I.O.S.U.D. - Universitatea de Vest ”Vasile Goldiş” din Arad

ŞCOALA DOCTORALĂ MULTIDISCIPLINARĂ

UNIVERSITATEA DE VEST
“VASILE GOLDIȘ”
din ARAD

Arad, 2024

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Biomarkeri predictibili cu aplicabilitate clinică în apariția, agravarea și răspunsul la tratament al bolilor pulmonare cronice

Doctorand: **Romana Olivia Popețiu**

Conducător de doctorat: **Prof. Univ. Dr. Maria Pușchiță**

UNIVERSITATEA DE VEST
"VASILE GOLDIȘ"
din ARAD

PhD THESIS SUMMARY

Predictive biomarkers with clinical applicability in the onset, exacerbation and treatment response of chronic lung diseases

PhD Student: **Romana Olivia Popețiu**

Scientific supervisor: **Prof. univ. dr. Maria Pușchiță**

UNIVERSITATEA DE VEST
"VASILE GOLDIȘ"
din ARAD

CUPRINS

INTRODUCERE 1
PARTEA GENERALĂ 2
STADIUL GENERAL AL CUNOAȘTERII 2
PARTEA SPECIALĂ 3
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ 3
1.IPOTEZA DE LUCRU/OBIECTIVE 3
2. METODOLOGIA GENERALĂ 3
2.1 Selecţia grupului de studiu 4
2.2 Criteriile de selecţie 4
2.3 Metode de lucru utilizate în evaluarea pacienţilor incluşi în studiu 5
2.4 Descrierea parametrilor de analize de laborator incluşi în cercetare 5
2.5 Analiza biostatistică 6
3. STUDIUL 1: EVALUAREA CLINICĂ ŞI PARACLINICĂ A PACIENȚILOR INCLUȘI ÎN STUDIU 8
3.1 Ipoteza de lucru/Obiective 8
3.2 Materiale şi metode 8
3.3 Rezultate 9
3.3.1 Caracterizarea grupului de studiu 9
3.3.2 Evaluarea clinică şi paraclinică a pacienţilor cu boli pulmonare cronice 10
3.3.3 Conduita terapeutică recomandată în grupul de studiu 11
3.3.4 Evoluția pacienţilor cu boli pulmonare cronice aflaţi sub tratament 12
3.4 Discuţii 12
3.5 Concluzii 13
4. STUDIUL 2:ANALIZA ROLULUI YKL-40 ÎN APARIȚIA, AGRAVAREA ȘI RĂSPUNSUL LA TRATAMENT ÎN BOLILE PULMONARE CRONICE 14
4.1. Introducere 14
4.2. Ipoteza de lucru/Obiective 14
4.3. Materiale şi metode 14
4.4. Rezultate 15
4.4.1. Analiza statistică a grupurilor de studiu 15
4.4.2. Analiza statistică comparativă între cele două loturi de pacienţi (pacienţi cu diferite simptomatologii respiratorii versus pacienţi diabetici) 19

4.4.3. Analiză statistică privind valoarea predictivă a YKL-40 în evoluţia BPOC 19
4.5. Discuţii 21
4.6 Concluzii 22
DISCUȚII GENERALE 23
CONCLUZII GENERALE 29
ORIGINALITATEA TEZEI ŞI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE 30
BIBLIOGRAFIE 31
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE 32
Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale 32

ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEZĂ

AATD	deficit de alfa-1 antitripsină
ABC	numărul absolut de bazofile
ACO	asthma-COPD overlap
ADN	acid dezoxiribo-nucleic
AEC	numărul absolut de eozinofile
AHC	antecedente heredo-colaterale
AINS	antiinflamatoare nonsteroidiene
ALC	număr absolut de limfocite
ALLC	numărul absolut de leucocite
AMC	numărul absolut de monocite
AMP	adenozin monofosfat
ANC	numărul absolut de neutrofile
APC	celulele prezentatoare de antigen
APP	antecedente personale patologice
ASA	acidul acetilsalicilic
BiPAP	bilevel positive airway pressure
BPOC	bronhopneumopatia obstructivă cronică
BA	astm bronșic
BAL	lavaj bronho alveolar
Ca^{2+}	calciu ionic
CAT	COPD assessment test
CHI3L1	chitinase 3 like protein 1
CO_2	dioxid de carbon
CT	computer tomograf
CV	coeficient de variabilitate
CVF	capacitate vitală forţată
DZ	diabet zaharat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GINA	Global Initiative for Asthma
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HbA1c	hemoglobina glicozilată
HTA	hipertensiune arterială
ICS	corticosteroizi inhalatori
Ig	imunoglobulină

IL	interleukină
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation
IMC	indicele de masă corporală
LAMA	antimuscarinice cu acţiune lungă
LABA	beta-agonişti cu acţiune lungă
MLR	raportul monocite/limfocite
mMRC	modified medical reserch concil
NHLBI	The National Heart, Lung and Blood Institute
NLR	raportul neutrofile/limfocite
OMS	Organizaţia Mondială a Sănătăţii
PEF	debitul expirator maxim
PCR	proteina C reactivă
PCR 2	proteina C reactivă recoltată la finalul tratamentului, înainte de externare
PCV13	vaccinul pneumococic conjugat cu 13 valenţi
PDE4	inhibitori ai fosfodiesterazei-4
pO_2	presiunea parţială a oxigenului
PPSV23	vaccinul cu polizaharidă pneumococică cu 23 valenţi
RENAR	Asociaţia de acreditare din România
ROC	receiver operating characteristic
SABA	beta2-agonişti cu acţiune scurtă
SAMA	agenţi antimuscarinici cu acţiune scurtă
SaO_2	saturaţia de oxigen
TA	tensiune arterială
TAs	tensiune arterială sistolică
VEMS	volum expirator maxim pe secundă
VSH	viteza de sedimentare a hematiilor
YKL-40	glicoproteină de legare a chitinei

INTRODUCERE

Astmul bronşic şi bronhopneumopatia obstructivă cronică (BPOC) sunt boli pulmonare obstructive care afectează milioane de oameni din întreaga lume.

Deşi astmul bronşic şi BPOC au multe asemănări, între ele există şi multe deosebiri. Sunt două boli distincte, cu diferenţe în ceea ce priveşte etiologia, simptomele, tipul de inflamaţie a căilor respiratorii, celulele inflamatorii, mediatorii, consecinţele inflamaţiei şi răspunsul la terapie.

Unele asemănări în inflamaţia căilor respiratorii în astmul sever şi BPOC şi răspunsul bun la terapia combinată în ambele boli sugerează că acestea au unele caracteristici fiziopatologice similare.

Astăzi, astmul şi bronhopneumopatia obstructivă cronică nu sunt pe deplin vindecabile, nu sunt suficient identificate şi nu sunt tratate suficient, iar terapia este încă în curs de dezvoltare. Dar, în viitor, o mai bună înţelegere a patologiei, identificarea şi tratamentul adecvat, poate şi noile medicamente, vor oferi o calitate mult mai bună a vieţii, şi vor ameliora morbiditatea şi mortalitatea acestor pacienţi.

Scopul acestei teze de doctorat este de a arăta asemănările şi deosebirile dintre aceste două boli, şi realizarea unei analize profunde asupra markerilor biologici deja cunoscuţi, cum ar fi fibrinogen, proteina C reactivă, VSH, IL6, procalcitonina, IgE totale, hemoleucograma completă cu formula leucocitară, respectiv nivelul seric de YKL-40, un nou biomarker cu potenţial real în diagnosticul şi urmărirea evoluţiei bolilor pulmonare cronice, respectiv în urmărirea răspunsului terapeutic al acestor boli.

Ipoteza principală a tezei de doctorat este demonstrarea utilităţii YKL-40 ca biomarker predictibil în apariţia, agravarea şi răspunsul la tratament al bolilor pulmonare cronice, şi urmărirea rezultatelor, care să ne indice, că YKL-40 poate fi un biomarker fidel în urmărirea eficacităţii tratamentului specific.

PARTEA GENERALĂ

STADIUL GENERAL AL CUNOAȘTERII

Bolile pulmonare cronice sunt boli ale căilor respiratorii și ale altor structuri ale plămânului. Unele dintre cele mai frecvente sunt: bronhopneumopatia obstructivă cronică (BPOC), astmul bronșic, bolile pulmonare profesionale și hipertensiunea pulmonară.

Pe lângă fumul de tutun, alți factori de risc generali includ: poluarea aerului, substanțele chimice profesionale, pulberile și infecțiile frecvente ale căilor respiratorii inferioare în timpul copilăriei.

Bolile pulmonare cronice nu sunt vindecabile. Totuși există diferite forme de tratament care pot ajuta la controlul simptomelor și la creșterea calității vieții pacienților.

Alianța globală a OMS împotriva bolilor pulmonare cronice are o viziune a unei lumi în care toți oamenii respiră liber [1].

