



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Невенка Илић

Значај мерења концентрације протеина Клара ћелија
у серуму код деце са атопијском конституцијом

-докторска дисертација-

Ментор: Проф. др Небојша Арсенијевић

Проф. др Александра Томић-Лучић

Крагујевац, 2017. година

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Матичне ћелије респираторног система	1
1.2. Развој плућа	4
1.3. Репарација епитела плућа после оштећења	8
1.4. Епителна индукција имунског одговора	11
1.5. Имунски одговор код деце	13
1.6. Атопија	17
1.7. Фенотипови болести доњих дисајних путева у дечијем узрасту	22
1.8. Астма	25
1.9. Концентрације протеина Клара ћелија у серуму	29
2. ЦИЉЕВИИ ХИПОТЕЗЕСТУДИЈЕ	32
3. ИСПИТАНИЦИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	33
3.1. Врста студије	33
3.2. Популација која се истражује	33
3.3. Узорковање	33
3.3.1. Лабораторијске анализе	34
3.3.2. Подаци о болестима доњих дисајних путева	38
3.4. Варијабле које се мере у студији	38
3.5. Снага студије и величина узорка	39
3.6. Статистичка обрада података	40
3.7. Етички принципи	41
4. РЕЗУЛТАТИ	42
4.1. СС16 и индивидуалне карактеристике у односу на атопију	42
4.1.1. СС16 и узраст	43
4.1.2. СС16 и пол	44
4.1.3. СС16 и начин исхране	45
4.1.4. СС16 и алергија у породици	46
4.2. СС16 и болести доњих дисајних путева у односу на атопију	49
4.2.1. СС16 код деце са различитим болестима доњих дисајних путева	50
4.2.1.1. БХР фенотип са малим концентрацијама СС16 у серуму	53
4.2.1.2. СС16 код деце са акутним респираторним болестима	55
4.2.2. Повезаност СС16 са хуморалним одговором према RSV	57

4.3. Повезаност CC16 са биомаркерима TH2 одговора, дефекта епитела као баријере и имунорегулације у односу на атопију	59
4.3.1. Испитивани биомаркери код деце са болестима доњих дисајних путева у односу на атопију	59
4.3.1.1. Испитивани биомаркери код деце са различитим болестима доњих дисајних путева	61
4.3.1.2. Испитивани биомаркери и број респираторних болести	63
4.3.1.3. Испитивани биомаркери и акутни визинг	64
4.3.2. Фактори удружени са променом CC16 у серуму	65
4.3.2.1. Фактор „Атопија“	66
4.3.2.2.1. CC16 и <i>TGFβ1</i>	66
4.3.2.2.2. CC16 и цитокини урођене имуности (<i>ECP</i> и <i>TNFα</i>)	68
4.3.2.2.2.1. БХР са еозинофилном инфламацијом.....	70
4.3.2.2.2.2. Континуирани визинг у току три месеца.....	75
4.3.3. Фактор „TSLP индукција“	79
4.3.3.1. Детерминанте концентрација TSLP у серуму	81
4.3.3.1.1. Начин исхране и TSLP у серуму	82
4.3.3.1.2. IL-10 и TSLP у серуму	84
4.3.3.2. Алергија у породици	85
4.3.3.3. Атопија без алергије у породици.....	87
4.4. Болести доњих дисајних путева у седмој години	88
4.4.1. БХР у узрасту до две године и болести доњих дисајних путева у 7. години .	88
4.4.2. Предиктори болести у седмој години у односу на пол	90
4.4.3. Предиктори акутног бронхитиса у седмој години.....	91
4.4.4. Предиктори хроничног бронхитиса у седмој години	93
4.4.5. Предиктори астме у седмој години	94
4.4.6. Предиктори одржавања концентрација CC16 у опсегу вредности које нису удружене са повећаним ризиком за испољавање астме у седмој години.....	96
4.4.7. RSV инфекција и испољавање болести у 7 години живота	98
4.4.8. Разлике у испитиваним биомаркерима у односу на испољавање болести доњих дисајних путева у другој и у седмој години живота.....	99
5. ДИСКУСИЈА	103
5.1 CC16 и индивидуалне карактеристике.....	103
5.1.1. CC16 као маркер раста плућа.....	103

5.1.2. Разлике у морфогенези плућа између полова.....	104
5.1.3. СС16 и исхрана.....	106
5.1.4. Утицај спољашњих фактора на СС16 у серуму	107
5.1.4.1. РСВ инфекција и СС16 код мушке деце са атопијом.....	107
5.1.4.2. Разлике у СС16 између полова и оксидативни стрес.....	108
5.2. СС16 и болести доњих дисајних путева	110
5.2.1. БХР фенотип са малом концентрацијом СС16 код деце са атопијом	111
5.2.2. Акутни визинг и вирусне респираторне инфекције	112
5.3. Повезаност СС16 са испитаваним биомаркерима	115
5.3.1.1. Маркери атопије код деце са болестима доњих дисајних путева	115
5.3.1.2. Маркери различитих болести доњих дисајних путева	117
5.3.2. Фактор „Атопија“	120
5.3.2.1. СС16 и TGFβ1 код деце са атопијом.....	120
5.3.2.2. СС16 и цитокини урођене имуности	122
5.3.2.2.1. БХР са еозинофилном инфламацијом	124
5.3.2.2.2. Континуирани визинг у току од три и више месеци	125
5.3.2.2.3. СС16 и имунорегулаторни цитокини.....	129
5.3.3. Фактор „TSLP индукција“	130
5.3.3.1. Детерминанте концентрација TSLP у серуму	132
5.3.3.2. TSLP и имунорегулација	134
5.3.3.3. Генетски детерминисано повећање TSLP.....	136
5.4. СС16 и болести доњих дисајних путева у седмој годни живота.....	137
5.4.1. Предиктори акутног бронхитиса у седмој години.....	140
5.4.2. Предиктори хроничног бронхитиса у седмој години	141
5.4.3 Предиктори астме у седмој години	142
5.4.4. Хомеостаза СС16.....	143
5.4.5. РСВ инфекција и болести доњих дисајних путева у седмој години ...	145
5.4.6. Прерастање болести доњих дисајних путева	147
5.5. Могућности примаране превенције.....	147
5.6. Лимитираност студије и даље пропоруке	149
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	151
7. ЛИТЕРАТУРА	153
8. ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА	167

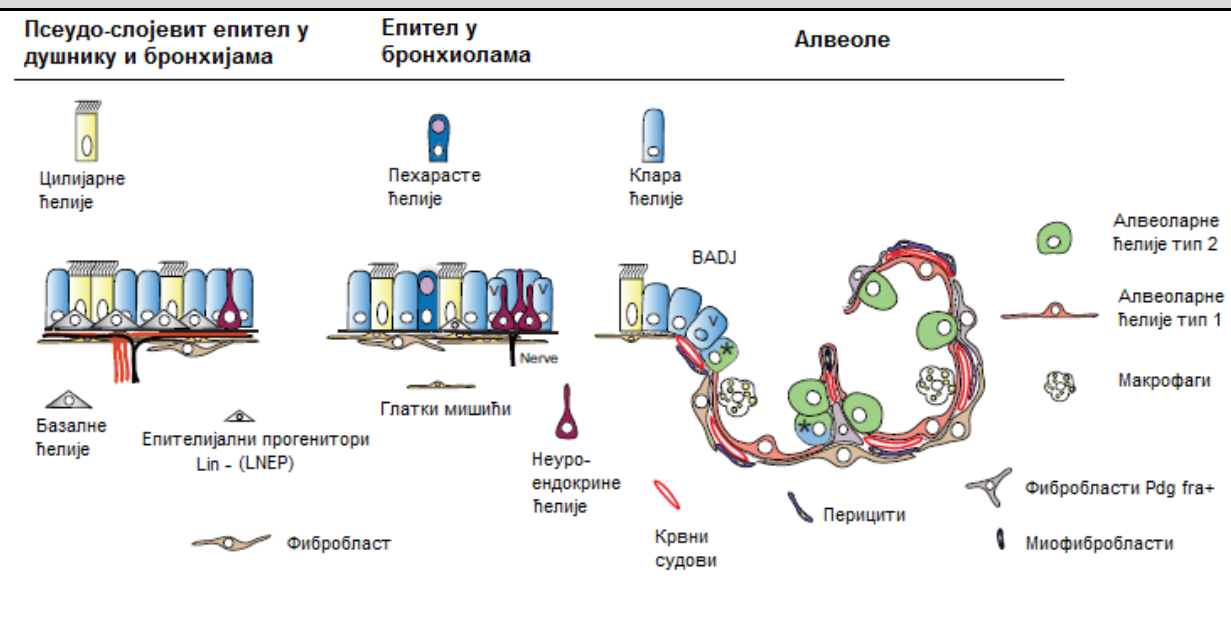
1. УВОД

Матичне ћелије карактерише њихов капацитет самообнављања и могућност да дају једну или више диференцираних ћелијских типова (Volarevic V 2011). Матичне ћелије плућа омогућавају раст и развој плућа, обнављање ткива у току нормалне плућне хомеостазе и регенерацију након оштећења (Volckaert T, 2014). Епител спроводне и респираторне зоне плућа континуирано је изложен инхалаторним агенсима као што су аерозагађење и микроорганизми који изазивају епително оштећење (Barkauskas CE, 2017). Иако је познато да се процеси репарације епитела дисајних путева одвијају уз помоћ матичних ћелија или субпопулација ћелија које подлежу трансдиференцијацији ипак њихова идентификација у хуманим плућима и њихов значај у поремећајима репарације, који су утврђени у хроничним респираторним болестима, још увек није јасан (Barkauskas CE, 2017).

