

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“ I U L I U H A Ţ I E G A N U ” C L U J - N A P O C A**

TEZĂ DE DOCTORAT

Markeri ai inflamației bronșice în astmul bronșic la copil

REZUMAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

PROF.DR. NANULESCU V MIRCEA

DOCTORAND

STATICESCU SORANA MARIANA

CLUJ NAPOCA

2016

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Astmul bronșic-noțiuni generale	18
2. Inflamația bronșică în astm	23
2.1. Dovezi asupra existenței inflamației	24
2.2. Rolul inflamației în patogeneza bolii	25
2.3. Aportul precizării tipului de inflamație bronșică în astmul bronșic pentru cercetare	27
2.4. Inflamația bronșică din astm-implicații terapeutice	30
3. Sputa provocată	32
3.1. Generalități	32
3.2. Indicațiile sputei provocate	33
3.3. Tehnica de provocare a sputei	34
3.4. Influența asupra sputei a soluțiilor nebulizate	35
3.5. Rolul celularității sputei în afecțiunile respiratorii	36
3.6. Celularitatea sputei – valori normale și patologice	37
4. Oxidul nitric exhalat	40
4.1. Fiziologie și fiziopatologie	40
4.2. Tehnici de determinare	41
4.3. Valori normale	41
4.4. Modificările oxidului nitric în astm : valoare pentru diagnostic, conducerea tratamentului	42
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Introducere	48
1.1. Ipoteză de lucru/Obiective	48
1.2. Metodologie generală	49
2. Studiul 1 – Valoarea metodei de dozare a oxidului nitric în aerul expirat pentru evaluarea copilului cu astm bronșic	55
2.1. Introducere	55
2.2. Ipoteză de lucru/obiective	55
2.3. Metodologie	56
2.4. Rezultate	56
2.5. Discuții	67
2.6. Concluzii	78
3. Studiul 2 – Valoarea celularității sputei pentru diagnosticul și monitorizarea tratamentului la copilul cu astm bronșic	81

4.1. Introducere	81
4.2. Ipoteză de lucru/obiective	81
4.3. Material și metodă	82
4.4. Rezultate	83
4.5. Discuții	96
4.6. Concluzii	111
4. Discuții generale	113
5. Concluzii generale (sinteză)	118
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	121
REFERINȚE	123

Cuvinte cheie: astm bronșic, sputa provocată, oxid nitric exhalat, copil

INTRODUCERE

Astmul bronșic (AB) este cea mai frecventă boală cronică întâlnită la vârsta pediatrică. În ciuda numeroaselor studii care au reușit să elucideze o mare parte a patogenezei bolii și a claselor de medicamente disponibile, incidența AB a crescut îngrijorător în ultimii ani, în special în țările dezvoltate și emergente. Managementul AB la copil este destul de diferit comparativ cu cel al adultului și deși s-au alcătuit numeroase ghiduri, în multe cazuri acestea se pot aplica doar parțial. Relativ frecvent, boala evoluează și la vârsta de adult, cu impact nefavorabil asupra calității vieții.

Inflamația căilor respiratorii inferioare este modificarea esențială a AB, iar acest proces poate fi prezent și la pacientul cu un nivel acceptabil de control al bolii. Evidențierea inflamației bronșice, alături de prezența simptomatologiei specifice recurente și obstrucția variabilă la nivelul căilor bronșice oferă informații pentru stabilirea diagnosticului de AB. Întrucât evidențierea directă a inflamației bronșice este posibilă doar cu metode invazive, există preocupări pentru găsirea unor tehnici noninvazive pentru decelarea indirectă a inflamației de la nivelul căilor respiratorii inferioare.

Dintre aceste metode noninvazive amintim dozarea oxidului nitric în aerul exhalat (NOe) și studiul celularității sputei.

Investigația bolnavului cu AB prin provocarea sputei a fost prima manoperă utilizată pentru evidențierea inflamației căilor bronșice atât în scop științific cât și diagnostic, metodă care tinde să înlocuiască lavajul bronhoalveolar.

Stabilirea nivelului de NOe este o altă metodă de investigare noninvazivă mult folosită în ultimii ani la pacientul pediatric. Valorile crescute ale NOe sunt direct corelate

cu prezența inflamației în căile bronșice, iar la pacientul aflat în stadiu aparent de control al bolii aceste valori crescute sunt predictibile în viitorul apropiat pentru un posibil episod de exacerbare.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Partea generală a tezei prezintă aspectele teoretice actuale cu privire la investigarea prezenței inflamației bronșice la copilul cu AB insistând asupra celor două metode de evaluare folosite în cadrul studiului: decelarea nivelului de NOe și studiul celularității sputei prin provocarea ei.

CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Obiective

Teza de față și-a propus investigarea inflamației bronșice la copilul cu AB cu ajutorul a doua metode noninvasive: analiza celularității sputei prin provocarea acesteia cu ajutorul soluțiilor saline hipertone și determinarea nivelului de NOe. Rezultatele obținute au fost corelate cu diverși alți parametrii clinici și paraclinici de evaluare a copilului cu AB. Lucrarea de față a dorit să stabilească utilitatea acestor două metode de investigație nu numai în stabilirea diagnosticului de AB dar și în monitorizarea evoluției bolii.

2. Metodologie

Cercetarea de față s-a efectuat în cadrul Spitalului de Urgență pentru Copii, Cluj-Napoca, Clinica Pediatrie III în perioada iulie 2008-martie 2012 și a cuprins 110 copii cu diagnosticul de AB. Studiul a fost de tip observațional și s-a efectuat cu consimțământul informat al părinților și în conformitate cu reglementările Comitetului de Etică a Spitalului de Urgență pentru Copii. Lotul de studiu a fost reprezentat de 52 pacienți de sex feminin (47,3%) și 58 de sex masculin (52,7%) cu vârsta medie de $10,07 \pm 3$ ani.

Criteriile de includere ale pacienților în studiu au fost: diagnostic cert de AB, vârsta între 6-18 ani, absența manifestărilor caracteristice de infecție acută de căi respiratorii în ultimele 6 săptămâni, capacitatea pacienților de a efectua corespunzător manoperele de investigație, acordul pacientului și al aparținătorilor de a participa la studiu. Au fost excluși din studiu pacienții care se aflau într-un episod sever de exacerbare al bolii și care nu au putut efectua adecvat manoperele de evaluare ale aparatului respirator.

Pacienții incluși în studiu au fost evaluați din punct de vedere clinic (examen obiectiv, aplicarea chestionarului Asthma Control Test) și paraclinic (stabilirea nivelului de Ig E totale, Eo și Ne din sânge, testări cutanate alergologice, spirometrie, celularitatea sputei și NOe).