Partea generală este compusă din 3 capitole și aduce în prim plan noțiuni generale, particulare și noutăți din literatura de specialitate despre bronhopneumopatia obstructivă cronică, astmul bronșic și YKL-40 un potențial biomarker cu aplicabilitate clinică pentru urmărirea evoluției bolilor pulmonare cronice.

PARTEA SPECIALĂ

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1.IPOTEZA DE LUCRU/OBIECTIVE

Ipotezele prezentului studiu sunt următoarele:

- YKL-40 poate fi utilizat ca biomarker predictibil în apariția, agravarea și răspunsul la tratament al bolilor pulmonare cronice.
- Nivelul mai scăzut al YKL-40 poate determina scăderea morbidității și mortalității datorate afecțiunilor pulmonare cronice.
- Nivelul seric crescut al YKL-40 poate crește riscul de agravare a bolilor pulmonare cronice.
- YKL-40 poate fi un indicator fidel în urmărirea eficacității tratamentului specific.

Obiectivele studiului

- Stabilirea lotului de pacienți care îndeplinește criteriile de includere în studiu;
- Revizuirea epidemiologiei astmului bronșic și a BPOC;
- Identificarea antecedentelor personale și heredocolaterale ale pacienților;
- Utilitatea investigațiilor clinice și paraclinice;
- Analiza managementului terapeutic în funcție de clasele de medicamente recomandate și gradul de inflamație cuantificat prin probele sanguine;
- Evaluarea nivelului seric al YKL-40 la lotul de studiu comparat cu un lot martor;
- Definirea unui biomarker precis, fidel, cu posibilitate de determinare minim invazivă, determinabil ori de câte ori este nevoie în urmărirea pacienților cu boli pulmonare cronice.

2. METODOLOGIA GENERALĂ

Studiul de față s-a realizat în conformitate cu principiile etice din Declarația de la Helsinki, care respectă cerințele etice necesare pentru cercetarea cu subiecți umani.

Înainte de începerea studiului, am obținut aprobarea din partea Comisiei de Etică de la Spitalul Clinic Județean de Urgență Arad și a Universității de Vest „Vasile Goldiș” din Arad (numărul avizului: 26/09.10.2019, respectiv 159/12.12.2019).

În acest studiu s-au înrolat pacienți cu boli pulmonare cronice (BPOC și astm bronșic), internați pe secția Medicină internă I și Pneumologie, respectiv pacienți fără antecedente de boli pulmonare internați pe secția Diabet zaharat, nutriție și boli metabolice din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad.

2.1 Selecția grupului de studiu

La începutul studiului au fost întocmite urmatoarele documente: consimțământul informat de participare la studiu, fișa de informare, fișe de colectare a datelor și foi de evaluare a pacienților și am precizat criteriile de selecție ale pacienților.

Studiul a fost efectuat în timpul pandemiei de coronavirus (COVID-19), prin urmare accesul nostru la un grup mai mare de adulți cu boli respiratorii obstructive a fost limitat.

În prima etapă au fost selectați 106 subiecți, dar utilizând criteriile de includere și excludere stabilite anterior începerii cercetării, în studiu am inclus un număr total de 90 de pacienți, care au îndeplinit criteriile de includere și au prezentat complianță crescută la studiu.

2.2 Criteriile de selecție

Criteriile de includere au fost: vârsta de 18 ani sau mai mult, consimțământul informat semnat, boală pulmonară cronică nou diagnosticată sau cunoscută, prezența unui volum expirator forțat cu variabilitate în evaluarea spirometrică, existența simptomelor respiratorii (de exemplu: respirație șuierătoare, dificultăți de respirație) și tratament în curs cu bronhodilatatoare, corticosteroizi inhalatori, și medicamente antihistaminice (numai pentru cei cu astm bronșic) [41].

Criterii de excludere: introducem în această categorie vârsta sub 18 ani, bolile psihiatrice (care pot afecta liberul arbitru) și testarea pozitivă pentru COVID-19 [41].

2.3 Metode de lucru utilizate în evaluarea pacienților incluși în studiu

La momentul includerii în studiu toți pacienții au fost informați despre scopul cercetării, metodele clinice și paraclinice utilizate iar apoi a fost semnat consimțământul informat de participare la studiu.

Pentru grupurile de studiu s-au conceput foi de evaluare care cuprind următoarele:

- caracteristici demografice,
- parametrii clinici: (anamneza pacienților, examen clinic general)
- parametrii paraclinici:
  - ✓ parametrii de laborator standard (hemoleucogramă, VSH, fibrinogen, IgE-totale, PCR, IL6, procalcitonină, HbA1c)- recoltați la internare (la înrolarea în studiu);
  - ✓ pentru PCR s-a efectuat și a 2-a determinare la finalul tratamentului efectuat în spital (va fi denumită în continuare PCR2);
  - ✓ Pentru fiecare pacient s-a evaluat nivelul seric al YKL-40, la înrolarea în studiu.
- parametrii electrocardiografici
- examen radiologic (Radiografie torace +/- CT torace),
- investigații funcționale: spirometrie.

2.4 Descrierea parametrilor de analize de laborator incluși în cercetare

Investigațiile hematologice, biochimice și imunologice din cadrul acestei cercetări au fost efectuate în Laboratorului clinic de analize medicale din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad, laborator acreditat RENAR (Asociația de acreditare din România) membră ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation).

Descrierea parametrilor de analize de laborator incluși în cercetare:

- Parametrii hematologici, obținuți din sânge integral (Hemoleucograma completă cu formulă leucocitară) au fost efectuați pe aparatul SYSMEX XN 1500, metoda folosita - citometrie în flux.

- Parametrii biochimici (PCR, HbA1c) obținuți din ser clotactiv, respectiv sânge integral au fost efectuați pe analizorul de biochimie COBAS 501 prin metoda imunoturbidimetrică respectiv turbidimetrică.
- Parametrii imunologici (procalcitonina, IL6, IgE-totale) obținuți din ser clotactiv au fost efectuați pe analizorul COBAS e601, prin metoda ECLIA (electrochemiluminiscență).
- Parametrul VSH (viteza de sedimentare a hematiilor) obținut din sânge integral s-a efectuat prin metoda manuala Westergren.
- Testarea parametrului Fibrinogen obținut din plasmă, a fost efectuată pe analizorul STA COMPACT MAX 3, prin metoda determinării vâscozimetrice.

Parametrul YKL-40/CHI3L1 a fost efectuat în Laboratorul Universității de Vest „Vasile Goldiş" din Arad pe analizorul Tecan Sunrise.

Pentru determinarea cantitativă a nivelului de YKL-40/CHI3L1 am folosit kitul de imunotestare Human Chitinase-3-Like-Protein 1 (YKL-40/CHI3L1) ELISA kit (nr. Catalog CSB-E13608h), conform instrucțiunilor producătorului CUSABIO (www.cusabio.com), materialul biologic folosit fiind ser clotactiv, obținut după centrifugare timp de 15 minute la 1000 rotații/minut, și ulterior stocat pe perioada cercetării la -20 grade Celsius.

Pentru citirea absorbției multicanal a rezultatelor ELISA, am folosit cititorul de placă de absorbție Tecan Sunrise, cu funcția de control al temperaturii pentru analizele enzimatice kinetice.

Pentru prelucrarea datelor obținute din prelevarea probelor biologice, determinarea nivelului seric al YKL-40, și altor investigații paraclinice s-au utilizat metode de calcul statistic omologate internațional.

2.5 Analiza biostatistică

Analiza biostatistică s-a efectuat în Microsoft Office Excel și Statistica version8 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Am folosit următoarele metode biostatistice:

(1) ***Analiza descriptivă*** a grupurilor luate în calcul a fost efectuată pentru fiecare parametru luat în considerare, exprimând rezultatele ca: (i) medie cu deviație

standard la variabilele continue cu distribuţie normală; (ii) mediană cu quartila inferioară şi superioară, minimă şi maximă la variabilele continue cu distribuţie non-gausiană; (iii) număr de cazuri şi frecvenţă pentru variabilele categoriale.

(2) Homogeneitatea grupurilor de studiu pentru sex şi vârstă a fost analizată cu ajutorul ***testului Mann-Whitney U și un Chi pătrat***. Aceste teste au fost apoi aplicate pentru a determina diferențele dintre grupuri în distribuția subiecţilor stratificaţi în funcţie de zona de origine (urban versus rural) şi starea actuală a fumatului (nefumător versus fumător).