1.1. Матичне ћелије респираторног епитела

У плућима постоји неколико матичних ћелија које су одговорне за обнављање различитих региона респираторног епитела и њихову регенерацију после оштећења, и то су: базалне ћелије (у бронхијама), Клара ћелије (у бронхиолама) и алвеоларне ћелије тип II (у алвеолама), док неуроендокрине ћелије показују карактеристику самообнављања, али не диференцирају у друге ћелијске типове (Volckaert T, 2014 Barkauskas CE, 2017), (слика 1).

Слика 1. Епителне ћелије у плућима миша (Barkauskas CE, 2017, Rock and Hogan 2011)



Респираторни епител у стању без оштећења показује врло споро обнављање и/или замену мукоцилијарног епитела (цилијарних и пехарастих ћелија) (Watson, J. K 2015). Базалне ћелије чине око 30% ћелија епитела спроводних дисајних путева код људи, налажу блиско на базалну мембрану и не проминирају ка лумену, за разлику од цилијарних и пехарастих ћелија. Базалне ћелије експримују транскрипторни фактор *Trp63* и цитокератин *Krt5*, интегрин $\alpha 6$, подопланин и трансмембрански рецептор за нервни фактор раста *Ngfr* (Watson JK 2015, Barkauskas CE, 2017). Хумане базалне ћелије су изоловане из носне слузокоже, епитела трахеје и бронхија, а после оштећења диференцирају у цилијарне и пехарасте ћелије (Barkauskas CE, 2017).

Клара ћелије су нецилијарне, ненеуроендокрине ћелије респираторног епитела и код људи, у физиолошким условима чине око 9% ћелија бронхија, 11% ћелија у терминалним бронхиолама, и око 22% ћелија у респираторним бронхиолама, односно 15-44% свих пролиферативних ћелија респираторног епитела (Boers JE, 1999). Популација Клара ћелија је хетерогена и њихово присуство је утврђено у неуроендокриним телашцима (*NEB – Neuroendocrine body*), у епителу споја између респираторних бронхиола и алвеола (*BADJ-Bronchoalveolar duct junction*), као у алвеолама где показују коекспресију маркера Клара ћелија и алвеоларних ћелија типа 2. У условима без оштећења Клара ћелије се споро самообнављају и диференцирају у цилијарне ћелије (Rawlins, E. L 2009), а у одговору на *IL-13* Клара ћелије претежно из проксималних региона дисајних путева могу директно диференцирати у пехарасте ћелије без пролиферације (Barkauskas CE, 2017). Диференцијација Клара ћелија индукована је експресијом β -катенина, а солубилни Е-кадерин стимулише диференцијацију Клара ћелија током регенерације или оштећења бронхиоларног епитела (Ceteci F 2012, Smith MK 2012). Дупло позитивне ћелије које садрже маркер и Клара ћелија и алвеоларних ћелија налазе се у *BADJ* и у алвеолама, а њихово узгајање на колагену тип I и IV индукује диференцијацију у алвеоларне ћелије тип 2, док узгајање на фибронектину доводи до диференцијације у Клара ћелије (Archer et al, 2013). Опредељење ка алвеоларној ћелији тип 2 зависно је и од присуства тромбоспондина, који секретују ендотелне ћелије плућних капилара (Barkauskas CE, 2017). Постоје мишљења да су ове дуплопозитивне прогениторске ћелије хематопоетског порекла (Archer et al, 2013). Субпопулације Клара ћелија разликују се у потенцијалу трансдиференцијације у базалне или алвеоларне ћелије, која је зависна и од њиховог положаја дуж дисајних путева (Barkauskas CE, 2017).

Клара ћелије секретују протеин Клара ћелија (CC16) који је у литератури познат као: *utero-globin* (секретује се у gravidној материци), *club cell secretory protein (CCSP)*, *club cell protein 16 (CC16)*, *club cell protein 10 (CC10)*, *secretoglobin (Scgb)*, и *urineprotein 1* (утврђен у бубрезима где се врши његов катаболизам) (Burmeister R, 2001). Протеин Клара ћелија кодиран је геном на 11q12.3-13.1 хромозому, и структурно је хомодимер који се састоји од два пептида величине 70 аминокиселина, међусобно повезаних ковалентним везама, а које формирају хидрофобни џеп унутар којег се могу везати липофобни лиганди као што су бифеноли. Протеин Клара ћелија је резистентан на ефекат протеаза, ниске температуре и промену *pH* вредности (Firth AL, 2014). Величина протеина Клара ћелија од само 15,8 *kDa* омогућава његов излазак из плућа у циркулацију на основу концентрационог градијента, па се концентрација овог протеина у серуму може користити као маркер акутних и хроничних оштећења плућа (Broeckaert FB, 2000). Осим *CC16*, Клара ћелије секретују и протеине А, Б и Д, који стабилизују сурфактант и штите га од деградације (Kuhn C, 1975). Клара ћелије имају улогу у физиолошком смањењу оксидативног стреса због велике експресије P450 монооксидаза, које учествују у метаболизму ксенобиотика (Giangreco A, 2002).

Алвеоларни епител чине два типа алвеоларних ћелија: тип 2 су кубоидне ћелије које секретују сурфактант Ц, док су тип 1 пљоснате ћелије које покривају највећи део површине алвеола и имају улогу у размени гасова. Алвеоларне ћелије тип 2 током оштећења епитела пролиферишу и осим самообнављања, диференцирају у алвеоларне ћелије типа 1, нарочито у одговору на ткивно ремоделовање после оштећења (Jain R, 2015). Популације алвеоларних ћелија тип 2 које се налазе на периферији и под плеуром имају највећи капацитет пролиферације и регенерације. Осим алвеоларних ћелија у алвеолама се налазе стромалне ћелије, капиларни ендотел, перицити и макрофаги.

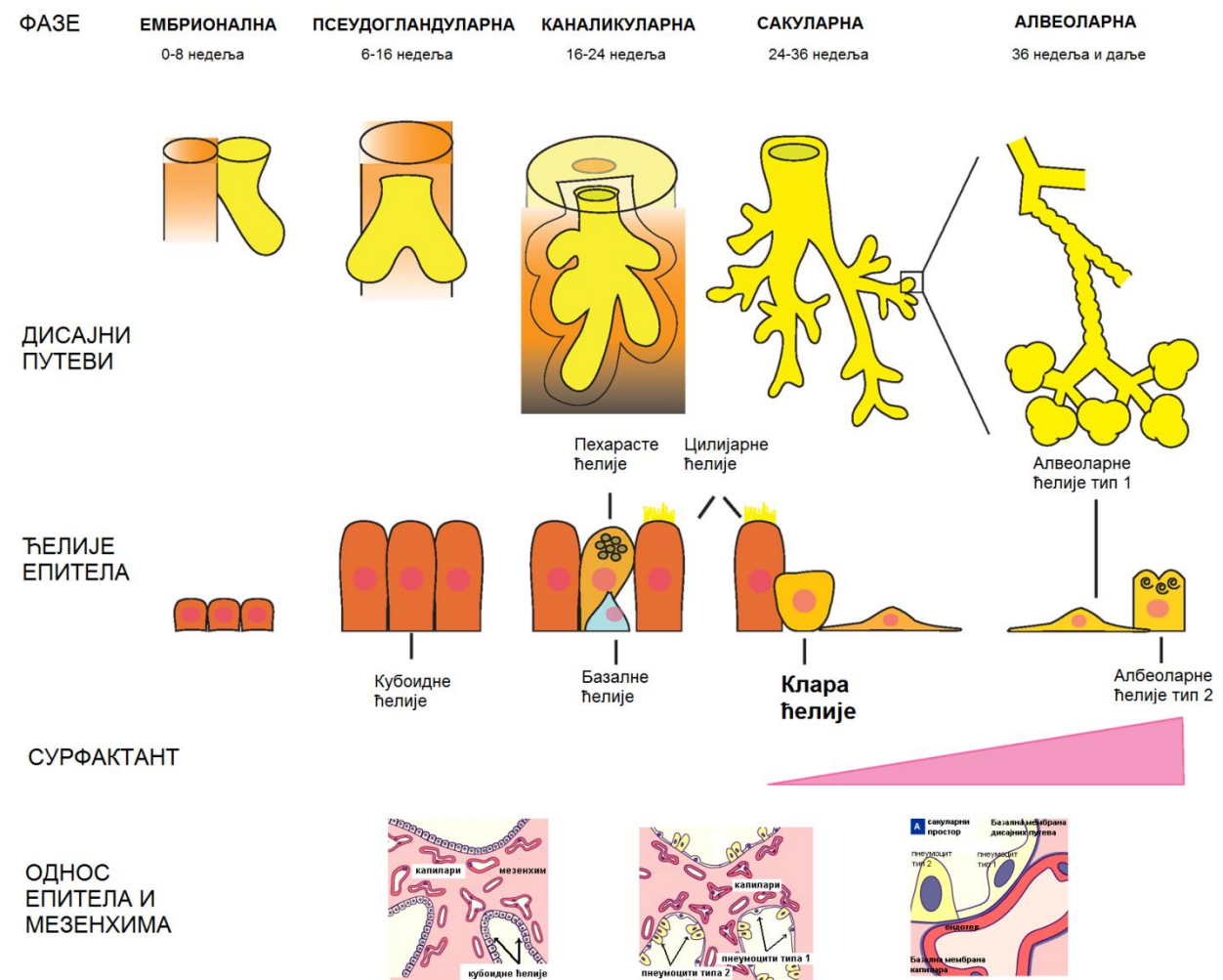
Понашање епителне матичне ћелије плућа регулисано је сигнаlima из микроокружења који могу матичну ћелију држати у стању мировања, одржавати самообнављање матичне ћелије у недиферентованом облику и промовисати транзиторну пролиферацију (Volckaert T, 2014). Диференцијација матичних ћелија изолованих из плућа је различита у односу на услове узимања узорка, односно да ли се ћелије узимају пре или после оштећења, од младих или старих јединки или постојања специфичних мутација које су удружене са болестима код људи (Barkauskas CE, 2017). Сличности између морфогенезе и процеса зарастања ране довели су до новог погледа

