

UNIVERSITATEA “LUCIAN BLAGA” DIN SIBIU
Facultatea de Medicin

TEZ DE DOCTORAT

**Aspecte privind evaluarea markerilor inflamației alergice și
imunomodularea în astmul bron ic**

REZUMAT

Coordonator,
Prof. Univ. Dr. MIHAI LEONIDA NEAMȚU

Doctorand,
Adriana Popescu

SIBIU

2015

Cuprins

Introducere.....	5
Lista de abrevieri.....	9
A. PARTEA GENERAL	11
1. Repere definitorii pentru astmul bron ic	12
1.1. Defini ie	12
1.2. Epidemiologie.....	12
1.3. Factorii implica i în dezvoltarea astmului.....	13
1.3.1 Factorii dependen i de organismul gazd	14
1.3.2 Factorii dependen i de mediu.....	14
1.4. Aspecte în diagnosticul i tratamentul astmului bron ic la copil	15
2. Microbiota	18
2.1. Ipoteza igienei.....	18
2.2. Dezvoltarea microbiotei.....	19
2.3. Ecologia microbiotei.....	20
3. Probioticele	22
3.1. Istoric i defini ii probiotice.....	22
3.2. Mecanismele ac iunii probioticelor.....	22
3.2.1. Maturarea barierei intestinale.....	23
3.2.2. Imunomodularea.....	23
3.2.3. Dezvoltarea celulelor dendritice.....	24
3.2.4. Stimularea toll-like receptors.....	24
3.2.5. Produc ia de Treg.....	25
3.3. Beneficiile probioticelor în diverse afecțiuni.....	25
3.3.1. Diareea asociat cu utilizarea antibioticelor.....	25

3.3.2. Diareea infecțioasă	26
3.3.3. Profilaxia diareei c 1 torului.....	27
3.3.4. Boala inflamatorie intestinală	28
3.3.5. Sindromul intestinului iritabil.....	29
3.3.6. Intoleranța la lactoz	30
3.3.7. Cancerul colorectal.....	30
3.3.8. Efecte hipocolesterolemizante.....	31
3.3.9. Vaginoza bacteriană și candidoza vulvovaginală	32
3.3.10. Steatoza hepatică	32
3.3.11. Enterocolita ulcero-necrotică	33
3.3.12. Inhibarea Helicobacter pylori și a altor patogeni intestinali	33
3.3.13. Infecțiile respiratorii.....	34
4. Efectele probioticelor în bolile alergice.....	35
4.1. Studii experimentale in vivo și in vitro.....	35
4.2. Evidențe clinice în boli alergice.....	36
4.2.1. Probioticele în prevenția bolilor alergice.....	36
4.2.2. Probioticele în tratamentul bolilor alergice.....	38
5. Mecanisme imunologice în patogeneza bolilor alergice.....	41
5.1. Sistemul imunitar înnăscut.....	41
5.2. Sistemul imunitar dobândit.....	42
5.3. Diferențierea celulelor T helper.....	43
5.4. Echilibrul Th1/Th2.....	44
5.5. Cascada celulelor implicate în patogeneza astmului.....	45
5.6. Rolul citokinelor în răspunsurile imune și alergice.....	46
5.6.1. Interferonul gamma.....	46

5.6.2. Interleukina-4.....	47
5.7. Imunomodularea cu probiotice.....	48
B. CERCETAREA PERSONAL	51
1. Obiectivele cercetării	52
2. Material de studiu și metodologia de lucru	53
2.1. Loturile de studiu.....	53
2.2. Metodele de diagnostic.....	55
2.3. Analiza statistic	56
3. Rezultate, discuții și concluzii	59
Studiul I: Evaluarea factorilor relevanți pentru dezvoltarea astmului și a markerilor inflamației alergice la pacienții cu astm	59
Studiul II. Evaluarea dinamicii IL-4, Interferonului gamma IFN , Eozinofilelor serice și IgE Totale după tratamentul cu probiotice	138
4. Concluzii generale	150
5. Contribuții personale	153
ANEXE	154
REFERINȚE	159

Introducere

La momentul actual, peste 20% din populația globală suferă de o formă sau alta a unei alergii, cu o prevalență care tinde să crească. Deși etiologia exactă a afecțiunilor alergice rămâne ambiguă, majoritatea cercetătorilor consideră că factorul indispensabil în declanșarea alergiilor este reprezentat de epifenomenul expunerilor la mediul înconjurător.

În lucrarea de față, am pornit de la premiza ipotezei igienei, conform căreia, creșterea tot mai mare în prevalența bolilor alergice apare ca urmare a unei scăderi a expunerii în primii ani de viață la microbi. Contactul cu microorganismele în perioada perinatală este corelat cu reglarea epigenetică a genelor implicate în inflamațiile alergice, conducând la scăderea probabilității de a dezvolta astfel anumite afecțiuni alergice.

Prin contactul timpuriu cu microbi în programarea imunității metabolice, chiar din perioada fetală și a copilăriei, apar noi posibilități de îmbunătățirea stărilor pacientului pediatric și de a reduce ulterior riscul expunerii la diverse boli. Conform ipotezei igienei, dezvoltarea timpurie a sistemului imunitar este influențată atât din punct de vedere calitativ, cât și cantitativ, de bacteriile microbiotei. Microbiota intestinală este extrem de variabilă în răspunsul la dietă și la factorii de mediu, în același timp, guvernează o serie de aspecte ale funcției imune din organism. Rolul bacteriilor din flora intestinală în modularea balanței Th1/Th2 este demonstrat în prezent, ca urmare a realizării unui echilibru între citokinele pro-inflamatorii și anti-inflamatorii.

O mare parte din cercetările în cazul bolilor alergice s-au focusat pe microbiota intestinală, bolile alergice la copii fiind asociate parțial cu dezechilibrele din cadrul microflorei intestinale. În cazul apariției disbiozei, reechilibrarea balanței microbiene poate fi realizată prin administrarea probioticelor, „microorganisme vii care administrate în cantități adecvate conferă un beneficiu real sănătății gazdei”.

Astmul are la bază dereglarea balanței Th1/Th2, în direcția producerii augmentate, de citokine Th2. Interesul pentru potențialul terapeutic al probioticelor în cazul afecțiunilor alergice reiese din faptul că ele îmbunătățesc permeabilitatea intestinală și reduc nivelul citokinelor inflamatorii. Conform ultimelor cercetări, alterarea producției citokinelor Th2, prin inducerea răspunsurilor Th1 poate interveni atât în profilaxia cât și în tratamentul bolilor alergice.

Utilizarea probioticelor în prevenirea sau chiar tratarea patologiei de tip alergic

reprezintă un concept nou. Studiile ultimilor ani au fost îndreptate asupra unei potențiale suplimentări cu probiotice a nutriției pediatrice, unele studii demonstrând un control al răspunsurilor inflamatorii, o modificare a profilului citokinic, a parametrilor spirometrici, sau a evoluției clinice la pacienții alergici de vârstă pediatrică (1).

Cercetarea Personală

Obiectivul principal al lucrării de față a fost studierea markerilor inflamației alergice în ser la pacienții cu wheezing ocazional, recurent și mai ales astm, precum și observarea modificărilor induse asupra acestor markeri de tratament imunomodulant cu probiotice. În acest sens, în studiul personal mi-am propus să evaluez factorii relevanți pentru dezvoltarea astmului și markerii inflamației alergice la pacienții cu astm precum și dinamica Interleukinei-4 (IL-4), Interferonului gamma (IFN γ) Eozinofilelor serice și IgE Totale la acești pacienți după tratamentul cu probiotice. Subsecvent acestui obiectiv central, am urmărit realizarea prelucrării statistice a unor parametri importanți în condiționarea diagnosticului astmului și a modificării dinamicii acestor parametri sub tratamentul cu probiotice. Studiul de față are un caracter prospectiv sub aspectul selecției pacienților, investigații și urmăririi lor sub tratament.