(3) Valorile măsurate pentru fibrinogen, PCR pre-tratament, PCR post-tratament (PCR2), VSH, IL-6, procalcitonina, YKL-40, numărul de leucocite, numărul absolut de neutrofile, procentul de neutrofile, numărul absolut de limfocite, procentul de limfocite, numărul absolut de eozinofile şi procentul de eozinofile aşa cum este descris mai sus în cazul seturilor de date privind vârsta (cu ***testele Mann–Whitney U***). După care, analiza corelațională în cadrul grupului (***corelațiile lui Spearman***) a fost efectuată pentru variabile care au arătat diferențe semnificative între grupuri pentru a determina asocierile dintre aceste variabile şi ceilalţi markeri bazaţi pe analize de sânge. Puterea lor a fost descrisă astfel: foarte slab, Rs = 0,00–0,19; slab, Rs = 0,20–0,39; moderat, Rs = 0,40–0,59; puternic, Rs = 0,60–0,79; şi foarte puternic, Rs = 0,80–1,00.

3. STUDIUL 1: EVALUAREA CLINICĂ ȘI PARACLINICĂ A PACIENȚILOR INCLUȘI ÎN STUDIU

3.1 Ipoteza de lucru/Obiective

Ipoteza de lucru porneşte de la nevoia constituirii unei baze de date cu caracteristicile demografice ale pacienţilor cu astm bronşic şi BPOC şi alcătuirea unei baze de date cu parametrii clinici ai acestor pacienţi.

Obiectivele studiului 1 vizează epidemiologia astmului bronşic şi BPOC-ului, astfel urmărim:

- Stabilirea lotului de pacienţi care îndeplineşte criteriile de includere în studiu;
- Revizuirea epidemiologiei astmului bronşic şi a BPOC;
- Identificarea antecedentelor personale şi heredocolaterale ale pacienţilor cu astm bronşic şi BPOC;
- Utilitatea investigaţiilor clinice şi paraclinice (imagistică, spirometrie şi determinările de laborator: VSH, fibrinogen, IgE-totale, PCR, IL6, procalcitonină, hemoleucograma);
- Analiza managementului terapeutic în funcţie de clasele de medicamente recomandate.

3.2 Materiale şi metode

În acest studiu am inclus un număr total de 90 de pacienţi (69 de persoane cu boli pulmonare cronice –grupul de studiu, şi 21 de persoane în lotul martor), care au îndeplinit criteriile de includere şi excludere şi au prezentat complianţă crescută la studiu.

În această parte a tezei de doctorat am urmărit caracteristicile demografice ale pacienţilor, respectiv simptomatologia care i-a determinat să se prezinte la spital, consumul de toxice, semnele clinice cum ar fi SaO_2, murmur vezicular diminuat, variaţiile VEMS, respectiv comorbidităţile şi evoluţia pacienţilor. Analiza statistică cuprinde analiză descriptivă şi comparativă simplă a grupurilor de studiu.

3.3 Rezultate

3.3.1 Caracterizarea grupului de studiu

Am observat că din totalul pacienților înrolați, 76.67% fac parte din grupul de studiu (69 pacienți), lotul martor (21 pacienți) fiind reprezentat de 23.33% din totalul pacienților incluși în studiu. De asemenea am observat că în grupul de studiu procentul pacienților de sex masculin (48.89%, din n=90, (44 pacienți)) este semnificativ mai mare comparativ cu procentul pacienților de sex feminin (27.78% din n=90, (25 paciente)) pe când în lotul martor 11.11% (din n=90) au fost bărbați (10 pacienți) iar 12.22% (din n=90)au fost femei (11 paciente).

Am observat, că majoritatea subiecților au fost recrutați din mediul rural atât în lotul de grup de studiu, cât și în lotul martor.

Grupul de studiu reprezintă 76.67% din totalul pacienților înrolați (n=90). Acest procent fiind compus din pacienții de provenienţă urbană (31.11%), și cei de provenienţă rurală (45.56%). Astfel, putem observa, că majoritatea subiecților din grupul de studiu sunt de provenienţă rurală.

În ceea ce privește lotul martor, s-a inclus un număr mai mic de pacienți 23.33% din numărul total de pacienți (n=90). Putem observa, că în cadrul lotului martor 8.89% au fost de provenienţă urbană (n=90), și 14.44% de provenienţă rurală (n=90).

În grupul de studiu la pacienții de sex masculin vârsta medie a pacienților a fost 64 de ani cu valori extreme între 41-86 de ani, deviație medie standard fiind de 10.79. La pacienții de sex feminin vârsta medie a fost de 68 de ani, cu valori extreme între 47-86 de ani, deviația medie standard fiind de 11.51.

În cazul lotului martor grupul a fost mai omogen, diferența de vârstă fiind mult mai mică decât în cazul grupului de studiu, totuși vârsta medie este similară.

La pacienții de sex masculin din lotul martor, vârsta medie a fost de 67 de ani, cu variații extreme între 52-79 de ani, deviația medie standard fiind de 7.43.

La pacienții de sex feminin din lotul martor vârsta medie a fost de 73 de ani, cu variații extreme între 41-85 de ani, deviația medie standard fiind de 11.83. De menționat la acest grup, că pacienta de 41 de ani a fost o excepție unică a grupului.

3.3.2 Evaluarea clinică și paraclinică a pacienților cu boli pulmonare cronice

3.3.2.1 Motivele internării pacienților cu boli pulmonare cronice

Motivele cele mai frecvente pentru care pacienții s-au prezentat la spital au fost: dispneea accentuată, tusea seacă sau productivă, wheezing, fatigabilitate și febră.

Dintre pacienții cu boli pulmonare cronice incluși în studiu 24.73% (n=69) au prezentat scăderea saturației de oxigen (SaO_2) sub 90% . Murmur vezicular diminuat s-a observat la 11.83% din pacienții cu boli pulmonare cronice (n=69). Stetacustic raluri s-au diagnosticat la 63.44% din totalul pacienților cu boli pulmonare cronice.

3.3.2.2 Investigații paraclinice efectuate în momentul internării pacienților din studiu

O etapă importantă în evaluarea pacienților cu boli pulmonare cronice a fost recoltarea de spută pentru examen microbiologic.

La 71.01% din totalul pacienților cu boli pulmonare cronice (n=69) examenul microbiologic al sputei a fost negativ. La 11.59% din pacienți examenul microbiologic a prezentat rezultat pozitiv. Germenii depistați în specimenul de spută a pacienților au fost: Klebsiella spp., Acinetobacter baumanii, Streptococcus spp. și Candida spp. La 17.39% dintre pacienți nu s-a recoltat specimen de spută (pacienții nu au putut expectora).

3.3.2.3 Consumul de toxice la pacienții cu boli pulmonare cronice

Cei mai mulți pacienți din grupul de studiu au fost incluși în grupul fumătorilor, în grupul martor un singur pacient a fost fumător.

În cadrul grupului de studiu, putem observa, că în cadrul sexului feminin raportul Fumătoare/Nefumătoare a fost 14:11. În cazul sexului masculin acest raport este mult mai dezechilibrat, numărul fumătorilor fiind cu mult mai mare decât al celor nefumători (40:4, Fumători/Nefumători).

3.3.2.4 Diagnosticul principal al pacienților cu boli pulmonare cronice

Studiul nostru urmărește pacienții cu boli pulmonare cronice, cum ar fi: astm bronșic, BPOC și ACO.

Am observat că cel mai frecvent pacienții din studiu au fost diagnosticați cu BPOC atât în cadrul pacienților de sex masculin, cât și în cadrul pacienților de sex feminin. Raportul M/F este de 3:1 în cadrul grupului cu BPOC.

Preponderenţa diagnosticului de BPOC în cadrul pacienţilor de sex masculin se poate explica prin faptul că printre ei au fost mult mai mulţi fumători, decât în cadrul grupului de studiu de sex feminin.

3.3.2.5 Comorbidităţile pacienţilor cu boli pulmonare cronice

Pacienţii din studiu au prezentat o serie de comorbidităţi. Cel mai frecvent s-au diagnosticat bolile cardiovasculare. În această categorie am inclus: hipertensiunea arterială, insuficienţa cardiacă, cordul pulmonar cronic, tulburările de ritm cardiac, patologia circulatorie (insuficienţa venoasă, tromboze, arteriopatiile), cardiopatia ischemică cronică şi boli valvulare. Alte boli depistate la pacienţii din studiu au fost: diabetul zaharat, bolile tiroidei, hepatite cronice virale, boală cronică de rinichi, sechele TBC, litiaza biliară, anemie.

În cazul pacienţilor din lotul martor toţi cei înrolaţi au fost diagnosticaţi cu diabet zaharat. Din acest motiv şi cele mai importante comorbidităţi au fost diagnosticate din gama complicaţiilor acestei boli: hipertensiune arterială şi tulburările circulatorii, tulburări ale lipidelor şi colesterolului, nefropatia şi neuropatia diabetică.

3.3.3 Conduita terapeutică recomandată în grupul de studiu

Pacienţii din grupul de studiu au urmat tratamente complexe. Din punct de vedere pneumologic managementul terapeutic a presupus combinarea mai multor clase de medicamente, printre care bronhodilatatoare şi steroizi inhalatori (tabel I).

Tabel I. Tratamentul administrat la pacienţii din grupurile de studiu.