на развој хроничних респираторних болести код људи, у коме се хронична инфламација разматра из аспекта утицаја на структуралне промене и виду ремоделовања дисајних путева које је последица интерреакције епителне јединице, стем ћелија и њихових ниша (Holgate ST, 2007).

1.2. Развој плућа

Развој плућа пролази кроз неколико фаза током којих долази до грањања дисајних путева, појаве различитих матичних и диферентованих ћелија епитела, као и до урастања крвних судова који са епителним ћелијама алвеола формирају ваздушно-крвну баријеру преко које се обавља размена гасова (слика 2)

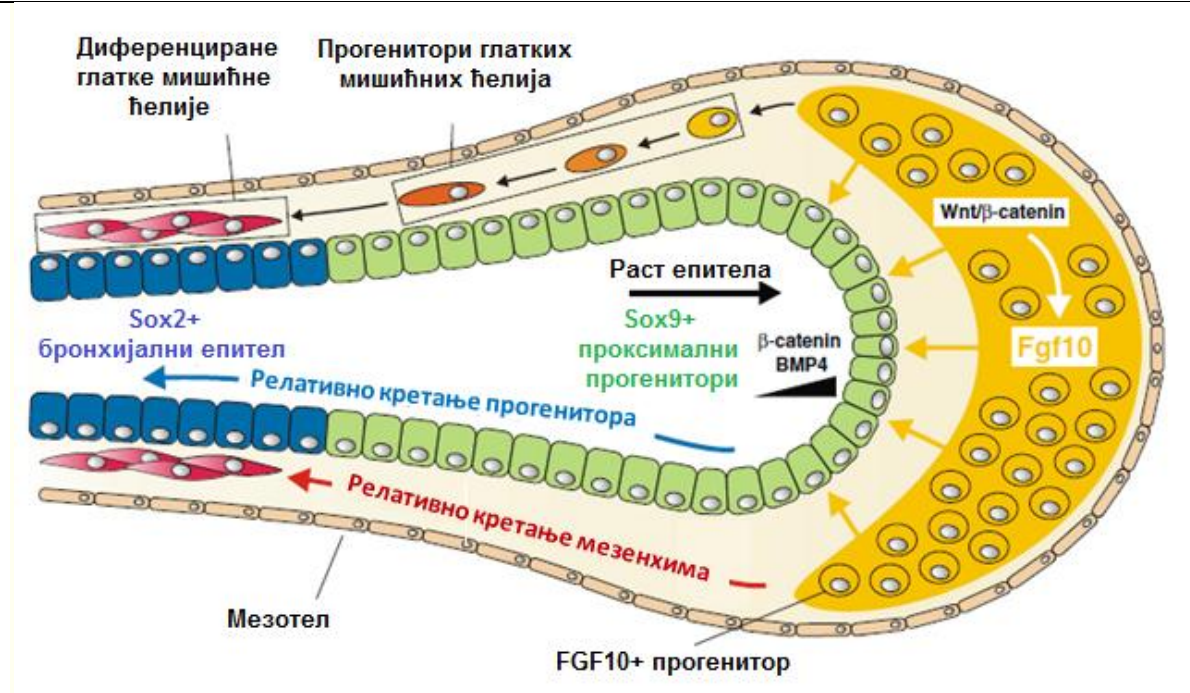
Слика 2. Развој плућа (Leibel S 2016. University of Fribourg, 2008)



Примордијално ткиво плућа издваја се пупљењем из ларинго-трахеалног усека на вентралној страни ждрела. У 33. дану гестације појављује се асиметрична деоба два главна бронха (Chung HL, 2011) који се даље гранају и расту у динамичном процесу епително-мезенхимне интеракције типа 1 и у псеудогландуларној фази раздвајају се на терминалне бронхиоле (16-20 генерација грањања), при чему је до краја ове фазе епител ($Id2^+$, енгл.-*inhibitor of differentiation 2*) у централним дисајним путевима слабо диферентован (Blanco CE 1994).

Фактор раста фибробласта 10 (енгл.-*Fibroblast growth factor 10- FGF10*) у дистално позиционираном мезенхиму (регулисан је *Wnt* сигнализацијом) делује на епителне прогениторе у којима преко β -катенина индукује експресију *Sox9* (*sex determining region Y box 9*), а инхибише експресију *Sox2*, што одржава изостанак диференцијације прогенитора (Nyeng P, 2008, Ramasamy SK 2007) и има улогу у хемотакси и усмеравању грањања дисајних путева (Chao CM, 2016).

Слика 3. Епително – мезенхимна интеракција током урастања дисајних путева



Како дисајни путеви урастају у мезенхимно ткиво, прогенитори се померају од дисталне позиције проксимално (удаљеније од мезенхимних ћелија које продукују FGF10) и почињу да експримују *Sox2* што их уводи у диференцијацију. Фактор трансформације раста бета ($TGF\beta$) инхибира експресију FGF10 у мезенхималним стромалним ћелијама плућа (Volckaert T, 2014) (слика 3).

У каналикуларној фази развоја плућа гранају се терминалне бронхиоле са стварањем ваздушног простора алвеоларних каналића и кесица – ацинуса у чију околину урастају крвни судови. Плућни епител у псеудо-гландуларној и каналикуларној фази развоја плућа сматра се оптималним извором матичних ћелија које имају потенцијал да диференцирају и у дисајне путеве и у алвеоле (Rosen C, 2015). Изоловани мултипотентни прогенитори у епителу током псеудо-гландуларне фазе (*Sox-9+*, *Id2+*) у *in vitro* условима диферентују иницијално у епителне ћелије бронхиоларног епитела (*Sox-2+*), и то Клара ћелије (*Scgb1a1+*; које диферентују у пехарасте ћелије), базалне ћелије (*p63+*; које диференцирају у цилијарне ћелије после смањења *Sox-2*) и неуроендокрине ћелије, док изоловани прогенитори у каналикуларној фази (*Id2+*, *Sox-9+*, *Podoplanin+*, *Sftpc+*), осим наведених, могу диференцирати и у алвеоларне ћелије тип 1 и тип 2 (Chao CM, 2016). Током ове фазе местимично се појављују FGF10+ липофибробласти који представљају нишу за алвеоларне ћелије типа 2 (Chao CM, 2016). На крају каналикуларне и на почетку сакуларне фазе развоја плућа, плућни епител секретује велики део амнионске течности и почиње стварање сурфактанта. Клара ћелије продукују сурфактант А, Б и Д, док алвеоларне ћелије типа 2 секретују сурфактант Ц (Atkinson J, 2008). Сурфактант се састоји од глицерофосфолипида, специфичних протеина, неутралних масти и холестерола, покрива алвеоларну површину и редукује површински притисак, тако да алвеоле након рођења не колабирају. Током сакуларне фазе ацинуси су обложени алвеоларним ћелијама типа 1 и 2 (Leibel S, 2016), а око ацинуса се умножавају капилари, док апоптоза мезенхималних ћелија омогућава њихово приближавање површини ацинуса и њихова базална мембрана фузионише са базалном мембраном епитела тако да се формира крвно-ваздушна баријера коју чине: ендотелне ћелије капилара, фузионисана базална мембрана и алвеоларне ћелије типа 1 (Chao CM, 2016). За правилно диференцирање респираторног епитела неопходна је супресија FGF10 секреције из мезенхимних ћелија око проксималних делова дисајних путева (током грањања респираторних путева) што доводи до диференцијације мезенхимних ћелија у глатке мишићне ћелије (регулисано Wnt/ β -катенин сигнализирањем), као и дистално на врху ацинуса (на крају гестације и постнатално у фази алвеоларизације) (Volckaert T, 2014, Volckaert T 2013).

