

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DR CAROL DAVILA BUCUREȘTI**

TEZĂ DE DOCTORAT – REZUMAT

**Rolul mediatorilor inflamatori din familia citokinelor în
Rinita Alergică și patologii asociate**

Conducător Științific

Prof. Univ.Dr. Călin Giurcaneanu

Doctorand

Nicolae Ovidiu Berghi

Cuprins

1. Introducere în tematică.....	pag. 4
2. Material și metodă.....	pag. 7
3. Statistică.....	pag. 11
4. Rezultatele studiului.....	pag. 11
5. Concluzii.....	pag. 22
6. Bibliografie selectivă.....	pag. 26
7. Lista de abrevieri.....	pag. 28
8. Lista lucrări publicate.....	pag. 29

1. Introducere în tematică

Nasul, sinusurile și plămânii reprezintă segmente ale tractului respirator. Aparatul respirator este împărțit artificial la nivelul corzilor vocale în căi aeriene superioare, respectiv inferioare, cele două porțiuni fiind anatomic contigue și înrudite imunologic [1]. Conceptul că, căile aeriene reprezintă un tot unitar, a fost propus prima dată la începutul anilor 2000 de către Passalacqua și colegii [2]. United Airway Disease (UAD) – teoria căilor aeriene unitare reprezintă conceptul că, căile aeriene superioare și inferioare formează un singur organ, cu bolile acestora aparând frecvent concomitent deoarece ele reflectă manifestări diferite ale unui singur proces patologic [1]. Un număr de mecanisme au fost propuse pentru a lega cele 2 părți ale tractului respirator din punct de vedere fiziopatologic: reflexul naso-bronșic, stimularea celulelor progenitoare de la nivelul măduvei hematogene, propagarea hematogenă a mediatorilor inflamatori de la un nivel al tractului respirator la altul și aspirarea mediatorilor inflamatori și a leucocitelor de la nivel sino-nazal în arborele traheo-bronșic. Exemplul clasic al acestei noțiuni este reprezentat de către asocierea rinită alergică – astm alergic [1]. Rinita alergică (RA) reprezintă o afecțiune simptomatică a nasului produsă de către o inflamație IgE-mediata indusă de expunerea la un alergen respirator, inflamație localizată la nivelul mucoasei care căptușește cavitatea nazală. Prima definiție a fost propusă în anul 1929 bazat pe 3 simptome cardinale: strănutul, obstrucția nazală și rinorea apoasă [3]. Astmul reprezintă o boală respiratorie comună cu o prevalență de peste 300 milioane de persoane global și în continuă creștere [4]. Definiția cea mai recentă a fost statuată în 2017 de către GINA (un proiect de colaborare între NHLBI, NIH și OMS) : boală inflamatorie a căilor aeriene care implică multiple celule inflamatorii și mediatori care contribuie la modificările caracteristice clinice și fiziopatologice. Astmul prezintă 2 caracteristici cheie : 1) un istoric de simptome respiratorii (dispnee, tuse, wheezing, constricție toracică) care variază de-a lungul timpului ca existență și intensitate și 2) limitarea variabilă a fluxului aerian expirator [4].

Rinita alergică (RA) este frecvent asociată cu astmul alergic (19%-38% dintre pacienții cu rinită prezintă concomitent astm) și deseori precede hiper-reactivitatea bronșică iar între 30%-80% dintre pacienții cu astm prezintă concomitent rinită [5]. Rinita precede dezvoltarea astmului și poate contribui la controlul nesatisfăcător al astmului. Simptomele nazale, fluxul de aer la nivel nazal și markerii inflamatori de la acest nivel se corelează direct cu inflamația căilor aeriene inferioare[5].

Astmul și rinita alergică împart trăsături imunopatologice comune incluzând un răspuns imun Th2- mediat, îngroșarea membranei bazale și hiperplazia celulei goblet [6]. Tradițional a

fost incriminată prezența în exces a citokinelor tip Th2 – IL-4, IL-5, IL-13, IL-31, chemokinelor asociate eozinofilelor (eotaxine) și cisteinil-leucotrienele care conduc la modificările patologice caracteristice alergiilor respiratorii [7]. Răspunsul alergic inițial (10-20 minute de la momentul expunerii) este caracterizat de edem , eritem, rinoree, prurit nazal, strănut la nivelul căilor aeriene superioare și edem, secreție de mucus, brohospasm și tuse la nivelul tractului respirator inferior. Răspunsul alergic tardiv (apărut la 2-6 ore de la momentul expunerii alergenic) la nivelul întregului tract respirator este asociat cu activarea eosinofilelor și infiltrarea țesuturilor cu limfocite T CD4 , proces esențial pentru menținerea procesului inflamator cronic și a afectării tisulare [7].

În ultimii ani au apărut dovezi incontestabile despre implicarea în fiziopatologia bolilor alergice respiratorii și a altor linii celulare (Th1, Th17, Treg) și mediatori inflamatori (citokine, chemokine). Limfocitele Th1 sunt implicate în fiziopatologia astmului alergic moderat-sever cu efecte suprapuse peste acelea ale limfocitelor Th2 [8]. Un subset de limfocite Th1 secretând predominant IL-18 a fost propus ca având roluri în promovarea inflamației alergice la nivelul tractului respirator, fiind numite celule super Th1 [9]. Limfocitele Th17 au fost deasemenea documentate în rinita și astmul alergic. Procentul acestora și al principalelor citokine secretate (IL-17) de către acestea a fost semnificativ mai mare la pacienții cu RA polisensibilizați comparativ cu martorii [10]. Nivelele IL-17 au crescut deasemenea la pacienții cu boli alergice respiratorii (rinită, astm) după provocari cu alergen [11]. Limfocitele T reglatorii mediază 1) supresia celulelor dendritice implicate în programarea limfocitelor T efectorii; 2) inhibarea directă a limfocitelor Th1,Th2 și Th17 (prin intermediul expresiei CD152 și CD179 care induc apoptoza acestora prin contact celular direct); 3) supresia IgE-alergen specifice și IgG4; 4) inhibiția mastocitelor, bazofilelor și eozinofilelor și 5) prevenirea migrării limfocitelor T efectorii către organele țintă [12].

O altă serie de articole au demonstrat implicarea în patogenia alergiilor respiratorii a unor citokine caracteristice inflamației neutrofilice (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6) și a chemokinelor (citokine cu rol în controlarea mișcărilor leucocitelor). IL-1 β a prezentat valori crescute la pacienți cu rino-sinuzită cronică eozinofilică și non-eozinofilică cu polipoză nazală și la pacienți cu rinită alergică în etapa tardivă a reacției alergice [13]. Creșteri semnificative ale valorilor serice ale IFN- γ au fost asociate cu răspunsul de tip întârziat urmând unei provocări bronșice cu alergen [14]. TNF- α a prezentat valori crescute la pacienți cu astm alergic și rinosinuzită cronică comparativ cu grupul martor și în secrețiile nazale la pacienți cu rinită alergică perenă [15]. IL-6 a fost depistată cu valori crescute în secrețiile nazale la pacienții cu rinită alergică și a prezentat asocieri cu dezvoltarea astmului alergic [16].

Chemokinele (CC) sunt citokine chemoattractante cu greutate moleculară medie de 8-10 kDa. Toate chemokinele împart o structură generală comună: minimum 3 foi β pliate, un α -helix în domeniul C-terminal și un număr de legături di-sulfidice care conectează rezidurile conservate de cisteină. Chemokinele sunt clasificate în 4 familii în funcție de poziția primelor 2 residuuri de cisteină în interiorul secvenței de aminoacizi de la capătul N-terminal : familia CXC (α), familia CC(β), familia CX3C(δ) și familia C(γ) [17]. În cadrul cercetării doctorale au fost evaluate chemokine din familiile α (MCP-1 (CCL2) și MIP-1 α (CCL3)) și β (ENA-78 (CXCL5), IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10)). CCL2 (MCP-1) prezintă roluri în recrutarea celulelor dendritice de origine monocitară în cursul reacției alergice, polarizarea celulelor Th2 și dezvoltarea hipertrofiei musculaturii netede în astm [18]. CCL3 (MIP-1 α) este implicată în recrutarea eosinofilelor, bazofilelor și mastocitelor și în patogeneza astmului prin activarea excesivă a celulelor musculare netede [19]. CXCL5 (ENA-78) este o chemokină importantă în activarea limfocitelor Th17 și recrutarea neutrofilelor în căile aeriene pulmonare [20]. CXCL8 (Interleukina-8) este o citokină chemotactică puternică care activează celule inflamatorii prin recrutarea de neutrofile, fagocite mononucleare, mastocite și limfocite T. IL- 8 a fost asociată atât cu boala astmatică cât și cu rinita și conjunctivita alergică [21]. CXCL10 (IP-10) este o chemokină a cărei secreție este indusă de către IFN- γ și care are un rol important în atragerea limfocitelor Th1 la locul inflamației prin intermediul receptorului CXCR3. CXCL10 a fost detectată în concentrații mai mari în fluidul de lavaj bronhoalveolar la copii astmatici versus martori și în cursul exacerbărilor versus perioade stabile de astm [22].