Clasa de medicamente / Grup de studiu	Bronhodilatatoare	Tratament combinat (bronhodilatatoare+steroizi)
Pacienţi de sex F cu AB	4	5
Pacienţi de sex F cu BPOC	5	8
Pacienţi de sex M cu AB	0	4
Pacienţi de sex M cu BPOC	12	23
Pacienţi de sex F cu ACO	0	3
Pacienţi de sex M cu ACO	0	5

Legendă: *valorile sunt reprezentate prin valori absolute din totalul pacienţilor cu boli pulmonare cronice (n=69)*

3.3.4 Evoluția pacienților cu boli pulmonare cronice aflați sub tratament

În evoluția pacienților am urmărit reinternările și decesul pe perioada studiului.

În lotul martor reinternările au fost mult mai puține decât în cazul pacienților cu boli pulmonare cronice și nu a existat nici un deces pe perioada studiului.

În cazul pacienților de sex masculin din lotul de boli pulmonare cronice reinternările au fost semnificativ mai multe decât în cazul lotului de sex feminin, sau în cazul pacienților din lotul martor.

De asemenea putem observa, că în cazul pacienților internați cu acutizări ale bolii pulmonare există decese: 4 decese în cadrul femeilor (n=69), și 6 decese în cadrul bărbaților (n=69).

3.4 Discuții

Prevalența estimată a BPOC este de aproximativ 1% în populația generală și crește brusc la persoanele cu vârsta ≥40 de ani [43]. Limita de vârstă pentru diagnosticul BPOC este evidențiată și de studiul nostru, nici un pacient nu a fost diagnosticat sub vârsta de 40 de ani cu boli pulmonare cronice, cei mai mulți pacienți fiind încadrați între 55-75 de ani.

Studiul nostru arată, că mult mai puțini pacienți au fost diagnosticați cu astm bronșic comparativ cu cei cu BPOC . Astfel, rezultatele noastre arată, că în grupul de studiu (n=69) astmul bronșic a fost diagnosticat la 18.84% dintre pacienți.

De asemenea la pacienții de sex feminin din studiul nostru astmul bronșic s-a dovedit a fi mai ușor de ținut sub control cu monoterapie, decât la pacienții de sex masculin. Dacă grupul pacienților de sex feminin cu astm bronșic (n=9) 44.45% a necesitat doar tratament cu bronhodilatatoare, la cei de sex masculin cu astm bronșic, putem observa că toți au fost supuși unor terapii combinate.

Suprapunerea astmului cu bronhopneumopatia obstructivă cronică (ACO) este caracterizată de limitarea persistentă a fluxului de aer și prezintă caracteristici atât ale astmului, cât și ale bronhopneumopatiei obstructive cronice [48, 49]. Pacienții cu ACO au o severitate crescută a bolii, au calitate mai slabă a vieții și suportă

costuri mai mari de asistență medicală în comparație cu pacienții cu astm bronșic sau BPOC simplu [48]. Acest lucru este subliniat și de studiul nostru, care arată, că pacienții în toate cazurile cu ACO au necesitat terapie combinată. Studiul nostru arată de asemenea și o evoluție a pacienților cu ACO mai severă, ei prezentând reinternări mai frecvente și cu durată de spitalizare mai lungă comparativ cu cei cu astm bronșic simplu.

În ceea ce privește mediul de provenienţă a pacienților studiul nostru arată, că majoritatea au fost de origine rurală (45.56%) din totalul pacienților înrolați (n=90). Acest lucru se poate explica prin lipsa de educație sanitară, prin frica oamenilor de a se prezenta la medic, pentru a nu fi diagnosticați cu diverse afecțiuni, prin indolența lor, și prin lipsa unităților medicale în zonele defavorizate.

3.5 Concluzii

- Bolile pulmonare au fost mai frecvent diagnosticate în cadrul sexului masculin, cu provenienţă din mediul rural.
- Dispneea accentuată a fost motivul cel mai frecvent pentru care pacienții s-au prezentat la consultație.
- Agenții infecțioși ca factori declanșatori au fost identificați doar la un procent mic de pacienți.
- Fumatul a fost un factor frecvent identificat în cadrul grupului de pacienți cu boli pulmonare cronice.
- Bronhopneumopatia obstructivă cronică asociată cu boli cardiovasculare și bolile metabolice au fost cel mai frecvent identificate la pacienții din studiu.
- Tratamentul combinat a fost opțiunea favorită la pacienții din studiu, cu toate acestea evoluția pacienților a fost marcată de numeroase reinternări pentru episoade de acutizare ale bolilor.

4. STUDIUL 2:ANALIZA ROLULUI YKL-40 ÎN APARIȚIA, AGRAVAREA ȘI RĂSPUNSUL LA TRATAMENT ÎN BOLILE PULMONARE CRONICE

4.1. Introducere

În studiul de față, am investigat nivelurile plasmatice ale unui singur potențial biomarker, respectiv YKL-40 în asociere cu biomarkerii inflamatori deja cunoscuți: fibrinogen, proteina C reactivă, VSH, IL6, procalcitonină, la pacienții cu astm bronșic și BPOC și la pacienții cu caracteristici ale ACO pentru a investiga caracteristicile inflamatorii ale ACO.

4.2. Ipoteza de lucru/Obiective

Ipoteza studiului II are la bază conceptul științific, că YKL-40 poate fi utilizat ca biomarker predictibil în apariția, agravarea și răspunsul la tratament al bolilor pulmonare cronice.

Obiectivele specifice ale studiului II:

- Evaluarea nivelului seric al YKL-40 la lotul de studiu comparat cu un lot martor, care cuprinde pacienți aparent sănătoși (diabetici, pacienți fără patologie respiratorie cunoscută);
- Definirea unui biomarker precis, fidel, cu posibilitate de determinare minim invazivă, determinabil ori de câte ori este nevoie în urmărirea pacienților cu boli pulmonare cronice;

4.3. Materiale și metode

În studiu am inclus un număr total de 90 de pacienți, care au îndeplinit criteriile de includere și excludere și au prezentat complianță crescută la studiu.

Loturile de studiu sunt în număr de două, astfel:

- grup martor: cuprinzând 21 de pacienți (fiind recrutați de pe secția de Diabet nutriție și boli metabolice),
- grup de studiu: cuprinzând 69 de pacienți (au fost recrutați de pe secția Medicină internă I și Pneumologie).

Analiza statistică este una complexă, cu utilizarea tuturor instrumentelor prezentate în capitolul de Metodologie generală.

4.4. Rezultate

4.4.1. Analiza statistică a grupurilor de studiu

4.4.1.1. Pacienţi diabetici

Din cei 21 de pacienţi diabetici incluşi în studiu 10 au fost bărbaţi (47,61%) şi 11 au fost femei (52,39%); 20 au fost nefumători (95,24%) şi 1 fumător (4,76%); 13 au provenit din mediul rural (61,90%) şi 8 din mediul urban (39,10%). Pacienţii de sex masculin şi feminin au prezentat vârste similare (65,90 ± 7,93 ani vs. 71,81 ± 11,80 ani; test T, p = 0.178).

Când pacienţii au fost stratificaţi pe baza sexului valorile măsurate pentru fibrinogen, proteina C reactivă în evoluție, VSH, IL6, procalcitonină, HbA1c, YKL-40, valoarea absolută a neutrofilelor, limfocitelor și eozinofilelor, raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor și limfocitelor precum și raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor și limfocitelor au prezentat variante similare între cele două grupuri. Aplicarea testului T pentru loturi inegale nu a relevat existenţa unor diferenţe semnificative între bărbaţi şi femei în ceea ce priveşte parametrii mai sus menţionaţi.

Din cauza numărului mic de indivizi fumători (n = 1) nu a putut fi realizată analiza statistică a datelor pentru pacienţii stratificaţi în funcţie de statutul de fumător/nefumător.

În cazul pacienţilor stratificaţi în funcţie de mediul de proveniență, valorile obţinute pentru parametrii măsuraţi au fost homoscedastice și nu au existat diferenţe semnificative între ele, *cu excepţia raportului dintre valoarea absolută a eozinofilelor și limfocitelor, caz în care pacienţii din mediul rural au prezentat valori semnificativ mai mari ca cei din mediul urban.*

4.4.1.2. Pacienţi cu boli respiratorii cronice (astm bronșic, BPOC și ACO)

Din cei 69 de pacienţi cu boli respiratorii cronice, 44 au fost bărbaţi (63,76%) şi 25 au fost femei (36,34%); 54 au fost fumători (78,26%) şi 15 nefumători (21,74%); 41 au provenit din mediul rural (59,42%) şi 28 din mediul urban (40,58%).

Pacienţii de sex masculin şi feminin au prezentat vârste similare (63,68 ± 10,79 ani vs. 65,84 ± 11,51 ani; test T, $p = 0.692$).