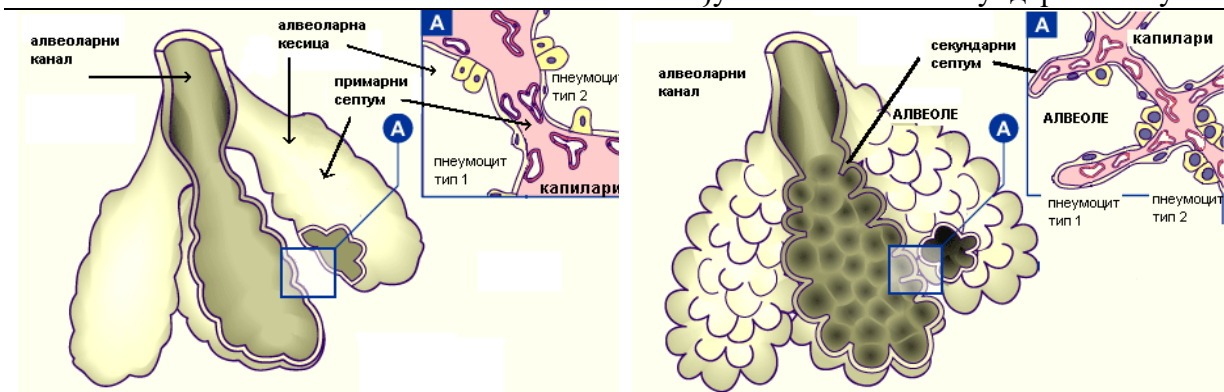
Алвеоларна фаза развоја плућа подразумева трансформацију незрелих сакуларних кесица са лимитираном изменом гасова у зрело плућно ткиво са великом површином алвеола (75m^2), које имају истањене зидове, уз истовремени развој богате

капиларне мреже и екстензивном сепарацијом јединица за размену гасова (*Chao SM, 2016*). Из примарног алвеоларног зида алвеоларни миофибробласти урастају у лумен алвеола правећи секундарне септе уз стварање еластичних влакана у њиховим врховима (*Chao SM, 2016*). што доводи до алвеоларне сепарације (Слика 4). Унутар ових септи развија се нова базална мембрана уз депозицију еластина у врху септе. Ова фаза почиње око 36. недеље гестације и на рођењу формирано је око 15% алвеола, а наставак алвеоларног дељења наставља се у току неколико година након рођења. Током интраутериног развоја алвеоларне ћелије типа 1 и 2 настају из биполарног прогенитора (*Id2+*, *Sox-9+*, *Podoplanin+*, *Sftpc+*), док након рођења алвеоларне ћелије типа 2 представљају прогениторе за алвеоларне ћелије типа 1, (као и током регенерације епитела након оштећења), а њихово одржавање у недиферентованом стању зависно је од продукције FGF10 из липофибробласта на које се алвеоларне ћелије типа 2 ослањају (*Chao SM, 2016*). Током детињства раст плућа обезбеђује пораст плућних функција који је паралелан порасту у телесној висини детета, а наставља се до адолесцентног доба, када се раст завршава (*Chung HL, 2011*).

Слика 4. Алвеоларна фаза развоја плућа (*University of Fribourg 2008*)

Пре рођења алвеоле формирају терминалне крајеве алвеоларних кесица и временом повећавају свој дијаметар

После рођења долази до умножавања броја алвеола на терминалним крајевима алвеоларних кесица и пораста дијаметра, а између њих се налазе секундарни септуми.



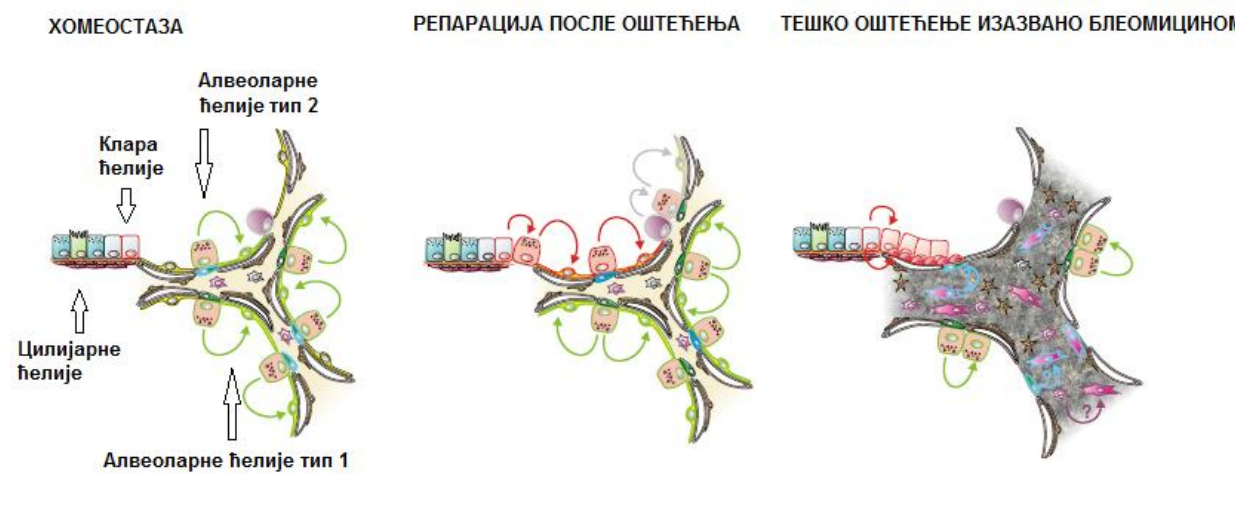
Традиционално се сматра да су структуралне промене у плућима током развоја завршавају формирањем алвеола и да развој плућа представља иреверзибилан процес. Међутим неколико експерименталних истраживања указало је на могућност убрзаног развоја и раста плућа и после периода постнаталне матурације (*Eisenhauer P, 2013*).

Сигнали који утичу на понашање матичне ћелије су фактори раста и други регулаторни фактори секретовани из околних ћелија (фибробласта, глатких мишића, ендотелних ћелија, неурона, итд), односно цитокина секретованих из епителних и имунских ћелија, затим сигнала из екстрацелуларног матрикса који чини резервуар фактора раста и обезбеђује механички ослонац матичним ћелијама преко интегрина, као и сигнала у директном међућелијском контакту са суседним матичним ћелијама преко адхезивних молекула и протеина јаких веза (енг. *tight junctions*) (Volckaert T, 2014).

1.3. Репарација епитела плућа после оштећења

Оштећење епитела праћено је промтном пролиферацијом и диференцијацијом матичних ћелија са регенерацијом и репарацијом епитела (Volckaert T, 2014). На анималним моделима је показано да су процеси репарације респираторног епитела зависни од типа матичних ћелија чија диференцијација доводи до регенерације различитих делова респираторног система, као и од врсте агенса који је довео до оштећења (слика 5).

Слика 5. Регенерација респираторног епитела након оштећења (Volckaert T, 2014)



Оштећење епитела великих дисајних путева нафтаљеном или сумпор-диоксидом преживљавају само базалне ћелије и мали број варијанти Клара ћелија (у NEB и BADC) које доприносе брзој регенерацији овог региона респираторног епитела диферентујући у мукоцилијарни епител (Rock JR, 2009, Rawlins EL, 2009). Иако се у условима без оштећења неуроендокрине ћелије одликују самообнављањем без диференцијације у

друге ћелијске типове, утврђено је да након оштећења оне могу диференцирати у Клара ћелије, али је њихов допринос регенерацији минималан (*Song H*, 2012).

Приликом оштећења дифтерија-токсином које доводи до аблације базалних ћелија (*Volckaert T*, 2014), и у експерименталним моделима генетске модификације која доводи до селективног изумирања базалних ћелија, утврђено је да Клара ћелије могу да подлегну репрограмирању и да експримују маркере базалних ћелија (*Tip63* и *Krt5*) (*Tata PR* 2017, *Pardo-Saganta A*, 2015). Међутим експресија *p63* (регулатора развоја базалних ћелија) повезан је са сквамозном метаплазијом уколико је експримиран у Клара ћелијама (*Koster MI*, 2004). Епително-сквамозна диференцијација описана је приликом испитивања диференцијације хуманих базалних ћелија порекла из носне слузокоже (*Kumar PA*, 2011).

На крају оштећење изазвано хипоксијом уништава највећи део ћелија спроводног респираторног епитела и алвеоларне ћелије типа 1, па стем ћелије порекла из субмукозних жлезда диференцирају у базалне и Клара ћелије у дисајним путевима, док дупло-позитивни *Scgblal+Sftpc+* прогенитори могу диференцирати и у алвеоларни и у бронхиоларни епител (*Volckaert T*, 2014). Након оштећења изазваног блеомицином Клара ћелије могу диференцирати у алвеоларне ћелије типа 1 и 2 (*Zheng D*, 2012).

