asthmasucks.info>
303. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
304. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
305. <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>
306. <https://www.genecalculators.net/>
307. <https://www.histology.leeds.ac.uk/index.php>
308. <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/>
309. <https://www.thermofisher.com/bg/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>
310. <https://www.thermofisher.com/bg/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>;

Как са защитени личните данни?

Личните данни ще се събират и обработват, но само за целите на изследването. Данните от изследването може да бъдат представени по време на медицински конференции или медицински журнали, но Вие няма да бъдете посочвани по име, нито ще бъдете идентифицирани в който и да е доклад или публикация, нито ще има възможност за разкриване на самоличността Ви чрез обратно проследяване на данните.

Как ще се съхраняват моите данни?

Всички писмени и цифрови данни се съхраняват в заключено помещение на Клиниката. Достъпът до тези данни е възможен само за избран персонал, ангажиран в изследването, и само посредством защитен достъп.

Трябва да ли да се включа в изследването?

Решението дали да включите детето, или не, зависи от Вас. Ако решите да участвате, ще Ви бъде предоставен настоящия информационен лист за сведение и ще бъдете помолени да подпишете формуляр за информирано съгласие в края на документа. Ако решите да участвате, можете да се оттеглите по всяко време без да посочвате причина. Това няма да повлияе върху нивото на грижите, които получава Вашето дете.

Кой отговаря за изследването? Проектът е разработка на лекарите в Клиниката по педиатрия на УМБАЛ „Александровска”, под ръководството на проф. Пенка Переновска

Информирано съгласие

Име:.....**Идентификационен код:**.....

Декларация

Моля подпишете

1. Потвърждавам, че прочетох и разбрах *Информацията за Пациента относно клиничното наблюдение* с дата
2. Получих копие от това подписано и датирано *Информирано Съгласие* и прилежащата *Информация за Пациента относно клиничното наблюдение*. Имах време и възможност да задам въпроси относно характера и целите на клиничното наблюдение, както за възможните рискове и ползи, които може да очаквам. Беше ми отговорено изчерпателно на всички въпроси.
3. Бях информиран, че данните на детето ми и моите ще бъдат запазени в тайна.
4. Разбирам, че участието е напълно доброволно и мога да се откажа във всеки един момент без да обяснявам защо. Това няма да се отрази на моето лечение или законови права.

1. Разрешавам да бъде използвана информацията, която произлиза от това клинично наблюдение. Получих подробно обяснение за целите, за които ще бъдат използвани тези данни, както и кой ще има достъп до тях. Като подписвам този документ предоставям възможност за събиране, обработване и транспорт на моите лични данни.

Име на детето (печатни букви): _____

Име на родител (печатни букви) и подпис: _____

Име на родител (печатни букви) и подпис: _____

Декларация на изследователя

Потвърждавам, че дадох разяснения относно характера и целите на това клинично наблюдение, както и за потенциалните рискове и ползи на участника, чието име е написано по-горе.

Подпис на лекаря взел информираното съгласие

дата (ден/месец/година)

Име на изследователя взел информираното съгласие (с печатни букви)

№.2 Въпросник за контрола на астмата: ACQ;

Моля, отговорете на въпроси 1 до 6. Оградете с кръгче цифрата, съответстваща на отговора, който най-добре описва как сте се чувствали през последните 7 дни.

1. *Средно, колко често през последните 7 дни се събуждахте нощем поради Вашата астма?*

- | | |
|----------------------|-----------------------------------|
| 0. Нито веднъж | 4. Много пъти |
| 1. Почти нито веднъж | 5. Твърде много пъти |
| 2. Малко пъти | 6. Не можех да спя поради астмата |
| 3. Няколко пъти | |

2. *Средно, колко тежка през последните 7 дни беше астматична симптоматика, когато се събуждахте сутрин?*

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| 0. Нямах симптоми | 4. Доста тежки симптоми |
| 1. Много слаби симптоми | 5. Тежки симптоми |
| 2. Слаби симптоми | 6. Много тежки симптоми |
| 3. Умерени симптоми | |

3. *Като цяло, през последните 7 дни колко ограничени бяхте в дейностите си поради астмата Ви?*

- | | |
|----------------------------|----------------------|
| 0. Въобще не бях ограничен | 3. Умерено ограничен |
| 1. Много слабо ограничен | 4. Много ограничен |
| 2. Слабо ограничен | 5. Крайно ограничен |
| 6. Напълно ограничен | |

4. *Като цяло, през последните 7 дни почувствахте ли недостиг на въздух поради астмата си?*

- | | |
|----------------|-----------------|
| 0. Не | 4. Доста |
| 1. Много малко | 5. Много |
| 2. Малко | 6. Твърде много |
| 3. Умерено | |

5. Като цяло, колко време през последните 7 дни имахте хрипове в гърдите?

- | | |
|------------------|----------------------|
| 0. Нямах | 4. Доста голяма част |
| 1. Почти нямах | 5. По-голяма част |
| 2. Малка част | 6. През цялото време |
| 3. Известна част | |

6. Средно, през последните 7 дни колко впръсквания/инхалации на бронходилататор, който има бързо действие (например Ventolin/Bricanyl), сте ползвали всеки ден? (Ако не сте сигурни как да отговорите на този въпрос, помолете за помощ)

- | | |
|--|---|
| 0. Нито веднъж | 4. 9-12 впръсквания/инхалации през повечето дни |
| 1. 1-2 впръсквания/инхалации през повечето дни | 5. 13-16 впръсквания/инхалации през повечето дни |
| 2. 3-4 впръсквания/инхалации през повечето дни | 6. Повече от 16 впръсквания/инхалации през повечето дни |
| 3. 5-8 впръсквания/инхалации през повечето дни | |

За попълване от лекуващия персонал

7. FEV1 измерено преди използване на бронходилататор:...Предвидена стойност на FEV1:...Измерена актуална стойност на FEV1 като % от предвидената: (Попълнете върху пунктираната линия стойностите, сравнете със съседната колонка и отбележете къде попада FEV1 % в съседната колона):

- | | |
|--------------------------|------------------------|
| 0. > 95% от предвиденото | 6. < 50% от предвидено |
| 1. 95 - 90% | |
| 2. 89 - 80% | |
| 3. 79 - 70% | |
| 4. 69 - 60% | |
| 5. 59 - 50% | |