Un rol important în patogenia alergiilor respiratorii este reprezentat de componenta genetică. Bolile alergice respiratorii (rinita, astmul) sunt considerate boli genetice complexe, datorită implicării unor multitudini de gene. Rolurile geneticii în astm și bolile alergice sunt legate de: 1) susceptibilitatea la atopie (genele care controlează imunoglobulina E prin intermediul lanțului α al receptorului de înaltă afinitate al IgE și nivelele serice ale IgE); 2) determinarea bolii țintită pe organ (gene de susceptibilitatea astmului: OPN3,CHML); 3) interacțiunea factorilor ambientali cu boala : gene care determină răspunsul la factori care influențează balanța Th1/Th2 a răspunsului imun (polimorfisme ale CD4 și TLR4), gene care alterează interacțiunile dintre factorii ambientali și boală; 4) modificarea severității bolii (polimorfismele TNF- α și severitatea astmului).

În ultimii ani a existat o schimbare în paradigma bolilor alergice respiratorii de la conceptul unei boli singulare la recunoașterea că rinita și astmul alergic sunt boli cronice complexe cu o heterogenicitate clinică și terapeutică marcată. Fenotipul unei boli descrie

caracteristicile observabile (clinice, fiziologice, morfologice, biochimice și răspunsul la tratament) fără o relație cu patologia subjacentă. Un endotip de boală reprezintă o cale biologică specifică (definind o etiologie și/sau un mecanism fiziopatologic consistent) care explică proprietățile observabile ale unui fenotip [23]. Bolile alergice au fost clasificate în funcție de tipul de răspuns imun predominant: Th2 și non-Th2. Răspunsul imun tip 2 este considerat în general ca definind astmul atopic și rinita alergică. Răspunsul imun tip 2 implică celule Th2, celule B tip 2, celule limfoide înăscute tip 2, celule NK secretoare de IL4, celule T-NK secretoare de IL4, bazofile, eozinofile și mastocite. Citokinele majore ale acestui tip de răspuns imun sunt IL-4, IL-5, IL-9 și IL-13 secretate de către celulele sistemului imun și IL-25, IL-31, IL-33 și TSLP secretate de către celulele epiteliale. Endotipul cu răspuns imun predominant non-Th2 cuprinde mai multe sub-endotipuri: inflamația neutrofilică, activarea căii Th17, remodelarea tisulară și inflamația neurogenică. Au fost descrise și endotipuri mixte Th2/Th17, fiind descrise în acest context 3 clustere majore: Th2-high, Th17-high și Th2/Th17-low [24].

Datorită frecvenței și implicațiilor majore ale bolilor alergice respiratorii în Europa secolului XXI și importanței unei clasificări cât mai exacte a afecțiunilor a fost realizat acest studiu care urmează trendul european și global al diagnosticării rinitei alergice din punct de vedere al mecanismelor imune implicate.

2. Material și metodă

Studiul prezentat este unul clinic, prospectiv, longitudinal care are drept obiectiv evidențierea rolului mediatorilor inflamatori (citokine, chemokine) în fiziopatologia și caracterizarea bolilor alergice respiratorii.

Studiul s-a desfășurat în cadrul Clinicilor și Laboratoarelor Sfânta Maria (fostă Anima) Victoriei București în intervalul ianuarie – august 2017.

Designul studiului a fost reprezentat de crearea a 2 loturi de participanți:

→ lot de studiu – reprezentat de pacienți cu rinită alergică cu/fără astm concomitent

→ lot martor – reprezentat de pacienți fără patologie alergică cunoscută evaluați în cadrul clinicii în contextul examinării medicale anuale

Obiectivul principal al studiului 1-a constituit evaluarea prezenței și rolului unui număr de citokine și chemokine asociate liniilor celulare limfocitare Th2/non-Th2 în rinita alergică.

Obiectivele secundare au fost reprezentate de : → evaluarea rolului chemokinelor α și β în caracterizarea endotipurilor Th2/non-Th2 în rinita alergică

→ corelarea valorilor chemokinelor α și β și a citokinelor cu inflamația căilor aeriene superioare (reprezentată prin hipertrofia de mucoasă nazală) și inferioare (reprezentată prin hiperreactivitatea de căi aeriene)

→ corelarea valorilor chemokinelor și citokinelor cu conjunctivita alergică (afecțiune frecvent asociată cu alergiile respiratorii)

→ corelarea valorilor chemokinelor și citokinelor cu tabloul clinic și tratamentul alergiilor respiratorii

Criterii de includere – pacienți cu rinită alergică și/sau astm concomitent care s-au adresat pentru consult de specialitate în Clinicile și Laboratoarele Sfânta Maria București în perioada ianuarie – august 2017, vârsta peste 18 ani , fără alte boli inflamatorii sau autoimune concomitente (bazat pe istoricul bolnavului, tablou clinic, valori normale ale markerilor de inflamație : fibrinogen, VSH, proteina c reactivă (PCR), factor reumatoid, complement C3 și C4, absența oricăror semne sau simptome de infecție intercurrentă) - 67.

- martori – pacienți care s-au adresat Clinicilor și Laboratoarelor Sfânta Maria pentru examenul medical anual, fără patologie alergică, inflamatorie sau autoimună cunoscută la momentul consultului- 38.

Evaluarea clinică, alergologică, spirometrică și de laborator a fost realizată cu acordul scris al Comisiei de Etică a UMF Carol Davila București și a conducerii Clinicii Anima Victoriei București (actual Clinicile și Laboratoarele Sfânta Maria) cu respectarea cerințelor Declarației de la Helsinki privitoare la drepturile pacienților. Includerea pacienților în studiu a fost efectuată doar după explicarea detaliată de către studentul doctorand a tuturor aspectelor acestuia, consultarea la domiciliu a consimțământului informat de către pacienți și predarea documentului semnat la o consultație ulterioară. Evaluarea de specialitate ORL a fost efectuată prin examinarea directă a cavităților nazale și ulterior prin endoscopie nazală de către medicul

specialist ORL. Majoritatea pacienților au provenit din mediul urban (zona metropolitană București) iar cei din mediu rural din comunele limitrofe acestuia. O perioadă de locuire neîntreruptă de minimum 10 ani a fost considerată suficientă pentru a se stabili tipul de locuire. A fost evaluat deasemenea fumatul și expunerea la substanțe toxice la locul de muncă. În caracterizarea loturilor au fost luate în considerare și tipul de naștere și ordinea nașterii datorită studiilor din literatura de specialitate care sugerează anumite legături între dezvoltarea bolilor alergice și naștere.

Participanții la studiu (pacienți, martori) au fost evaluați prin intermediul testării cutanate alergologice prick care a fost realizată în concordanță cu recomandările Academiei Europene de Alergologie și Imunologie Clinică (EAACI) din anul 2012 [25]. Testarea a inclus studierea sensibilității la acarieni (Dermatophagoides farinae și Dermatophagoides pteronyssinus), epitelii animale (câine, pisică), gândac de bucătărie (Blatella germanica), mucegaiuri (Penicillium mix, Alternaria alternata, Cladosporium mix, Aspergillus mix) și polenuri (ierburi-graminee, cereale, buruieni – Ambrosia elatior, Artemisia vulgaris, Parietaria mix și arbori – Betulaceae, Oleaceae, Cupresaceae, Platan). În concordanță cu recomandările ghidului EAACI au fost evaluate deasemenea și polenuri specifice României și acestei zone a continentului european : ierburi – cereale, Helianthus annuus, buruieni- Plantaginaceae; arbori – Fagus grandifolia, Salicaceae. Testarea a fost validată prin folosirea substanțelor de control – pozitiv (histamina), negativ (ser fiziologic). Un test a fost considerat pozitiv dacă la 15 minute de la aplicarea acestuia , la locul testării, a fost prezentă o papulă cu un diametru de minimum 3 mm înconjurată de eritem. Au fost utilizate produsele firmei LoPharma (Italia).