Metodologie. Pentru atingerea obiectivelor propuse, a fost selectat un lot de 136 copii de ambe sexe, diagnosticați cu wheezing ocazional, recurent și astm în Spitalul Clinic de Pediatrie Sibiu, Clinica de Pediatrie, în perioada 2013-2015. Recrutarea pacienților a fost efectuată în baza protocolului de studiu, aprobat de Comisia de etică pentru studii clinice, a Spitalului Clinic de Pediatrie.

Cei 136 de pacienți selectați conform randomizării și care au întrunit criteriile de includere, s-au constituit într-un lot la care s-au evaluat factorii relevanți pentru dezvoltarea astmului și a markerilor inflamației alergice la pacienții cu astm (Studiul I);

La acești pacienți s-a făcut o evaluare clinică și paraclinică în vederea stabilirii diagnosticului de wheezing sau astm bronșic conform recomandărilor Ghidurilor Practall (2).

Din cei 136 de pacienți incluși în studiul I, 80 au fost admiși în studiul II, restul neîndeplinind criteriile de complianță necesare pentru a finaliza studiul sau datorită retragerii din studiu, din proprie inițiativă.

Aspecte privind evaluarea markerilor inflamației alergice și imunomodularea în astmul bronșic

Pacienților incluși în studiul II, li s-a administrat zilnic timp de patru săptămâni o combinație de probiotice. Copiii sub 2 ani au primit câte o capsulă pe zi, cei între 2 și 12 ani câte o capsulă de 2 ori pe zi, respectând modul de administrare a preparatului, conform vârstei.

Evaluarea biologică a pacienților care au primit tratament imunomodulant cu probiotice a inclus determinarea eozinofiliei sangvine, prin determinarea tabloului sangvin periferic și a imunoglobulinelor E totale. Pentru evaluarea inflamației alergice s-au determinat din ser nivelul plasmatic al Interleukinei-4 (IL-4) și al Interferonului gamma (IFN- γ). Determinările de laborator s-au făcut în momentul includerii în studiu și au fost repetate după patru săptămâni de tratament. Am ales să evaluez acești parametri înainte și după administrarea de probiotice, pentru că aceștia pot defini profilul inflamator și alergic, corelarea lor putând fi de real folos în conturarea diagnosticului de astm, în contextul clinic corespunzător.

Pacienții au primit o combinație de probiotice care conține 3 tulpini de bacterii. Fiecare capsulă conține 5,04 mg bacterii liofilizate (cel puțin $1,2 \times 10^7$ unități formatoare de colonii din care: $4,5 \times 10^6$ Lactobacillus acidophilus, $3,0 \times 10^6$ Bifidobacterium infantis, $4,5 \times 10^6$ Enterococcus faecium). Excipienți, conținutul capsulei: lactoză, dextrin, amidon de cartof, stearat de magneziu, învelișul capsulei: hipromeloz, dioxid de titan, agenți de gelificare, apă.

Criterii de includere în studiu: vârsta sub 14 ani, consimțământul informat de a fi admisi în studiu, astm bronșic diagnosticat în antecedente, wheezing în antecedente (ocazional sau recurent). Criterii de excludere din studiu: refuzul părintelui sau tutorei legale, afecțiuni congenitale care evoluează cu dispnee expiratorie (mucoviscidoză, deficit de α_1 -antitripsină, deficit de IgA secretor, epilepsia diencefalică, dischinezia traheobronșică, refluxul gastroesofagian), malabsorbție, boli imunologice sau oncologice, malformații congenitale.

Examenul clinic, s-a axat pe anamneză, identificarea factorilor de risc alergizanți și examenul obiectiv în vederea stabilirii gradului de severitate a bolii. Pe baza anamnezei am notat și-au obținut datele referitoare la antecedentele personale patologice de natură alergică, prezența antecedentelor heredo-colaterale de alergii respiratorii, prezența altor manifestări ale atopiei (respiratorii, cutanate), debutul simptomelor.

Examenul de laborator a cuprins următorii parametri: hemoleucograma automată cu

minim 22 parametri, proteina C reactiv , complementul seric, electroforeza proteinelor serice, imunoglobulinele IgM, IgG, IgA, IgE totale, Ig E specifice-panel de 36 alergeni, Interleukina-4 și Interferon gamma, Fe, Ca total, Mg.

Serul pacienților a fost analizat prin metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), pentru Ig E totale, IL-4 și IFN . Pentru determinarea Ig E specifice serice s-a folosit panel mixt de 36 alergeni. Tehnologia CLIA este semicantitativ , cu detecție prin chemiluminiscență și folosește luminometrul CLA-1.

Datele au fost încercate și prelucrate cu ajutorul funcțiilor statistice din SPSS 18.0. S-au folosit testul ANOVA, testul t-Student, Corelația Kruskal-Wallis. Coeficientul de corelație Pearson (r) redă gradul de asociere liniară între două variabile din același grup. În exprimarea grafică a fost utilizat și coeficientul R², care reprezintă pătratul coeficientului Pearson.

Rezultate și discuții

Studiul I. Evaluarea factorilor relevanți pentru dezvoltarea astmului și a markerilor inflamației alergice la pacienții cu astm

Astmul bronșic este o afecțiune complexă care are la bază interacțiunea continuă dintre factorii genetici și de mediu. Incidența sa în creștere în ultimele decade, la copiii de vârstă colară , mai ales în țările dezvoltate, este cel mai probabil explicată prin modificări ale factorilor de mediu. La nivel european, studiile au demonstrat că prevalența astmului a atins un platou în țările dezvoltate, în timp ce, în țările estice, în plină dezvoltare, se observă o creștere tot mai pronunțată a bolilor alergice, și implicit a astmului. Explicațiile acestei creșteri sunt complexe, neexistând o cauză singulară sau o ipoteză unică aplicabilă populației generale. Variabilitatea interindividuală ar putea fi consecința factorilor de mediu, precum dieta, igiena, infecțiile, alergenii și poluarea aerului, în combinație cu factorii genetici.

Din datele demografice prezentate în studiul personal, reiese că vârsta pacienților incluși în studiu a variat între 1 și 14 de ani, 77,9% din pacienți având vârsta între 1-4 ani. Rezultatele obținute sunt similare cu cele găsite în literatura de specialitate în care este raportat debutul astmului bronșic sub vârsta de 5 ani. În ciuda particularităților clinice și dificultăților de explorare care pot fi incriminate în diagnosticarea astmului bronșic la vârstă mică , peste 80% din cazuri de astm bronșic sunt diagnosticate la vârsta precolară . Prevalența crescută la vârste mici a fost înregistrată în studiul ISAAC faza 3, unde s-a observat o creștere

Aspecte privind evaluarea markerilor inflamației alergice și imunomodularea în astmul bronșic

a incidenței alergiilor respiratorii la grupa de vârstă 6-7 ani (3).