Pacienţii stratificaţi pe baza sexului au prezentat varianţe egale pentru valorile măsurate pentru fibrinogen, PCR, VSH, HbA1c, YKL-40, valoarea absolută a limfocitelor şi raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor şi limfocitelor, dar nu şi pentru PCR 2 (PCR 2 a fost recoltat la finalul tratamentului, înainte de externare), IL6, procalcitonină, valoarea absolută a neutrofilelor şi eozinofilelor şi raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor şi limfocitelor. Drept urmare, analiza statistică a datelor din primul set de variabile a fost realizată cu testul T pentru probe inegale, iar pentru cel de al doilea set de variabile cu testul neparametric Mann-Whitney.

Nu au existat diferenţe semnificative între sexul masculin şi feminin în ceea ce priveşte valorile medii pentru fibrinogen, PCR, VSH, HbA1c, YKL-40, valoarea absolută a limfocitelor şi raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor şi limfocitelor. În mod similar, aplicarea testului Mann-Whitney a relevat rezultate similare în ceea ce priveşte PCR 2 (test Mann-Whitney, $p = 0,557$), IL6 (test Mann-Whitney, $p = 0,229$), procalcitonină (test Mann-Whitney, $p = 0,243$), valoarea absolută a neutrofilelor (test Mann-Whitney, $p = 0,667$) şi eozinofilelor (test Mann-Whitney, $p = 0,247$) şi raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor şi limfocitelor (test Mann-Whitney, $p = 0,138$).

Când pacienţii au fost stratificaţi pe baza statutului de fumător/nefumător, valorile medii determinate pentru fibrinogen, PCR, IgE, VSH, YKL-40, valoarea absolută a neutrofilelor şi limfocitelor şi raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor şi limfocitelor au fost homoscedastice, dar nu şi valorile măsurate pentru PCR 2, IL6, procalcitonină, HbA1c, valoarea absolută a eozinofilelor şi raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor şi limfocitelor.

Testul T pentru loturi inegale a relevat lipsa unor diferenţe semnificative între fumători şi nefumători în ceea priveşte valorile măsurate pentru fibrinogen, PCR,

VSH, HbA1c, YKL-40, valoarea absolută a limfocitelor și raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor și limfocitelor. De asemenea, testul Mann-Whitney a demonstrat rezultate similare în ceea ce privește PCR 2 (test Mann-Whitney, p = 0,472), HbA1c (test Mann-Whitney, p = 0,370), valoarea absolută a eozinofilelor (test Mann-Whitney, p = 0,185) și raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor și limfocitelor (test Mann-Whitney, p = 0,256). Totuși a fost observat un trend semnificativ pentru atingerea pragului de semnificație statistică în cazul procalcitoninei (test Mann-Whitney, p = 0,065), cu *valorea medie a procalcitoninei fiind de aproximativ 100 de ori mai mare în cazul indivizilor nefumători*.

Pacienții din mediul urban și rural au prezentat variațe similare pentru fibrinogen, IgE, VSH, HbA1c, YKL-40, valoarea absolută a limfocitelor și neutrofilelor raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor și limfocitelor. Spre deosebire, valorile observate pentru PCR, PCR2, IL6, procalcitonină, valoarea absolută a eozinofilelor și raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor și limfocitelor la pacienții stratificați în funcție de mediul de proveniență au fost heteroscedastice.

Analiza statistică a relevat lipsa unor diferențe semnificative între pacienții din mediul urban și rural în ceea ce privește valorile medii ale fibrinogen, IgE, VSH, HbA1c, YKL-40, valoarea absolută a limfocitelor și neutrofilelor raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor și limfocitelor. Rezultate similare au fost obținute în urma analizei neparametrice a datelor pentru PCR (test Mann-Whitney, p = 0,659), PCR2 (test Mann-Whitney, p = 0,616), IL6 (test Mann-Whitney, p = 0,663), procalcitonină (test Mann-Whitney, p = 0,493), valoarea absolută a eozinofilelor (test Mann-Whitney, p = 0,489) și raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor și limfocitelor (test Mann-Whitney, p = 0,843).

Ulterior, pacienții au fost grupați în funcție de simptomatologia respiratorie ca pacienți cu astm bronșic, pacienți cu BPOC și pacienți cu simptomatologie combinată (BPOC + astm bronșic). Din numărul total de 69 de pacienți cu simptomatologie

respiratorie identificată, 13 au avut astm bronșic, 48 au avut BPOC și respectiv 8 BPOC+astm bronșic.

Seturile de date corespunzătoare celor trei grupuri au prezentat conform testului Levene varianțe similare pentru fibrinogen (test Levene, p = 0,288), PCR (test Levene, p = 0,164), PCR2 (test Levene, p = 0,435), VSH (test Levene, p = 0,102), IL6 (test Levene, p = 0,477), procalcitonină (test Levene, p = 0,413), YKL-40 (test Levene, p = 0,775), neutrofile# (test Levene, p = 0,523), limfocite# (test Levene, p = 0,904), raport N/L# (test Levene, p = 0,796), eozinofile# (test Levene, p = 0,852) și raport E/L# (test Levene, p = 0,646), dar nu pentru HbA1c (test Levene, p = 0,000). Drept urmare, analiza tuturor variabilelor exceptând HbA1c a fost realizată cu autorul ANOVA, iar pentru HbA1c cu ajutorul Welch's ANOVA. Nu au existat diferențe semnificative între grupurile de pacienți analizate pentru fibrinogen (ANOVA, p = 0,755), PCR (ANOVA, p = 0,481), PCR2 (ANOVA, p = 0,780), VSH (ANOVA, p = 0,384), IL6 (ANOVA, p = 0,777), procalcitonină (ANOVA, p = 0,724), neutrofile# (ANOVA, p = 0,718), limfocite# (ANOVA, p = 0,630), raport N/L# (ANOVA, p = 0,984), eozinofile# (ANOVA, p = 0,859) și raport E/L# (ANOVA, p = 0,775).

Totuși au fost identificate diferențe semnificative în cazul YKL-40 (ANOVA, p = 0,013) și HbA1c (Welch's ANOVA, p = 0,029). Analiza post hoc a datelor a relevat valori semnificativ mai mari ale YKL-40 în cazul pacienților cu astm bronșic comparativ cu pacienții cu simptomatologie dublă (test HSD pentru mostre inegale, p = 0,049). Rezultate similare au fost obținute când au fost comparați pacienții cu BPOC cu cei cu simptomatologie dublă (test HSD pentru mostre inegale, p = 0,041), dar nu și pentru pacienții cu BPOC versus cei cu astm bronșic (test HSD pentru mostre inegale, p = 0,988). În ceea ce privește valorile HbA1c, analiza post hoc a indicat valori semnificativ mai mari în cazul pacienților cu simptomatologie dublă comparativ cu cei cu astm bronșic (test HSD pentru mostre inegale, p = 0,048), dar nu și pentru celelalte comparații (test HSD pentru mostre inegale, $p \geq 0,215$).

În concluzie YKL-40 se conturează a fi un biomarker important în diagnosticul diferențial al ACO de astm bronșic și BPOC.

4.4.2. Analiza statistică comparativă între cele două loturi de pacienți (pacienți cu diferite simptomatologii respiratorii versus pacienți diabetici)

Variantele măsurate pentru fibrinogen, PCR, IgE, VSH, IL6, valoarea absolută a neutrofilelor și limfocitelor și raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor și limfocitelor au fost homoscedastice între pacienții cu diabet și cei cu diferite simptome respiratorii. Situația opusă a fost valabilă pentru PCR 2, procalcitonină, HbA1c, YKL-40, valoarea absolută a eozinofilelor și raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor și limfocitelor.

Nu au fost determinate diferențe semnificative între pacienții cu diabet și cei cu afecțiuni respiratorii în ceea ce privește valorile medii ale fibrinogen, PCR, IgE, VSH, IL6, valoarea absolută a neutrofilelor și limfocitelor și raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor și limfocitelor. Rezultate similare au fost observate în urma analizei neparametrice a datelor pentru PCR2 (test Mann-Whitney, p = 0,173), procalcitonină (test Mann-Whitney, p = 0,238), valoarea absolută a eozinofilelor (test Mann-Whitney, p = 0,099) și raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor și limfocitelor (test Mann-Whitney, p = 0,309).

Totuși au fost observate diferențe semnificative între cele două grupuri pentru HbA1c și YKL-40. Mai precis, valorile HbA1c au fost semnificativ mai mari în cazul pacienților cu diabet comparativ cu cei având afecțiuni respiratorii (test Mann-Whitney, p <0,001), *în timp ce pacienții cu afecțiuni respiratorii au avut valori semnificativ mai mari în cazul YKL-40 (test Mann-Whitney, p < 0,001).*

4.4.3. Analiză statistică privind valoarea predictivă a YKL-40 în evoluția BPOC

În acest studiu, ne-am propus să comparăm hemoleucograma pacienților cu stadiu avansat de BPOC pe baza nivelurilor serice de YKL-40.