Anamneza a precizat istoricul de boala și tratamentul de fond, prezența/absența episoadelor de exacerbare sau a altor manifestări clinice respiratorii în ultimele 6 săptămâni, antecedentele personale caracteristice terenului atopic (rinita alergică, dermatita atopică, sensibilizarea la alergenii de mediu).

Examenul obiectiv s-a efectuat complet, pe aparate și sisteme, acordându-se o importanță mai mare examinării aparatului respirator. Studiul nostru a exclus pacienții care au prezentat în ultimele 6 săptămâni infecții ale căilor respiratorii, dar și pacienții care au prezentat semne de infecție bacteriană la bilanțul paraclinic (proteina C reactivă pozitivă, VSH accelerat). Am inclus în studiu și pacienții care s-au prezentat pentru un episod de exacerbare al bolii, dar care au fost capabili să efectueze corect spirometria și dozarea NOe.

3. Studiul 1

Am plecat de la premiza conform căreia măsurarea NOe se corelează cu inflamația bronșică, astfel încât, ipotetic, dozarea acestui marker ar putea preciza rolul pe care procesul inflamator îl are în dezvoltarea tabloului clinic al bolii și ar putea să ne orienteze în stabilirea diagnosticului și monitorizarea tratamentului.

În acest studiu ne-am propus următoarele obiective: precizarea relației dintre NOe și funcția respiratorie măsurată prin spirometrie la copii cu AB, comportamentul NOe la copiii cu AB alergic, valoarea dozării NOe pentru aprecierea controlului AB, efectele tratamentului cu GCI asupra concentrației NOe.

Dozarea NOe s-a efectuat la 110 pacienți, 58 de sex masculin (52,7%) și 52 de sex feminin (47,3%) cu vârsta medie de $10,07 \pm 3$ ani (6-18 ani), pentru determinarea NOe utilizandu-se un dispozitiv Niox-MiNo Sweden; rezultatele au fost interpretate în funcție de prezența sau nu a glucocorticoizilor în terapia pacientului. Cele mai ridicate valori ale NOe au fost înregistrate la bolnavii cu AB necontrolat ($52,1 \pm 37,4$ p.p.b.) în timp ce pentru cei cu AB parțial controlat și controlat valorile au fost mult mai mici, respectiv $17(9,75-31,75)$ p.p.b. pentru bolnavii cu AB controlat și $19(11,25-32,75)$ p.p.b. pentru pacienții cu AB parțial controlat. Diferențele între mediile valorilor NOe decelate pentru cele trei loturi de pacienți formate în funcție de nivelul controlului au fost semnificative statistic ($p=0,035$), iar conform testului Cramer V între nivelul de control al bolii și NOe există corelație, dar fără semnificație statistică ($r=0,28/p=0,06$).

Analiza statistică a valorilor NOe din cele 3 loturi de pacienți formate în urma împărțirii în funcție de nivelul de control al bolii a arătat prezența unor diferențe semnificative statistic între bolnavii cu AB controlat – AB necontrolat ($p=0,039$), respectiv AB controlat – AB parțial controlat ($p=0,039$).

În cadrul subplotului de pacienți cu valori crescute ale NOe, 32 pacienți (45,7%) nu urmau nici un fel de terapie, în timp ce 26 pacienți (37,1%) urmau o terapie GCI iar 12 pacienți (17,2%) se aflau în curs de tratament cu montelukast.

La bolnavii tratați cu GCI am înregistrat valori mai mici ale NOe ($18,5(10,5-31)$ p.p.b.) comparativ cu cei care nu primeau un astfel de tratament ($38,9 \pm 31,8$ p.p.b.).

Diferențele între mediile valorilor obținute în cadrul celor două loturi formate au fost fără semnificație statistică ($p=0,09$). În urma aplicării testului Chi Square am observat că pacienții cu terapie cu GCI au șanse de 32 de ori mai mari față de cei fără această terapie, pentru valori normale ale NOe. Pentru pacienții care primeau terapie cu compusi GCI am decelat valori ale NOe de 31(30-32) ppb atunci când doza de corticoid a fost ≤ 200 μ grame, în timp ce pentru pacienții care primeau doze mai mari de 200 μ grame de corticoid media valorilor NOe a fost de 21,5(19-30) ppb.

Din cei 46 pacienți care nu au urmat terapie cu GCI, 12 au primit Montelukast. La toți acești pacienți valoarea NOe a fost peste limita superioară a normalului (29,5(14,5-49) p.p.b.). Nu am putut demonstra existența de diferențe între lotul pacienților tratați cu Montelukast și loturile pacienților tratați cu GCI sau a celor care nu urmau nici un fel de terapie ($p=0,2$). În urma aplicării testului Chi Square am demonstrat că bolnavii care primesc asocierea Montelukast - GCI au șanse de 2,46 ori mai mari de a avea valori normale ale NOe comparativ cu bolnavii care nu urmează o astfel de asociere.

Valorile medii ale NOe au fost mai ridicate la copiii cu AB care au prezentat valori scăzute ale FEV₁(27(9,25-44,75) p.p.b.). Analiza statistică a datelor nu a evidențiat vreo corelație între NOe și FEV₁ ($r= -0,007/p=0,49$). La copiii cu AB la care valorile MEF₅₀ au fost scăzute s-au înregistrat concentrații mai ridicate ale NOe (27(9,75-76,75) p.p.b.) comparativ cu grupul de bolnavi la care valoarea acestui parametru spirometric a fost în limite normale (20,5(9-37) p.p.b.), diferențele fiind semnificative statistic ($p=0,008$).

Nivelul NOe la pacienții care în luna premergătoare dozării NOe au prezentat un episod de obstrucție bronșică a fost mult mai ridicat comparativ cu cei care nu au prezentat un episod de exacerbare (49 \pm 36,9 p.p.b. versus 19(9-37) p.p.b.), între cele două grupe de bolnavi formate diferențele fiind totuși fără semnificație statistică ($p=0,08$). Conform testului Chi Square valoarea NOe nu este influențată de prezența sau absența unui episod de obstrucție bronșică în luna premergătoare determinării.

Din cei 110 pacienți, la 45 s-au efectuat testări cutanate la diverși alergeni, valorile cele mai ridicate ale NOe fiind înregistrate la cei cu hiperergie cutanată la mucegai, iar cele mai scăzute la cei cu hiperergie cutanată la graminee. Am observat, la majoritatea claselor de alergeni testate existența diferențelor semnificative statistic între mediile valorilor NOe înregistrate (respectiv valori ale $p<0,05$). Diferențele nu s-au decelat în cazul gramineelor ($p=0,133$) și a mucegaiului ($p=0,1$). În cadrul studiului de față nu am demonstrat existența vreunei asocieri între prezența sensibilității cutanate la alergeni testați și valorile ridicate ale NOe.

