

**I.O.S.U.D. - UNIVERSITATEA DE VEST
"VASILE GOLDIȘ" DIN ARAD
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ**

SIMONA MARIA IOVI (BORTA)



TEZA DE DOCTORAT

**ALELE PREDICTIVE ALE RISCULUI DE EXACERBARE
ÎN ASTMUL BRONȘIC ALERGIC – MBL2D ȘI MBL2H**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. MARIA PUȘCHIȚĂ

**Timișoara
2023**

REZUMAT

Astmul bronșic prezintă subiect de controversă în literatura de specialitate, fiind definit de Inițiativa Globală pentru Astm (GINA) ca "o boală heterogenă, caracterizată prin inflamația cronică a căilor respiratorii", cu producția excesivă de imunoglobulină E (IgE) și aflux de leucocite, în special eozinofile.

Acest subiect a prezentat importanță pentru studiul nostru, care are ca temă principală analiza modificărilor genetice întâlnite în astmul bronșic alergic la copii și examinarea rolului jucat de gena lectinei de legare a manozei (MBL) și rolul alelelor MBL2D și MBL2H în fiziopatologia crizelor acute ale bolii.

Subiectul cercetării noastre prezintă interes global, astmul bronșic fiind o boală specifică țărilor dezvoltate industrial (prevalența sa fiind de 7% în Franța, 8% în Statele Unite și 15-18% în Anglia). Din acest motiv cercetările actuale se concentrează pe descoperirea de teste genetice în vederea diagnosticului precoce și tratamentului personalizat mult mai eficient al astmului bronșic. Gena MBL și alelele sale, MBL2D și MBL2H, prezintă interes global și din ce în ce mai multe studii cercetează potențialul lor determinant în astmul bronșic și rolul în evoluția bolii. Se cunoaște despre glicoproteina secretată de gena MBL, denumită lectina de legare a manozei, că intervine în procesul de opsonizare și este prima componentă a complementului pe calea lectinei, iar insuficiența MBL determină susceptibilitate crescută la infecții și atopie. În România nu există teste de screening omologate, care să ajute la aprecierea corectă a prevalenței astmului bronșic, boala fiind subdiagnosticată. Se estimează, că în România ar exista peste un milion de astmatici, cu toate că figurăm cu prevalență de 3-6 persoane la 100.000 de locuitori. De asemenea se observă incidență din ce în ce mai ridicată a astmului bronșic la copiii din zonele urbane și a astmului problematic-sever (3,7% față de 1,5%) .

Studiul nostru a pornit de la premisa, că gena MBL și alelele sale, MBL2D și MBL2H, pot prezenta anumită relevanță clinică în combinație cu markerii biologici standard în evaluarea pacienților adulți cu astm bronșic. Noi am dorit să analizăm eficiența acestor markeri genetici atât în diagnosticul astmului bronșic alergic la copii cât și în evoluția bolii în rândul populației cu vârsta sub 18 ani având potențial predictiv pentru determinarea episoadelor de acutizare ale bolii.

Astmul bronșic fiind o boală cronică cu posibilă evoluție severă cu tot cu tratament corect administrat poate afecta semnificativ calitatea vieții pacienților prin limitarea competențelor fizice ale organismului. Pe lângă scăderea QoL al pacienților determină și costuri semnificative în ceea ce privește medicația și metodele terapeutice utilizate în tratamentul paliativ ale acestor pacienți în fazele avansate ale bolii.

Obiectivele studiului:

- Evaluarea caracteristicilor clinice (severitatea simptomelor) și paraclinice (variabilitatea VEMS, prezența eozinofiliei) ale pacienților incluși în studiu, având în vedere că studiul are ca și subiecți copii diagnosticați cu astm bronșic alergic;
- Evaluarea antecedentelor heredo-colaterale (AHC) (cum ar fi părinți fumători sau cu astm bronșic, mediu toxic etc) și a celor personale patologice (teren atopic, alergii cunoscute etc);
- Evaluarea aplicabilității clinice în diagnosticul astmului bronșic alergic la copii a determinării nivelului plasmatic de MBL în concordanță cu markerii biologici cunoscuți: creșterea granulocitelor eozinofile, creșterea nivelului IgE plasmatic;
- Evaluarea rolului expresiei genei MBL și a alelelor MBL2D și MBL2H în etiologia astmului bronșic alergic la copii și în apariția episoadelor de acutizare.