În ceea ce privește parametrii serici în funcție de stadiul BPOC, după potrivirea sexului și vârstei am diagnosticat 23 de subiecți cu BPOC severă și 24 de subiecți cu BPOC foarte severă din grupul inițial de pacienți.

Nu s-au observat diferenţe semnificative în ceea ce priveşte vârsta medie între aceste categorii de pacienţi (testul Mann-Whitney U, p = 0,975). Datele privind distribuţia pe sexe au fost similare între aceste grupuri (testul χ 2, p = 0,679), pacienţii de sex masculin fiind de două ori mai mulţi decât pacienţii de sex feminin.

Fumatul a avut o incidenţă similară la adulţii cu BPOC severă şi adulţii cu BPOC foarte severă (test χ 2, p = 0,964), fumătorii fiind de zece ori mai mulţi decât nefumătorii.

Analiza markerilor serici a evidenţiat perturbări subtile în profilul hematologic al pacienţilor cu stadiu avansat de BPOC. Astfel, numărul absolut de leucocite (ALLC) a fost cu mult peste valorile măsurate la pacienţii sănătoşi. În contrast, valorile măsurate pentru număr absolut de limfocite (ALC) şi procentul de limfocite au fost sub nivelul normal. Cu toate acestea, nu au fost găsite diferenţe semnificative între grupuri pentru niciunul dintre parametrii analizaţi (teste Mann-Whitney U, p ≥ 0,131).

În ceea ce priveşte nivelurile de YKL-40 seric subiecţii au fost împărţiţi în două grupuri folosind mediana valorilor YKL-40 seric al populaţiei generale de studiu (3934,5 pg/mL) ca punct de referinţă. Valorile mediane (cu quartile inferioare şi superioare) pentru numărul absolut de leucocite (ALLC), numărul absolut de neutrofile (ANC), numărul absolut de limfocite (ALC), numărul absolut de monocite (AMC), procentul de monocite, nivelul hemoglobinei şi hematocritului la pacienţii cu YKL-40 scăzut şi pacienţii cu YKL-40 crescut sunt prezentate în Tabelul II.

Tabel II. Parametrii hematologici la pacienţii cu nivele diferite de YKL-40

Parametru hematologic	**Pacienţi cu YKL-40 scăzut**	**Pacienţi cu YKL-40 crescut**
ALLC (10^3 celule/uL)	10.81 (8.05; 13.04)	10.57 (8.16; 13.71)
ANC (10^3 celule/uL)	7.25 (5.25; 8.70)	7.91 (5.79; 10.81)
AMC (10^3 celule/uL)	0.87 (0.70; 1.08)	0.80 (0.63; 1.04)
Procent monocite (%)	8.10 (6.70; 9.65)	7.70 (6.10; 12.70)
Hemoglobină (g/dl)	14.05 (12.75; 15.25)	13.50 (12.10; 14.20)
Hematocrit %	43.40 (38.00; 42.75)	42.20 (38.30; 44.50)

Valorile date sunt reprezentate ca valori mediane cu quartile inferioare și superioare (între paranteze). Valorile marcate (*) indică diferențe semnificative când comparăm cu pacienții cu YKL-40 scăzut (Mann-Whitney U tests, *** — $p < 0.001$, ** — $p < 0.01$, * — $p < 0.05$).

Procentul de neutrofile la subiecții din cea mai mare cuartilă YKL-40 a arătat creștere semnificativă față de adulții cu YKL-40 scăzut (testul Mann-Whitney,p = 0,024). Acest lucru este în contrast cu rezultatele obținute pentru numărul absolut de limfocite (ALC) (testul Mann-Whitney, p = 0,007) și procentul de limfocite (testul U și Mann-Whitney, p =0,025). Valorile măsurate pentru raportul neutrofile/limfocite (NLR) (testul Mann-Whitney U, p = 0,028) a prezentat o tendință similară cu cea observată pentru procentul de neutrofile. Cu toate acestea, numărul absolut de eozinofile (AEC) (Testul Mann-Whitney, p = 0,001) și procentul de eozinofile (Testul Mann-Whitney, p = 0,002) au fost semnificativ crescute în primele straturi.

Raportul monocite/limfocite (MLR) a crescut semnificativ la indivizii cu YKL-40 ridicat (Testul Mann-Whitney, p = 0,015), în timp ce parametrii legați de bazofile, adică numărul absolut de bazofile (ABC) (Testul Mann-Whitney, p = 0,021) și procentul de bazofile (Testul Mann-Whitney, p = 0,014), a arătat o tendință opusă.

4.5. Discuții

Rezultatele noastre arată, că YKL-40 este o mare promisiune pentru identificarea pacienților cu ACO. Cu toate acestea, există puține studii publicate privind biomarkerii pentru ACO.

Studiul nostru nu a relevat diferențe semnificative între valorile YKL-40 la pacienții cu astm bronșic și BPOC, doar comparativ cu grupul de ACO, aceștia din urmă pacienți au prezentat nivel de YKL-40 semnificativ mai mic, decât cei cu astm bronșic sau BPOC. Totuși valorile cele mai mari de YKL-40 au fost măsurate la grupul de pacienți cu BPOC [58,59].

Diferenţele dintre nivelurile plasmatice de YKL-40 între pacienţii cu caracteristici de ACO şi cei cu astm bronşic şi BPOC au fost semnificative statistic în studiul nostru de faţă, grupurile ACO au avut o valoare mediană mai mică.

Un posibil motiv ar putea fi faptul că în studiul nostru majoritatea subiecţilor cu astm bronşic şi BPOC au fost pacienţi internaţi în stare severă, cu rezistenţă la tratament. În trecut s-a demonstrat pe scară largă că nivelul plasmatic de YKL-40 la aceşti pacienţi a fost considerabil mai mare decât la pacienţii cu astm bronşic uşor până la moderat, bine controlat [61].

4.6 Concluzii

1. YKL-40 poate fi un biomarker important în diagnosticul bolilor pulmonare cronice.
2. YKL-40 şi în asociere cu proteina C reactivă în stadiul compensat de boală, procalcitonină, valoarea absolută a eozinofilelor şi raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor şi limfocitelor poate fi un indicator de diagnostic în bolile pulmonare cronice.
3. YKL-40 poate fi un biomarker important în diagnosticul diferenţial al ACO de astm bronşic şi BPOC.
4. Din cauza lotului mic de pacienţi studii ulterioare sunt necesare pentru demonstrarea eficacităţii şi utilităţii acestei biomarker YKL-40.

DISCUȚII GENERALE

Prezenta teză de doctorat oferă prima perspectivă asupra semnificației clinice ale concentrațiilor YKL-40 ca biomarker pentru a distinge între astm bronșic și BPOC în populația caucaziană. Acest lucru extinde cunoștințele disponibile despre acest subiect, care erau limitate până acum la rezultatele din cohortele japoneze [59,62].

Rezultatele prezentului studiu pilot sunt de larg interes pentru comunitatea europeană a cercetătorilor din domeniul bolilor pulmonare, în special celor din Europa de Est, unde incidența tulburărilor respiratorii asociate fumatului este printre cele mai ridicate la nivel mondial [71]. Adulții de vârstă mijlocie și tinerii cu BPOC au arătat o prevalență semnificativ mai mare a fumatului decât cei diagnosticați cu astm bronșic.

Nivelurile serice de YKL-40 măsurate la pacienții cu BPOC au fost semnificativ mai înalte decât cele observate pentru astm bronșic. Aceste constatări completează datele de la populațiile asiatice [59,62]. Prin urmare, datele noastre oferă pentru prima dată, dovezi pertinente pentru aplicabilitatea clinică potențială a YKL-40 ca biomarker pentru a delimita între BPOC și astm bronșic la caucazieni.

În studiul nostru fibrinogenul a fost semnificativ mai crescut la pacienții cu BPOC comparativ cu cei cu astm bronșic.

Dovezi tot mai multe susțin existența unei asocieri semnificative, dependente de concentrație, între nivelurile crescute de fibrinogen și funcția pulmonară diminuată, și risc crescut de dezvoltare a BPOC și apariția episoadelor de exacerbare, respectiv scăderi mai mari ale raportului VEMS/FVC la cohortele de vârstnici [80-83].

La pacienții astmatici s-au evidențiat asocieri puternic pozitive între fibrinogen și VSH și PCR pre-tratament, în timp ce YKL-40 părea a fi independent de celelalte variabile analizate. Aceste constatări pot reflecta faptul bine-cunoscut că fibrinogenul, PCR și VSH sunt markeri generali ai inflamației sistemice și tind să fie direct legați între ei, chiar și la subiecții sănătoși [86,87].

