

**Наслов рада:**  
**БИОМАРКЕРИ АЛЕРГИЈСКИХ ФЕНОТИПОВА**  
**КОД ДЕЦЕ УЗРАСТА ДО 2 ГОДИНЕ**

Име и презиме: Невенка Илић

Занимање: Специјалиста педијатрије, Лекар на дијагностици алергија

Адреса:(куће) Атинска 14/18, 34000 Крагујевац; (посла) Николе Пашића 1, 34000 Крагујевац

Телефон: 034 341-272 (кућа); 504-540 (посао)

Моб тел: 064 3700318

Адреса електронске поште: *ilic\_nevenka@yahoo.com*

Име и презиме потенцијалног ментора: проф. др Дејан Баскић

Титула: ванредни професор

Предмет: Микробиологија са имунологијом

# Општи подаци и протокол истраживања

## Назив: БИОМАРКЕРИ АЛЕРГИЈСКИХ ФЕНОТИПОВА

### КОД ДЕЦЕ УЗРАСТА ДО 2 ГОДИНЕ

#### САЖЕТАК

##### УВОД

Више од половине свих случајева астме почиње пре 3. године живота, те је идентификација алергијских феноטיפова у дечијој популацији од значаја за истраживања појединачних патофизиолошких механизма везаних за настанак астме.

##### МЕТОД

Испитивањем ће бити обухваћена деца узраста до 2 године која ће бити подељена у две групе 1) здрава деца без испољавања симптома и 2) деца која су имала испољавање симптома који се могу повезати са алергијским болестима ("*allergy like*"). Деца са "*allergy like*" симптомима биће разврстана у дефинисане фено типове атопије. Концентрације укупних *IgE*, специфичних *IgE* (*Phadiatop infant*) и *ECP* одредићемо *in vitro* ФИА методом на *Immunocap-100* апарату. Концентрација биомаркера (*IL 10*, *TGF beta*, *TSLP* и *CC16*) одређиваће се у узорцима серума *ELISA* методом.

##### ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ

Деца са атопијом имаће повишене концентрације укупних *IgE* антитела и снижену концентрацију *IL 10*. Деца са гастроинтестиналном болешћу ће имати и повећани серумски ниво *TSLP -a* као показатеља дефекта коже и слузокожа у односу на контролну групу. Деца са атопијском респираторном болешћу у случају постојања рецидивантног визинга имаће и повећање концентрације *TGF beta 1* у односу на контролну групу, док ће деца са неатопијским визингом имати снижене вредности *CC16*. Деца са мултисистемским испољавањем атопије имаће највише концентрације укупних *IgE* антитела, *ECP-a*, *TSLP -a* и *TGF beta 1*.

##### ОЧЕКИВАНИ ЗАКЉУЧАК

Различити клинички фено типови атопије у узрасту до 2 године узоковани су дефектима коже и слузокоже као баријере и имунопатогенетским разликама у цитокинском одговору на алергене. Диференцирање појединачних атопијских, као и неатопијских симптома у најранијем узрасту има значајне импликације на прогнозу, терапију и превенцију хроничних респираторних болести.

КЉУЧНЕ РЕЧИ атопија, деца, *IL 10*, *ECP-a*, *TSLP -a*, *TGF beta 1*.

## УВОД

Више од половине свих случајева астме почиње пре 3. године живота, а 80% пре 6. године (1). Стога је идентификација алергијских фенотипова у дечијој популацији од значаја је за фокусирање истраживања на узорке и последице у оквиру појединачних патофизиолошких механизма везаних за настанак астме (2). 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 (3). 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 (4). 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 хиперреагивност дисајних путева; 3) поремећај репарације дисајних путева (5).

Еозинофилни катјонски протеин (*ECP*) се ослобађа из еозинофила у току њихове дегранулације. *ECP* је добар показатељ степена алергијског запаљења у алергијским болестима, али 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 (6).