Evaluarea hipertrofiei de mucoasă nazală (HMN) a fost realizată de medicul specialist ORL prin examinare directă și endoscopie nazală cu fibroscop nazal flexibil. Evaluarea hiperreactivității bronșice a fost efectuată prin intermediul tehnicii numită spirometrie cu test bronhodilatator. Pacienții și martorii au efectuat inițial o spirometrie simplă pentru evaluarea bazală a funcției pulmonare. Ulterior li s-a administrat , conform ghidului GINA, 400 mcg de bronhodilatator – salbutamol. O a doua spirometrie a fost efectuată la un interval de 20-30 minute. A fost calculată diferența între cele 2 valori VEMS – post și prebronhodilatator. O diferență semnificativă a fost considerată $\Delta VEMS \geq 200$ ml (12%) [26].

Analiza probelor de sânge a fost realizată în cadrul a 2 laboratoare de cercetare: Laboratorul de Imunologie din cadrul Institutului Național pentru Cercetare și Dezvoltare Medicală Militară „ Cantacuzino” și Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științei Biomedicale „ Victor Babeș”.

În cadrul Institutului Cantacuzino au fost analizate chemokinele și un număr de interleukine : IL- 1 β , IL-6 , IL-10, IFN – γ și TNF – α . Citokinele și chemokinele au fost testate în mostre serice diluate 1/2 utilizând Human Multianalyte Profiling Base Kit A (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) urmărind următorul protocol. A fost utilizată o placă cu substrat de filtru (96 celule MILLIPORE) pretrată cu 25 μ l/celula Beadlyte® Cytokine Assay Buffer în care au fost adăugate 50 μ l/celula/standard care au fost agitate, amestecate și incubate pe un shaker plat orbital (PSU 2T PLUS,Biosan) pentru un interval de 2 ore în întuneric la temperatura camerei. Diluții standard au fost realizate în conformitate cu indicațiile producătorului la următoarele concentrații 0 pg/mL, 1.2 pg/mL, 4.9 pg/mL, 19.5 pg/mL, 78.1 pg/mL, 312.5 pg/mL, 1250 pg/mL și 2500 pg/mL. Într-o etapă ulterioară 25 μ l Beadlyte Anti-Human Multi-Citokine Beads 3 au fost adăugați în fiecare celulă. Excesul a fost îndepărtat prin aspirare (VAC-USAFA CONFORT, Integra Biosciences) și celule resuspendate cu 50 μ l/celulă Beadlyte Cytokine Assay Buffer. A urmat o nouă îndepărtare a excesului și resuspendare cu 75 μ l/celulă cu soluție tampon, urmată de adăugarea a 25 μ l/celula Anti-Human Multi-Cytokine 3 Biotin și incubarea plăcii pentru 90 minute în întuneric la temperatura camerei. După o incubare suplimentară de 30 minute cu 25 μ l/celula Beadlyte Streptavidin-Phycoerytrin (diluat în soluție tampon 1:25) reacția a fost stopată cu 25 μ l/celula Beadlyte Stop Solution. Placa a fost golită și ulterior reumplută cu 125 μ l/celula soluție tampon. Citirea plăcii a fost efectuată pe platforma Luminex 100ă iar datele au fost procesate cu Luminex 100 IS 2.3 Software. Rezultatele au fost exprimate în pg/ml pentru fiecare citokină și chemokină evaluată.

În cadrul Institutului Victor Babeș au fost lucrate probele pentru interleukinele 4,13 și 17. Mostrele de sânge obținute pentru măsurarea nivelului interleukinelor au fost plasate într-un tub separator cu ser și au fost centrifugate la 1000 g pentru 15 minute și au fost depozitate la - 80°C până la efectuarea analizei. Nivelurile IL4/IL13/IL17 au fost măsurate prin tehnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizând Berthold technologies Reader Apollo 8, LB912, Software MicroWin 2000, Orgenics Microplate Washer 2600, Plate Shaker Termostat PST-60 HL, R&D System ELISA kits.

3. Statistica

În cadrul studiilor efectuate analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programului SPSS 18.00 (Statistical Package for the Social Sciences), care a fost folosit pentru planificarea și colectarea datelor, precum și pentru managementul acestora, întocmirea de tabele și grafice și prezentarea rezultatelor. Pentru semnificația statistică a fost luată în considerare o marjă a valorii $p \leq 0.05$ cu interval de confidențialitate de peste 95%.

4. Rezultatele studiului

Au fost luați în studiu conform criteriilor de includere un număr total de 67 pacienți selectați consecutiv în lotul pacienți și 38 de voluntari în lotul martor.

Vârsta medie a pacienților incluși în studiu a fost de 35,96 ani cu o variabilitate de ± 12.25 ani. Mediana vârstei pacienților a fost de 33 ani. Vârsta medie a martorilor introduși în studiu a fost de 40.47 ani cu o variabilitate de ± 12.15 ani. Mediana vârstei martorilor a fost de 38.5 ani.

În lotul de pacienți conform repartiției pe genuri au fost incluși un număr de 19 pacienți de sex masculin și 48 de pacienți de gen feminin. În lotul martor conform repartiției pe genuri au fost incluși 3 pacienți de sex masculin și 35 de pacienți de gen feminin. Majoritatea pacienților incluși în studiu au provenit din mediul urban (București – 59 pacienți versus 8 din mediul rural – județul Ilfov) și integral voluntarii din lotul martor (38 persoane cu domiciliul în mediul urban).

Diagnosticul de rinită alergică a fost realizat de către studentul doctorand, medic primar alergolog, pentru 32 pacienți (cazuri nou diagnosticate). În cazul celorlalți 35 de pacienți diagnosticul de rinită alergică a fost stabilit în anii anteriori de către medicul investigator sau alți medici specialiști alergologi. Durata medie a bolii până la momentul diagnosticului a fost de 2.54 ani. Un număr de 14 pacienți au fost diagnosticați concomitent astm. 23 pacienți au prezentat concomitent simptome de conjunctivită alergică.

Tabloul clinic a fost dominat de obstrucția nazală (52 pacienți-77.61%) urmată de strănut (50 pacienți – 74.62%), rinoree apoasă (44 pacienți – 65.67%) și strănut(40 pacienți – 59.7%).

Ambele loturi incluse în studiu au fost evaluate serologic din punct al terenului atopic. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 1, 2 și 3. Valorile crescute ale eozinofilelor și IgE seric total în lotul de pacienți comparativ cu lotul martor sunt concordante cu datele din literatura de specialitate , care indică o implicare majoritară a liniei celulare Th2 în rinita alergică exprimată indirect prin valorile crescute ale celor 2 indici.

Tabel 1 Eosinofilie (numar absolut)

	NUME					
	PATIENT			MARTOR		
	Mean	Median	Standard Deviation	Mean	Median	Standard Deviation
HLG-EO(NR)	,35	,23	,35	,20	,14	,19

Tabel 2 Eosinofilie (procentual)

	NUME					
	PATIENT			MARTOR		
	Mean	Median	Standard Deviation	Mean	Median	Standard Deviation
HLG-EO(%)	3,4	3,1	2,1	1,8	1,7	1,3

Tabel 3 IgE seric total

	NUME					
	PATIENT			MARTOR		
	Mean	Median	Standard Deviation	Mean	Median	Standard Deviation
IgE	277,26	116,34	528,72	42,82	14,99	131,56

Din punct de vedere al sensibilizării pacienții au fost împărțiți în monosensibilizați (un singur test cutanat prick pozitiv) și polisensibilizați (minimum 2 teste cutanate prick pozitive) (Tabel 4).

Tabel 4 Mono/Polisensibilizare

	NUME		
	PATIENT	MARTOR	
	Count	Count	
0	0	37	
ALERGEN(NR) 1	11	0	
2	56	0	

Diametrul mediu al unui test în lotul studiat a fost de 8,36 mm (față de un minimum necesar conform ghidurilor de testare de 3 mm). Expresia grafică a distribuției dimensiunii testelor este înfățișată în figura 1. În tabelul 5 sunt prezentate valorile exacte ale măsurării testelor.