Утврђене су и матичне ћелије из кожане сржи које после оштећења доспевају у плућа и диференцирају у бронхијалне епителне ћелије (*Sueblinvong V* 2008), смањујући ендотоксином изазвано оштећење (*Xu J*, 2007). *Epitel-like* ћелије из кожане сржи, садрже Клара ћелијски протеин и маркере алвеоларних ћелија типа 1 и 2, долазе до плућа после оштећења нафталеном и могу успешно да репопулишу дисајне путеве летално озраченог миша (*Wong AP* 2009). Ова популација ћелија сматра се извором прогенитора ван плућа који представља стем-ћелијски резервуар способан да репарише плућни епител након оштећења (*Crosby LM*, 2010). Ћелије пристигле на место оштећења, преко интерреакције интегрина и услед дејства фактора раста, секретују компоненте екстрацелуларног матрикса, реорганизују свој цитоскелет чиме се промовише кретање и истовремено продукују металопротеиназе, које деградирају адхезивну подлогу, тако да долази до њиховог кретања и везивања за аутологно створени нови матрикс (*Crosby LM*, 2010). Локални и новоприсели прогенитори пролиферишу и диференцирају у епителне ћелије (*Barkauskas CE*, 2017).

Генерално на културама ћелија епитела плућа након оштећења утврђена је активност фактора који су: повезани са развојем плућа (*Wnt*- морфогенеза грањања

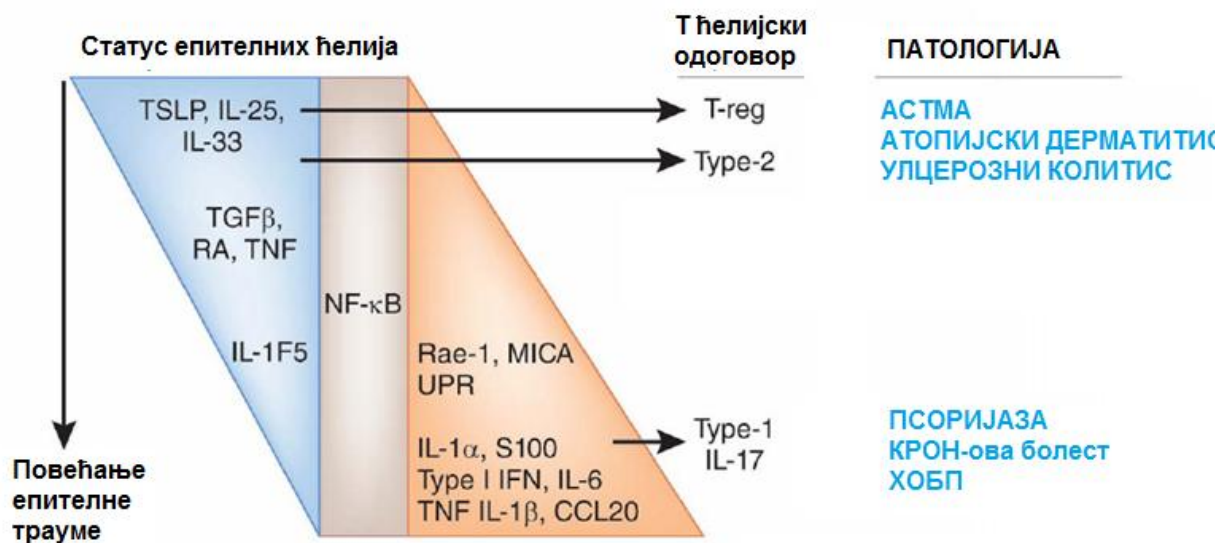
дисајних путева; β -катенин – регулација ћелијске диференцијације); фактори који се налазе у оштећеном ткиву као што су фибронектин и фибриноген (провизорни матрикс за миграцију ћелија у току ране репарације); металопроотеиназе (*MMP9* – смањује миграцију, *MMP1* и *MMP7* – смањују адхезију, а повећавају миграцију прогенитора); фактори инфламације (*интегрини* потенцирају миграцију: $\alpha\beta6$ и $\alpha\beta8$ активирају *TGF β 1*; *цитокини* : *IL-2* стимулише миграцију, редукује апоптозу, *INF γ* – повећава миграцију, *IL-4* стимулише миграцију и репарацију, *TGF β 1* стимулише миграцију, инхибира пролиферацију, повећава адхезију, индукује епително-мезенхимну транзицију; фактори раста (фамилија епидермалних фактора раста појачава репарацију преко стимулације миграције и пролиферације ћелија; фамилија фибробластних фактора раста стимулише миграцију, пролиферацију Клара ћелија, диференцијацију, адхезију алвеоларних ћелија типа 2; механички фактори (циклично истезање и компресија – инхибиција миграције, а стимулација пролиферације ћелија) (*Crosby LM, 2010*).

Есеји са хуманим матичним ћелијама од различитих донора показали су значајну варијабилност у кинетици пролиферације и диференцијације прогенитора респираторног епитела (*Barkauskas CE, 2017*), тако да у хроничним респираторним болестима постоји нарушавање баланса у правцу преваге броја пехарстих над цилијарним ћелијама, (што је утврђено у астми (*Rock JR, 2010*)), односно сквамозних над мукоцилијарним ћелијама, чак и у условима одсуства оштећења, па постоје мишљења да су ове карактеристике условљене епигенетским променама (*Shaykhiev R, 2013*). Клара ћелије, преко оксидације са цитохром Р-450 монооксидазом, учествују у биотрансформацији удахнутих штетних и токсичних компонената које се повезују са епигенетским променама (фуран, ароматични угљени хидрати, нафтаген, бензопирен, озон, азот оксид, компоненте дуванског дима итд), Удахнуте токсичне компоненте изазивају структурне промене Клара ћелија у току првог сата од излагања, са миграцијом хроматина, увећањем митохондрија и повећањем ендоплазматичног ретикулума, па су после 24 сата од излагања Клара ћелије увећане са великим бројем вакуола које секретују протеин Клара ћелија, који повратно штити епител од додатног оштећења (*Blundell P, 2005*). Међутим хронична изложеност дуванском диму удружена је са редукцијом броја Клара ћелија (*Nomori H, 1994*).

1.4. Епителна индукција имунског одговора

Током оштећења, главна карактеристика мукозног имунског система представља одржавање финог баланса између активације имунског система у циљу заштите против патогена и регулације имунског одговора у циљу спречавања непотребног или прејаког одговора који би могао оштетити физиолошку функцију респираторног система (*Abbas AK, 2012. Regional Immunity*). За функционисање респираторне мукоцилијарне баријере неопходно је одржавање чврстих веза између цилијарних ћелија, пехарастих ћелија које секретују мукус и Клара ћелија које секретују сурфактант (*Lloyd CM, 2010*). Респираторни епител реагује на микроорганизме и друге штетне стимулусе из спољашње средине који надјачавају мукоцилијарну баријеру, али и на унутрашње чиниоце, првенствено цитокине (*Lloyd CM, 2010*). Цитокине који мењају окружење матичних ћелија плућа осим имунских, продукују и епителне ћелије у плућима у одговору на оштећење или инфекцију чиме доприносе јачању имунског одговора у плућима (*Whitsett, 2015*).

Слика 6. Епителна индукција имунског одговора (*Swamy M, 2010*)



У случају изостанка стреса епителних ћелија активација нуклеарног фактора капа Б (NFκB) удружена је са продукцијом IL-25 и лимфопоетина строме тимуса (TSLP) који првенствено индукују Т регулаторни одговор, док у случају стреса, без нарушавања интегритета баријере, условљавају ТН2 одговор. Када постоји дисрегулација ови цитокини изазивају болести као што су астма, атопијски дерматитис или улцерозни колитис (*Swamy M, 2010*).

Повећање епителне трауме и нарушавање интегритета епитела или присуство дисрегулације доводи до индукције IL-1, IL-6, TNF α , TGF β 1, што омогућава TH17 диференцијацију Т ћелија, односно у присуству TNF α секретује се INF тип 1 што доводи до индукције TH1 одговора са развојем болести као што су хронична опструктивна болест плућа (ХОБП), псоријаза и Кронова болест (Swamy M, 2010) (слика 6).