Repartiția sezonieră a situat frecvența crescută a internărilor toamna (30,4%), prim vara (28,1%), i iarna (25,2%), datorit faptului c anumiți factori de mediu au activitate diferit în funcție de sezon. Variațiile sezoniere în astm au fost demonstrate, boala având cea mai crescut incidență în luna septembrie. Primavara există o scădere a statusului imunologic i o aglomerare a alergenilor din aer, iar toamna datorit reîntoarcerii în colectivitate apar cazuri mai multe de tulburări respiratorii de tip astmatic. Astmul alergic este frecvent sezonier i se observ mai ales la copii i la adulții tineri. Forma nesezonier poate fi consecința alergiei la pene, la perii animalelor, la acarienii din praf la fungi i alte antigene prezente de obicei în mediul înconjurător (4).

În ceea ce privește expunerea declarativă la pneumoalergeni, din studiul de față reiese c expunerea la praf de cas a dominat în toate subgrupele studiului, aproximativ 40% din copii având contact cu cel puțin unul din alergenii *Dermatophagoides pteronyssinus* sau *Dermatophagoides farinae*. Nu s-au remarcat diferențe semnificative între sexe. Aceste rezultate vin s completeze datele existente în literatură care au demonstrat c expunerea în perioada timpurie a copilăriei la praful de cas este implicat în dezvoltarea astmului, fiind înregistrat un risc relativ de 5 ori mai crescut la cei expuși (5).

În studiul de față, s-a observat o expunere crescută a copiilor la mucegai (20%), un alt alergen important. Literatura sugerează c , în urma expunerii la mucegai, se pot agrava simptomele, chiar pot fi declanșate exacerbările astmatice. Sporii fungici sunt responsabili atât de formele sezoniere, cât i de cele perene ale alergiilor respiratorii (6).

În ceea ce privește expunerea la perii de animale, pe lotul din studiul personal, aceasta a fost întâlnit cu o frecvență de 31,3% la copiii proveniți din mediul rural i de 15% la cei din mediul urban ($p=0,031$). Rolul expunerii i sensibilizării la perii de animale este incert. Studiile sunt controversate, unele, demonstrând c expunerea la acești alergeni conduce la o creștere a riscului de apariție a astmului, iar altele susțin că aceasta expunere este benefică (7).

În studiul de față, din datele prelucrate, a reieșit că diagnosticul de wheezing și astm s-a întâlnit mai frecvent la copiii de sex masculin, (55,9%), sex ratio fiind de 1,27:1. Ținând seama de vârsta populației incluse în studiul de față, rezultatele obținute coincid cu datele existente în literatura de specialitate. Prevalența astmului este aproape de două ori mai mare la băieți decât la fete până la vârsta de 14 ani. Pe măsură ce copiii se maturizează, diferența

dintre sexe se inversează, și în perioada adultă prevalența astmului este mai mare la femei decât la bărbați. Vârsta la care se modifică raportul pare a fi 12 ani, datorită incidenței în creștere a bolilor alergice respiratorii la fete în decada a II-a de vârstă. Au fost propuse mai multe explicații: diametrul mic al căilor aeriene în comparație cu volumul pulmonar la băieți și diferențele imunologice între cele două sexe pot fi cauze ale acestui raport (8).

Din analiza datelor a reieșit că 88,2% din pacienții incluși în studiul personal, provin din mediul urban. Aceste rezultate sunt similare cu datele din literatură care susțin că bolile alergice sunt mai frecvent întâlnite în mediul urban decât în cel rural. Stilul de viață modern a condus la creșterea prevalenței în mediul urban. În numeroase studii s-a dovedit că mediul rural exercită o protecție în ceea ce privește apariția bolilor alergice, expunerea la pneumoalergeni, contactul cu animale, în general stimularea microbiană și alergică a copilului ducând la o dezvoltare mai competitivă a sistemului imun (9). În mediul urban, nivelurile crescute ale emisiilor autovehiculelor, au fost corelate cu o creștere a incidenței afecțiunilor alergice. Poluanții atmosferici sunt considerați factori de risc, dar intervenția acestora în dezvoltarea astmului rămâne încă necunoscută. Totuși, numeroși cercetători consideră mediul urban, prin poluanții atmosferici, ca fiind un factor predispozant mai crescut, față de mediul rural (10).

În studiul personal, antecedentele heredocolaterale de atopie au fost prezente la 49,3% din pacienți, antecedentele alergice la rudele de gradul I (32,4%) putând fi un predictor puternic pentru dezvoltarea astmului. În prezent, literatura recunoaște determinismul genetic în dezvoltarea astmului alergic. Riscul se multiplică dacă există atopie la ambii părinți, atopia pe linie maternă rămânând factorul de risc major pentru astm (11).

Felul nașterii reprezintă un factor predispozant în apariția astmului. Din totalul copiilor incluși în studiul meu, majoritatea au fost născuți natural, totuși 27,9% au fost născuți prin cezariană. Analize recente, au evaluat relația între felul nașterii și incidența astmului la copii. Cercetătorii susțin rolul protectiv al nașterii pe cale naturală, propunând, teorii posibile, în strânsă legătură cu ipoteza igienei: colonizarea timpurie prin transfer bacterian de la mamă, poate ajuta la dezvoltarea postnatală a sistemului imun; o altă posibilă explicație ar fi că, hormonii eliberați în timpul travaliului ar putea prezenta un rol protectiv pentru copil (12).

În studiul personal, 68,4% din copii au fost alptați natural, iar restul participanților la studiu, au fost alimentați artificial sau mixt. După analiza datelor nu s-a realizat o corelație

Aspecte privind evaluarea markerilor inflamației alergice și imunomodularea în astmul bronșic

între tipul de alimentație și diagnostic. În literatura actuală sunt descrise observații contradictorii în ceea ce privește faptul, ca măsură de prevenire a bolilor alergice ale copilului (13).

Din totalul copiilor incluși în studiu, doar 5,1% au fost expuși la fumul de țigară în perioada sarcinii, frecvența expunerii, necorelându-se cu frecvența diagnosticului de astm. În contrast, literatura de specialitate menționează că fumatul în timpul sarcinii crește de 4 ori riscul de apariție a wheezingului și a sensibilizării alergice la copil. Totodată, a fost evidențiată o posibilă afectare ulterioară a funcției pulmonare, cu apariția inflamației bronșice și implicit a astmului bronșic în copilărie (14). În ceea ce privește expunerea postnatală la fumul de țigară, la copiii proveniți din mediul rural fumatul pasiv a fost prezent în procent de peste 30%, rezultat interpretabil, ce poate fi explicat totuși, prin existența unui status socio-economic scăzut și a educației deficitare a părinților.

Evaluarea biologică a relevat că neutrofilele au fost crescute în 49,3% din cazuri, cu o medie semnificativ mai crescută, la copiii peste 6 ani ($6,52$ vs $4,89 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p=0,05$). Valorile medii, în formula leucocitară exprimate procentual, s-au încadrat în limite normale, 40,4% din cazuri au depășit limita de referință. În cazul limfocitelor, valoarea absolută a fost sub limita minimă de referință în 68,4% dintre cazuri; nu s-au înregistrat diferențe semnificative în nici una din subgrupele de analiză. Valorile procentuale ale monocitelor s-au încadrat în intervalul 1,60-17,11%, în 9,6% din cazuri înregistrându-se depășirea limitei maxime de referință (1-12%). În ceea ce privește procentul bazofilelor, 11,8% din totalul pacienților au înregistrat valori procentuale peste limita de referință. Valoarea medie cea mai mare s-a remarcat în grupa pacienților proveniți din mediul rural și la grupa de vârstă sub 4 ani.