Cele mai semnificative corelații la pacienții cu BPOC au fost găsite pentru YKL-40; adică asocierea negativă cu parametrii legați de limfocite și asocierea pozitivă, dar

mai slabă, cu parametrii legaţi de neutrofile. Date fiind legăturile strânse dintre YKL-40 şi neutrofile şi între neutrofile şi limfocite [88,89,90], este plauzibil să crească nivelul seric de YKL-40 mediat de numărul total de neutrofile, astfel produce o scădere a numărului total de limfocite şi a procentului de limfocite. Acest echilibru alterat de neutrofile şi limfocite oferă dovezi indirecte pentru niveluri mai mari de inflamaţie în BPOC decât în astm bronșic [91].

Interesant este, că subiecţii cu YKL-40 ridicat au prezentat un profil inflamator caracterizat prin creşterea semnificativă a nivelurilor de procalcitonină. Servind ca marker al infecţiilor bacteriene, procalcitonina este foarte utilă pentru ghidarea tratamentului cu antibiotice în infecţiile respiratorii [92], astfel poate prezice exacerbările acute ale BPOC şi astm bronșic mai degrabă decât să diagnosticheze sau să delimiteze aceste afecţiuni pulmonare [93-95]. Deoarece această proteină este precursorul calcitoninei - hormon cheie în homeostazia calciului [96] - aceşti subiecţi sunt susceptibili de a prezenta alterări ale homeostaziei calciului. Există, într-adevăr, dovezi care susţin rolul implicării Ca^{2+}în dezvoltarea/exacerbarea bolilor respiratorii cronice [97].

Pacienţii cu fibrinogen crescut au evidenţiat un pattern de inflamaţie distinct în comparaţie cu cei care au prezentat nivel YKL-40 ridicat, cu creşterea semnificativă a IL-6 şi concentraţii PCR pre-tratament crescute.

IL-6 – un mediator cheie al răspunsului inflamator – induce sinteza hepatică a PCR [98]. Acest lucru poate explica creşterea simultană a acestor biomarkeri la subiecţii din cel mai mare cuartil de fibrinogen. Observăm că nivelurile PCR post-tratament în ultimul strat au revenit la valori comparabile cu cele observate la adulţii cu un nivel scăzut de fibrinogen, în ciuda faptului că au fost semnificativ crescute înainte de tratament. Aceste date confirmă eficacitatea antiinflamatoare a tratamentului administrat.

Cu toate acestea, nu a existat nicio relaţie între YKL-40 seric şi fibrinogen în grupurile de pacienţi cu astm bronșic şi BPOC. Împreună cu datele menţionate mai sus, constatările noastre sugerează că acestea două variabilele servesc ca biomarkeri independenţi. Acest lucru ar putea reflecta diferite aspecte moleculare, cum ar fi

inflamația cronică subiacentă legată de tulburarea funcției respiratorii. UtilizareaYKL-40 sau fibrinogenului ca biomarkeri unici a avut sensibilitate scăzută, dar specificitate relativ ridicată în discriminarea între astm bronșic și BPOC. Utilizarea lor combinată a îmbunătățit în totalitate specificitatea diferențierii între aceste afecțiuni respiratorii obstructive cronice. Prin urmare, pacienții cu fibrinogen scăzut și niveluri scăzute de YKL-40 sunt foarte probabil să fie diagnosticați mai degrabă cu BPOC decât cu astm bronșic. Cercetările viitoare trebuie să examineze mai îndeaproape legăturile dintre YKL-40 și aceste boli.

În ceea ce privește relevanța practică a nivelului de YKL-40 ca biomarker pentru a delimita între BPOC sever și BPOC foarte sever, după cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care oferă o perspectivă asupra acestui aspect. În plus, descoperirile prezente îmbunătățesc cunoștințele existente cu privire la legătura dintre YKL-40 și parametrii hematologici în BPOC. Rezultatele acestui studiu au implicații semnificative pentru înțelegerea potențialului YKL-40 seric și a parametrilor hematologici ca markeri de prognostic pentru BPOC inclusiv predicția exacerbărilor, declinul funcției pulmonare, mortalitatea și răspunsul la tratament.

Majoritatea adulților de vârstă mijlocie și tineri cu BPOC avansat erau fumători actuali. Acest lucru este în concordanță cu datele din literatura de specialitate care susține rolul critic al fumatului în dezvoltarea BPOC [73,74,103].

În lucrarea de față, prevalența acestei boli a fost mai mare la bărbați decât la femei. Într-adevăr, datele epidemiologice compilate de la Eurostat au arătat că 30,6% dintre bărbații români au fumat în 2019 față de doar 7,5 % dintre femei [104].

Cea mai evidentă modificare a parametrilor hematologici (față de nivelurile normale) a fost numărul absolut de leucocite (ALLC) ridicat. Având în vedere rolul esențial al leucocitelor în răspunsul organismului la infecție, inflamație sau leziuni tisulare [108], se crede că acest eveniment imunitar provine din inflamația crescută și remodelarea căilor respiratorii asociate cu BPOC [109].

De asemenea, merită menționat faptul că limfocitele au fost singurele tipuri de leucocite, care au prezentat valori în afara intervalului de referință, mai precis valori

subnormale. Această dereglare a sistemului imunitar, numită și limfopenie, apare în perioadele severe de boală sau exacerbări ale BPOC, în timp ce persoanele cu boală stabilă prezintă de obicei valori normale de limfocite [110]. Din moment ce populația studiată a inclus adulți cu BPOC avansat care au fost internați în spital în timpul episoadelor de exacerbare ale bolii, limfopenia poate reflecta pur și simplu această stare de fapt [111]. Cu toate acestea, este posibil ca această afecțiune să fie legată de severitatea bolii la pacienții recrutați [112]. Mai mult, terapia prelungită sau cu doze mari de corticosteroizi —adesea întâlnită la persoanele cu BPOC avansat – poate, de asemenea, induce limfopenie[113].

Literatura de specialitate oferă puține informații despre nivelurile serice de YKL-40 în BPOC avansat. Cu toate acestea, se știe că valorile măsurate în timpul episoadelor de exacerbare pot fi semnificativ mai mari în comparație cu perioadele stabile [114].

Subiecții înrolați în prezentul studiu au fost internați în spital în episoade de exacerbare și prin urmare, este probabil ca toți acești pacienți să fi fost în aceeași fază a bolii. Datorită absenței unor diferențe semnificative între grupuri în concentrațiile serice de YKL-40, descoperirile actuale nu favorizează utilizarea acestui biomarker pentru a delimita între BPOC sever și BPOC foarte sever.

Studiul de față a identificat un procent de neutrofile semnificativ mai mare, dar un numărul absolut de neutrofile (ANC) similar în serul adulților cu nivel ridicat de YKL-40 și BPOC sever față de adulții cu nivel de YKL-40 scăzut și BPOC avansat. Prin urmare, se pare că această categorie de pacienți afișează modificări în procentul altor tipuri de leucocite mai degrabă decât modificări cantitative legate de numărul de neutrofile. Seturi de date legate de celelalte clase de leucocite susțin această presupunere. Astfel, cele menționate mai sus au evidențiat o scădere semnificativă atât a numărului absolut de limfocite(ALC), cât și a procentului de limfocite în comparație cu indivizii cu nivel de YKL-40 scăzut.

Valori similare pentru numărul absolut de neutrofile (ANC), dar număr absolut de limfocite(ALC) semnificativ mai scăzute pot explica raportul neutrofile/limfocite (NLR) semnificativ crescut observat aici la subiecții cu YKL-40 ridicat. Valorile NLR

reflectă un dezechilibru între neutrofile și limfocite, ceea ce indică inflamație sistemică în curs și servește ca un marker general al activității bolii, severității și prognosticului [120].

În ciuda cunoștințelor limitate care leagă YKL-40 seric de raportul neutrofile/limfocite în BPOC, există dovezi paraclinice indirecte ale potențialelor asocieri. Este deja cunoscut că raportul neutrofile/limfocite crescut indică o stare proinflamatoare [120], în timp ce concentrațiile serice crescute de YKL-40 reflectă inflamația și remodelarea tisulară [114].

Ca rezultat, combinația între raportul neutrofile/limfocite crescut și YKL-40 seric poate avea efecte sinergice în contribuția la progresia bolii și riscul de exacerbare, indicând un potențial fenotip de boală mai severă și mai progresivă.

Acest studiu oferă primele dovezi care conectează parametrii hematologici, cum ar fi cei legați de bazofile(numărul absolut de bazofile (ABC), procentul de bazofile) și YKL-40 seric la pacienții cu BPOC. Scăderea semnificativă a numărului de bazofile observată la subiecții cu YKL-40 ridicat poate fi influențat de factori multipli. Având în vedere rolul lor în medierea alergiilor și declanșarea răspunsului inflamator prin migrarea la locul inflamației [128], este posibil ca bazofilele să fie recrutate din sânge apoi transportate la nivelul țesutului pulmonar, producând astfel o scădere a celulelor circulante. De asemenea, acest eveniment ar putea reflecta redistribuirea cauzată de inflamație a bazofilelor din fluxul sanguin [129] în plămâni ca răspuns la concentrațiile crescute de YKL-40 în ser. Iar în ultimul rând inflamația persistentă a căilor respiratorii la subiecții BPOC avansat poate produce activarea și degranularea cronică a bazofilelor, cu eliberarea ulterioară de granule care duc la epuizarea sau scăderea nivelului bazofilelor în sânge [130]. Bazofilia tisulară a fost recent identificată ca un nou semn distinctiv al BPOC avansat [128].

