



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

БИОМАРКЕРИ АЛЕРГИЈСКИХ ФЕНОТИПОВА КОД ДЕЦЕ УЗРАСТА ДО 2 ГОДИНЕ

Кључне речи :

алергија, ECP, TSLP, TGF beta, Clara cell protein

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Више од половине свих случајева астме почиње пре 3. године живота, а 80% пре 6. године. Алергијски маратон представља појаву да се код генетски предиспонираних особа у раном детињству јављају екзем, алергија на храну и ИгЕ-везани визиг, који уз појаву алергијске кијавице прогредира у астму у старијем узрасту. Актуелна истраживања у свету обухватају испитивање серумских биомаркера алергијског запаљења, у покушају разјашњења имунопатолошких механизма, који доводе до сличних симптома у оквиру алергијских *IgE*-везаних и *nonIgE*-везаних, као и неалергијских болести. ЦИЉ: Утврдити значај серумских биомаркера (ECP-a, TGF beta, TSLP и CC16) у диференцијацији фенотипова алергијских болести испољених у прве две године живота. МЕТОДОЛОГИЈА: Испитивањем ће бити обухваћена деца узраста до 2 године која ће бити подељена у три групе: 1) деца са визингом; 2) деца са екцемом; 3) деца са визингом и екцемом. Концентрације укупних *IgE*, специфичних *IgE* (*Phadiatop infant*) и ECP одредићемо *in vitro* ФИА методом на *Immucap-100* апарату. Концентрација биомаркера (TGF beta, TSLP и CC16) одређиваће се у узорцима серума ELISA методом. ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ: Прецизно утврђивање алергијских фенотипова код деце у односу на имунопатолошке механизме који до њих доводе. Еозинофилну инфламацију испољила би деца са атопијском конституцијом, највишу серумску концентрацију *TGF beta* имала би деца са атопијским визингом, а *TSLP-a* деца са удруженим екцемом и визингом, док би деца са изолованим визингом имала ниску концентрацију *CC16* без обзира на атопију. ЗНАЧАЈ СТУДИЈЕ: Применљивост у клиничкој пракци у смислу разликовања алергијских фенотипова код деце, а тиме и примене оптималне терапије, као и правовремено и адекватно спровођење превенције алергијских болести.

Циљ истраживања

Утврдити значај серумских биомаркера (*ECP-a*, *TGF beta*, *TSLP* и *CC16* протеина) у диференцијацији фенотипова алергијских болести испољених у прве две године живота.



Актуелност истраживања

Више од половине свих случајева астме почиње пре 3. године живота, а 80% пре 6. године (1). Алергијски маратон представља појаву да се код генетски предиспонираних особа у раном детињству јављају екцем, алергија на храну (спонтано нестају током 2. и 3. године живота) и ИгЕ-везани визиг, који уз појаву алергијске кијавице прогредира у астму у старијем узрасту (2). Генетска предиспозиција условљава рану сензибилизацију на инхалаторне алергене са настанком хроничне инфламације епитела дисајних путева, што уз понављана оштећења и последичну репарацију, доводи до ремоделовања дисајних путева, а за последицу има бронхијалну хиперреактивност и астму. Као други могући имунопатогенетски механизми, који учествују у настанку ремоделовања дисајних путева у раном детињству, се наводе: 1) постојање "астма фактора" који истовремено индукује еозинофилну инфламацију и ремоделовање; 2) протективно ремоделовање које превенира хиперреагибилност дисајних путева; 3) поремећај репарације дисајних путева (3).

У узрасту до 2 године најчешће клиничке манифестације алергије су екцем/атопијски дерматитис и визинг/астма. У више студија је показана повезаност између атопијског дерматитиса и астме, а од могућих механизма ове повезаности наводе се или системски поремећаји имунолошког система, који доводе до изражене *Th2* инфламације или дефекти баријере у кожи и/или слузокожи бронхија који узрокују имунолошку инфламацију при излагању алергену (4).

Велики број студија бави се испитивањем серумских биомаркера алергијског запаљења, у покушају разјашњења имунопатолошких механизма, који доводе до сличних симптома у оквиру алергијских *IgE*-везаних (80% дечије астме и 50% астме одраслих) и *nonIgE*-везаних (атопијски дерматитис), као и неалергијских болести (астма на напор), са значајним импликацијама на терапију и превенцију.