Испитивање утицаја цитокина на диференцијацију матичних ћелија респираторног епитела показала су да је главни индуктор доминантне диференцијације базалних у пехарасте ћелије IL-13 (Danahay H, 2015, Barkauskas CE, 2017), док на повећање удела цилијарних ћелија утиче присуство IL-6 (Tadokoro T, 2014). TSLP ослобођен из епителних ћелија под утицајем тригера из спољашње средине активира ћелије урођеног и специфичног имунитета који резултује у доминантно TH2 одговору (Morshed M, 2012). IL-4 и IL-13 индукују M2 (алтернативну) активацију макрофага, који су одговорни за резолуцију инфламаторног одговора преко великог капацитета чишћења ендоцитозом, синтезом трофичних фактора који су удружени са редукцијом секреције проинфламаторних цитокина (Wynn TA, 2004). У процесима репарације ткива алтернативно активисани макрофаги могу бити главни извор TGF- β (Abbas AK, 2012) TGF- β инхибише пролиферацију и ефекторску функцију Т ћелија и TH1 и TH2 субкласе, као и класичну активацију макрофага, активацију неутрофила и ендотелних ћелија, али стимулише продукцију IgA која су потребна за мукозни имунитет и промовише репарацију ткива после локалних инфламацијских реакција. TGF- β стимулише синтезу колагена и продукцију матрикс-модификујућих ензима из макрофага и фибробласта, уз промоцију ангиогенезе (Abbas AK, 2012). Хронично оштећење и продужена активација просеца репарације може да резултује у смањењу репараторног потенцијала исцрпљеног пула прогенитора, што доводи до дефектне репарације и прогресивног ремоделовања дисајних путева и фиброзе (Beers MF, 2011). Утврђено је да хронично оштећење респираторне слузокоже редукује пролиферативни потенцијал Клара ћелија, доводи до њихове трансдиференцијације у ћелије које продукују мукус (Evans C, 2004) и развоја перибронхилане фиброзе (Perl AK, 2011). Промене у респираторном епителу које су утврђене код пацијената са астмом су хиперплазија базалних ћелија, метаплазија пехарастих ћелија које се појављују у дисталним дисајним путевима где нормално не постоје, при чему пехарасте ћелије не

пролиферишу већ настају диференцијацијом Клара ћелија (Volckaert T, 2014) уз активацију субепителних миофибробласта (Descalzi D, 2007).

Утицај Клара ћелија на инфламацију у плућима је неразјашњен. Клара ћелије секретују *CC16* који своје антиинфламаторно дејство остварује преко инхибиције фосфолипазе А2, смањења настанка еокозаноида и продужења полуживота сурфактанта (Shiyu S, 2011), али су експерименти на анималним мишијим моделима дали контрадикторне резултате – са једне стране, дефицијенција *CC16* праћена је порастом *TH2* цитокина (*IL-4*, *IL-5*, *IL-13*) и појавом еозинофине инфламације након инхалаторне сензибилизације (Chen LC, 2001), али је супротно томе утврђено да Клара ћелије продукују еотаксин којим индукују еозинофилну инфилтрацију и да њихова деплеција доводи до смањења *IL-4* и *IL-13* у ткиву плућа (Sonar SS, 2012). На ћелијским културама хуманих епителних ћелија плућа (*BEAS-2B*) показан је позитиван ефекат *TH1*, али не и *TH2* цитокина као што су *IL-4* и *IL-13* на секрецију *CC16* (Yao XL 1998), а инкубација хуманих *TH2* ћелија са *CC16* доводи до редукције стварања *TH2* цитокина (Hung, C. 2004).

1.5. Иmunски одговор код деце

После рођења имунски систем је изложен новим условима спољашње средине, као и великом броју непатогених микроорганизама који колонизују кожу и слузокоже, али и патогеним агенсима против којих је неопходна активација имунског одговора. Повећана осетљивост новорођенчади на инфекције у односу на старију децу и одрасле удружена је са квантитативним и функционалним разликама у генерисању имунског одговора и недостатку имунолошке меморије. Рано у животу генерално постоји усмеравање имунског система ка индукцији имунолошке толерације (Muenchhoff M 2014), јер је током интраутериног развоја плода присутан је велики број *Treg* ћелија са ниским степеном Т ћелијске пролиферације и активно отклањање активисаних Т ћелија преко *FasL* индуковане апоптозе (Godfrey WR, 2005). Код одојчади постоји доминација *TH2* одговора која је условљена слабијим примарним *TH1* одговором услед мање продукције *IL-12* из дендритских ћелија у одговору на липополисахарид (*LPS*), мање експресије костимулаторних молекула на *CD4+* ћелијама у току активације, мање експресије транскриптоног фактора *STAT4*, веће метилације гена за *INF γ* (Lewis DB, *Developmental immunology*, 2010), као и мање продукције *TNF α* (Levy O, 2007).

Код новорођенчади је утврђено да неутрофили имају слабији одговор на хемотаксу, смањену експресију адхезионих молекула и редукцију експресије лактоферина, протеина који повећава пермеабилност и смањену оксидазну активност, а код одојчади не функционишу на нивоу одраслих особа, због редукованог пула и пролиферације. (Levy, O, 1999, Ambruso DR 1984, Qing G 1995)

На рођењу и током прве године живота у ткиву дисајних путева налази мали број дендритских ћелија, те су функције адаптивног имунског одговора врло лимитиране услед недоступности антиген презентујућих ћелија (Holt PG, 2010). Код одојчади после инфекције респираторног тракта утврђено је изразито повећање густине мукозних дендритских ћелија у дисајним путевима, а број антиген презентујућих ћелија у мукози респираторног тракта се не враћа на базални ниво и након неколико недеља после инфекције, што указује или на дуготрајни ефекат вирусне инфекције на хомеостазу дендритских ћелија у дисајним путевима у овом узрасту или се повећан број дендритских ћелија одржава перзистентним присуством малог броја вирусних партикула (Holt PG, 2010). Главни механизам инфламације посредоване *TH2* имунским одговором и последичном сензибилизацијом у току вирусних инфекција је последица доласка незрелих дендритских ћелија из коштане сржи са повећаном експресијом *FcεR1* рецептора, а што представља основу за ангажовање *TH2* имунског одговора на аероалергене, у инфламаторном миљеу вирусних болести дисајних путева (Holt PG, 2011).

На антигену стимулацију, Т ћелије из тимуса (који достиже највећу целуларност у узрасту између 6-12 месеци) првенствено диференцирају у *TH2* ћелије, које продукују *IL-4* и *IL-13*. Уколико је и дошло до диференцијације у *TH1* ћелије, након поновљене стимулације антигеном оне подлежу апоптози, док *TH2* ћелије пролиферишу. Апоптоза *TH1* ћелија индукована је деловањем *IL-4* и *IL-13*. Продукција *IL-4* је такође мања у *CD4+* Т-ћелијама у односу на старију децу. Смањена продукција *IL-4* и *INF-γ* повезана је са великим процентом наивних Т-ћелија са једне стране и са великим процентом регулаторних Т имуносупресорних ћелија (*Treg*) (Lewis, 2013- 32). *IL-2* је, углавном, фактор раста за *Treg* ћелије, а не доводи до повећане продукције *INF-γ*, што и одговара налазу мањег броја *TH1* ефекторских меморијских ћелија код деце у односу на одрасле (Lewis DB, 2010), па се развој имунског система током одојачког периода врло често поистовећује са прогресивним сазревањем *TH1* одговора. (Lewis, 2013- 32). *CD8+* Т ћелијски одговор је присутан на рођењу, али је је утврђен функционални дефицит и

мањи број цитотоксичних Т ћелија током раног детињства у односу на одрасле (*Prendergast AJ, 2012*).

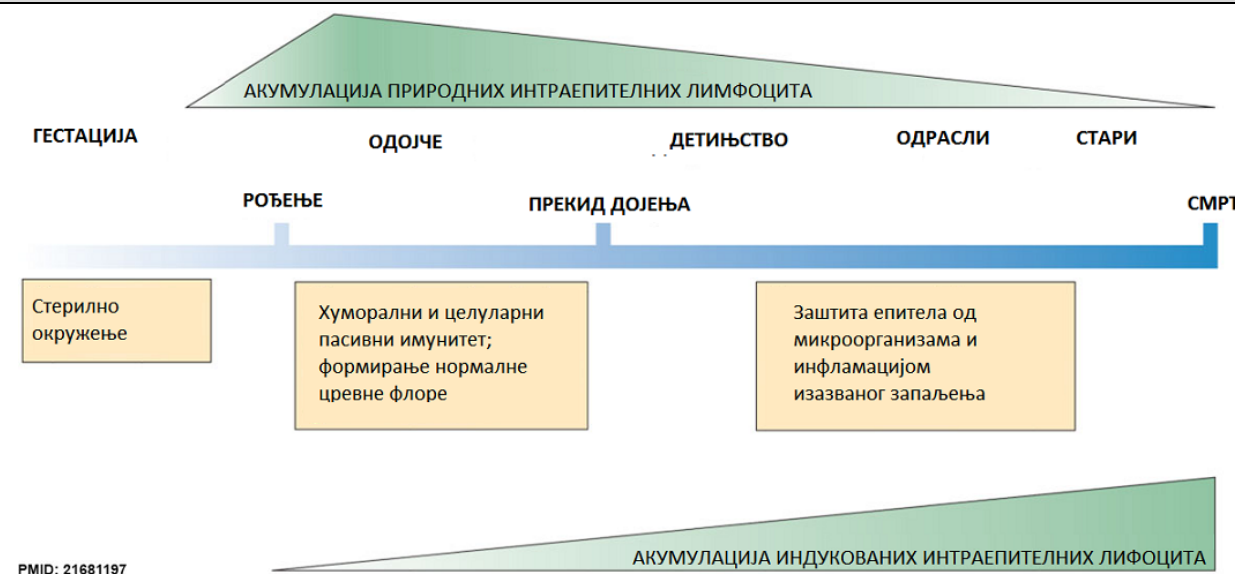
Функција Б-ћелија је снижена током првих месеци живота. Б-ћелије које учествују у препознавању Т-зависних антигена показују и смањену експресију рецептора за комплемент (*CD-21*), адхезионих молекула и ХЛА молекула II класе, редуковану експресију *CD-40*, костимулаторних молекула (*B7-1, B7-2*) и рецептора за фактор активације Б-ћелија (*BAFF*). У одговору на Т-независне антигене у одојачком периоду нарочито су значајне Б-1 Б-ћелије и у великом броју се налазе у мукози и у слезини. Током првих месеци живота у одговору на антигенску стимулацију присутна је продукција IgM у ниским нивоима, без промене изотипа тешког ланца (*Lewis, 2013-32*). Б-ћелије маргиналне зоне нису присутне на рођењу, њихов број се постепено повећава и достиже проценат лимфоцита у слезини одраслих након друге године живота (*Lewis, 2013-32*). Имуноглобулин Г (*IgG*) преноси се пасивно од мајке и код превремено рођене деце налази се у нижој концентрацији у односу на децу рођену у термину. Полувреме живота *IgG* је 21 дан, па се концентрација мајчиних антитела након рођења смањује. Најнижа концентрација укупних *IgG* измерена је између 2. - 4. месеца живота, након чега расте услед накупљања новостворених, дечијих *IgG*. У узрасту од 12 месеци продукција укупних *IgG* достиже 60% концентрације одраслих (*Lewis BD, 2013*). *IgM* су природна, полиреактивна антитела, које стварају Б-1 Б-ћелије. Након рођења серумска концентрација *IgM* брзо расте, нарочито на антигену стимулацију и у 12 месеци достиже 75% концентрације одраслих, док *IgA* у узрасту од 12 месеци достижу само 20% концентрација *IgA* у серуму одраслих. Ниво *IgE* у крви из пупчаника су повишени код деце са предиспозицијом за атопију, али се сматра да *IgE* може бити и порекла из мајчине крви, мада механизам његовог транспорта није познат (*Lewis, 2013-32*).