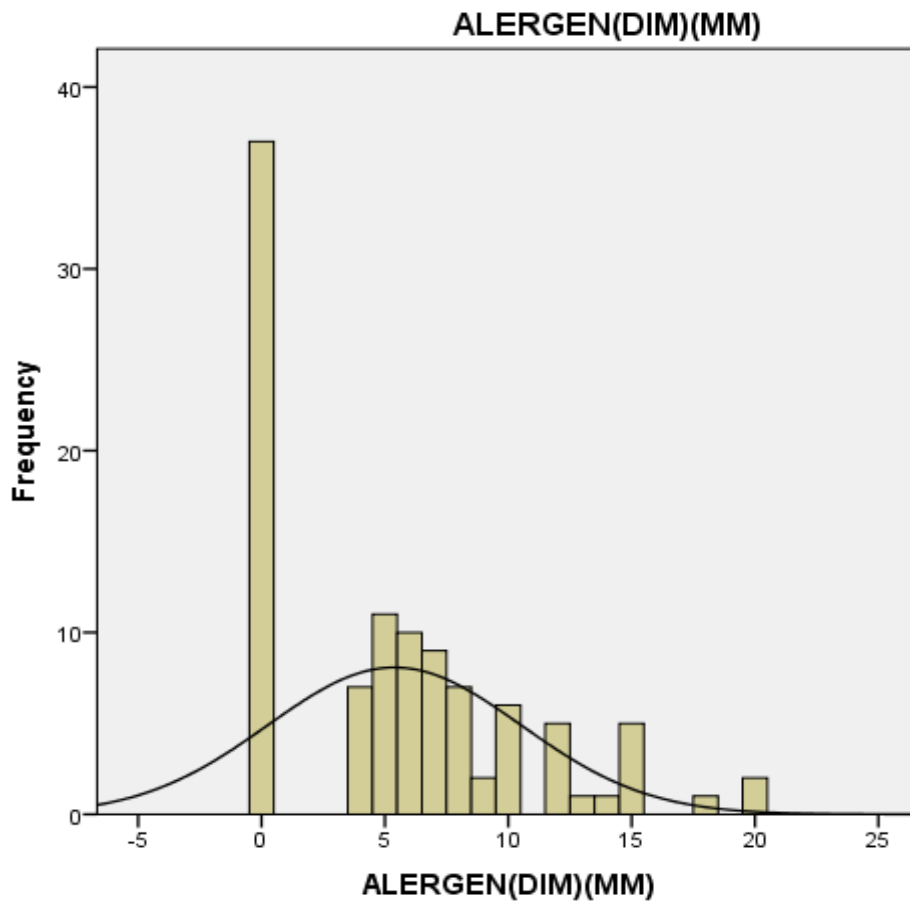


Fig.1 Dimensiune teste alergeni

Table 1

	NUME	
	PATIENT	MARTOR
	Count	Count
0	0	37
4	7	0
5	11	0
6	10	0
7	9	0
8	7	0
9	2	0
10	6	0
12	5	0
13	1	0
14	1	0
15	5	0
18	1	0
20	2	0

Tabel 5 Dimensiuni teste alergeni

Din punct de vedere al tipurilor de alergene implicate , pacienții au fost clasificați în pacienți cu sensibilizare la alergene cu originea în interiorul clădirilor (acarieni, gândaci, epitelii animale, mucegaiuri), cu sensibilizare la alergene de exterior (polenuri) și cu sensibilizare mixtă (interior + exterior) (Tabel 6)

Tabel 6 Tip de sensibilizare

	NUME	
	PATIENT	MARTOR
	Count	Count
interior	21	0
I/M/E mixt	19	0
exterior	27	0

Plecând de la această clasificare într-o etapă ulterioară am împărțit pacienții ca prezentând rinită alergică perenă (cu sensibilizare la alergene de interior și/sau mixtă) sau rinită alergică sezonieră (cu sensibilizare exclusivă la polenuri) (Tabel 7)

Tabel 7 Sezonier/Peren

	NUME	
	PATIENT	MARTOR
	Count	Count
0	0	38
P/S persistent	32	0
sezonier	35	0

Pacienții au fost evaluați pentru existența inflamației cronice la nivelul căilor aeriene superioare. Un număr de 37 de pacienți (55.22%) au fost diagnosticați de către medicul specialist ORL cu hipertrofie de mucoasă nazală, semn al inflamației cronice a mucoasei nazale. Un număr de 3 pacienți au fost diagnosticați concomitent cu sinuzită. Evaluarea statistică a decelat o asociere semnificativă a HMN cu rinită alergică (tabel 8).

Tabel 8 Hipertrofie mucoasa nazala

ANOVA

HIPERTROF MUC					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,395	1	7,395	45,974	,000
Within Groups	16,567	103	,161		
Total	23,962	104			

Inflamația căilor aeriene inferioare a fost evaluată utilizând procedura spirometriei cu test bronhodilatator. Hiperreactivitatea bronșică a fost evaluată atât din punct de vedere absolut (diferența în ml între cea de a doua și prima spirometrie) cât și procentual. Valoarea medie a diferenței absolute a VEMS a fost pentru lotul de pacienți de 128.21 ml ± 121.87 ml , iar mediana 90 ml. Valorile pentru lotul martor au fost de 26.84 ml ± 18.76 ml, iar mediana de 20 ml. Diferența procentuală pentru VEMS a fost de 4.57% ± 3.94% pentru lotul de pacienți și 2.71% pentru martori. Valorile mediane au fost 4% în lotul de pacienți și 2% în lotul martor. Evaluarea semnificației statistice a rezultatelor obținute a fost realizată cu ajutorul testelor statistice t-student și Mann-Whitney (Tabel 9 și 10).

Tabel 9 VEMS –semnificație statistică

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
VEMS(%)	Equal variances assumed	4,733	,032	2,151	103	,034	1,857	,863	,145	3,568
	Equal variances not assumed			2,043	65,851	,045	1,857	,909	,042	3,671
VEMS(ML)	Equal variances assumed	53,772	,000	5,083	103	,000	101,367	19,944	61,813	140,921
	Equal variances not assumed			6,670	71,407	,000	101,367	15,198	71,067	131,667

Tabel 10 VEMS semnificație statistică

Test Statistics^a

		VEMS(%)	VEMS(ML)
Mann-Whitney U		911,500	623,000
Wilcoxon W		1652,500	1364,000
Z		-2,437	-4,356
Asymp. Sig. (2-tailed)		,015	,000
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.	,057 ^b	,000 ^b
	99% Confidence Interval		
	Lower Bound	,000	,000
	Upper Bound	,115	,043
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	Sig.	,019 ^b	,000 ^b
	99% Confidence Interval		
	Lower Bound	,000	,000
	Upper Bound	,053	,043

a. Grouping Variable: NUME

b. Based on 105 sampled tables with starting seed 1502173562.

Pentru diferența absolută a existat o asociere semnificativă statistic în ambele teste ($p = 0.000$). Pentru diferența procentuală cele 2 teste statistice au furnizat valori diferite : $p = 0.045$ (t-student – asociere semnificativă) și $p = 0.057$ (Mann –Whitney – ne semnificativ).

Pacienții introduși în studiu au fost evaluați și din punctul de vedere al gradului de afectare dat de rinita alergică. A fost folosit scorul TNSS (Total Nasal Symptome Score – scorul total al simptomelor nazale). Acesta ia în considerare congestia nazală, rinoreea apoasă, pruritul nasal, strănutul și tulburările de somn , pentru fiecare simptom pacientul putând acorda un punctaj variind de la 0 (lipsa afectării) până la 3 (afectare severă). Gradul de severitate variază de la : ușor (0-5 puncte), moderat (6-10 puncte) și sever (11-15 sever). Lotul de pacienți urmărit în cadrul studiului a prezentat un scor TNSS de 6.98 și o mediană de 7.00 cu o deviație standard de ± 3.83 , astfel încadrându-se în gradul mediu de severitate. A fost observat un scor ușor mai mare la pacienții de sex masculin versus feminin (6.09 vs 4.02). TNSS s-a corelat cu hipereosinofilia – număr absolut ($r = 0.240$, $p = 0.022$) și procentual ($r = 0.367$, $p = 0.000$) și valorile crescute ale IgE serice ($r = 0.283$, $p = 0.003$). Au fost remarcate corelații cu polisensibilizarea ($r = 0.772$, $p = 0.000$) și magnitudinea sensibilizării – evaluată prin mărimea testului cutanat ($r = 0.689$, $p = 0.000$). Corelațiile remarcate indică o legătură strânsă între magnitudinea sensibilizării alergice și nivelul de intensitate al simptomatologiei. O altă corelație importantă remarcată a fost între TNSS și inflamația cronică a mucoasei nazale reprezentată prin hipertrofia mucoasei nazale ($r = 0.564$, $p = 0.000$).