Biomarkerii biologici standard în diagnosticul astmului bronșic alergic sunt reprezentați de numărul de granulocite eozinofile și nivelul de IgE plasmatic. Acești biomarkeri prezintă de cele mai multe ori valori crescute la pacienții diagnosticați cu astm bronșic alergic. Studiile actuale însă se axează pe descoperirea unor biomarkeri noi de diagnostic și prognostic în astmul bronșic. Concentrația plasmatică de MBL este considerat un factor nou cu multiple posibilități atât în evaluarea inițială cât și în urmărirea evoluției pacienților cu astm bronșic.

Rezultatele cercetărilor în domeniu au arătat nivel ridicat de MBL circulant atât la adulți, cât și la copiii cu astm bronșic, deși puține lucrări raportează asocierea

valorilor MBL cu severitatea simptomelor. Totuși există studii, care sugerează, că nivelul MBL ar putea juca rol modulator în progresia astmului bronșic, astfel să fie un marker de sensibilitate pentru evoluția negativă a bolii .

Acest studiu are scopul de a contribui la dezvoltarea unui posibil test de diagnostic și prognostic, minim invaziv, bazat pe măsurarea nivelului seric de MBL în concordanță cu nivelul plasmatic de IgE și al celulelor eozinofile în astmul bronșic alergic de la vârste fragede.

Obiectivele Studiului 1:

- Evaluarea caracteristicilor clinice (severitatea simptomelor) și paraclinice (variabilitatea VEMS, prezența eozinofiliei) ale pacienților incluși în studiu;
- Evaluarea AHC și APP;
- Evaluarea aplicabilității clinice în diagnosticul astmului bronșic alergic la copii a determinării nivelului plasmatic de MBL în concordanță cu markerii biologici cunoscuți: creșterea granulocitelor eozinofile și creșterea nivelului IgE plasmatic.

Studiul a fost realizat la Secția Clinica Pediatrie II, Spitalul Clinic Județean de Urgență, Arad, România, pe o perioadă de 1 an între 2019 și 2020 și a inclus 133 de pacienți, dintre care 69 cu astm bronșic care au participat la un consult pediatric pentru simptome respiratorii și 64 de subiecți sănătoși cu vârstă, sex și etnie similară, ca și grup de control. Din grupul de studiu un număr de 43 de pacienți au fost de acord și cu recoltarea probelor de laborator.

Am realizat anamneza tuturor pacienților pentru descoperirea antecedentelor medicale personale, alergii, antecedente familiale și consumul de substanțe toxice în cazul părinților (alcool, fumat etc.).

În plus, s-au efectuat probe ventilatorii pentru a evalua funcțiile pulmonare și au fost recoltate specimene de sânge pentru a determina nivelul cantitativ de IgE și concentrațiile plasmatice de MBL.

Pentru a obține cât mai multe informații, am efectuat anamneza detaliată a pacienților să cunoaștem aspectele legate de simptomatologia resimțită, de antecedentele personale patologice (alergiile și stările atopice fiind factori favorizanți pentru apariția astmului bronșic alergic), de AHC (consumul de toxice a părinților, în special fumatul), mediul de proveniență și stilul de viață.

Rezultatul studiului nostru în ceea ce privește distribuția pacienților în funcție de mediul de proveniență este în concordanță cu studiile internaționale, care arată preponderență mai mare a astmului bronșic din zonele urbane

Au fost incluși în studiu pacienți cu vârsta sub 18 ani cunoscuți cu antecedente de astm bronșic alergic, care s-au prezentat pentru acutizarea bolii și pacienții care au prezentat primul episod de simptomatologie respiratorie sugestiv pentru această patologie.

În studiul nostru am inclus în total 133 pacienți, dintre care 69 în grupul pacienților cu astm bronșic. Putem observa distribuția relativ omogenă între sexe în toate grupele de studiu. Totuși, putem observa o predominanță ușoară a numărului de pacienți de sex feminin diagnosticați cu astm bronșic.