Nu am putut demonstra existența unei asocieri între testarea cutanată și nivelul NOe. Doar la alimente se observă o tendință spre asociere ($p=0,09$). Atunci când pacienții au fost stratificați în funcție de nivelul NOe (normal, crescut) și numărul de alergeni la care testarea cutanată a fost pozitivă, am constatat la cei cu hiperergie cutanată la 1 respectiv 3 alergeni o distribuție aproximativ asemănătoare între cei cu valori normale și cei cu valori crescute ale acestui marker (3 alergeni: 3 pacienți, respectiv 1 alergen: 13

pacienți). La cei cu sensibilizare la 2 alergeni numărul pacienților cu valori crescute ale NOe a fost mult mai mare (9 vs 2 pacienți).

Întrucât unele date din literatură menționează o relație între valoarea Ne și Eo din sânge pe de-o parte și inflamația bronșică pe de altă parte, am studiat relația dintre aceste celule sanguine și NOe. Între nivelul Eo sangvine și NOe nu am decelat prezenta vreunei corelații și nici diferențe semnificative statistic, în timp ce între nivelul NOe și nivelul Ne din sânge am decelat existența unei corelații inverse într-un grad de asociere acceptabil ($r = -0,36/p = 0,012$).

Valorile medii ale NOe au fost asemănătoare la cei care asociază rinita alergică comparativ cu cei la care nu este prezentă această comorbiditate (22(10-45,75) vs 20(12-39,75)), iar aplicarea testului Chi Square a arătat că pentru pacienții din lotul nostru de studiu rinita alergică nu este un factor care ar putea influența valorile NOe ($p = 0,56$).

Stratificarea pacienților pe 3 categorii de vârstă a dus la identificarea unor diferențe semnificative statistic ($p = 0,009$) pentru valorile NOe înregistrate. Cele mai scăzute valori ale NOe au fost înregistrate la pacienții cu vârste între 6-9 ani (18(11-41,25 p.p.b.)), pe când cele mai ridicate au fost observate la bolnavii din categoria 15-18 ani (59,1±50,3 p.p.b.). Între cei doi parametri studiați nu s-a evidențiat corelație semnificativă statistic ($r = 0,17/p = 0,06$).

Aplicarea testului Chi Square ne-a arătat că sexul nu reprezintă un factor care influențează valoarea NOe ($p = 0,5$, OR=1,01-95%CI 0,4-0,2).

4. Studiul 2

Studiul nostru a plecat de la ipoteza conform căreia analiza celularității sputei la copilul cu AB oferă informații importante asupra procesului de inflamație bronșică din căile respiratorii. Ipotetic, stabilirea tipului și a procentului de celule din spută ar putea duce la formularea cu mare probabilitate a diagnosticului de AB alergic dar în același timp ar oferi informații asupra evoluției inflamației bronșice în cursul tratamentului cu GCI.

Obiectivele studiului au fost: stabilirea relației dintre celularitatea sputei și numărul de Eo și Ne din sânge precum și cu parametrii spirometrici care evidențiază obstrucția bronșică (FEV₁, MEF₅₀), profilul celularității sputei la copilul cu AB alergic comparativ cu cel nonalergic, stabilirea relației dintre celularitatea sputei și nivelul de control al bolii, influența terapiei cu GCI asupra celularității sputei, evaluarea metodei de provocare a sputei în termeni de rată a succesului, toleranță și reacțiile secundare.

Lotul de studiu a fost reprezentat de 67 pacienți cu AB, 28 de sex feminin (41,8%) și 39 de sex masculin (58,2%), cu vârsta medie de 10,4±3,1 ani. Am obținut spută pentru studiul celularității la 55 dintre cei 67 de pacienți investigați (rata de succes a investigației a fost de 82%). Cei mai mulți pacienți incluși în studiu au prezentat o formă parțial controlată a bolii (25 pacienți - 45,4%) și erau în curs de terapie cu GCI (34 pacienți - 61,8%).

Pe parcursul probei doar 11 copii (16,4%) au prezentat reacții adverse ușoare: rinoree (7,4%), strănut (2,9%), tuse (5,9%), scăderea FEV₁ cu mai mult de 12% după aerosolizare (4,4%). Aceste simptome au remis integral la terapia cu Salbutamol.

În cadrul studiului nostru în cele mai multe cazuri am observat prezența fenotipului neutrofilic și paucigranulocitic (16 pacienți pentru fiecare categorie). Din categoria pacienților cu fenotip neutrofilic cei mai mulți (8 din 16) au prezentat un nivel necontrolat al bolii, restul fiind cu un nivel parțial controlat (4 pacienți) și controlat (4 pacienți). Din categoria pacienților cu fenotip eozinofilic cei mai mulți (10 din 14) au fost cu AB parțial controlat în timp ce 3 au fost cu AB controlat și 1 pacient cu AB necontrolat. Pentru cele 4 fenotipuri de spută studiate am decelat prezența unor diferențe semnificative statistic ale mediilor pe grupe atunci când celula studiată a fost reprezentată de Ne sau de Eo ($p < 0,001$).

Celularitatea sputei la pacienții cu obstrucție bronșică (valori FEV₁ ≤ 80%) a demonstrat prezența unui procent ridicat de Eo (29,6±31,5%) și normal de Ne (46,8±22,1%) în timp ce pentru bolnavii cu funcție respiratorie normală (valori FEV₁ > 80%) procentul celor două categorii de celule din spută a fost în limite normale (1(0-4,15)% pentru Eo, respectiv 45(20-69,25)% pentru Ne). Analiza obstrucției bronșice la nivelul căilor respiratorii mici efectuată prin măsurarea MEF₅₀ a evidențiat valori mai mari ale procentului de Ne și normale ale celui de Eo la cei cu obstrucție bronșică.

Media FEV₁ după nebulizare crește semnificativ statistic ($p=0,045$) în raport cu media FEV₁ anterior nebulizării de soluții hipertone (90,21% inițial versus 93,46% final). Din cei 17 pacienți care au avut valoarea FEV₁ scăzută după nebulizare, 12 au avut valori reduse și înainte de administrarea aerosolilor; din cei 37 pacienți cu valori FEV₁ normale postprovocare 34 au prezentat valori normale și înainte de aerosolizare.

În funcție de Eo din sânge, la cei cu valori normale ($< 0,16 \times 10^3/\mu\text{l}$) procentul de Eo în spută a fost ușor crescut (2,9±4,9 %). Bolnavii cu un nivel ridicat de Eo din sânge au prezentat în spută procente normale ale Eo (2(0-5) %).

Pacienții cu AB atopice au prezentat un nivel al Eo din spută mult mai ridicat (5(0-15) comparativ cu bolnavii cu AB nonatopice (0(0-0,25)%), între cele două loturi de pacienți decelându-se pentru mediile valorilor înregistrate, diferențe semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,001$). Aplicarea testului Chi Square ne-a arătat că există asociere între prezența atopiei și Eo din spută, Eo din spută reprezentând un factor de predicție pentru atopie ($p < 0,001$).