Evaluarea citokinelor și chemokinelor studiate a fost făcută inițial între cele 2 grupuri de studiu, ulterior fiind corelate cu diverse aspecte ale tabloului clinic sau alte caracteristici luate

în considerație în studiu. Din punct de vedere statistic 3 mediatori inflamatori au prezentat diferențe semnificative între cele 2 loturi: IL-4, IL-8 și MIP-1 α (CCL3).

Valorile obținute pentru IL-4 sunt prezentate în tabelul 10.

Descriptives									
IL-4									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
PATIENT	65	11,04354	32,217902	3,996139	3,06033	19,02674	,443	212,232	
MARTOR	12	2,97783	2,033423	,586999	1,68586	4,26981	1,001	7,372	
Total	77	9,78655	29,721526	3,387082	3,04059	16,53250	,443	212,232	
Model									
Fixed Effects			29,771810	3,392813	3,02772	16,54537			
Random Effects				3,392813 ^a	-33,32323 ^a	52,89632 ^a			-11,222053

a. Warning: Between-component variance is negative. It was replaced by 0.0 in computing this random effects measure.

Calculul semnificației statistice a fost realizat utilizând testul t – student și este prezentat în tabelul 11.

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
IL-4	Equal variances assumed	2,426	,124	,862	75	,391	8,065705	9,354128	-10,568673	26,700083
	Equal variances not assumed			1,997	66,611	,050	8,065705	4,039021	,002920	16,128491

Rezultatele obținute confirmă pe de o parte componenta Th2 a inflamației alergice (IL-4 fiind un marker important al acestei linii limfocitare) și pe de altă parte alegerea corectă a loturilor de studiu.

Ceialți doi mediatori pentru care s-au obținut valori diferite între loturi sunt reprezentanți ai familiei chemokinelor : IL – 8 (familia α a acestora) și MIP-1 α /CCL3 (familia β).

Valorile IL-8 obținute în cadrul studiului sunt rezumate în tabelul 12 , iar semnificația statistică este prezentată în tabelul 13.

Tabel 12 IL – 8 Valori serice

Descriptives									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
IL-8*2									
PATIENT	67	35,01298600	75,46640120	9,219688302	16,60528438	53,42068762	1,717560322	370,1296933	
MARTOR	38	15,24833918	12,62582038	2,048178525	11,09833529	19,39834307	2,458863809	74,70283730	
Total	105	27,86006620	61,33546384	5,985728364	15,99014223	39,72999017	1,717560322	370,1296933	
Model									
Fixed Effects			60,88186463	5,941461613	16,07657841	39,64355398			
Random Effects				9,963915689	-98,74348652	154,4636189			118,8883556

Tabel 13 IL- 8 calcul statistic

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
IL-8*2	Equal variances assumed	9,208	,003	1,599	103	,113	19,76464682	12,36384053	-4,756114804	44,28540844
	Equal variances not assumed			2,093	72,361	,040	19,76464682	9,444452745	,9390781126	38,59021552

Valorile obținute sunt în concordanță cu literatura de specialitate citată în partea teoretică care asociază rinita alergică cu valori crescute ale IL-8. Un alt aspect demn de menționat este asocierea, conform datelor științifice, dintre expunerea pacienților cu boli respiratorii la poluarea urbană și creșterea nivelurilor serice ale IL-8. Studiul de doctorat a fost realizat pe pacienți cu domiciliul stabil în municipiul București, una dintre cele mai poluate capitale europene, ceea ce ar putea explica aceste valori mărite. O observație interesantă o reprezintă decelarea unei corelații între valorile celor 2 markeri : IL-4 și IL-8 ($r = 0.350$, $p = 0.02$). Această corelație a fost remarcată recent în literatura de specialitate IL-4 promovând transcripția genei IL-8 prin intermediul căii ERK1/2 în celulele endoteliale arteriale pulmonare umane și equine [27]. Decelarea valorilor crescute ale MIP-1 α (CCL3) reprezintă o descoperire importantă a tezei de doctorat, în măsura în care această chemokină nu este asociată inflamației alergice ci având un rol predominant chemoattractant pentru macrofage, monocite și neutrofile în statusul inflamator acut. MIP-1 α (CCL3) este considerată în literatura de specialitate ca jucând un rol important în dezvoltarea unui număr de boli

inflamatorii și autoimune: poliartrita reumatoidă, sindrom Sjögren, sarcoidoza. MIP-1 α (CCL3) este responsabilă de inițierea răspunsului inflamator prin activarea macrofagelor. MIP-1 α acționează deasemenea ca și un potent chemoattractant pentru anumite linii celulare T : limfocite T CD8⁺ activate (citotoxice). Valoarea medie a concentrațiilor MIP-1 α în cele 2 loturi a fost 15.03 ng/ml pentru pacienți și 8.34 ng/ml pentru martori (vezi tabel 14).

Tabel 14 MIP-1 α (CCL3)

	NUME					
	PATIENT			MARTOR		
	Mean	Median	Standard Deviation	Mean	Median	Standard Deviation
MIP* 2	15,031800745089	9,89598253314	7,11605074025	8,34040353368	9,89598253314	4,465016362124

Asocierea MIP-1 α cu rinita alergică a fost semnificativă statistic , în condițiile în care au fost utilizate două tipuri de teste : t – student (valori presupus neegale p = 0.01) și Mann- Whitney (p = 0.026).(vezi tabel 15 și 16).

Tabel 15 MIP-1 α (CCL3) calcul statistic

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
MIP*2	Equal variances assumed	6,292	,017	3,255	37	,002	6,691397211	2,056041132	2,525462166	10,85733226
	Equal variances not assumed			3,608	36,990	,001	6,691397211	1,854458276	2,933872485	10,44892194

Tabel 16 MIP-1 α (CCL3) calcul statistic

Test Statistics ^a		MIP*2
Mann-Whitney U		103,000
Wilcoxon W		223,000
Z		-2,421
Asymp. Sig. (2-tailed)		,015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		,026 ^b
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.	,014 ^c
	99% Confidence Interval	
	Lower Bound	,011
	Upper Bound	,017
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	Sig.	,008 ^c
	99% Confidence Interval	
	Lower Bound	,005
	Upper Bound	,010

a. Grouping Variable: NUME

b. Not corrected for ties.

c. Based on 10000 sampled tables with starting seed 484067124.

MIP-1 α a fost deasemenea corelată cu diagnosticul de rinită alergică ($r = 0.472$, $p = 0.002$), durata bolii ($r = 0.346$, $p = 0.031$), polisensibilizarea (sensibilizare la cel puțin 2 aeroalergene concomitent)($r = 0.325$, $p = 0.046$) și hipertrofia mucoasei nazale ($r = 0.570$, $p = 0.000$).

Au fost remarcate un număr de asocieri relevante statistic între citokinele și chemokinele evaluate în studiul de doctorat. Valorile IL-4 au fost corelate cu cele ale IL-8 (discutate anterior), MIP -1 α ($r = 0.386$, $p = 0.039$) și ENA- 78 ($r = 0.380$, $p = 0.001$). Corelarea valorilor MIP-1 α cu cele ale IL-4 reprezintă o descoperire a studiului de doctorat. Studiarea literaturii de specialitate a evidențiat un studiu publicat în anul 2010 pe pacienți de sex masculin în care limfocitele NKT au produs concomitent cantități mari de MIP-1 α și moderate de IL-4[28]. O altă asociere interesantă între markeri ai inflamației eozinofilice/neutrofilice este cea între ENA-78 și IL-4. Studiarea literaturii de specialitate a identificat un studiu în care IL-4 a inhibat parțial inducția ENA-78 prin intermediul Polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) , un ARN dublu-catenar sintetic [29].

Valorile MIP-1 α s-au corelat cu TNSS (scorul total al simptomelor nazale) : $r = 0.495$, $p = 0.01$ (corelatie Pearson) și $\rho = 0.453$, $p = 0.04$ (corelatie Spearman).

Au fost evaluate și asocierile dintre markerii studiați și un subgrup de pacienți care prezentau concomitent și conjunctivită alergică. Două chemokine studiate au fost asociate semnificativ cu conjunctivita alergică : IL- 1 β ($p = 0.018$) și ENA-78 ($p = 0.034$). Stimularea IL-1 β a condus la supraproducția de IL-33 care joacă anumite roluri în fiziopatologia conjunctivitei alergice cronice prin intermediul activării mastocitelor. IL-1 β a prezentat valori scăzute în studii experimentale pe animale alergice comparativ cu cele de control atunci când au fost testate medicamente utilizate în conjunctivita alergică : macroporat (murin) și carvedilol (șobolan). Deasemenea, EBI-005, un inhibitor al IL-1 β a prezentat o activitate biologică semnificativă atunci când a fost testată la pacienți cu conjunctivită alergică. Studiarea literaturii de specialitate nu a evidențiat asocieri între ENA-78 și conjunctivita alergică [30].