*IL 10* је имуномодулаторни цитокин са главном биолошком функцијом у лимитирању и заустављању инфламаторног процеса и у регулацији и диференцијацији имунолошких ћелија (7). Један од имунопатолошких механизма настанка алергијских болести подразумева снижење броја или функције Т регулаторних ћелија (8). Оштећена продукција *IL 10* након вакцинације, инфекција и промене цревне флоре може бити узрок развоја *Th2* имунолошког одговора, што за последицу има клиничко испољавање алергијских болести (9).

*TGF beta* је протеин који контролише ћелијску пролиферацију и диференцијацију са значајним ефектом у процесима растања 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 (10). У астми код деце и одраслих утврђене су повишене концентрације серумског *TGF beta* у односу на здраве особе (11).

Тимусни стромални лимфопоетин (*TSLP*) је протеин од значаја у диференцијацији Т лимфоцита, који се разматра као протеин одговоран за настанак склоности ка алергији (12), али и као генерални маркер дефекта коже као баријере (13). 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 хиперреагивност бронхијалног стабла, тј. астме и у одсуству дефекта коже, као и без присуства еозинофила (13).

*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 (14). У испитивању 813 одојчади утврђен је нижи ниво *Clara Cell* протеина код деце са понављаним визингом, али то није било повезано са алергијском сензибилизацијом (15).

## ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

### А. Циљеви истраживања:

- 1) Дефинисати клиничке фенотипове атопијске конституције код деце узраста до 2 године
- 2) Утврдити повезаност серумских нивоа укупних *IgE* антитела, *IL 10*, *ECP-a*, *TGF beta 1*, *TSLP -a* и *CC16* и атопијских фенотипова код деце узраста до 2 године

### Б. Хипотезе истраживања:

- 1) Деца са атопијом имају повишене вредности укупних *IgE* антитела и снижене концентрације *IL 10* у односу на здраву децу.
- 2) Атопија се у узрасту до 2 године манифестује у три фенотипа:
  - 1) гастроинтестинална болест са клиничким знацима атопијског дерматитиса и/или појавом рецидивантних гастроинтестиналних симптома (ређе столице, повраћање и изражени грчеви);
  - 2) респираторна болест у виду рецидивантног ринитиса, акутног отитиса и/или визинга и
  - 3) мултисистемска болест са комбинованим симптомима и/или копривњачом.
- 3) Деца са атопијском гастроинтестиналном болешћу имају повећани серумски ниво *TSLP -a* као показатеља дефекта коже и слузокожа у односу на контролну групу.
- 4) Деца са атопијском респираторном болешћу имају повећање концентрације *TGF beta 1* у односу на контролну групу, док ће деца са неатопијским визингом имати снижене концентрације *CC16*.
- 5) Деца са мултисистемским испољавањем атопије имаће највише концентрације укупних *IgE* антитела, *ECP-a*, *TSLP -a* и *TGF beta 1*, а најниже концентрације *IL 10*.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

### Врста студије:

Аналитичком студијом пресека утврдиће се учесталост симптома који се могу повезати са алергијом, а клиничка студија ће обухватити утврђивање атопије и нивоа серумских биомаркера у испитиваним групама.

### Методологија:

#### А. Пацијенти

Испитивање ће бити спроведено код деце узраста до 2 године, при чему ће се деца укључивати у студију методом случајног узорка, при редовним систематским прегледима, непосредно пре вакцинације или ревакцинације, у тренутку потпуног здравља детета. Подаци ће се добити анкетирањем родитеља и увидом у медицинску документацију (педијатријски картон). Деца ће бити разврстана у две групе: 1) здрава деца без испољавања симптома и 2) деца која су у периоду од рођења до тренутка испитивања, имала испољавање симптома и знакова који се могу повезати са алергијским болестима ("*allergy like*" симптоми) и то: једна или више понављаних бронхоопструкција потврђених од стране педијатра, рецидивантни ринитис, гастроинтестинални симптоми повезани са узимањем хране (дијареја, повраћање и ненапредовање у тежини), екзематозне промене по кожи, акутна и хронична уртикарија/ангиоедем, анафилакса, системске реакције на ујед инсекта (16).