Am decelat valori mult mai ridicate ale IgE totale la bolnavii care au asociat astmului rinita alergică (266,7±210 UI/ml) comparativ cu bolnavii la care rinita alergică a fost absentă (81,5(29-212) UI/ml). La lotul pacienților cu AB și rinită alergică procentul de Eo a fost mai mare (2,9±2,6) în comparație cu bolnavii cu AB fără această asociere (2(0-14,25)% dar diferențele nu sunt statistic semnificative. Prin aplicare testului Chi Square am constatat că prezența rinitei alergice nu influențează procentul de Eo din spută ($p=0,72$).

Atunci când pacienții au fost stratificați în funcție de nivelul procentual al celulelor din spută studiate (normal, crescut) și numărul de alergeni la care testarea cutanată a fost pozitivă am constatat, pentru procentul de Eo, valori mult crescute la pacienții cu hiperergie cutanată la 1 respectiv 2 alergeni, în timp ce bolnavii cu testare cutanată la 3 sau mai mulți alergeni au avut valori normale ale acestui tip de celulă din spută.

Pentru procentul de Ne din spută am observat valorile cele mai ridicate ale acestui tip celular la bolnavii care prezentau sensibilitate cutanată la 3 sau mai mult de 3 alergeni testați în timp ce bolnavii cu sensibilitate cutanată pozitivă la 1 alergen au avut procente ale Ne din spută în limite normale, iar cei cu sensibilitate cutanată pozitivă la 2 alergeni au avut valori ușor crescute.

Întrucât datele din literatură menționează la bolnavii cu AB valori crescute ale NOe la cei cu infiltrat inflamator eozinofilic am studiat corelația dintre celularitatea sputei și concentrația NOe. Subîmpărțind lotul de studiu în funcție de valori normale respectiv valori crescute ale NOe, nu am constatat diferențe statistic semnificative pentru media Eo din sputa exprimată procentual ($1,8(0-4,6)\%$ vs $2,1 \pm 2,1\%$); nu a existat corelație statistic semnificativă între cei doi parametri analizați ($r=-0,29$; $p=0,17$). În schimb valorile medii ale Ne din spută, exprimate procentual, au fost mai mari la cei cu valori crescute ale NOe ($57,5 \pm 25,6\%$ vs $46,2 \pm 21,4\%$), pentru aceste două variabile corelația directă fiind înalt semnificativă ($r=0,67$; $p=0,001$).

Valorile cele mai mari pentru Eo din spută au fost înregistrate la cei cu AB parțial controlat ($6(3,75-24)\%$). Aplicarea testului Chi Square a demonstrat că există o asociere semnificativă din punct de vedere statistic între procentul de Eo din spută și nivelul de control în sensul că un procent mai mic de 2,5% al Eo în spută se asociază cu AB controlat sau parțial controlat ($p=0,018$).

Valorile cele mai mari ale procentului de Ne din sputa au fost înregistrate în AB necontrolat ($64,6 \pm 30,7\%$), comparativ cu valorile pentru forma de boală parțial controlată ($46,2 \pm 20,1\%$), respectiv controlată ($35 \pm 19,7\%$). Diferențele celor 3 categorii de valori sunt statistic semnificative ($p=0,001$). Conform Chi Square între procentul de Ne din spută și nivelul de control al bolii există o asociere semnificativă din punct de vedere statistic. Un procent al Ne din spută $<47\%$ se asociază cu AB controlat sau parțial controlat ($p=0,044$).

Analiza statistică nu a evidențiat diferențe pentru procentul de Eo în spută la cei tratați cu GCI comparativ cu cei care nu au primit acest tratament ($p=0,64$). Deși valorile procentuale ale Ne sunt mai mari la cei fără terapie cu GCI ($50,1 \pm 28,3$ vs $42,6 \pm 21$), diferențele nu sunt statistic semnificative ($p=0,32$).

5. Concluzii generale

Teza de față aduce contribuții importante într-un domeniu de mare actualitate, respectiv aplicarea de manopere noninvasive dar care în același timp oferă informații

fidele despre procesul inflamator bronșic la categoria de pacienți cu AB și vârsta pediatrică.

Decelarea nivelului de NOe la copilul cu AB este o manoperă ușor de efectuat care este cu succes utilizată la copiii cu AB de vârstă mică sau dificil de evaluat. Rezultatele obținute în cadrul tezei de față arată utilitatea acestei tehnici de investigare nu numai în procesul de stabilire al diagnosticului de boala dar și în cel de urmărire a bolnavului (urmărire atât a evoluției tabloului clinic dar și a impactului pe care o anumită terapie).

- valori medii ale NOe care depășesc limita superioară a normalului la pacienții cu AB necontrolat. Aceste valori au fost semnificativ crescute comparativ cu valorile înregistrate la pacienții cu AB parțial controlat sau controlat

- valori scăzute ale NOe la pacienții cu AB aflați în terapie GCI comparativ cu pacienții care nu urmau un astfel de tratament. Șansele ca pacienții aflați în terapie GCI să prezinte valori normale ale NOe au fost de 32 de ori mai mari raportat la pacienții care nu primeau această terapie, deși diferențele între valorile medii ale celor două clase de pacienți nu au fost semnificative statistic

- prezența unui episod de obstrucție bronșică în luna premergătoare decelării nivelului de NOe a dus la obținerea unor valori crescute ale acestui parametru în comparație cu bolnavii care nu au avut un astfel de eveniment în antecedentele recente, dar diferențele între valorile medii ale celor două clase de pacienți formate nu au fost semnificative statistic

- în cazul unui rezultat pozitiv în urma testării cutanate am observat asocierea de valori mari ale NOe, această observație fiind înregistrată la majoritatea claselor de alergeni testați. Deși am înregistrat valori medii mai mari ale NOe la categoria pacienților cu AB și valori ale IgE totale crescute, diferențele între această clasă de pacienți și clasa de bolnavi care au avut valori ale IgE totale normale nu au fost semnificative statistic

- există o corelație slabă între intensitatea inflamației din CR decelată cu ajutorul NOe și expresia clinică a AB. Deși investigarea cu ajutorul testelor funcționale respiratorii este foarte importantă în procesul de evaluare a bolnavului cu AB, determinarea NOe reprezintă o metodă adițională de examinare a statusului inflamator.

Evaluarea celularității sputei recoltată în urma provocării cu ajutorul soluțiilor hipertone reprezintă o alta metodă adjuvantă care aplicată împreună cu metodele uzuale de evaluare ale copilului cu AB aduc un aport în plus de informații asupra statusului inflamator al bolnavului evaluat. Cu ajutorul rezultatelor înregistrate în teza de față am reușit să confirmăm acest aspect, aplicarea acestei metode putând fi o alternativă a metodelor uzuale de evaluare pulmonară folosite la copilul cu AB.