Evaluarea inflamației căilor aeriene superioare și inferioare a reprezentat o altă temă importantă de cercetare în doctorat. Prezența inflamației cronice a fost considerată a fi existența hipertrofiei mucoasei nazale la nivelul căilor aeriene superioare și hiperreactivitatea bronșica la nivelul căilor aeriene inferioare. Evaluarea hipertrofiei de mucoasă nazală (HMN) a fost realizată de medicul specialist ORL prin examinare directă și endoscopie nazală. HMN

a fost identificată la 37 de pacienți. Evaluarea statistică a decelat o asociere semnificativă a HMN cu rinita alergică ($p = 0.000$). Hipertrofia de mucoasă nazală a fost asociată semnificativ cu valorile MIP-1 α ($p = 0.000$), eozinofilia atât în valoare absolută ($p = 0.047$) cât și procentuală ($p = 0.000$) și valorile Ig E seric total ($p = 0.000$). HMN a fost corelată deasemenea cu polisensibilizarea ($r = 0.525$, $p = 0.000$) și intensitatea sensibilizării alergice ($r = 0.431$, $p = 0.000$). Rezultatele obținute reconfirmă corelarea descrisă în literatura de specialitate între simptomatologie (tabloul clinic), valorile markerilor serici ai terenului atopic (hipereozinofilie, valori crescute ale IgE seric total) și elementele examenului obiectiv (hipertrofia de mucoasă nazală). Corelațiile obținute reconfirmă necesitatea examinării complete (alergologie, orl, paraclinic) a pacienților cu rinită alergică.

Evaluarea hiperreactivității bronșice a fost efectuată prin intermediul tehnicii numită spirometrie cu test bronhodilatator. Pacienții și martorii au efectuat inițial o spirometrie simplă pentru evaluarea bazală a funcției pulmonare. Ulterior li s-a administrat , conform ghidului GINA, 400 mcg de bronhodilatator – salbutamol. O a doua spirometrie a fost efectuată la un interval de 20-30 minute. A fost calculată diferența între cele 2 valori VEMS – post și pre-bonhodilatator. O diferență semnificativă a fost considerată Δ VEMS ≥ 200 ml (12%).

Valoarea medie a diferenței VEMS a fost de 128.21 ± 121.87 ml în grupul de pacienți și 26.84 ± 18.76 ml în grupul martor. Procentual a existat o diferență a VEMS de 4.57% în grupul de pacienți și 2.71% în grupul martor. Evaluarea semnificației statistice a rezultatelor obținute a fost realizată cu ajutorul testelor statistice t-student și Mann-Whitney.

Tabel 17 VEMS calcul statistic

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
VEMS(%)	Equal variances assumed	4,733	,032	2,151	103	,034	1,857	,863	,145	3,568
	Equal variances not assumed			2,043	65,851	,045	1,857	,909	,042	3,671
VEMS(ML)	Equal variances assumed	53,772	,000	5,083	103	,000	101,367	19,944	61,813	140,921
	Equal variances not assumed			6,670	71,407	,000	101,367	15,198	71,067	131,667

Tabel 18 VEMS calcul statistic

Test Statistics^a

		VEMS(%)	VEMS(ML)
Mann-Whitney U		911,500	623,000
Wilcoxon W		1652,500	1364,000
Z		-2,437	-4,356
Asymp. Sig. (2-tailed)		,015	,000
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.	,057 ^b	,000 ^b
	99% Confidence Interval		
	Lower Bound	,000	,000
	Upper Bound	,115	,043
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	Sig.	,019 ^b	,000 ^b
	99% Confidence Interval		
	Lower Bound	,000	,000
	Upper Bound	,053	,043

a. Grouping Variable: NUME

b. Based on 105 sampled tables with starting seed 1502173562.

Pentru diferența absolută a existat o asociere semnificativă statistic în ambele teste ($p = 0.000$). Pentru diferența procentuală cele 2 teste statistice au furnizat valori diferite: $p = 0.045$ (t-student – asociere semnificativă) și $p = 0.057$ (Mann-Whitney – nesemnificativ). VEMS (%) s-a corelat pozitiv cu polisensibilizarea alergică ($r = 0.225$, $p = 0.022$) și intensitatea acesteia ($r = 0.203$, $p = 0.039$). VEMS (ml) s-a corelat cu debutul clinic al afecțiunii ($r = 0.448$, $p = 0.000$), cu polisensibilizarea ($r = 0.466$, $p = 0.000$) și intensitatea acesteia ($r = 0.423$, $p = 0.000$). A fost remarcată corelația pozitivă cu valorile crescute ale eozinofiliei sanguine ($r = 0.193$, $p = 0.049$).

Un aspect important remarcat a fost corelarea inflamației căilor aeriene inferioare cu cea a căilor aeriene superioare ($r = 0.303$, $p = 0.002$), aceasta fiind în concordanță cu studiile de specialitate din literatura internațională care prezintă arborele respirator precum un tot unitar, cu diferențe particulare legate de tipul de țesut de la nivelul fiecărui segment al acestora. În concordanță cu datele de mai sus au fost remarcate corelații între prezența inflamației la nivelul căilor aeriene inferioare și elemente ale tabloului clinic al rinitei alergice: obstrucție nazală ($r = 0.417$, $p = 0.000$), rinoree apoasă ($r = 0.268$, $p = 0.006$), strănut ($r = 0.374$, $p = 0.000$), prurit nazal ($r = 0.272$, $p = 0.005$).

5. Concluzii

Studiul doctoral a fost efectuat într-un ambulator de specialitate din municipiul București pe două loturi de participanți proveniți din populația generală a orașului și a localităților înconjurătoare. Această situație conferă un anumit grad de particularitate studiului deoarece

pacienții au fost selectați din pacientura obișnuită a unui centru medical pluridisciplinar, mai probabil de a reflecta sensibilizarea alergică din zona respectivă. Obiectivul principal al studiului l-a reprezentat evaluarea rolului citokinelor în rinita alergică și alte boli alergice asociate (astm, conjunctivită). Au fost studiate citokine asociate liniilor celulare Th1, Th2, Th17 și Treg. Obiectivele secundare au fost reprezentate de evaluarea asocierilor și corelațiilor între citokinele studiate și diferite aspecte ale alergiilor respiratorii : inflamația aeriană, sensibilizarea , elemente ale tabloului clinic și epidemiologice.

Rinita alergică este considerată o boală Th2-mediată. Studiul nostru este în concordanță cu datele din literatura de specialitate. Valorile medii ale IL-4 au fost de 11.04 pg/ml la pacienți comparativ cu 2.97 pg/ml la subiecții de control, cu o valoare $p = 0.05$ (calculat prin testul t – student). Valorile IgE total au fost semnificativ diferite între cele două loturi 277 UI/ml (media), 116.34 UI/ml (mediana) în lotul de pacienți versus 42.82 UI/ml (media), 14.99 UI/ml (mediana) în lotul martor, cu o valoare $p = 0.001$ (t – student). IgE seric total a fost evaluat și prin intermediul ROC analysis (calcul ariei de sub curbă) obținând valoarea 0.879. Rezultatul obținut este considerat din punct de vedere statistic bun pentru a separa pacienții cu fond atopic de cei din lotul martor. IL-4 și IgE seric total sunt considerați în literatura de specialitate ca markeri ai inflamației Th2-mediate. Aceste date confirmă deasemenea și alegerea corectă a loturilor de studiu. Scorul mediu TNSS în lotul de pacienți cu rinită alergică a fost de 7.0 ± 3.83 , ceea ce a determinat caracterizarea lotului de pacienți cu RA ca având o formă moderată de boală.

Noutatea studiului a fost demonstrarea pentru prima dată în România a implicării a două chemokine (CXCL8 (IL-8) și CCL3 (MIP-1 α)) în rinita alergică. IL-8 a prezentat o valoare medie de 35.01 pg/ml (pacient) versus 15.24 pg/ml (martor) cu o valoare $p = 0.04$ (t – student). Aceste rezultate sunt deasemenea în concordanță cu literatura internațională. În plus articole recente au legat creșterea IL-8 la pacienții cu rinită alergică de poluarea urbană (studii efectuate în orașe intens poluate din Asia de Sud-Est). Ținând cont de faptul că Bucureștiul este , conform datelor instituțiilor responsabile de calitatea mediului, cea mai poluată capitală din Uniunea Europeană, datele obținute în studiul nostru oferă o imagine asupra importanței factorilor externi nocivi asupra alergiilor respiratorii. Studii recente indică că poluarea atmosferică crește alergenicitatea polenurilor provenite de la plantele anemofile conducând astfel la creșterea incidenței bolilor alergice respiratorii (rinită, astm, conjunctivită).