Valorile individuale ale procentului de eozinofile, au depășit limita de referință (0-4%) la 56 copii (41,2% din total lot). Pe cazistica studiată, s-au remarcat valori semnificativ mai crescute ale eozinofilelor la copiii proveniți din mediul rural ($p=0,036$), rezultate în neconcordanță cu datele din literatură care consideră mediul rural protectiv în dezvoltarea alergiilor (15). O valoare medie semnificativ mai crescută a procentului de eozinofile a fost înregistrat la sexul feminin 4,38% în timp ce la sexul masculin aceasta a fost de 3,74%, ($p=0,047$), valori în concordanță cu datele din literatură, care consideră eozinofilele un biomarker sex-dependent (16).

Valorile medii ale eozinofilelor la pacienții cu astm bronșic au fost semnificativ mai

crescute, în comparație cu valorile înregistrate la pacienții cu wheezing recurent sau ocazional. Dintre cele 5 tipuri de leucocite din formula leucocitar :

- valorile medii ale limfocitelor au fost semnificativ mai reduse la pacienții cu astm bronhic, apropiindu-se de minimul intervalului de referință ($p=0,001$);
- valorile medii ale eozinofilelor au fost semnificativ mai crescute la copiii cu astm bronhic, excedând maximul intervalului de referință ($p=0,001$);
- cele mai mari valori medii ale bazofilelor s-au întâlnit la copiii cu wheezing ocazional, dar s-au aflat în intervalul de referință al acestui parametru ($p=0,001$).

Funcție de diagnostic, a fost înregistrată o diferență semnificativă a procentelor eozinofilelor între wheezingul recurent și cel ocazional (de 4 ori mai mare), observația fiind consonantă cu datele din literatură care, dincolo de controverse, consideră creșterea numărului de eozinofile ca marker al alergiilor, sau parametru de risc pentru apariția patologiei alergice (17).

După evaluarea relației dintre eozinofile și Ig E totale a rezultat că valorile celor doi markeri au fost slab corelate ($r= +0,194$; $R^2=0,0375$; $p=0,042$), această corelație fiind uneori folosită în diagnosticarea astmului alergic. Cei doi markeri au înregistrat valori crescute, atât în cazul astmului bronhic, cât și în cazul wheezingului recurent, valori concordante cu observațiile din literatură, care se referă la legătura dintre astm și severitatea acestuia și care sunt influențate nu doar de unul, ci de o serie de factori de risc (18).

Numărul de eozinofile și valorile IL-4, au prezentat o corelație directă moderată ($r= +0,670$; $R^2=0,4485$; $p=0,001$) având valori crescute la copiii astmatici. Datele concordă cu rezultatele altor cercetători (Borres et al. – creșterea atât a numărului de eozinofile, cât și a nivelurilor de IL-4 la copiii care au dezvoltat boli alergice, în primii 6 ani de viață) (19).

În contrast cu datele din literatură valorile IFN γ au fost slab corelate direct cu valorile eozinofilelor ($r= +0,226$; $R^2=0,0513$; $p=0,048$). Astmul atopic este caracterizat în plus printr-o corelație între intensitatea inflamației eozinofilice și creșterea concentrației IL-4 cu o scădere în paralel, a producției de IFN γ (20).

Ținând cont de caracterul inflamator al patologiei selectate, nivelurile crescute ale proteinei C reactive (CRP) obținute, sunt în concordanță cu literatura (21). Valorile individuale au avut o varianță amplă, la 31,6% dintre copii CRP a depășit limita maximă de

Aspecte privind evaluarea markerilor inflamației alergice și imunomodularea în astmul bronșic

referin (<10 mg/L). Proteina C reactivă a înregistrat cel mai crescut nivel mediu la copiii cu astm bronșic ($23,0 \pm 7,09$ mg/l), iar cel mai redus la copiii cu wheezing ocazional ($11,59 \pm 7,09$ mg/l). Studiul a arătat asocierea nivelurilor crescute ale CRP seric cu sexul masculin ($14,26$ vs $10,53$ mg/L; $p=0,031$), cu vârsta mai mică de 4 ani ($12,914$ vs $10,31$ mg/L; $p=0,637$) și cu proveniența din mediul urban ($12,65$ vs $12,15$ mg/L; $p=0,925$).

Corelația dintre valorile proteinei C reactivă și nivelurile IgE totale a fost directă, de intensitate moderată, aproximativ 29% dintre copiii au asociat valori crescute ale IgE totale și CRP ($r= +0,288$; $R^2=0,1478$; $p=0,002$), rezultat ce poate fi extrapolat la populația generală. În schimb, evaluând relația dintre nivelurile IL-4 și CRP s-a observat o slabă corelație indirectă.

Sistemul complement (C3) joacă un rol integral în răspunsurile imune ale gazdei. Pe cazistica studiată, valorile individuale s-au încadrat în intervalul 71-210 mg/L, 22,8% dintre acestea au depășit limita maximă de referință și 4,4% limita inferioară (90-180 mg/L). Valorile crescute au fost la sexul feminin, la grupa de vârstă peste 4 ani și la copiii proveniți din mediul rural. Complementul seric C3 a înregistrat cea mai mică valoare medie la copiii cu wheezing recurent ($120,70 \pm 30,39$ mg/l), iar cea mai mare la cei cu astm bronșic ($177,81 \pm 26,79$ mg/l) ($p=0,001$). Nivelurile serice C3 au fost crescute atât la copiii cu astm cât și la cei cu wheezing ocazional, nerealizându-se o corelație directă cu diagnosticul. Literatura de specialitate prezintă corelații pozitive între valorile C3 și severitatea astmului, inițierea și amplificarea răspunsului inflamator putând fi realizat prin activarea cascadei complementului (22).

Evaluarea datelor obținute în studiul personal, a arătat o corelație slabă directă nesemnificativ statistic între valorile IL-4 și C3. Unii cercetători au făcut o legătură între IL-4 și sistemul complement, nivelurile crescute de C3 fiind rezultatul acțiunii citokinelor Th2 implicate în patogeneza astmului (23). Valorile IgE totale s-au corelat semnificativ cu nivelurile C3, 24,9% dintre pacienții cu valori crescute ale IgE înregistrau valori crescute ale complementului seric ($r= +0,249$; $R^2=0,0654$; $p=0,012$).

În ceea ce privește electroforeza proteinelor, valorile individuale ale procentului de albumine, s-au încadrat în intervalul 54-67,80%. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative ale valorilor medii între sexe, grupe de vârstă sau medii de proveniență ($p>0,05$). Dintre globuline, fracțiunea Alfa 2 electroforetică a avut valorile individuale procentuale peste limita maximă de referință (5,9-11%) la 50,7% dintre copiii, variind de la 9,20% la 15,30%.

Diferențe semnificative ale valorilor medii s-au remarcat la sexul masculin (12,11% vs 10,56%; $p=0,048$) și la grupa de vârstă 0-6 ani (11,98 vs 10,85%; $p=0,031$). Nu s-au înregistrat diferențe semnificative ale valorilor medii între medii de proveniență (11,79 vs 12,22%; $p=0,347$). Valorile individuale ale raportului albumine/globuline au excedat valorile de referință (1-2) la 11,8% dintre copii, variind în intervalul 1,27-4,46.