- rata de succes a manoperei de provocare a sputei a fost de 82%, reacțiile adverse înregistrate fiind ușoare și remisive după administrarea de Salbutamol

- pentru categoria de bolnavi cu AB la care spirometria a decelat valori

caracteristice obstrucției bronșice am înregistrat modificări ale procentului de Eo (procent crescut în cazul unor valori FEV₁ scăzute) și Ne (procent crescut în cazul unor valori MEF₅₀ scăzute) din spută

- cuantificarea bolnavilor în funcție de terenul alergic a dus la observarea de valori ale Eo din sputa crescute comparativ cu bolnavii la care acest factor a lipsit, diferențele între cele două clase de pacienți fiind semnificative statistic. La categoria de bolnavi cu sensibilizare la pneumoalergeni, pentru cei cu hiperergie la părul de câine și praful de casa am înregistrat procente ale Eo în spută mult crescute

- copiii cu AB necontrolat au avut valori ale procentului de Ne din spută mult mai ridicate comparativ cu valorile decelate la copiii cu AB parțial controlat și controlat.

Deși studiul de față a demonstrat că sputa bolnavilor cu AB necontrolat este bogată în Ne și nu în Eo așa cum cele mai multe cercetări științifice au arătat, există multe lucrări științifice în literatura recentă care susțin importanța acestei celule. Studiile acestea au arătat că pacienții cu AB necontrolat nu răspund favorabil la terapia glucocorticoidă iar această observație s-ar datora prezenței în spută a unui procent ridicat de Ne. Rezultatele acestea au implicații asupra aspectului clinic de boală deoarece terapia în cazul acestor pacienți trebuie să fie schimbată.

În ceea ce privește decelarea unei corelații între cele două tehnici de evaluare folosite în cadrul acestui studiu am reușit stabilirea unei corelații directe între procentul de Ne din spută și valoarea NOe dar nu și între valoarea NOe și procentul de Eo din spută.

În concluzie rezultatele obținute în cadrul studiului de față au implicații practice asupra testării statusului inflamator la copilul cu AB aflat nu numai în perioada de control a bolii dar și în faza de boală necontrolată. Aplicate împreună cele două metode de investigație pot să crească acuratețea unui diagnostic cert de boală și pot fi facil utilizate în monitorizarea evoluției bolii sub o anumită terapie.

**UNIVERSITY OF MEDECIN AND PHARMACOLOGY
“IULIU HAȚIEGANU”CLUJ-NAPOCA**

THESIS

**Bronchial inflammation markers in
bronchial asthma in child**

SCIENTIFIC COORDINATOR

PROF.DR. NANULESCU V MIRCEA

DOCTORAND

STATICESCU SORANA MARIANA

CLUJ NAPOCA

2017

CONTENTS

INTRODUCTION	13
ACTUALITY IN BRONCHIAL ASTHMA	
1. Bronchial asthma-general notions	18
2. Bronchial inflammation in asthma	23
2.1. Evidences of the presence of inflammation	24
2.2. Rol of inflammation in disease pathogenesis	25
2.3. Importance of specific type of bronchial inflammation in asthma for the scientific field	27
2.4. Bronchial inflammation in asthma – therapeutically implications	30
3. Induced sputum	32
3.1. General aspects	32
3.2. Indications for induced sputum	33
3.3. Methodology for induction sputum	34
3.4. Influence on sputum of the saline solutions	35
3.5. Rol of sputum cellularity in respiratory diseases	36
3.6. Sputum celullarity – normal and pathological values	37
4. Exhaled nitric oxide	40
4.1. Physiology and physiopathology	40
4.2. Determination techniques	41
4.3. Normal values	41
4.4. Nitric oxide modification in asthma : values for diagnosis and treatment	42
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Introduction	48
1.1. Hypothesis/Objectives	48
1.2. General method	49
2. First study – Value of nitric oxide determination for the child with bronchial asthma	55
2.1. Introduction	55
2.2. Hypothesis/Objectives	55
2.3. Methodology	56
2.4. Results	56
2.5. Discussions	67
2.6. Conclusions	78
3. Second study – Value of induced sputum for the diagnosis and monitorisation of the treatment in child with bronchial asthma	81
4.1. Introduction	81
4.2. Hypothesis/Objectives	81
4.3. Methodology	82
4.4. Results	83
4.5. Discussions	96
4.6. Conclusions	111
4. General discusions	113
5. General conclusions (sinthesis)	118
6. Originality and contributions of the thesis	121
BIBLIOGRAPGY	123

Key words: bronchial asthma, induced sputum, exhaled nitric oxide, child

INTRODUCTION

Bronchial asthma (BA) is the most common chronic disease seen in pediatric age. Despite numerous studies, they have failed to elucidate much of the pathogenesis and drug classes available within BA, and the incidence has increased dramatically in recent years, especially in developed and emerging countries. The management of BA in children is quite different compared to that of an adult and although there are many guides, in many cases this can be applied only partially. Relatively frequently, the disease progresses to adulthood, with negative impact on quality of life.

Lower airway inflammation is the essential modification of BA, and this process may be present in patients with an acceptable level of disease control. Highlighting bronchial inflammation, along with the presence of specific symptoms and recurring bronchial obstruction variable tract provides information for the diagnosis of AB. Since direct evidence of bronchial inflammation is possible only with invasive methods, there are concerns for finding noninvasive techniques for indirect detection of inflammation of the lower respiratory tract.

Two from the noninvasive tests to determine the bronchial inflammation are the level of nitric oxide in exhaled air (NO_e) and the study of sputum cellularity.

The investigation of a patient with BA with the help of sputum was the first method used to highlight bronchial airway inflammation both for scientific and diagnostic reasons, a method that tends to replace bronchoalveolar lavage.

Establishment of NO_e is another noninvasive method of investigation of the pediatric patient used much in recent years. Elevated NO_e are directly correlated to the presence of inflammation in the bronchial pathways and in the patient that is on the stage of disease control, apparently these high values are predictable for a future exacerbation.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The general part of the thesis presents the current theoretical issues regarding the investigation of the presence of bronchial inflammation in children with BA, focusing on the two methods used in the study: NO_e level detection and the study of sputum cellularity by induction.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

1. Objectives

This thesis has proposed to investigate bronchial inflammation in children with BA using two noninvasive methods: analysis of sputum cellularity by its induction using hypertonic saline solutions and determine the level of NO_e. The results were correlated with a variety of other clinical and paraclinical parameters which evaluate the child with BA. This paper sought to establish the utility of these two investigative methods not only in the diagnosis of BA but also in monitoring the disease progression.