Un alt aspect de noutate al tezei de doctorat îl reprezintă obținerea unor diferențe semnificative statistic pentru chemokina CCL3 (MIP-1 α) între cele două loturi. Valorile medii ale MIP-1 α au fost de 15.03 pg/ml în lotul de pacienți și 8.34 pg/ml în lotul martor cu un $p = 0.001$ (t- student). Decelarea acestor valori reprezintă o noutate în evaluarea și caracterizarea rinitei alergice, până în acest moment MIP-1 α fiind cunoscută ca având roluri în patogeneza astmului prin efecte asupra musculaturii netede din pereții căilor aeriene și în atragerea eosinofilelor în căile aeriene. Un alt aspect observat a fost corelarea acestei chemokine cu inflamația căilor aeriene reprezentată prin hipertrofia mucoasei nazale ($r = 0.570$, $p = 0.000$) în mod direct și indirect corelarea cu durata bolii ($r = 0.346$, $p = 0.031$). Corelarea cu polisensibilizarea ($r = 0.325$, $p = 0.046$) este un alt aspect de noutate , această descoperire necesitând studii ulterioare pentru explicarea în detaliu a mecanismului fiziopatologic. Valorile MIP-1 α au fost deasemenea corelate cu gradul de afectare clinică măsurat cu ajutorul scorului TNSS ($r = 0.495$, $p = 0.001$). Analiza ROC pentru CCL3 a obținut o valoare de 0.714 considerată optimă din punct de vedere statistic pentru a diferenția pacienții de cei din lotul martor.

Corelarea unor chemokine (IL-8, ENA-78) și citokine (IFN - γ) asociate inflamației neutrofilice cu rinita alergică (afecțiune predominant eozonofilică)(IL- 8 ($p = 0.022$), ENA-78 ($p = 0.046$), IFN- γ ($p = 0.045$)) reprezintă un alt element de noutate al tezei de doctorat. Această corelație sugerează implicarea liniei celulare limfocitare Th1 în patogeneza rinitei alergice. O altă corelație interesantă a fost observată între citokine asociate inflamației eozinofilice IL-4 și chemokine asociate inflamației neutrofilice : IL-8 ($r = 0.350$, $p = 0.02$), MIP-1 α ($r = 0.386$, $p = 0.039$) și ENA-78 ($r = 0.512$, $p = 0.000$). Asocierile decelate în cadrul studiului indică un posibil rol al liniilor celulare Th1 și Th17 și inflamației neutrofilice în patogeneza rinitei alergice.

Scorul TNSS a fost corelat cu anumite elemente studiate în cadrul doctoratului. Hipereosinofilia atât în valoare absolută ($r = 0.240$, $p = 0.022$) cât și procentual ($r = 0.367$, $p = 0.000$) și valorile IgE seric total ($r = 0.283$, $p = 0.003$) s-au corelat cu gradul de severitate al rinitei. O altă corelație observată și preconizată a fost între durata bolii și scorul TNSS ($r = 0.532$, $p = 0.000$). Polisensibilizarea ($r = 0.772$, $p = 0.000$) și intensitatea acesteia (măsurata prin dimensiunea testului prick $r = 0.689$, $p = 0.000$) s-au corelat previzibil cu nivelul simptomatologiei. O altă corelație previzibilă a fost remarcată cu markerul obiectiv al inflamației cronice la nivelul mucoasei nazale, hipertrofia de mucoasă nazală ($r = 0.564$, $p = 0.000$). Evaluarea pacienților cu rinită alergică a fost realizată și din punctul de vedere al caracterului temporal al acesteia : sezonier (SAR)/peren (PAR). În concordanță cu studiile de

specialitate SAR a fost corelată cu polisensibilizarea. Principalele polenuri care au determinat sensibilizarea la pacienți au fost gramineele (inclusive cereale) și familia Asteraceae (Ambrosia elatior, Artemisia vulgaris, Helianthus annuus). Rezultatele obținute sunt corelate cu studiile de aerobiologie publicate în diverse țări europene. Gramineele reprezintă principala sursă de alergii respiratorii sezoniere la nivel european. Ambrosia elatior, o buruiănă cu originea în America de nord și care a început să apară în Europa la începutul secolului XX a prezentat o extindere agresivă în ultimele decenii în anumite zone geografice ale României (Banat, Oltenia, Muntenia, Dobrogea) . Helianthus annuus (floarea soarelui) este o plantă intens cultivată în sudul României (sute de mii ha anual) și care face parte din aceeași familie ca și Ambrosia (Asteraceae) cu care prezintă un anumit grad de reactivitate încrucișată. Studii ulterioare sunt necesare pentru a determina relevanța clinică a reactivității încrucișate între Ambrosia elatior și Helianthus annuus.

Un alt aspect remarcat în cadrul studiului a fost corelarea inflamației căilor aeriene superioare cu cea a căilor inferioare. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu literatura de specialitate care prezintă căile aeriene ca fiind un tot unitar indiferent de localizare și de tipul de țesut de la acel nivel, termen cunoscut ca United Airway Disease (UAD). Inflamația de căi aeriene inferioare s-a corelat semnificativ cu simptomatologia nazală din rinita alergică.

Lucrarea de față punctează complexitatea fiziopatologiei rinitei alergice. Clasic rinita alergică este considerată o boală mediată de limfocitele Th2. Contribuția personală a autorului constă în punerea în evidență a rolului unui număr de chemokine , anterior asociate cu inflamația neutrofilică, MIP-1 α (CCL3) și IL-8 (CXCL8) în patogeneza rinitei alergice. Deasemenea acest studiu , datorită regiunii geografice din care au fost selectați pacienții, a pus în evidență rolul poluării urbane (prin creșterea valorilor IL-8) în patogeneza alergiilor respiratorii. Studiul doctoral a relevat existența unei categorii particulare de pacienți cu rinită alergică : persoane cu domiciliu în mediu urban expuse zilnic la niveluri mari de poluare urbană.

6. Bibliografie selectivă

1. Yii ACA, Tay TR, Choo XN, Koh MSY, Tee AKH, Wang DY. Precision medicine in united airways disease: A "treatable traits" approach. *Allergy*. 2018;73(10):1964-1978.
2. Passalacqua G, Ciprandi G, Canonica GW. The nose-lung interaction in allergic rhinitis and asthma: united airways disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:7-13
3. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T et al., World Health Organization.; GA(2)LEN.; AllerGen. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008 Apr;63 Suppl 86:8-160. Review.
4. Becker AB, Abrams EM. Asthma guidelines: the Global Initiative for Asthma in relation to national guidelines. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2017 Apr;17(2):99-103.
5. Ciprandi G, Caimmi D, Miraglia Del Giudice M etc. Recent developments in United airways disease. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012;4(4):171-177.
6. Giavina-Bianchi P, Aun MV, Takejima P, Kalil J, Agondi RC. United airway disease: current perspectives. *J Asthma Allergy*. 2016 May 11;9:93-100.eCollection 2016. Review.
7. Licari A, Castagnoli R, Denicolò CF, Rossini L et al. The Nose and the Lung: United Airway Disease? *Front Pediatr*. 2017 Mar 3;5:44. eCollection 2017. Review.
8. Moldaver DM, Larché M, Rudulier CD. An Update on Lymphocyte Subtypes in Asthma and Airway Disease. *Chest*. 2017;151(5):1122-1130. Review.
9. Nakanishi K, Tsutsui H, Yoshimoto T. Importance of IL-18-induced super Th1 cells for the development of allergic inflammation. *Allergol Int*. 2010;59(2):137-141. doi:10.2332/allergolint.10-RAI-0208
10. Tsvetkova-Vicheva V, Konova E, Lukanov T, Gecheva S, Velkova A, Komsa-Penkova R. Interleukin-17 producing T cells could be a marker for patients with allergic rhinitis. *Isr Med Assoc J*. 2014 Jun;16(6):358-62.
11. Liu Y, Zeng M, Liu Z. Th17 response and its regulation in inflammatory upper airway diseases. *Clin Exp Allergy*. 2015 Mar;45(3):602-
12. Ray A, Khare A, Krishnamoorthy N, Qi Z, Ray P. Regulatory T cells in many flavors control asthma. *Mucosal Immunol*. 2010 May;3(3):216-29. Epub 2010 Feb 17.