În studiul nostru am descoperit, că 26.08% dintre pacienții astmatici ($n=69$) au prezentat AHC de astm bronșic (Tabel X). Putem observa de asemenea, că majoritatea copiilor cu astm bronșic provin din mediu în care se fumează, unul dintre părinți, sau ambii. Astfel, în studiul nostru am observat, că în 27.53% din cazuri fumează doar mama, în 36.23% din cazuri fumează doar tatăl și în 14.49% din cazuri fumează ambii părinți.

Rezultatele noastre arată, că nu există diferențe semnificative statistic în evoluția bolii astmatice la pacienții incluși în studiu, în funcție de consumul de toxice a părinților (*test Kruskal-Wallis*, $p=0.438$). Interesant este că pacientul cu cea mai severă evoluție a bolii, provine din familie de nefumători.

Totuși, dacă calculăm media claselor de medicamente administrate, putem observa, că pacienții cu mamă fumătoare și cei cu ambii părinți fumători au avut nevoie în medie de 3 clase diferite de tratament, în schimb celelalte două categorii de pacienți au primit tratament cronic constituit în medie din 2 clase diferite de medicamente.

În studiul nostru am urmărit atât modificările la auscultare, cum ar fi ralurile pulmonare și wheezing-ul expirator, cât și modificările probelor sanguine.

Studiul nostru a investigat pentru prima dată potențiala semnificație clinică a nivelului MBL plasmatic în contextul astmului bronșic la copii, aceste rezultate fiind publicate într-o revistă de specialitate cu factor de impact. Valorile măsurate au arătat heterogenitate mai largă la pacienții cu astm bronșic decât la martori.

Rezultatele noastre sugerează, că nivelul plasmatic MBL comparativ cu valorile IgE prezintă un rol diagnostic relativ pentru astmul bronșic la copii și adolescenți, deoarece concentrațiile de MBL au o relevanță mai mare în diagnosticul astmului bronșic la copii și sensibilitate și specificitate mai mari, având în vedere că toți pacienții astmatici au avut valori ale MBL modificate comparativ cu valorile IgE, care au fost modificate doar la câțiva pacienți cu astm bronșic. Discrepanța dintre valorile IgE în cadrul grupurilor de studiu necesită studii suplimentare; sunt necesare și studii suplimentare pentru elucidarea rolului jucat de MBL în determinismul și evoluția astmului bronșic la pacienții minori.

Lectina de legare amanozei (MBL) este prima componentă a complementului pe calea lectinei și un reactant de fază acută secretat de ficat. Este codificată la om de o singură genă funcțională (MBL2) localizată pe cromozomul 10q11.2 – q21. Concentrația scăzută și insuficiența MBL sunt cauzate de polimorfisme în codonii **52** (CGT → TGT; desemnat alela D), **54** (GGC → GAC; B) și **57** (GGA → GAA; C) în exonul 1 al genei structurale MBL2, care rezultă în substituții de aminoacizi Arg→Cys, Gly→ Asp și Gly→Glu în peptidă. Concentrația MBL depinde în mare măsură de mai multe polimorfisme ale regiunii promotorului genei MBL2, dintre care perechea de baze (bp) din poziția -221 este din punct de vedere clinic cea mai importantă (schimbarea nucleotidelor G → C; respectiv alelele Y → X). Prezența alelei X în starea homozigotă influențează concentrația serică de MBL bazală egală cu cea alelă variantă structurală unică.

În România din cauza lipsei de studii sunt foarte puține date legate de determinismul genetic al astmului bronșic. Cercetările internaționale au arătat deja că gena MBL2 este un factor important al sistemului imunitar înnașcut, iar funcționarea sa deficitară poate cauza susceptibilitate crescută la infecții, alergii și dezvoltarea astmului bronșic.

Acest studiu are scopul de a aduce completări la datele deja cunoscute despre gena MBL2 și cele două alele importante. După cunoștințele noastre acest studiu evaluează pentru prima dată în România importanța lor în etiopatogeneza

astmului bronșic, severitatea și frecvența exacerbărilor bolii la pacienți cu vârste sub 18 ani.

Obiectivele Studiului 2:

- Evaluarea incidenței diferitelor genotipuri;
- Evaluarea incidenței diferitelor alele;
- Evaluarea exacerbărilor în funcție de alela prezentă;
- Evaluarea aplicabilității clinice atât în diagnosticul astmului bronșic alergic la copii, cât și valoarea predictivă pentru evoluția bolii.