Велики број гастроинтестиналних и респираторних болести у најранијем узрасту помажу развој урођеног и стеченог имунског одговора на микроорганизме, али се паралелно томе развија и толеранција на непатогене антигене (*Holt PG, 2010*). Развој толеранције на епителима завистан је од интраепителних лимфоцита који могу бити природни (који су прошли селекцију и тимусу и имају рецепторе за сопствене антигене) и индуковани који су се срели са страним антигеном, а затим акумулирали у епителу (*Cheroutre H, 2011*). Механизам толеранције на епителу утврђен је за природне *TCR $\gamma\delta$ ⁺* интраепителне лимфоците код којих стимулација *TCR*-а уз паралелну активацију

инхибиторних *NK* рецептора доводи до експресије *TGFβ1* (Cheroutre H, 2011). Ове ћелије имају улогу у обликовању епителне морфологије, експресији ХЛА молекула класе II, у измени класа имуноглобулина у *IgA*, развоју *IL-10* толеранције и репарацији епитела након оштећења (Cheroutre H, 2011). $\gamma\delta^+$ интраепителни лимфоцити препознају молекуларне обрасце сопствене ћелије у стресу (као што су *heat shock* протеини) када инхибирају продукцију *INFγ*, као и молекуларне обрасце патогена, када продукују *INFγ* и *TNFα* (Cheroutre H, 2011). Природне *TCRγδ⁺* интраепителне ћелије експримују костимулаторне молекуле *JAML* (енг. *junctional adhesion molecule-like*) који повећавају експресију кератиноцитног фактора раста из самих *TCRγδ⁺* лимфоцита након везивања за *Coxsackie* вирус или аденовирус рецептор (*CAR*) (Witherden DA 2010), који је неопходан за обнављање интегритета епитела у одговору на физичка и инфламаторна оштећења (Cheroutre H, 2011).

Настањивање епитела индукованим интраепителним лимфоцитима зависно је од експресије интегрин *αE* (CD103) који је индукован са *TGFβ1*, а преко кога интраепителни лимфоцит интерреагује са Е кадерином и улази у епител. Овај улазак дешава се рано у животу и популација ових ћелија постепено расте са узрастом у одговору на излагање спољашњим антигенима, па је њихов репертуар „персонализован“ у зависности од окружења у коме јединка живи и антигенима којима је континуирано изложена (Cheroutre H, 2011), (слика 7).

Слика 7. Измена интраепителних лимфоцита током живота (Cheroutre H, 2011)



Мајчино млеко смањује осетљивост одојчета на инфекције, јер обезбеђује довољне количине IgA који везују микроорганизме на мукозним мембранама одојчета и смањују активацију проинфламаторног одговора и лактоферина који лизира микроорганизме и редукује инфламаторни одговор (*Hanson LA, 2007*). Мајчино млеко има директан ефекат на имунски систем неонатуса, на сазревање *TH1* имунског одговора и стварање имунолошке меморије (*Kelly D, 2000*), јер садржи *IL-1, IL-6, IL-12, TNF α , INF γ* и *IL-8* који потмомажу у развоју *TH1* одговора и стимулишу одбрамбени потенцијал одојчета (*Eglinton BA 1994, Palkowetz KH, 1994*). Мајчино млеко садржи и значајне количине анти-инфламаторних компоненти као што су *TGF β 1, IL-10*, еритропоетин и лактоферин који редујују прејак проинфламаторни одговор (*Walker A, 2010*).

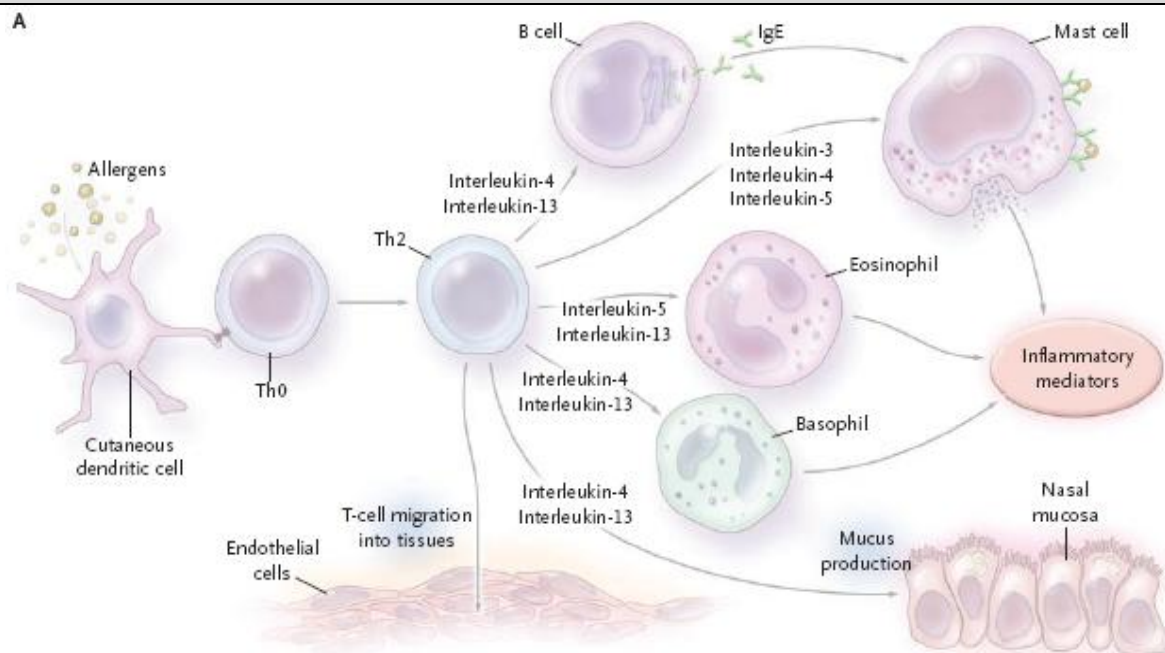
1.6 Атопија

Алергијска хиперсензитивност је последица доказане или вероватне имунолоше реакције и може бити узрокована механизмом хуморалног имунитета или ћелијског имунског одговора по IV типу касне преосетљивости (*Johansson SG, 2001*). Ревидирана номенклатура алергијских болести Светске здравствене организације из 2004. год подразумева да се атопијске болести искључиво повезују са присуством IgE везане сензибилизације, која се доказује или присуством специфичних *IgE* антитела у серуму или позитивним *skin prick* кожным тестом (*Johansson SG, 2004*). Атопија представља алергијску, *IgE* везану хиперсензитивност, а дефинисана је као генетска предиспозиција за развој *IgE* имуноглобулина у одговору на излагање алергену и удужена је са појавом специфичних *IgE* антитела, што доприноси развоју клиничког поремећаја (фенотипа) (*Macaubas C, 2003*).

Главне карактеристике алергије су: 1) генетска предиспозиција; 2) алергени, 3) презентација алергена преко Д \mathbb{H} и активација *TH2 CD4+* ћелија, као и продукција *IgE* антитела на уобичајене антигене из спољашње средине на које здраве особе не реагују, 4) специфична *IgE* антитела се везују за Fc рецепторе на маст ћелијама (сензибилизација) и приликом поновног излагања истом антигену долази до ослобађања медијатора, који су одговорни за испољавање различитих клиничких манифестација (кожне алергије, алергије на храну, алергијски ринитис, астма и системска анафилакса) 5) клиничке манифестације непосредне преосетљивости, у раној фази, последица су васкуларних и реакција глатке мускулатуре у току неколико минута

од излагања алергену, док је у касној фази непосредне преосетљивости присутна инфламација узрокована цитокинима за 2-4 сата након излагања алергену.