Nivelurile serice ale imunoglobulinelor A și M s-au încadrat în intervalele de referință, valorile individuale ale IgG înregistrând valori peste limita maximă de referință (400-1250 mg/dL) în 41,9% dintre cazuri. Creșterea IgG, ca rezultat al procesului inflamator, poate contribui la diagnosticul serologic de infecție. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între sexe, grupe de vârstă sau medii de proveniență ($p>0,05$). Imunoglobulinele IgA au fost semnificativ mai reduse la pacienții cu astm bronșic ($p=0,001$), rezultate ce concordă cu observațiile din literatură, care susțin că nivelurile de IgA sunt mai scăzute la persoanele alergice (24). Unii autori sugerează că manifestările atopice sunt dependente de maturarea întârziată a producției de IgA (25). În studiul de față, 26% dintre copii au asociat valori crescute ale IgM cu valori reduse ale limfocitelor, rezultate ce pot fi extrapolate la populația generală deoarece corelațiile au fost semnificative din punct de vedere statistic.

În ceea ce privește nivelul IgE totale, în studiul personal, un procent de 36% din pacienți au înregistrat valori peste limita maximă de referință. S-au observat valori medii semnificativ mai crescute la grupa de vârstă peste 4 ani (70,46 vs 48,97 kU/L; $p=0,001$) și la copiii proveniți din mediul urban (59,57 vs 28,81 kU/L; $p=0,001$). Rezultatele nu au arătat nici o corelație semnificativă statistic cu sexul pacienților, antecedentele heredocolaterale, sau tipul de alimentație în primele 6 luni de viață, similar cu opiniile din literatura de specialitate (26).

Am evaluat relația între nivelurile IgE totale și IL-4, acestea corelându-se moderat pozitiv, dar semnificativ statistic ($r= +0,415$; $R^2=0,1725$; $p=0,025$). Concluziile sunt similare cu cele obținute în studii anterioare din literatură, în care s-au raportat niveluri crescute atât a IgE, cât și a IL-4 la pacienții cu astm bronșic (20).

Valorile individuale ale IgE totale s-au corelat cu parametrii formulei leucocitare astfel: direct cu neutrofilele ($r= +0,258$; $R^2=0,0665$; $p=0,006$), eozinofilele ($r= +0,194$; $R^2=0,0375$; $p=0,042$) și bazofilele ($r= +0,197$; $R^2=0,0387$; $p=0,039$) și indirect cu limfocitele ($r= -0,263$; $R^2=0,0692$; $p=0,005$)

Aspecte privind evaluarea markerilor inflamației alergice și imunomodularea în astmul bronșic

Corelațiile au fost moderate ca intensitate, evidențiind faptul că 20-25% dintre copii au asociat valori crescute ale IgE cu valori crescute ale neutrofilelor, eozinofilelor și bazofilelor.

Nivelurile IgE totale sunt crescute la pacienții cu alergii respiratorii, dar pot fi influențate de vârstă, predispoziție genetică, etnie, imunitate și unele etape ale afecțiunilor. Astfel, măsurarea nivelurilor IgE totale, poate avea o valoare limitată ca și test screening pentru bolile alergice (27).

IgE totale pot fi considerate biomarkeri ai stării alergice, în timp ce IgE specifice pot fi utilizate ca și markeri ai răspunsului alergic, mai ales la copii, în cazul căror teste cutanate sunt dificil de realizat. Cercetarea personal arată, după evaluarea IgE specifice, că 87% din pacienții incluși au fost polisensibilizați, restul de pacienți fiind monosensibilizați.

Parametrii inflamației alergice au prezentat următoarele corelații cu scorul total IgE specifici alergeni alimentari:

- eozinofile – moderat corelație directă ($r = +0,299$; $R^2 = 0,0894$; $p = 0,050$);
- IgE totale – moderat corelație directă ($r = +0,484$; $R^2 = 0,2344$; $p = 0,035$);
- IL-4 – slab corelație directă ($r = +0,235$; $R^2 = 0,0552$; $p = 0,575$);
- IFN – slab corelație indirectă ($r = -0,159$; $R^2 = 0,0227$; $p = 0,706$).

Scorul alergenilor alimentari a fost crescut la 16,2% dintre copii și poate fi asociat cu valori crescute ale IgE (AUC=0,917; IC 95%: 0,701-1,133) și IL-4 (AUC=0,625; IC95%: 0,232-1,018).

Parametrii inflamației alergice au prezentat următoarele corelații cu scorul total IgE specifici la alergeni externi:

- eozinofile – slab corelație directă ($r = +0,138$; $R^2 = 0,0190$; $p = 0,640$);
- IgE totale – slab corelație directă ($r = +0,321$; $R^2 = 0,1031$; $p = 0,352$);
- IL-4 – puternic corelație indirectă ($r = -0,997$; $R^2 = 0,9940$; $p = 0,001$);
- IFN – slab corelație indirectă ($r = -0,209$; $R^2 = 0,0437$; $p = 0,653$).

Scorul alergenilor externi a fost crescut la 15,4% dintre copii și poate fi asociat cu valori crescute ale ale IgE (AUC=0,662; IC95%: 0,142-1,182) și IL-4 (AUC=0,617; IC95%: 0,282-0,952).

Parametrii inflamației alergice au prezentat următoarele corelații cu scorul total IgE specifici alergeni interni:

- eozinofile – moderat corelație directă ($r = +0,543$; $R^2 = 0,2948$; $p = 0,001$);
- IgE totale – slab corelație directă ($r = +0,249$; $R^2 = 0,0620$; $p = 0,138$);
- IL-4 – slab corelație directă ($r = +0,190$; $R^2 = 0,0361$; $p = 0,683$);
- IFN – slab corelație indirectă ($r = -0,117$; $R^2 = 0,0136$; $p = 0,664$).

Scorul alergenilor interni a fost crescut la 14,7% dintre copii și a fost asociat cu valori crescute ale eozinofilelor $>1,20\%$ (AUC=0,895; IC95%: 0,797-0,992).

56% dintre pacienți au prezentat simultan sensibilizare la alergeni de interior și de exterior. În cazul pacienților cu sensibilizare la alergeni de interior s-a observat o ușoară predominanță a mediului rural. În prezența sensibilizării la alergeni de exterior se corelează semnificativ cu mediul urban ($p = 0,002$).

Valorile individuale ale IL-4, cu o varianță amplă (242%), s-au încadrat în intervalul 2,82-310 pg/ml. Din totalul pacienților, 78,4% au avut IL-4 crescut semnificativ statistic. ($p = 0,004$) valoarea medie cea mai mare fiind detectată la pacienții cu astm bronșic (16,85 pg/ml, $p = 0,609$). Pe cazistica studiată se remarcă valori medii ușor mai crescute la grupa de vârstă peste 5 ani (18,57 vs 16,12 pg/ml; $p = 0,895$), iar pe sexe valorile medii ale IL-4 au fost aproximativ egale (16,97 vs 16,66 pg/ml; $p = 0,98$).

Valorile individuale ale IL-4 au evidențiat următoarele corelații

- neutrofile – corelație directă slabă ca intensitate, însă rezultatul nu poate fi extrapolat la populația generală ($r = +0,113$; $R^2 = 0,0128$; $p = 0,247$);
- limfocite – corelație indirectă slabă ca intensitate, însă rezultatul nu poate fi extrapolat la populația generală ($r = -0,214$; $R^2 = 0,046$; $p = 0,296$);
- monocite – parametri independenți ($r = -0,102$; $R^2 = 0,0105$; $p = 0,745$);
- eozinofile – moderat corelație directă ($r = +0,670$; $R^2 = 0,4485$; $p = 0,001$);
- bazofile – slab corelație indirectă ($r = -0,130$; $R^2 = 0,0169$; $p = 0,562$).