2. Methodology

This research was conducted in the Emergency Hospital for Children, Cluj-Napoca, III Pediatric Clinic between July 2008 and March 2012, and included 110 children with a diagnosis of BA. The study was observational and conducted with informed parental consent and in accordance with the Ethics Committee of the Emergency Hospital for Children. The study group consisted of 52 female patients (47.3%) and 58 males (52.7%) with the mean age of 10.07 ± 3 years.

The criteria for inclusion of patients in the study were: definite diagnosis of BA, age between 6-18 years, the absence of characteristic manifestations of acute respiratory tract infection in the last 6

weeks, patients' ability to perform appropriate the maneuvers investigation, onsent of the patient and caregivers to participate in the study. There were excluded from the study patients who were in a severe exacerbation episode of the disease and who could not perform adequate evaluation of the respiratory maneuvers.

The patients included in the study were evaluated clinically (physical exam, the Asthma Control Test questionnaire) and paraclinically (determining the level of total IgE, serological level of Eo and Ne, skin test for allergy, spirometry cellularity sputum and NOe).

Anamnesis insisted on the disease history and background therapy, presence / absence of exacerbations or other respiratory clinical manifestations in the past 6 weeks, personal history of atopy characteristic (allergic rhinitis, atopic dermatitis, sensitization to allergens in the environment).

Physical examination was performed completely to all systems, giving greater importance to the respiratory examination. Our study excluded patients who in the past 6 weeks presented respiratory tract infections, and patients who had signs of bacterial infection after laboratory tests (positive C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate accelerated). We included in the study patients who came for an exacerbation of the disease, but were able to correctly perform spirometry and dosing NOe.

3. Study 1

We started from the premise that the measure of NOe correlates with bronchial inflammation and so hypothetically the determination of this marker may indicate the role that the inflammatory process plays in the development of clinical disease and may focus in establishing the diagnosis and monitoring of the treatment.

In this study, we proposed the following objectives: to specify the relationship between NOe and respiratory function measured by spirometry in children with BA, to observe the NOe behavior in children with allergic BA, the capacity of NOe to appreciate the control of the disease and the NOe effects on the GCI dosage.

NOe dosation was performed in 110 patients, 58 male (52.7%) and 52 female (47.3%) with mean age of 10.07 ± 3 years (6-18), by using the NIOX MINO Sweden device. Results were interpreted according to the presence or not of glucocorticoids in the therapy of the patient. The highest Noe values were recorded in patients with uncontrolled BA (52.1 ± 37.4 ppb) while those with controlled and partially controlled were much lower - 17 (9.75-31 75) ppb for patients with controlled BA and 19 (11.25 to 32.75) p.p.b. with partially controlled BA. The differences between the mean values of Noe detected for the three groups of patients formed by the level of control were statistically significant ($p = 0.035$), and according to the test Cramer V between the level of disease control and Noe there is a correlation but without statistical significance ($r = 0.28 / p = 0.06$).

Statistical analysis values of NOe of the 3 groups of patients formed after division by the level of disease control showed the presence of statistically significant differences between patients with controlled BA and uncontrolled BA ($p = 0.039$), respectively AB controlled - AB partially control ($p = 0.039$).

In the subgroup of patients with elevated NOe, 32 patients (45.7%) were not having any therapy, while 26 patients (37.1%) were GCI therapy and 12 patients (17.2%) were under treatment with montelukast.

In patients treated with GCI we recorded lower values of NOe (18.5 (10.5 to 31) p.p.b.) compared to those who did not receive such treatment (38.9 ± 31.8 p.p.b.). Differences between the mean values obtained in the two groups formed were not statistically significant ($p = 0.09$). After applying the Chi Square test we observed that patients with GCI therapy are likely 32 times higher than those without this therapy for having NOe normal values. For patients receiving therapy with GCI compounds we detected values of NOe of 31 (30-32) ppb when the dose of corticoid ≤ 200 μ grame, while for patients receiving higher than 200 μ grame doses of corticoid the average of NOe was of 21.5 (19-30) ppb.

Of the 46 patients who were having GCI therapy, 12 received Montelukast. NOe values in all patients were above the upper limit of normal (29.5 (14.5 to 49) p.p.b.). We could not prove the existence of differences between the group of patients treated with montelukast and the group of patients treated

with GCI or those who did not follow any therapy ($p = 0.2$). After applying the Chi Square test we have demonstrated that patients receiving the combination Montelukast - GCI had 2.46 times higher chance of having normal levels of NOe compared to patients who do not follow such an association.

NOe average values were higher in children with BA who presented low FEV1 values (27 (9.25 to 44.75) p.p.b.). Statistical analysis of data did not reveal any correlation between NOe and FEV1 ($r = -0.007 / p = 0.49$). In children with BA, values of MEF50 were lower than those with higher concentrations of NOe (27 (9.75 to 76.75) ppb) compared with patients where this parameter was within normal limits (20.5 (9-37) ppb), the differences being statistically significant ($p = 0.008$).

NOe level in patients who in the month preceding dosing NOe had had an episode of bronchial obstruction was significantly higher compared to those who did not show an exacerbation (49 versus 19 ± 36.9 ppb (9-37) ppb), between the two groups of patients formed the differences being not statistically significant ($p = 0.08$). According to the Chi Square, NOe value are not influenced by the presence or absence of an episode of bronchial obstruction in the month preceding the determination.

Of the 110 patients of the study, to 45 we performed an allergic skin tests that was in all cases positive to various allergens, the highest values of NOe being recorded in those with cutaneous hypersensitivity to mold, and the lowest in those with cutaneous hypersensitivity to grasses. We noticed in most classes of allergens tested that there was a statistically significant difference between the mean values of NOe recorded (respectively p values <0.05). The differences were not detected in the case of grasses ($p = 0.133$) and mildew ($p = 0.1$). In the present study we have not demonstrated any association between the presence of skin sensitivity to allergens tested and high levels of NOe.

We could not prove an association between skin test and the NOe levels. Only for food we observed a tendency for association ($p = 0.09$). When patients were stratified by the level of NOe (normal, increased) and the number of allergens that the skin test was positive, we found that those with skin hypersensitivity to 1 allergen and 3 allergens, a distribution roughly similar between those with normal and those with elevated levels of this marker (3 allergens: 3 patients and 1 allergen: 13 patients). In those with sensitization to 2 allergens the number of patients with elevated NOe was much higher (9 vs 2 patients).

As some data in the literature mentions a relationship between Ne and Eo values in blood on the one hand and bronchial inflammation on the other hand, we studied the relationship between blood cells and NOe. Between serological Eo and NOe we have not detected the presence of any correlations and no statistically significant differences, while between the NOe level and serological Ne we've detected a reverse correlation an acceptable degree of association ($r = -0.36 / p = 0.012$).