Acesta este un studiu prospectiv care își propune să analizeze corelațiile dintre gena alelă MBL prezentă și numărul de exacerbări, respectiv severitatea acestora la copii și adolescenți cu astm bronșic.

Subiecții de studiu sunt pacienți cu vârsta <18 ani care au îndeplinit criteriile de includere (copii și adolescenți, careau prezentat o variabilitate a volumului expirator forțat (FEV) și au fost sub tratament cu bronhodilatatoare și antihistaminice), ai căror părinți au dat acordul scris pentru participare. De asemenea am obținut consimțământul informat de la adolescenți.

Studiul a fost realizat la Secția Clinica Pediatrie II, Spitalul Clinic Județean de Urgență Arad, România, pe o perioadă de 1 an între 2019 și 2020 și a inclus 133 de pacienți, dintre care 64 de pacienți cu astm bronșic care au participat la un consult pediatric pentru simptome respiratorii și 69 de subiecți sănătoși cu vârstă, sex și etnie similară, ca și grup de control.

Statusul de fumător al tatălui s-a arătat a fi un factor de risc important pentru dezvoltarea astmului bronșic la copiii proveniți din familii cu antecedente heredo-colaterale nesemnificative sau absente în ceea ce privește această maladie.

Din câte știm, acesta este primul studiu care examinează în România relevanța clinică a nivelului plasmatic de MBL în contextul astmului bronșic la pacienții cu vârsta sub 18 ani. Rezultatele cercetării noastre ar trebui, prin urmare, să extindă cunoștințele anterioare despre legătura presupusă între MBL și patogenia de

astm bronșic la copii și oferă date noi cu privire la noile instrumente potențiale care să fie utilizate în simplificarea și îmbunătățirea diagnosticului acestei patologii la copii și adolescenți.

Studiul nostru s-a concentrat pe determinarea nivelurilor plasmatice de IgE la pacienții stratificați pe baza nivelurilor de MBL și eozinofilelor din sânge în fluxul sanguin sistemic. Am găsit 12 pacienți cu astm bronșic care au prezentat niveluri crescute de eozinofile în probele de sânge, în timp ce subiecții din grupul de control au avut un număr normal de eozinofile. Acest lucru sugerează că numărul eozinofilelor poate fi util pentru delimitarea între copiii cu astm bronșic și copiii sănătoși. Odată prezente în căile respiratorii și circulația sistemică a sângelui, eozinofilele eliberează unele substanțe, care pot determina modificările bronhoconstricției și deteriorării celulelor epiteliale. Această deteriorare, legată de citokinele profibrotice eliberate de asemenea de eozinofile și celulele epiteliale, poate duce la remodelarea căilor respiratorii.

Nivelurile crescute de MBL și activitatea sa la pacienții alergici pot contribui la activarea suplimentară de complement prin calea lectinei și, prin urmare, la o severitate crescută a markerilor alergici, cum ar fi creșterea numărului de eozinofile din sânge. Activarea complementară a MBL poate conduce, de asemenea, direct la dezvoltarea alergiilor prin afectarea nivelului de citokine proinflamatorii.

Prin urmare, studiul de aici a avut ca scop să contribuie la descoperirea unui posibil test minim invaziv de diagnostic sau prognostic bazat pe măsurarea nivelurilor serice de MBL în conformitate cu nivelul IgE și al celulelor eozinofile în astmul bronșic alergic încă de la vârste fragede.

În studiul nostru, concentrațiile plasmatice de MBL au fost semnificativ mai mari la copiii cu astm bronșic comparativ cu controalele sănătoase. De asemenea, am găsit o corelație pozitivă între concentrațiile din plasmă de MBL și nivelurile de IgE în probele de sânge periferic. Aceste date oferă dovezi pentru o asociere între acești doi biomarkeri, care pot reflecta aspecte moleculare similare care stau la baza perturbării funcțiilor căilor respiratorii. Cu toate acestea, această asociere este dificil de luat în considerare pentru a indica un rol al MBL în patogeniza astmului alergic la pacienții copii și adolescenți, dat fiind faptul că această corelație nu implică cauzalitate. Mai degrabă, ar trebui considerată ca o constatare interesantă care merită investigații suplimentare.