Еозинофилни катјонски протеин (*ECP*) је рибонуклеаза, а ослобађа из еозинофила у току њихове дегранулације. Прегледом литературе утврђено да је *ECP* добар показатељ степена алергијског запаљења у алергијским болестима, али да није повезан са настанком хиперреактивности дисајних путева у астми. Није утврђена статистички значајна разлика између нивоа *ECP*-а код асматицара са атопијском и неатопијском астмом (5).

TGF beta је протеин који контролише ћелијску пролиферацију и диференцијацију са значајним ефектом у процесима зарастања рана, а због потврђеног ефекта на хиперплазију и хипертрофију глатких мишићних ћелија у бронхијама, разматра се и као главни биомаркер ремоделовања дисајних путева у астми (6). У астми код деце и одраслих утврђене су повишене концентрације серумског *TGF beta* у односу на здраве особе (7).

Тимусни стромални лимфопоетин (*TSLP*) је протеин од значаја у диференцијацији Т лимфоцита, који се разматра као протеин одговоран за настанак склоности ка алергији (8), али и као генерални маркер дефекта коже као баријере (9). Показан је есенцијалан значај *TSLP* у антигеном изазваној диференцијацији Т лимфоцита ка *Th2* одговору у алергијским инфламаторним болестима у кожи. Утврђено је да *TSLP* трансгени мишеви могу развити



хиперреагибилност бронхијалног стабла, тј. астме и у одсуству дефекта коже, као и без присуства еозинофила (9).

16 kDa Clara cell protein (CC16) продукују Клара ћелије у терминалним бронхиолама. Овај протеин има протективне ефекте на епител дисајних путева и разматра се као биомаркер интегритета плућног епитела у акутним и у хроничним болестима плућа. Користи се за детекцију ефеката инхалаторних иританата на плућни епител, као што су дувански дим или аерозагађење. Код пацијената са астмом утврђени су нижи нивои серумског CC16 протеина(10). У испитивању 813 одојчади утврђен је нижи ниво Clara Cell протеина код деце са понављаним визингом, али то није било повезано са алергијском сензибилизацијом (11).

**Предмет и опис истраживања,
задачи, методологија, очекивани резултати:**

А. Задачи истраживања:

- 1) Извршити груписање деце узраста до две године са симптомима алергијских болести у различите фенотипове: 1) деца са визингом, 2) деца са екцемом, 3) деца са визингом и екцемом и 4) здрава деца.
- 2) Утврдити постојање сензибилизације на уобичајене алергене у испитиваним групама деце.
- 3) У испитиваним групама утврдити степен еозинофилне инфламације, одређивањем серумског нивоа ECP-a.
- 4) У испитиваним групама утврдити степен ремоделовања дисајних путева, одређивањем серумског нивоа TGF beta.
- 5) У испитиваним групама утврдити постојање дефекта коже као баријере, одређивањем серумског нивоа TSLP -a.
- 6) У испитиваним групама утврдити постојање дефекта слузокоже дисајних путева као баријере, одређивањем серумског нивоа CC16.
- 7) Утврдити постојање евентуалне повезаности између серумских нивоа наведених биомаркера и фенотипова алергијских болести.

Б. Пацијенти.

Испитивањем ће бити обухваћена деца узраста до 2 године која су до дана укључивања у студију имала бар једну бронхоопструкцију потврђену од стране педијатра и/или постојање екцема. Испитаници ће бити подељени у три групе: 1) деца са визингом; 2) деца са екцемом; 3) деца са визингом и екцемом. Контролну групу чиниће здрава деца која нису имала испољавање ових симптома.



Ц. Методологија.

Општи протокол:

Деца ће се уз сагласност родитеља укључивати у студију приликом систематског педијатријског прегледа, непосредно пре вакцинације или ревакцинације у тренутку потпуног здравља детета. Након анкетања родитеља и увида у медицинску документацију (педијатријски картон) узимаће се по 2 мл пуне крви. Крв ће се после 60 мин. центрифугирати, а серум складиштити на -75 C , до тренутка анализирања.