Corelația directă dintre valorile IL-4 și valorile eozinofilelor chiar dacă este moderată, este semnificativă statistic, relație ce corespunde cu observațiile generale din literatură (28).

Aspecte privind evaluarea markerilor inflamației alergice și imunomodularea în astmul bronșic

IL-4 a realizat următoarele corelații cu markerii biologici care au prezentat diferențe semnificative în funcție de caracteristicile epidemiologice:

- proteina C reactiv – slab corelație indirect ($r = -0,137$; $R^2 = 0,0187$; $p = 0,497$);
- complementul seric – slab corelație direct ($r = +0,141$; $R^2 = 0,0198$; $p = 0,362$);
- calciu – parametri independenți ($r = -0,007$; $R^2 = 0,00005$; $p = 0,976$);
- magneziu – slab corelație indirect ($r = -0,151$; $R^2 = 0,0227$; $p = 0,538$).

Analizând relația dintre nivelurile IL-4 și IgE totale, corelația Pearson evidențiază o moderat corelație direct ($r = +0,415$; $R^2 = 0,1725$; $p = 0,025$), semnificativ din punct de vedere statistic, corelație ce concordă cu datele din literatura de specialitate (29).

Valorile individuale ale IFN- γ cu o varianță amplă (164%) s-au încadrat în intervalul 1,20-40,80 pg/ml. Pe cazuistica studiată se remarcă valori medii ușor mai scăzute la fete (2,90 vs 4,24 pg/ml; $p = 0,511$) și la grupa de vârstă sub 5 ani (3,35 vs 3,90 pg/ml; $p = 0,799$).

Valorile individuale ale IFN- γ corelate cu markerii formulei leucocitare au evidențiat următoarele:

- neutrofile – corelație indirect moderată ca intensitate, semnificativ din punct de vedere statistic ($r = -0,412$; $R^2 = 0,1698$; $p = 0,048$);
- limfocite – corelație direct moderată ca intensitate, semnificativ din punct de vedere statistic ($r = +0,560$; $R^2 = 0,3136$; $p = 0,028$);
- monocite – parametri independenți ($r = +0,0028$; $R^2 = 0,00000005$; $p = 0,999$);
- eozinofile – slab corelație direct ($r = +0,226$; $R^2 = 0,0513$; $p = 0,048$);
- bazofile – slab corelație direct ($r = +0,196$; $R^2 = 0,0385$; $p = 0,332$).

Evaluând relația cu markerii biologici, care au prezentat diferențe semnificative în funcție de caracteristicile epidemiologice, IFN- γ a prezentat următoarele corelații:

- proteina C reactiv – slab corelație indirect ($r = -0,161$; $R^2 = 0,026$; $p = 0,497$);
- complementul seric – parametri independenți ($r = -0,108$; $R^2 = 0,0117$; $p = 0,362$);
- calciu – parametri independenți ($r = -0,06$; $R^2 = 0,0036$; $p = 0,976$);
- magneziu – slab corelație indirect ($r = -0,103$; $R^2 = 0,0106$; $p = 0,538$).

Analizând relația dintre IFN γ și IgE totale, corelația Pearson evidențiază o foarte slabă corelație directă ($r = +0,036$; $R^2 = 0,0013$; $p = 0,673$), ne semnificativ din punct de vedere statistic.

În studiul personal, nivelurile serice ale IL-4 și IFN γ au fost peste limita de detecție în toate subgrupele de diagnostic. Valorile medii ale IL-4 au fost crescute semnificativ în astmul bronșic în timp ce în subgrupele cu diagnostic de wheezing acestea au fost mai scăzute. În contrast nivelurile IFN γ au fost scăzute la pacienții diagnosticați cu astm bronșic. Cei doi parametri au fost indirect corelați, rezultatele fiind compatibile cu observațiile din alte studii (30, 31).

Rezultate și discuții

Studiul II. Evoluția principalilor markeri ai inflamației alergice în dinamică, înainte și după tratamentul cu probiotice

În cazul evaluării pacienților după patru săptămâni de tratament se constată o scădere semnificativă statistic a nivelurilor serice ale IL-4. Astfel, la începutul tratamentului, a fost înregistrată o valoare medie a IL-4 de 16,85 pg/ml, această valoare scăzând pe durata tratamentului până la 6,44 pg/ml, scădere semnificativă statistic ($p = 0,005$).

Evoluția IL-4 și IFN γ este indirect corelată, valorile medii ale IL-4 scăzând cu 10,41 pg/ml, în timp ce ale IFN γ cresc cu 2,42 pg/ml. Conform datelor din literatură tratamentul cu probiotice crește nivelurile IFN γ în paralel cu scăderea nivelurilor IL-4, aceste efecte fiind dependente de tulpina folosită, indicând o modificare a balanței IFN γ și IL-4 (32).

În multe studii clinice a fost evidențiat potențialul probioticelor de a induce eliberarea de citokine Th1, precum IFN γ (33) și de a inhiba producția citokinelor Th2, precum IL-4 (34, 35). Totuși, această modificare a balanței Th1/Th2 în urma tratamentului cu probiotice este controversată (36,37).

Între sexe s-au evidențiat diferențe ale valorilor IL-4 (-17,08 vs -12,62 pg/ml; $p = 0,697$) și creșteri ale valorilor IFN γ (2,38 vs 2,47 ng/ml; $p = 0,963$) mai mari la sexul masculin. Analog, între grupe de vârstă, s-au evidențiat diferențe ale valorilor IL-4 (-16,17 vs -13,61 pg/ml; $p = 0,832$) și creșteri ale valorilor IFN γ (3,15 vs 0,69; $p = 0,208$).

Scăderea valorilor IL-4 și IgE totale este, în ambele cazuri, mai mare la pacienții cu

Aspecte privind evaluarea markerilor inflamației alergice și imunomodularea în astmul bronșic

wheezing recurent comparativ cu cei cu astm bronșic, cea mai redusă scădere fiind înregistrată la pacienții cu wheezing ocazional, diferențele între valorile inițiale și cele înregistrate după administrarea de probiotice fiind semnificativ mai mari în aceste cazuri.

Din punct de vedere statistic, analiza valorilor medii ale markerilor inflamației alergice post-tratament a concluzionat că cele mai mari valori medii ale IgE, eozinofilelor și IL-4 se regăsesc la copiii cu astm bronșic ($p < 0,05$), în timp ce la copiii cu wheezing ocazional s-au remarcat cele mai mari valori medii ale IFN- γ ($p = 0,001$).

Dacă la debutul studiului s-au remarcat corelații semnificative, directe între valorile IgE și numărul de eozinofile ($r = +0,192$; $p = 0,042$), între nivelurile IgE și IL-4 ($r = +0,415$; $p = 0,025$), între numărul eozinofilelor și valorile IL-4 ($r = +0,670$; $p = 0,001$) și indirect între valorile eozinofilelor și valorile IFN- γ ($r = -0,226$; $p = 0,048$), la finalul studiului, corelațiile nu au mai fost semnificative din punct de vedere statistic.

Corelația între scăderea numărului eozinofilelor periferice și cea a nivelurilor IgE totale a fost directă, semnificativă din punct de vedere statistic, însă moderată ca intensitate ($r = +0,278$; $R^2 = 0,0775$; $p = 0,012$). Corelația dintre modificările nivelurilor IFN- γ și IL-4 a fost indirectă, moderată ca intensitate, remarcându-se faptul că 25,6% dintre pacienți au asociat creșterea valorilor IFN- γ cu reducerea nivelurilor IL-4 ($r = -0,256$; $R^2 = 0,0653$; $p = 0,022$).