#### Б. Методи истраживања.

Венска крв ће бити узимана деци у јутарњим часовима, након 2 сата центрифугирана, а серум ће бити чуван на  $-75^{\circ}\text{C}$  до извођења есеја.

#### *Утврђивање сензибилизације и степена еозинофилне инфламације*

Концентрације укупних *IgE* и специфичних *IgE* (*Phadiatop infant*) одредићемо *in vitro* *FIA* методом на *Immucap-100* апарату (*Phadia AB, Uppsala, Sweden*). *Phadiatop infant* је мултитест за детекцију *IgE* везаних алергијских болести који обухвата детекцију специфичних *IgE* антитела на протеине: беланца, крављег млека, кикирикија, рачића, длаке мачке и пса, гриње, полена сребрне брезе, мачијег репка, амброзије и коприве (17). Истом методом одређиваће се и концентрација *ECP-a* у серуму.

#### *Одређивање серумске концентрације биомаркера*

Концентрација биомаркера (*IL 10*, *TGF beta*, *TSLP* и *CC16*) одређиваће се у узорцима серума *ELISA* методом.

#### Ц. Статистичка обрада података

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 узорак испитаника од 128 деце. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (т-тестом за два независна узорка или *Mann-Whitney U* тестом) између група испитаника, са снагом студије  $\geq 80\%$ . За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет *SPSS*.

## ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ И ЗНАЧАЈ СТУДИЈЕ

### 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 атопијом имати повећане концентрације укупних *IgE* антитела, док ће серумски ниво *IL 10* бити низак.

Деца са гастроинтестиналном болешћу ће имати и повећани серумски ниво *TSLP* –*a* као показатеља дефекта коже и слузокожа у односу на контролну групу.

Деца са атопијском респираторном болешћу у случају постојања рецидивантног визинга имаће и повећање концентрације *TGF beta 1* (настанак ремоделовања дисајних путева) у односу на контролну групу, док ће деца са неатопијским визингом имати снижене вредности *CC16*. Деца са мултисистемским испољавањем атопије имаће највише концентрације укупних *IgE* антитела, *ECP-a*, *TSLP* –*a* и *TGF beta 1*, а најниже концентрације *IL 10*.

### 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.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Martinez F. Development of Wheezing Disorders and Asthma in Preschool Children. *Pediatr* 2002;109 (2):362-67.
2. Bousquet J, Bieber T, Fokkens W, Kowalski ML, Humbert M, Niggemann B, Simon HU, Burney P, van Cauwenberge P, Zuberbier T, Akdis CA, Demoly P. Important questions in allergy: novel research areas. *Allergy*. 2008 Feb;63(2):143-7.
3. Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 2006;116:1150–1158.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, Rea TH, Wyzykowski R, Kim J et al. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol* 1995 154:1956-1963.
8. Wu K, Bi Y, Sun K and Wang Ch. IL-10-Producing Type 1 Regulatory T Cells and Allergy. *Cellular & Molecular Immunology* 2007;4(4):269-275.
9. Dunstan JA, Hale J, Breckler L, Lehmann H, Weston S, Richmond P, Prescott SL. Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-10 and interferon-gamma responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria. *Clin Exp Allergy*. 2005 Oct;35(10):1309-17.
10. 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.
11. Manuyakorn W, Kamchaisatian W, Atamasirikul K et al. Serum TGF-beta1 in atopic asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2008;26(4):185-9.
12. 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.
13. 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.
14. Kawai T, Abe S. Serum Levels of Clara Cell 10-kDa Protein Are Decreased in Patients with Asthma. *Lung* 1999;177:45–52.
15. 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.
16. Hřst A, Andrae S, Charkin S, Diaz-Vazquez C, Dreborg S, Eigenmann PA et al. Allergy testing in children: why, who, when and how? *Allergy* 2003;58:559–569.
17. Halvorsen R, Jenner A, Hagelin EM, and Borres M. Phadiatop Infant in the Diagnosis of Atopy in Children with Allergy-Like Symptoms. *Int J Pediatr*. 2009;2009:460737.