NOe average values were similar in those who associated allergic rhinitis compared to those who did not present this comorbidity (22 (10 to 45.75) vs 20 (12 to 39.75)) and the application of Chi Square test showed that in patients from our study group, allergic rhinitis is not a factor that might influence the NOe ($p = 0.56$).

After the stratification of patients according to age in 3 groups we observed statistically significant differences ($p = 0.009$) in the NOe values recorded. The lowest values of NOe were recorded in patients aged between 6-9 years (18 (11 to 41.25) ppb), while the highest were seen in patients ranging from 15-18 years (59.1 ± 50.3 ppb). Between the two studied parameters we found no statistically significant correlation ($r = 0.17 / p = 0.06$). Applying the Chi Square test showed us that gender is not a factor influencing the amount of NOe ($p = 0.5$, CI 0.4 to 0.2 OR = 1.01 to 95%).

4. Study 2

Our study started from the assumption that analyzing sputum cellularity in children with BA provides an important information on the process of inflammation of the bronchial airways. Hypothetically, the type and the percentage of cells in sputum could lead to the formulation with high probability of the diagnosis of allergic BA and at the same time would provide information on the development of bronchial inflammation during treatment with GCI.

The objectives of these study were: the establishment of the relation between sputum cellularity and the values of serological Eo and Ne and spirometry parameters highlighting bronchial obstruction

(FEV1, MEF50), the profile of sputum cellularity in children with allergic BA compared to nonallergic BA, the establishment of the cellularity sputum and level of disease control therapy GCI influence on sputum cellularity, evaluating the method of sputum challenge in terms of success rate, tolerance and side reactions.

The study group consisted of 67 patients with BA, 28 females (41.8%) and 39 males (58.2%) with a mean age of 10.4 ± 3.1 years. We obtained sputum cellularity for study in 55 of the 67 patients investigated (investigation success rate was 82%). Most patients in the study experienced a controlled partial form of the disease (25 patients - 45.4%) and were under GCI therapy (34 patients - 61.8%).

During the investigation only 11 children (16.4%) had mild side effects: runny nose (7.4%), sneezing (2.9%), cough (5.9%) decrease in FEV1 less than 12% by aerosol (4.4%). These symptoms resolved fully after treatment with Salbutamol.

In our study in most cases we observed the presence of neutrophilic phenotype and paucigranulocytic (16 patients per group). In the category of the neutrophilic phenotype of patients the majority (8 of 16) showed a level of uncontrol disease, the remainder being partially controlled (4 patients) and controlled (4 patients). In the category of patients with eosinophilic phenotype the most (10 of 14) were partially controlled BA while 3 were controlled BA and 1 patient with uncontrolled BA. For the 4 phenotypes of sputum study, we have revealed the presence of statistically significant differences when the cell media group studied was represented by Ne or Eo ($p < 0.001$).

Sputum cellularity in patients with bronchial obstruction (FEV1 values $\leq 80\%$) demonstrated the presence of a high percentage of Eo ($29.6 \pm 31.5\%$) and normal Ne ($46.8 \pm 22.1\%$) while for patients with normal respiratory function (FEV1 values $> 80\%$) the proportion of the two types of cells in sputum was in the normal range (1 (0 to 4.15)% for Eo and 45 (20 to 69.25)% for Ne). Analysis of bronchial obstruction in the small airways performed by measuring MEF50 showed higher values of percentage of Ne and the Eo normal in those with bronchial obstruction.

Media FEV1 after nebulization was statistically significant increase ($p = 0.045$) compared with the average FEV1 in the beginning of the nebulisation of hypertonic solutions (90.21% versus 93.46% initial final). Of the 17 patients who had low FEV1 value after nebulization, 12 had low values before the administration of the aerosols; of the 37 patients with normal FEV1 values after nebulisation 34 had normal values before aerosolization.

According to serological Eo in those with normal levels ($< 0.16 \times 10^3 / \text{ml}$), the Eo percentage of sputum was slightly elevated ($2.9 \pm 4.9\%$). Patients with high serological Eo had normal Eo sputum percent (2 (0-5)%).

Patients with atopic BA showed a level much higher in sputum Eo (5 (0-15)) compared to patients with nonatopic BA (0 (0-0.25%)) and between the two groups of patients we discovered averages values, significant differences statistically ($p < 0.001$). The application of the Chi Square test showed us that there is association between the presence of atopy and sputum Eo, sputum Eo representing a predatory factor for atopy ($p < 0.001$).

We detected much higher values of total IgE in patients who have asthma associated with allergic rhinitis ($266.7 \pm 210 \text{ IU} / \text{ml}$) compared to patients that without allergic rhinitis association (81.5 (29-212) IU / ml). In the group of patients with BA-allergic rhinitis association, the percentage of sputum Eo was higher (2.9 ± 2.6) compared to patients without this association (2 (0 to 14.25)% but the differences were not statistically significant. After Chi Square test application we found that the presence of allergic rhinitis is not influence by the percentage of sputum Eo ($p = 0.72$).

When patients were stratified by the percentage of cells in sputum (normal, increased) and the number of positive allergens in the skin test we found the percentage of Eo much higher in patients with hipersensitivity in 1 and 2 allergens, while patients with positiv sensitivity to 3 or more allergens had normal percentage cell in the sputum.

For the percentage of Ne sputum we noticed the highest values in patients presenting with skin sensitivity to 3 or more than 3 allergens tested while patients with skin sensitivity positive to 1 allergen had a percentage of sputum Ne normal and those with positive skin sensitivity to 2 allergens were slightly elevated.

Since the literature mentions in patients with BA elevated NOe values in those with eosinophilic inflammatory infiltrate, we studied the correlation between the concentration of sputum cellularity and NOe. After subdividing the study group by normal and elevated NOe we found no statistically significant differences for media of Eo sputum expressed as a percentage (1,8 (0 to 4.6)% vs $2.1 \pm 2.1\%$) ; there was no statistically significant correlation between the two parameters analyzed ($r = -0.29$; $p = 0.17$). Instead sputum Ne mean values, expressed as a percentage, were higher in those with elevated NOe ($57.5 \pm 25.6\%$ vs $46.2 \pm 21.4\%$) and for these two variables we found a direct correlation highly significant ($r = 0.67$; $p = 0.001$).

The highest values for sputum Eo were recorded in patients with partially controlled BA (6 (3.75 to 24)%). The Chi Square test showed that there was a statistically significant association between the percentage of sputum Eo and the level of control in the sense that a smaller percentage of 2.5% of Eo in sputum is associated with controlled or partially controlled BA ($p = 0.018$).