Raportul valorilor citokinelor IFN- γ /IL-4 inițial, a variat de la 0,006 la pacienții cu wheezing ocazional până la 5,13 la cei cu wheezing recurent, fiind înregistrată diferențe semnificative între valorile medii în funcție de diagnostic ($p = 0,201$). Cea mai mare valoare medie a raportului IFN- γ /IL-4 s-a remarcat la pacienții cu wheezing recurent (0,753 vs 0,389 wheezing ocazional și respectiv 0,465 astm bronșic).

După tratament, raportul valorilor citokinelor IFN- γ /IL-4 a variat de la 0,03 la pacienții cu astm bronșic până la 26,88 la cei cu wheezing recurent, înregistrându-se diferențe semnificative ale valorilor medii în funcție de diagnostic ($p = 0,027$). Cele mai mari valori medii a raportului IFN- γ /IL-4 s-au remarcat la pacienții cu wheezing (2,001 wheezing ocazional vs 2,893 wheezing recurent și respectiv 0,744 astm bronșic).

Concluzii generale

1. Referitor la structura diagnosticului, au predominat astmul bronșic (39,7%) și wheezingul recurent (38,7%).
2. Alergia respiratorie este mai frecventă la pacientul cu vârsta între 1-4ani; de sex masculin; 88,2% din cazuri provin din mediul urban; factorul genetic a fost prezent la 50% din cazuri; expunerea (declarativ) la diferiți pneumoalergeni a situat pe primul loc praful de cas.
3. Nu au putut fi corelate cu dezvoltarea astmului:
 - alimentația (naturală/artificială);
 - expunerea pre sau postnatală la fumul de țigară și nașterea prin cezariană ambele cu procente mai mici decât cele raportate în literatura de specialitate.

Evaluarea biologică a pacientului cu astm bronșic/wheezing recurent a relevat:

4. Eozinofilele, au înregistrat valori crescute peste limita de referință la 41,2% din pacienți, valorile fiind semnificativ mai crescute la: copiii proveniți din mediul rural ($p=0,036$), la sexul feminin ($p=0,047$) și la copiii diagnosticați cu astm bronșic ($p=0,001$);
5. Eozinofilele și IgE totale au înregistrat valori crescute atât în astm cât și în wheezingul recurent, acești doi parametri fiind totuși slab corelați ($r=+0,194$; $R^2=0,0375$; $p=0,042$);
6. Numărul eozinofilelor și nivelurile IL-4, au fost crescute la pacienții diagnosticați cu astm, coeficientul de corelație fiind ridicat ($r=+0,670$; $R^2=0,4485$; $p=0,001$);
7. Proteina C reactivă a fost mai crescută la copiii cu astm, preferând sexul masculin (14,26 vs 10,53 mg/L; $p=0,031$), vârsta < 4 ani (12,91 vs 10,31 mg/L; $p=0,637$) și proveniența din mediul urban (12,65 vs 12,15 mg/L; $p=0,925$); corelându-se direct moderat cu IgE totale la 29% din pacienți ($r=+0,288$; $R^2=0,1478$; $p=0,002$);
8. C3a fost mai crescută la 22,8% din pacienți preferând astmul bronșic, sexul feminin, vârsta > 4 ani și proveniența din mediul rural corelându-se semnificativ direct cu IgE totale la 24,9% din pacienți ($r=+0,249$; $R^2=0,0654$; $p=0,012$);
9. Nivelurile IgA au fost semnificativ mai reduse la copiii cu astm bronșic ($p=0,001$);

10. IgE au înregistrat valori peste limita de referință la 36% din pacienți, cu valori medii mai crescute, semnificative statistic, la vârste >4 ani ($p=0,001$) și la copiii proveniți din mediul urban (59,57 vs 28,81 kU/L; $p=0,001$);
11. Valorile IgE și IL-4 s-au corelat moderat pozitiv dar semnificativ statistic ($r=+0,415$; $R^2=0,1725$; $p=0,025$);
12. Valorile individuale ale IFN γ au avut valori medii u or mai sc zute la fete (2,90 vs 4,24 pg/ml; $p=0,511$) și la grupa de vârst sub 5 ani (3,35 vs 3,90 pg/ml; $p=0,799$);
13. Valorile individuale ale IFN γ au fost corelate slab indirect cu numărul de eozinofile ($r=-0,226$; $R^2=0,0513$; $p=0,048$);
14. Analiza relației dintre IFN γ și IgE totale (corelația Pearson) a evidențiat o foarte slabă corelație indirectă ($r=-0,036$; $R^2=0,0013$; $p=0,673$), nesemnificativ din punct de vedere statistic;
15. A fost relevată o slabă corelație indirectă, între nivelurile eozinofilelor și cele ale IFN γ , însă semnificativ statistic ($r=-0,226$; $R^2=0,0513$; $p=0,048$);
16. Nivelurile serice ale IL-4 și IFN γ au fost peste limita de detecție în toate subgrupele de diagnostic. Valorile medii ale IL-4 au fost mai crescute în astmul bronșic față de wheezing. În contrast nivelurile IFN γ au fost mai mici la pacienții diagnosticați cu astm bronșic. Cei doi parametri au fost indirect corelați, rezultatele fiind compatibile cu observațiile din alte studii;
17. După evaluarea IgE specifice, a fost relevat faptul că, 87% din pacienți au fost polisensibilizați. Spectrul sensibilizărilor îmbracă următorul aspect:
 - Alergeni alimentari-16,2% din pacienți au prezentat sensibilitate crescută, predominant la soia 15% și albuș de ou 10%;
 - Alergeni externi-15,4% din pacienți au prezentat sensibilitate crescută, predominant la *aspergillus* și plop/salcie (12,5%);
 - Alergeni interni-12,5 % din pacienți au prezentat sensibilitate crescută, predominant la *Dermatophagoides pteronissinus* și *farinae* (20%).

Reevaluarea statusului imunologic aferent reacției inflamatorii al pacienților după tratamentul cu probiotice, a oferit date care s pot susține capacitatea de imunomodulare a

acestei terapii constatându-se:

18. Sc derea semnificativ a eozinofilelor (exprimate procentual) de la o valoare medie de 4.03 % la 2,03% ($p=0,05$);
19. Sc derea valorilor medii ale IgE totale s-a corelat semnificativ statistic cu sc derea numărului eozinofilelor ($p=0,05$);
20. Sc derea valorilor medii ale IL-4, semnificativ statistic de la 16,85 pg/ml la 6,44 pg/ml ($p=0,005$);
21. Modificările nivelurilor IL-4 și IFN γ se corelează indirect, IL-4 scade cu 10,41 pg/ml iar IFN γ crește cu 2,42 pg/ml ceea ce ar sugera (în concordanță cu unele studii clinice) că tratamentul cu probiotice ar induce eliberarea de citokine Th1 precum IFN γ și de a inhiba eliberarea de citokine Th2 precum IL-4.

Contribuții personale

În cercetarea de față s-a evaluat profilul biologic al astmaticului, prin determinarea unor parametri biologici relevanți pentru astm (Eozinofile serice, IgE totale, IL-4, IFN γ) analizând și relațiile posibile între aceștia, menite să susțină în plus diagnosticul de astm.