Studiul nostru are limitele sale. O astfel de limitare este reprezentată de faptul că probeleau fost colectate în timpul perioadelor de remisie la copii deja diagnosticați cu astm bronșic. A doua limitare se datorează faptului că nivelurile plasmatice de MBL pot varia ușor întredivizi în funcție de factorii de mediu (de exemplu,expunerea la arsenic, plumb, poluanți organici persistenti,poluarea aerului) și infecții sau alte patologii inflamatorii, care ar putea interfera cu rezultatele obținute.

Cu toate acestea, rezultatele noastre sunt promițătoare. Credem că determinarea MBL plasmatic în viitor poate fi folosită ca test de diagnostic și prognostic în astmul bronșic. Aceste descoperiri susțin studii de cercetare anterioare care au raportat niveluri crescute de MBL atât la adulți, cât și la copii diagnosticați cu astm bronșic. Studiile sugerează că MBL ar putea juca un rol modulator în progresia astmului și, prin urmare, să fie un marker al susceptibilității pentru boală severă sau un marker pentru un fenotip distinct de astm. Doi autori au raportat o asociație între nivelurile de MBL și eozinofilie, susținând ipoteza noastră a unui rol pentru MBL în diferite fenotipuri de astm .

În studiul nostru am investigat semnificația diferitelor genotipuri ale MBL2, care pot determina concentrație scăzută de MBL și insuficiență de MBL la copiii diagnosticați cu astm bronșic alergic.

O limitare importantă a studiului nostru este reprezentat de lipsa datelor asupra rolului jucat de gena MBL în declanșarea astmului bronșic, și în rata exacerbărilor la copii. Comparativ cu adulții, copiii au sistemul imunitar mai puțin dezvoltat, astfel evoluția bolii și reacțiile organismului vor fi diferite la stimuli.

La evaluarea efectului genotipului MBL2 asupra apariției atopiei la martori, nu au fost detectate rezultate semnificative statistic. Cu toate acestea, atunci când se evaluează simptomele clinice dintre controalele cu atopie, simptomele tractului respirator inferior tind să fie mai puțin frecvente la femeile care poartă genotipul A / O decât la cele cu genotipul A / A. Diferențele de distribuție a genului în ceea ce privește atopia și tulburările conexe au fost detectate anterior.

S-a observat că defectul de opsonizare cauzat de insuficiența MBL este asociat cu atopie la copii. Cu toate acestea, legătura directă între insuficiența MBL și atopie nu a fost studiată anterior.

Rezultatele noastre anulează efectul predispozant sugerat anterior al insuficienței MBL asupra atopiei, cel puțin la copii. De fapt, insuficiența MBL poate oferi chiar protecție împotriva simptomelor atopice în anumite subgrupuri.

Originalitatea tezei de doctorat intitulată ” Alele predictive ale riscului de exacerbare în astmul bronșic alergic – MBL2D și MBL2H” constă în faptul că, după cunoștințele noastre în România este prima lucrare științifică, care urmărește legătura dintre nivelul seric de MBL și riscul de exacerbare al astmului bronșic alergic la copii, respectiv alelele prezente la pacienții incluși în studiu, și rolul acestora în evoluția bolii. Nivelul de MBL seric s-a dovedit un marker important în diagnosticarea astmului bronșic alergic la copii având o specificitate și o sensibilitate crescută față de ceilalți markeri. Descoperirea remarcabilă a acestui studiu este faptul că în cazul pacienților fără antecedente heredo-colaterale de astm bronșic, consumul de tutun în cazul tatălui a predispus la apariția acestei maladii.

Rezultatele acestei lucrări subliniază importanța epigeneticii în cazul astmului bronșic alergic la copii, respectiv importanța stilului de viață al părinților, care prin consumul de tutun poate determina apariția astmului bronșic alergic la copii prin modificarea epigenomului, în lipsa antecedentelor heredo-colaterale pentru această maladie.

Dacă genetica "dă naștere" vieții epigenetice o modelează. Acest aspect aduce în discuție responsabilitatea în ceea ce privește stilul de viață al părinților pentru a nu determina apariția de maladii la copii. În același timp cunoașterea implicării genetice în cazul copiilor cu astm bronșic poate influența abordarea și managementul adecvat al astmului bronșic la copii pentru a evita apariția formelor severe de astm bronșic la vârsta adultă.