The highest values of the percentage of sputum Ne has been recorded in uncontrolled BA ($64.6 \pm 30.7\%$) compared with the values for partially controlled ($46.2 \pm 20.1\%$) and controlled ($35 \pm 19.7\%$) forms of the disease. The differences of the three types of values are statistically significant ($p = 0.001$). According to Chi Square between the percentage of sputum Ne and the level of control of the disease there is an statistically significant association. Ne sputum percentage $<47\%$ is associated with controlled or partially controlled BA ($p = 0.044$).

Statistical analysis revealed no differences for Eo percentage in sputum in patients treated with GCI compared with those who did not receive this treatment ($p = 0.64$). Although the values are higher in those without therapy GCI (50.1 ± 28.3 vs 42.6 ± 21), the differences are not statistically significant ($p = 0.32$).

5. General Conclusions

This thesis makes an important contributions in an area of great interest - the application of noninvasive maneuvers but at the same time that provides accurate information about bronchial inflammatory process in the category of pediatric patients with BA.

The detection of NOe levels in children with BA is an easy evaluation that is successfully used in young children with BA. The results obtained in this thesis show the usefulness of this technique for investigating not only in determining the diagnosis of disease but also in patient tracking (tracking both the development and the clinical picture of the impact that a given therapy).

- NOe average values exceeding the upper limit of normal in patients with uncontrolled BA. These values were significantly increased compared to those recorded in patients with controlled or partially controlled BA

- NOe low levels in patients with BA treated with GCI compared to patients who were not following such treatment. The chances that patients with GCI therapy to provide normal levels of NOe were 32 times higher compared to patients who did not receive this therapy, although the differences between the average value of the two classes of patients were not statistically significant

- the presence of an episode of bronchial obstruction in the preceding month shows NOe levels much higher compared with patients who did not have such an event in recent history, but the differences between the average value of the two classes of patients formats were not statistically significant

- in the case of a positive result in skin testing we noticed high levels of NOe, this observation was recorded in most classes of allergens tested. Although we recorded higher average values of NOe in BA patients and elevated total IgE values, the differences between this class and the class of sick patients who had normal total IgE values were not statistically significant

- There is a weak correlation between the intensity of the inflammation detected by NOe and the clinical expression of BA. While investigating BA using pulmonary function tests is very important in the evaluation of the patient with this disease, the determination of NOe is an additional method for examining the inflammatory status.

Evaluarea celularității sputei recoltată în urma provocării cu ajutorul soluțiilor hipertone reprezintă o alta metodă adjuvantă care aplicată împreună cu metodele uzuale de evaluare ale copilului cu

AB aduc un aport în plus de informații asupra statusului inflamator al bolnavului evaluat. Cu ajutorul rezultatelor înregistrate în teza de față am reușit să confirmăm acest aspect, aplicarea acestei metode putând fi o alternativă a metodelor uzuale de evaluare pulmonară folosite la copilul cu AB.

- rata de succes a manoperei de provocare a sputei a fost de 82%, reacțiile adverse înregistrate fiind ușoare și remisive după administrarea de Salbutamol
- pentru categoria de bolnavi cu AB la care spirometria a decelat valori caracteristice obstrucției bronșice am înregistrat modificări ale procentului de Eo (procent crescut în cazul unor valori FEV₁ scăzute) și Ne (procent crescut în cazul unor valori MEF₅₀ scăzute) din spută
- cuantificarea bolnavilor în funcție de terenul alergic a dus la observarea de valori ale Eo din sputa crescute comparativ cu bolnavii la care acest factor a lipsit, diferențele între cele două clase de pacienți fiind semnificative statistic. La categoria de bolnavi cu sensibilizare la pneumoalergeni, pentru cei cu hiperergie la părul de câine și praful de casa am înregistrat procente ale Eo în spută mult crescute
- copiii cu AB necontrolat au avut valori ale procentului de Ne din spută mult mai ridicate comparativ cu valorile decelate la copiii cu AB parțial controlat și controlat.

Deși studiul de față a demonstrat că sputa bolnavilor cu AB necontrolat este bogată în Ne și nu în Eo așa cum cele mai multe cercetări științifice au arătat, există multe lucrări științifice în literatura recentă care susțin importanța acestei celule. Studiile acestea au arătat că pacienții cu AB necontrolat nu răspund favorabil la terapia glucocorticoidă iar această observație s-ar datora prezenței în spută a unui procent ridicat de Ne. Rezultatele acestea au implicații asupra aspectului clinic de boală deoarece terapia în cazul acestor pacienți trebuie să fie schimbată.

În ceea ce privește decelarea unei corelații între cele două tehnici de evaluare folosite în cadrul acestui studiu am reușit stabilirea unei corelații directe între procentul de Ne din spută și valoarea NOe dar nu și între valoarea NOe și procentul de Eo din spută.

În concluzie rezultatele obținute în cadrul studiului de față au implicații practice asupra testării statusului inflamator la copilul cu AB aflat nu numai în perioada de control a bolii dar și în faza de boală necontrolată. Aplicate împreună cele două metode de investigație pot să crească acuratețea unui diagnostic cert de boală și pot fi facil utilizate în monitorizarea evoluției bolii sub o anumită terapie.

Evaluation of sputum cellularity after induction by using hypertonic solutions is another method applied in association with usual methods of assessment of children with BA that brings an additionally contribution of information to the patient's inflammatory status. Using the results achieved in this thesis have been unable to confirm that this method may be an alternative to the usual methods used in children with pulmonary BA.

- success rate of labor challenge sputum was 82%. The recorded side effects were mild and resolved following administration of Salbutamol
- for the category of patients with BA in which the spirometry values were characteristic for bronchial obstruction we discovered changes in the percentage of sputum Eo (increased percentage with low FEV₁ values) and Ne (increased percentage values for low MEF₅₀)
- quantify patients by allergic ground led to increased sputum Eo values compared with patients in which this factor was absent, the differences between the two classes of patients being statistically significant. In the category of patients with sensitization to pneumoalergens, for those with hypersensitivity to dog hair and house dust we recorded high percentages of sputum Eo
- children with uncontrolled BA had values of Ne sputum much higher compared to those detected in children with partially controlled and controlled.

Although the present study demonstrated that patients with uncontrolled BA have a sputum rich in Ne and not in Eo as most scientific research has shown there are many recent scientific literature supporting the importance of this cell. These studies have shown that patients with uncontrolled BA does not respond favorably to glucocorticoid therapy and this observation was due to the presence of a high percentage of sputum us. These results have implications for therapy because of the clinical disease in these patients must be changed.

Regarding the detection of a correlation between the two valuable techniques used in this study we managed to establish a direct correlation between the percentage of sputum Ne and NOe values but not between NOe values and Eo sputum percentage.

In conclusion the results obtained in the present study have practical implications on testing the inflammatory status in children with BA not only during disease control but also in the uncontrolled phase of the disease. Applied together the two methods of investigation can increase the accuracy of a definite diagnosis of disease and can be easily used to monitor disease progression in a certain therapy.