Această teză aduce ca noutăți, sub aspectul contribuției personale originale și cu potențial de valoare pentru practica medicală nemijlocită:

- Evaluarea profilului biologic al pacientului astmatic prin intermediul unor noi parametri (IL-4, IFN γ);
- Corelațiile între diverșii markeri ai inflamației alergice și influențele mediului, ale sensibilizării și ale severității bolii asupra acestor markeri;
- Realizarea evaluării terapiei imunomodulante cu o combinație de probiotice (pornind de la profilul citokinic inițial al pacientului cu astm bronșic/wheezing recurent), evaluare care a relevat sc derea semnificativă a Eozinofilelor, IgE totale și IL-4, și creșterea IFN γ , practic reechilibrarea balanței Th1/Th2.
- Obținerea unor rezultate care sunt încurajatoare privind posibilitatea terapiei de imunomodulare pentru pacienții cu patologie alergică, cu efecte benefice atât în plan clinic cât și biologic care oferă perspective noi pentru managementul pacientului astmatic.

Bibliografie selectiv

1 Fiocchi A, Pawankar R, Cuello-Garcia C, Ahn K, Al-Hammadi S, Agarwal A et al. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *World Allergy Organization Journal*. 2015;8(1):4.

2 Bacharier et al. European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma în childhood: a Practall consensus report. *Allergy* 2008 63(1):5-34.

3 Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006;368:733–743.

4 Randolph C. Seasonality of asthma: a retrospective population study. *Pediatrics*. 2014;134 Suppl 3:165-6.

5 Celedon JC, Milton DK, Ramsey CD, et al. Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2007 Jul;120(1):144–149.

6 Sachin N. Baxi, MD1 and Wanda Phipatanakul. The Role of Allergen Exposure and Avoidance in Asthma MD, MS1 *Adolesc Med State Art Rev*. 2010; 21(1): 57–ix.

7 Mandhane PJ, Sears MR, Poulton R, et al. Cats and dogs and the risk of atopy in childhood and adulthood. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(4):745–750. e744.

8 From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2015. Available from: <http://www.ginasthma.org/>.

9 N. Nicolaou, N. Siddique, A. Custovic Allergic disease in urban and rural populations: Increasing prevalence with increasing urbanization *Allergy* 2005; 60(11): 1357–1360.

10 Adler A, Tager I, Quintero DR. Decreased prevalence of asthma among farm reared children compared with those who are rural but not farm-reared. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:67–73

11 Bjerg A, Hedman L, Perzanowski M, Platts-Mills T, Lundback B, Ronmark E. Family History of Asthma and Atopy: In-depth Analyses of the Impact on Asthma and Wheeze in 7- to 8-Year-Old Children. *Pediatrics*. 2007;120(4):741-748.

12 Josef Neu, MD, Jona Rushing, MD. Cesarean versus Vaginal Delivery: Long term infant outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clin Perinatol*. 2011; 38(2):321–331.

13 Kull I, Melen E, Alm J, Hallberg J, Svartengren M, van Hage M et al. Breast-feeding in

relation to asthma, lung function, and sensitization in young schoolchildren. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(5):1013-1019.

14 V. Fuentes-Leonarte et al. Pre- and postnatal exposure to tobacco smoke and respiratory outcomes during the first year *Indoor Air* 2015; 25: 4–12

15 Priftis K, Mantzouranis E, Anthracopoulos M. Asthma Symptoms and Airway Narrowing in Children Growing up in an Urban versus Rural Environment. *J Asthma*. 2009;46(3):244-251.

16 Rubner F, Jackson D, Tisler C, Rajamanickam V, Gern J, Lemanske R. Relationships Among Eosinophils, Asthma, and Sex in a High-Risk Birth Cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(2):AB228.

17 Oymar K, Havnen J, Halvorsen T, Bjercknes R. Eosinophil counts and urinary eosinophil protein X in children hospitalized for wheezing during the first year of life: prediction of recurrent wheezing. *Acta Paediatr*. 2001;90(8):843-9.

18 Siroux V, Oryszczyn MP, Paty E, Kauffmann F, Pison C, Vervloet D, Pin I. Relationships of allergic sensitization, total immunoglobulin E and blood eosinophils to asthma severity in children of the EGEA Study. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(6):746-51.

19 Borres MP, Björkstén B. Peripheral blood eosinophils and IL-4 in infancy in relation to the appearance of allergic disease during the first 6 years of life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004;15(3):216-20.

20 Bettiol et al. Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and nonatopic asthmatics: relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels. *Allergy*. 2000;55(12):1134-41.

21 Balakrishnan M, Gaki N, Vikas D, Charanjeet K. C reactive protein as a marker of asthma control. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences* 2013;3(3):114-119.

22 Fattah M, El Baz M, Sherif A, Adel A. Complement components (C3, C4) as inflammatory markers in asthma. *Indian J Pediatr*. 2010;77(7):771-773.

23 Mosca T, Menezes MC, Dionigi PC, Stirbulov R, Forte WC. C3 and C4 complement system components as biomarkers in the intermittent atopic asthma diagnosis. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(6):512-6.

24 Grundbacher FJ, Massie FS. Levels of immunoglobulin G, M, A, and E at various ages in allergic and nonallergic black and white individuals. *J Allergy Clin Immunol*.

1985;75(6):651-8.

25 Lúdvíksson BR, Eiríksson TH, Ardal B, Sigfússon A, Valdimarsson H. Correlation between serum immunoglobulin A concentrations and allergic manifestations in infants. *J Pediatr*. 1992;121(1):23-7.

26 Satwani H, Rehman A, Ashraf S, Anwar H. Is Serum Total IgE levels a good predictor of Allergies in Children? 2009;59(10).

27 Huang H-WL, Ko-Huang W., Ruey-Hong S., Hailun S., Jinan L., Ko-Hsiu. Distribution of allergens in children with different atopic disorders in central Taiwan. *Acta Paediatr. Taiwan*, 2006;47(3):127-134.

28 Possa S, Leick E, Prado C, Martins M, Tibério I. Eosinophilic Inflammation in Allergic Asthma. *Frontiers in Pharmacology*. 2013;4-7.

29 Mishra JK et al. An Immunological Study of Bronchial Asthma with Special Reference to Interleukin-4, Interferon- and Immunoglobulin E *Indian J Allergy Asthma Immunol* 2011; 25(2): 91-96

30 Bogic M et al. Clinical significance of measurement of interleukin 4 and interleukin 5 serum concentrations in bronchial asthma. *Jugoslov Med Biochem* 2004;23:51-54

31 Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Increased interleukin-4 and decreased interferon- γ in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1290-3.

32 Sashihara MT, Sueki N, Ikegami S. An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *J. Dairy Sci* 2006;89:2846-2855.

33 Ghadimi, D., Fölster-Holst, R., De Vrese, M., Winkler, P., Heller, K.J., Schrezenmeir J. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on T H1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology* 2008;213:677-692.

34 Chen YS, Jan RL, Lin YL, Chen HH, Wang JY. Randomized placebo-controlled trial of lactobacillus on asthmatic children with allergic rhinitis. *Pediatr. Pulmonol* 2010;45:1111-1120.

35 Kawase M, et al. Effect of fermented milk prepared with two probiotic strains on Japanese cedar pollinosis in a double-blind placebo-controlled clinical study. *Int. J. Food Microbiol* 2009;128:429-434.

36 Tamura M, et al. Effects of probiotics on allergic rhinitis induced by Japanese cedar

pollen: randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Int. Arch. Allergy Immunol* 2007;143:75-79.

37 Gourbeyre P, Denery S, Bodinier M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;89(5):685-695.