În general, rezultatele studiului de față indică faptul că YKL-40 seric ridicat în BPOC avansat este asociat cu valori semnificativ scăzute pentru limfocite, parametrii hematologici legați de eozinofile și bazofile, dar fără modificări ale neutrofilelor și numărului de monocite în comparație cu indivizii YKL-40 scăzut. Aceste date

sugerează mai mult afectarea severă a răspunsului imun al acestor pacienți, probabil legată de epuizarea celulelor imune și conducând la un profil de risc mai sever. Identificarea acestor caracteristici noi ale BPOC avansat ilustrează complexitatea și heterogenitatea acestei tulburări respiratorii cronice inflamatorii cu privire la imunopatologie, cu posibile implicații pentru tratamentul personalizat.

Deși concluziile ar trebui interpretate cu prudență, acest studiu oferă câteva perspective interesante asupra conexiunii dintre YKL-40 și parametrii hematologici în BPOC avansat. Un punct forte cheie este că efectuează o examinare cuprinzătoare asupra mai multe tipuri de leucocite. Un alt punct forte al prezentului studiu este faptul că subiecții erau potriviți în funcție de vârstă și sex înainte de începerea studiului. Acest lucru ne-a permis să evităm riscul de a fi nevoiți să facem analize cu prea multe straturi, cu dimensiunea redusă a eșantionului [131]. În schimb, majoritatea studiilor privind YKL-40 și BPOC au fost utilizate pentru ajustarea statistică a vârstei pentru a limita părtinirea legată de vârstă pentru cohorte comparate (de exemplu, [62], [58],[133]).

Deoarece toate analizele biochimice au fost efectuate pentru pacienți în timpul perioadelor de exacerbare, este de asemenea, probabil ca profilurile hematologice și nivelurile YKL-40 să fi fost modificate în comparație cu perioadele stabile ale bolii [110, 119]. Ca urmare, amploarea schimbărilor acestor parametri ar trebui să fie mai mare și, prin urmare, mai relevantă pentru înțelegerea legăturii imunopatologice între YKL-40 și parametri hematologici în bronhopneumopatia obstructivă cronică avansată.

CONCLUZII GENERALE

În concluzie, studiul nostru arată, că în viitor am putea folosi YKL-40 seric în combinație cu ceilalți markeri inflamatori în diagnosticul și urmărirea evoluției pacienților cu boli pulmonare cronice. Acești pacienți prezentând și profiluri inflamatorii distincte.

Pacienții cu nivel crescut de YKL-40 indiferent de boala pulmonară diagnosticată au prezentat niveluri semnificativ crescute de procalcitonină. În contrast, subiecții cu fibrinogen crescut au prezentat concentrații semnificativ crescute de IL-6 și niveluri crescute de PCR pre-tratament.

În ciuda limitărilor studiului nostru, rezultatele de față sugerează că YKL-40 seric este într-adevăr un biomarker promițător pentru diagnosticul diferențial între bronhopneumopatia obstructivă cronică și astmul bronșic nu numai în populația asiatică, ci și în cea caucaziană. Avem nevoie de studii transnaționale efectuate cu dimensiuni mai mari ale eșantionului și implicând pacienți cu fenotipuri diferite ale acestor boli.

Acest lucru ar trebui să ajute la definirea unui interval de referință mai precis al valorilor YKL-40 asociate cu bronhopneumopatia obstructivă cronică, astm bronșic și alte boli respiratorii. Mai mult, deținerea de seturi mari de date va facilita generarea unei curbe ROC (receiver operating characteristic) pentru acest biomarker, care, în condițiile prezente, nu a fost posibilă din cauza caracterului exploratoriu al acestui proces și utilizarea unei valori limită unice definite a posteriori.

ORIGINALITATEA TEZEI ŞI CONTRIBUŢIILE INOVATIVE

Originalitatea tezei de doctorat intitulată ***"Biomarkeri predictibili cu aplicabilitate clinică în apariţia, agravarea şi răspunsul la tratament al bolilor pulmonare cronice"*** constă în faptul că, după cunoştinţele noastre în România este prima lucrare ştiinţifică, care urmăreşte legătura dintre nivelul seric de YKL-40 în comparaţie cu markerii inflamatori deja cunoscuţi şi utilizaţi în activitatea clinică, cum ar fi: fibrinogen, PCR, VSH, procalcitonină, valoarea absolută a limfocitelor şi raportul dintre valoarea absolută a neutrofilelor şi limfocitelor precum şi raportul dintre valoarea absolută a eozinofilelor şi limfocitelor la pacienţii cu boli pulmonare cronice (astm bronşic şi bronhopneumopatia obstructivă cronică).

BIBLIOGRAFIE

1. WHO. (2019). Retrieved from http://www.who.int/respiratory/en/
2. Rovina N, K. A. (2013). Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? Mediators Inflamm., 2013:413735. doi:doi:10.1155/2013/413735.
3. Singh D, A. A. (2019). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science committee report. Eur Respir J., 53(5).
4. Collaborators., GBD 2015 Chronic Respiratory Disease. (2017). Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Respir Med.:5(9), 691-706.
5. Stockley. (1999). Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. Am J Respir Crit Care Med., 60(5 Pt 2):S49-52.
6. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. (2023). Pocket Guide To Copd Diagnosis, Management, And Prevention A Guide For Health Care Professionals.
7. Parker CM, V. N. (2005). Physiological changes during symptom recovery from moderate exacerbations of COPD. Eur Respir J., 26(3):420-8.
8. Agarwal AK, R. A. (2021). StatPearls. Retrieved from Chronic Obstructive Pulmonary Disease: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559281/
9. Decramer M, J. W. (2012). Chronic obstructive pulmonary disease. Lancet., 379(9823):1341–51. doi:doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9.
10. Vlahos R, B. S. (2014;). Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. Front Immunol., 5:435. doi: doi:10.3389/fimmu.2014.00435.

Număr total referinţe bibliografice utilizate în teză: 136

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Romana Olivia Popeţiu,** Imola Donath-Miklos, Simona Maria Borta, Larisa Alexandra Rus, Anamaria Vîlcea, Dragoş Vasile Nica, Maria Puşchiţă; Articol: Serum YKL-40 Levels, Leukocyte Profiles, and Acute Exacerbations of Advanced COPD; Revista: *MDPI Journal of Clinical Medicine***2023**, *Volume 12*, Issue 18, 6106, ISSN 2077-0383; număr pagini: 13; https://doi.org/10.3390/jcm12186106; factor impact: 3.9.
2. **Romana Olivia Popeţiu**, Imola Donath-Miklos, Simona Maria Borta, Silviu Daniel Moldovan, Luminiţa Pilat, Dragos, Vasile Nica, Maria Puşchiţă; Articol: Serum YKL-40 Levels in Patients with Asthma or COPD: A Pilot Study; Revista: *MDPI • Medicina***2023**, *Volume 59*, Issue 2, 383**:** ISSN: 1648-9144; număr pagini: 13; https://doi.org/10.3390/medicina59020383; factor impact: 2.948.
3. **Romana Olivia Popeţiu**, Silviu Daniel Moldovan, Simona Maria Borta, Oana Lucia Amza, Maria Puşchiţă; Articol: Interrelaţia dintre chitinase3-like protein 1 (CHI3L1)-YKL-40, proteina C reactivă şi spirometrie în bolile pulmonare cronice; Revista: *Practica medicală - Romanian Journal of medical practice*, **2019**, *Vol. 14*, Nr. 4 (69), ISSN 1842-8258 | e-ISSN 2069-6108 ISSN-L 1842-8258, pg. 393-395, Ref: Ro J Med Pract. 2019;14(4) DOI: 10.37897/RJMP.2019.4.9; revista indexata: Crossref, Directory of open access journals, SCOPUS, NLM Catalog, EBSCOhost, Semantic Scholar.
4. **Romana Olivia Popeţiu**, Silviu Daniel Moldovan Simona Maria Borta, Maria Puşchită, Articol: Corelaţie între Chitinase-3-like protein 1 şi bolile pulmonare cronice, Revista: *Revista Medicală Română - Romanian Medical Journal*, **2019**, Vol. LXVI, No. 3, ISSN 1220-5478 | e-ISSN 2069-606X ISSN-L 1220-5478, pg. 202-206, Ref: Ro Med J. 2019;66(3) DOI: 10.37897/RMJ.2019.3.3; revista indexata: Crossref, Directory of open access journals, SCOPUS, NLM Catalog, EBSCOhost, Semantic Scholar.