Утврђивање сензибилизације и степена еозинофилне инфламације

Концентрације укупних *IgE* и специфичних *IgE* (*Phadiatop infant*) одредићемо *in vitro* *FIA* методом на *Immucap-100* апарату. Истом методом одређиваће се и концентрација *ECP-a* у серуму.

Одређивање серумске концентрације биомаркера

Концентрација биомаркера (*TGF beta*, *TSLP* и *CC16*) одређиваће се у узорцима серума *ELISA* методом.

Статистичка обрада: Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима концентрације *ECP-a* и *TGF beta*, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за т-тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму *G*Power3*. На основу претпоставке која захтева већи узорак (*ECP*), утврђен је дефинитивни број испитаника према групама и то: здрави 32 испитаника, деца са визингом 32 испитаника, деца са екземом 32 испитаника и деца са визингом и екземом 32 испитаника (**укупан узорак од 128**). Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (т-тестом за два независна узорка или *Mann-Whitney U* тестом) између три групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет *SPSS*.

Очекивани резултати:

Сходно подацима из литературе који се односе на алергијске фенотипове код деце и имунопатолошких механизма значајних за настанак астме, можемо претпоставити да ће деца са изолованим атопијским визингом, као и деца са атопијским дерматитисом и визингом имати високе концентрације *ECP-a*, *TGF* бета и *TSLP-a*. Деца са атопијским дерматитисом ће имати високе концентрације *ECP-a* и *TSLP-a*. Деца са неатопијским визингом ће имати снижене вредности *CC16*.

Значај истраживања

Истраживање ће допринети разјашњавању клиничких симптома алергијских болести у најранијем узрасту из аспекта имунопатолошких механизма, што има значајне импликације на постављање тачне дијагнозе, а самим тим и примену оптималне терапије, као и правовремено и адекватно спровођење превенције алергијских болести.



Временски оквир

Сходно величини студијског узорка и броју деце узраста до 2 године са симптомима алергијских болести која имају систематске прегледе у централном Дечијем диспанзеру Дома здравља у Крагујевцу, предвиђено је да ова студија траје 6 месеци.

Литература

1. Martinez F. Development of Wheezing Disorders and Asthma in Preschool Children. *Pediatr* 2002;109 (2):362-67.
2. Hamelmann E, Herz U, Holt A. et al. New Visions for basic research and primary prevention of pediatric allergy: An iPAK summary and future trends. *Pediatr Allergy Immunol* 2008;19(Suppl.19):4-16.
3. Turato G, Barbato A, Baraldo S et al. Nonatopic Children with Multitrigger Wheezing Have Airway Pathology Comparable to Atopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:476–482.
4. Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 2006;116:1150–1158.
5. Koh GC, Shek LP, Goh DY et al. Eosinophil cationic protein: is it useful in asthma? A systematic review. *Respir Med.* 2007;101(4):696-705.
6. Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol* 2007;85(5):348-56.
7. Manuyakorn W, Kamchaisatian W, Atamasirikul K et al. Serum TGF-beta1 in atopic asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2008;26(4):185-9.
8. Headley MB, Zhou B, Shih WX et al. TSLP conditions the lung immune environment for the generation of pathogenic innate and antigen-specific adaptive immune responses. *J Immunol* 2009;182(3):1641-7.
9. Demehri S, Morimoto M, Holtzman MJ, Kopan R. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol.* 2009;7(5):e1000067.
10. Kawai T, Abe S. Serum Levels of Clara Cell 10-kDa Protein Are Decreased in Patients with Asthma. *Lung* 1999;177:45–52.
11. Yang KD, Ou CY, Chang JC, et al. Infant frequent wheezing correlated to Clara cell protein 10 (CC10) polymorphism and concentration, but not allergy sensitization, in a perinatal cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;20(4):842-8.

Руководилац пројекта:

проф. др Дејан Баскић

Главни истраживач:

проф. др Дејан Баскић

Ангажовани истраживачи:

Доц. др Марина Петровић

Асс. Гордана Костић

Др Невенка Илић, специјалиста педијатрије

Др Весна Величковић, специјалиста педијатрије