13. Leaker BR, Malkov VA, Mogg R, et al. The nasal mucosal late allergic reaction to grass pollen involves type 2 inflammation (IL-5 and IL-13), the inflammasome (IL-1 β), and complement. *Mucosal Immunol.* 2017;10(2):408-420.
14. Pelikan Z. Delayed type of asthmatic response to allergen challenge and cytokines in the peripheral blood. *Respiration.* 2012;84(5):385-95.
15. Tyurin YA, Lissovskaya SA, Fassahov RS, Mustafin IG et al. Cytokine Profile of Patients with Allergic Rhinitis Caused by Pollen, Mite, and Microbial Allergen Sensitization. *J Immunol Res.* 2017;2017:3054217.
16. Nasiri R, Movahedi M, Amirzargar AA, Hirbod-Mobarakeh A et al. Association of interleukin 6 single nucleotide polymorphisms with allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014 Sep;78(9):1426-9.
17. Patterson's Allergic Diseases. Eight Edition. Chapter 1. Review of Immunology. p1-15. 2018
18. Singh SR, Sutcliffe A, Kaur D, Gupta S, Desai D, Saunders R, Brightling CE. CCL2 release by airway smooth muscle is increased in asthma and promotes fibrocyte migration. *Allergy.* 2014 Sep;69(9):1189-97.
19. Halwani R, Al-Abri J, Beland M, Al-Jahdali H et al. CC and CXC chemokines induce airway smooth muscle proliferation and survival. *J Immunol.* 2011 Apr 1;186(7):4156-63.
20. Fujie H, Niu K, Ohba M, Tomioka Y et al. A distinct regulatory role of Th17 cytokines IL-17A and IL-17F in chemokine secretion from lung microvascular endothelial cells. *Inflammation.* 2012 Jun;35(3):1119-31.
21. Baos S, Calzada D, Cremades L, Sastre J et al. Biomarkers associated with disease severity in allergic and nonallergic asthma. *Mol Immunol.* 2017 Feb;82:34-45. .
22. Tworek D, Kuna P, Młynarski W, Górski P et al. MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) and I-TAC (CXCL11) concentrations after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Arch Med Sci.* 2013 Oct 31;9(5):849-53.
23. Desai M, Oppenheimer J. Elucidating asthma phenotypes and endotypes: progress towards personalized medicine. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016 May;116(5):394-401. Review.
24. Agache I, Akdis CA. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. *Allergol Int.* 2016 Jul;65(3):243-52. Review.

25. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ et al; Global Allergy and Asthma European Network.; Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*. 2012 Jan;67(1):18-24.
26. GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention: Updated. ; 2020
27. Yang DF, Huang H, Guan S, Zhu HF, Zhang CC, Zhao JP, Fang HJ, Lavoie JP. Interleukin(IL)-4 promotion of CXCL-8 gene transcription is mediated by ERK1/2 pathway in human pulmonary artery endothelial cells. *Mol Immunol*. 2011 Sep;48(15-16):1784-92.
28. Snyder-Cappione JE, Tincati C, Eccles-James IG, Cappione AJ, Ndhlovu LC, Koth LL, Nixon DF. A comprehensive ex vivo functional analysis of human NKT cells reveals production of MIP1- α and MIP1- β , a lack of IL-17, and a Th1-bias in males. *PLoS One*. 2010 Nov 3;5(11):e15412.
29. Imaizumi T, Hatakeyama M, Taima K, Ishikawa A, Yamashita K, Yoshida H, Satoh K. Effect of double-stranded RNA on the expression of epithelial neutrophil activating peptide-78/CXCL-5 in human endothelial cells. *Inflammation*. 2004 Aug;28(4):215-9.
30. Goldstein MH, Tubridy KL, Agahigian J, Furfine E et al. A Phase 2 Exploratory Study of a Novel Interleukin-1 Receptor Inhibitor (EBI-005) in the Treatment of Moderate-to-Severe Allergic Conjunctivitis. *Eye Contact Lens*. 2015 May;41(3):145-55.

7. Lista de abrevieri

UAD – United Airway Disease

GINA – Global Initiative for Asthma

RA –Rinita Alergică

Chemokine - CC

EAACI - European Academy of Allergology and Clinical Immunology

HMN – Hipertrofie mucoasă nazală

VEMS – Volum expirator maxim per secundă

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

TNSS - scorul total al simptomelor nazale

ORL – Otorinolaringologie

8. Lista de lucrări publicate

Articole

- 1. **Berghi Nicolae Ovidiu**, Dumitru Mihai, Țucureanu Cătălin, Caragheorgheopol Ramona, Bără Constantin. Serum Values of CXCL8 (Interleukin-8) in Allergic Rhinitis – Series of Case Reports . Proceedings Of National ENT, Head and Neck Surgery Conference (Arad, Romania, 06-09 June 2018) p 41-45. **Indexată Web of Science Core Collection**
- 2. **Berghi Ovidiu**, Dumitru Mihai, Caragheorgheopol Ramona, Cătălin Țucureanu, Anca Simioiniuc – Petrescu, Roxana Sfrent-Cornățeanu, Călin Giurcăneanu. The Relationship between Chemokine Ligand 3 and Allergic Rhinitis. *Cureus*. 2020;12(4):e7783. Published 2020 Apr 22. doi:10.7759/cureus.7783. **Indexată Pubmed/Web of Science Core Collection**
- 3. **Berghi NO**, Dumitru M, Vrinceanu D, Ciuluvica RC, Simioniuc-Petrescu A, Caragheorgheopol R, Tucureanu C, Cornateanu RS and Giurcaneanu C: Relationship between chemokines and T lymphocytes in the context of respiratory allergies (Review). *Exp Ther Med* 20: 2352-2360, 2020 **Indexată Pubmed/Web of Science Core Collection Factor Impact ISI 1,785**

Postere/Prezentări orale congrese medicale naționale/internaționale

1. Nicolae Ovidiu Berghi, Mihai Dumitru, Catalin Tucureanu, Ramona Caragheorgheopol, Roxana Sfrent-Cornateanu. Concentrațiile Serice Ale CXCL5 ȘI CXCL8 In Rinita Alergica - Studiu-Pilot. P53. Congresul National de Otorinolaringologie si Chirurgie Cervico-Faciala cu participare internationala. 6-9 iunie 2018 Arad

2. N.O. Berghi, C. Bara, R. Sfrent-Cornateanu. High concentrations of seric chemokines in patients with allergic rhinitis (results of a pilot-study). *MAEDICA - a Journal of Clinical Medicine*. Supplement Congress of the University of Medicine and Pharmacy CAROL DAVILA (June 7th -9th 2017) p.89

3. Berghi, NO ; Marta, D ; Tucureanu,C; Caragheorgheopol, R ; Mihai, D ; Covaci, A ; Bara, C; Sfrent-Cornateanu, R. ALLERGY. Volume: 74. Pages: 558-558. Supplement: 106. Special Issue: SI. Meeting Abstract: TP1030. Published: AUG 2019

4. Nicolae Ovidiu Berghi, Catalin Tucureanu , Ramona Caragheorgheopol , Mihai Dumitru , Daciana Marta , Constantin Bara , Roxana Sfrent-Cornateanu. IL-1 β in Patients with Allergic Conjunctivitis. MAEDICA - a Journal of Clinical Medicine. Supplement Congress of the University of Medicine and Pharmacy CAROL DAVILA (October 10th -12th 2018) p.76

5. Nicolae Ovidiu Berghi, Mihai Dumitru , C. Tucureanu , R. Caragheorgheopol , Constantin Bara , Roxana Sfrent-Cornateanu. THE ROLE OF TOTAL NASAL SYMPTOM SCORE IN THE EVALUATION OF ALLERGIC RHINITIS. Abstracts of the 5th Congress of the Romanian Rhinologic Society. Romanian Journal of Rhinology, Volume 9, No. 36, October - December 2019

6. Ovidiu Nicolae Berghi,Mihai Dumitru.Co-Sensitization in Asteraceae Family – Pilot study. London Rhinology Volume 56 SUPPLEMENT 27 JUNE 2018

7. N.O. Berghi, M. Dumitru, C. Tucureanu, R. Caragheorghe, D. Marta, C. Bara, R. Sfrent-Cornateanu . Nasal mucosal hypertrophy and allergic rhinitis. 5th Congress of European of ORL – NHS BRUSSELS , JUNE 29 –JULY 3, 2019