Слика 8. TH2 одговор (*Frew AJ, 2008*)



За ћелијски имунски одговор на алергене одговорне су Т ћелије које се након презентације алергена активирају и диференцирају у *TH2* тип ефекторских ћелија и секретују цитокине *TH2* имунског одговора (слика 8) и то: *IL-4* (промена изотипа у ϵ (епсилон) тешки ланац имуноглобулина у Б ћелијама, стимулација развоја *TH2* ћелија из наивних *CD4+* ћелија, аутокрини фактор раста за диференциране *TH2* ћелије, антагонистички ефекат у односу на *INF γ* са инхибицијом развоја *TH1* и *TH17* ћелија, повећање перисталтике, а заједно са *IL-13* учествује у алтернативној активацији макрофага што доводи до продукције колагена итд); *IL-5* (стимулише раст, диференцијацију и активацију еозинофила, пролиферацију Б лимфоцита и продукцију *IgA* антитела); *IL-13* (у фибробластима и макрофагима стимулише експресију арагиназе 1 и *TGF β 1* са повећаном продукцијом колагена чиме промовише фиброзу током репарације ткива у хроничним инфламаторним процесима, стимулише пролиферацију, диференцијацију и секреторну функцију пехарастих ћелија бронхијалног епитела, чиме повећава продукцију мукуса у дисајним путевима, индукцију експресије ендотелних адхезионих молекула и хемокина, чиме доприноси развоју инфламације) (*Abbas AK, Effector Mechanisms of Cell-Mediated Immunity, 2012, (Frew AJ, 2008)* (слика 8).

Хуморални одговор на алергене подразумева пролиферацију специфичних Б ћелија после 4-7 дана од првог излагања алергену, уз екстензивну промену изотипа у *IgE*, повећање афинитета продукованих *IgE* и стварање меморијских Б ћелија. Након диференцијације у плазма ћелије које секретују антитела високог афинитета и меморијских (функционално „тихих“) ћелија, неке од дугоживећих плазма ћелија напуштају лимфни чвор и мигрирају у коштану срж или инфламирано ткиво (*Abbas AK, B Cell Activation 2012*). Из коштане сржи се за 2-3 недеље од првог излагања алергену специфична антитела на алерген продукују континуирано у току више година (*Abbas AK, B Cell Activation 2012, Ree R, 2014*).

Активација ефекторских механизма *TH2* одговора почиње када алерген премости *IgE* антитела везана за *FcεRI* молекуле на мембрани маст ћелија, што доводи до њихове активације. Маст ћелија експримује око 300 000 *FcεRI*, а агрегација око 100 рецептора је довољна за детектабилни одговор (*Renauld JC, 2001*). Код особа које имају атопијску конституцију на мембрани маст ћелија везана су углавном специфична *IgE* антитела за одређени алерген, те је он довољан да премости потребан број *IgE* неопходан за активацију ћелије. Код особа које немају атопију, *IgE* се са једне стране продукују у малој количини, а везани *IgE* на мембрани маст ћелија су различите специфичности, па ни један појединачни антиген не може довести до премошћавања оног броја *IgE* молекула који је довољан за активацију ћелије (*Renauld JC, 2001, Abbas AK, IgE-Dependent Immune Responses, 2012*). Активација маст ћелија доводи до ослобађања биогених амина (хистамина) и азот окида што се манифестује уртикама са црвенилом и отоком коже уз контрацију глатких мишића у цревима и бронхијама. Ипак, бронхоконстрикција у астми је много дужа од полувермена елиминације хистамина, па се сматра да овај биогени амин нема великог значаја у том алергијском фенотипу.

Активирани маст ћелије синтетишу и секретују липидне медијаторе у ком процесу фосфолипаза А2 хидролизује мембранске фосфолипиде као што је арахидонска киселина, и ослобађају се супстрати од којих након конверзије уз помоћ циклооксигеназе и липооксигеназе настају простагландини и леукотријени. Простангландин *D₂* делује као вазодилататор и бронхоконстриктор, потенцира хемотаксу неутрофила и њихову акумулацију на месту инфламације. Леукотријени узрокују пролонгирану бронхоконстрикцију (*LTC₄*), дуготрајне уртике и црвенило по кожи. Фактор активације тромбоцита (*PAF*) ослобађа се из мембранских фосфолипида

изазива бронхоконстрикцију, повећање пермеабилности крвих судова са вазодилатацијом, а и касној фази реакције преосетљивости може активирати леукоците и допринети инфламацији.

Синтеза и секреција цитокина из мастоцита настаје након активације транскрипторних фактора *NF- κ B* и *AP-1* који индукују транскрипцију гена за *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-13*, *TNF α* итд. Исти цитокини ослобађају се и из активисаних *TH2* ћелија и базофила, а од значаја су у касној фази реакције преосетљивости. *TNF α* може бити новосинтетисан, али се може налазити и у већ постојећим гранулама унутар маст ћелије. Овај цитокин активира експресију адхезионих молекула на ендотелу и заједно са хемокинима доприноси настанку неутрофилно-моноцитне инфилтрације (*Abbas AK, Immunity to Microbes 2012*). После преошћавања *IgE* на маст ћелијама долази до продукције *TSLP* из маст ћелија што аутокринно повећава експресију *TSLPR* и доводи до развоја *TSLP* зависног одговора у проинфламаторном окружењу (*IL-1*, *TNF α*) при чему маст ћелије почињу да продукују (*IL5*, *IL6*, *IL13*, *TNF α* , *GM-CSF*) и хемокине (*CCL1* and *CXCL8*) (*Allakhverdi Z, 2007*). Маст ћелијска дефицијенција удружена је са падом *TSLP*-а у моделима алергијског ринитиса код мишева (*Miyata M, 2008*). На дендридским ћелијама *TSLP* индукује експресију костимулаторних молекула (*CD40*, *CD80*), ХЛА молекула класе 2 и *OX40L*, након чега Д \mathbb{T} при презентацији антигена наивним Т ћелијама индукују њихову диференцијацију у *TH2* ћелије које продукују *IL-4*, *IL-5*, *IL-13* и велике количине *TNF α* , али не и *IL-10* (*Boita M 2013*). *TH2* цитокини и *IgE* могу повратно амплификовати продукцију *TSLP* (*Takai T, 2012*). Директни ефекат *TSLP* описан је на *CD4+* у тимусу где изазива њихову диференцијацију у *Treg*, док се ефекат на *CD8+* састоји у индукцији цитотоксичних Т ћелија које продукују велике количине *INF γ* и повећању њиховог преживљавања кроз појачану експресију *Bcl-2* анти-апоптоичног протеина (*Rochman Y, 2008, Boita M 2013*). *TSLP* може индуковати пролиферацију прогенитора базофила и еозинофила (*Allakhverdi Z, 2007*).

Еозинофили настају у коштаном сржи где *IL-3*, *IL-5* и *GM-CSF* омогућавају њихову матурацију. Еозинофили циркулишу у крви где чине око 2-4% леукоцита, али су и нормално присутни у периферним ткивима, нарочито у мукози респираторног гастроинтестиналног и генитоуринарног тракта. *IL-5* повећава матурацију еозинофила из прогенитора у коштаном сржи, активира их и повећава отпуштање садржаја гранула. Еозинофили синтетишу више од 28 цитокина, хемокина и фактора раста у својим кристалоидним гранулама (*Lacy P, 2001*), од којих су најзначајнији катјонски протеини

(главни базични протеин (*MBP – major basic protein*) и еозонофилни катјонски протеин (*ECP – eosinophil cationic protein*), лизозомне хидролазе, као и еозинофилне пероксидазе и каталазе (*Abbas AK, IgE-Dependent Immune Responses, 2012.*) Накупљање еозинофила на месту инфламације одвија се преко експресије Е селекина на васкуларном ендотелу, који се везује за интегрин *VLA-4* на мембрани еозинофила, што потенцирају и хемокини, и то, еотаксин (*CCL11*) кога продукују ендотелне ћелије, а који се везује за *CCR3* - хемокински рецептор на еозинофилима. Експресију адхезионих молекула за еозинофиле потенцира *IL-4* који се такође продукује од стране *TH2* ћелија. Продукти маст ћелија као што су продукт комплемента *C5a* и липидни медијатори *PAF* и *LTB₄* такође потенцирају привлачење еозинофила на место инфламације (*Abbas AK, IgE-Dependent Immune Responses, 2012.*)

Базофили су крвни гранулоцити са структуром и функцијом која је слична маст ћелијама. Настају из прогенитора из коштане сржи, сазревају у циркулацији, где чине мање од 1% леукоцита. Иако нормално нису присутни у ткивима базофили се могу накупити на месту непосредне реакције преосетљивости (*Abbas AK, IgE-Dependent Immune Responses, 2012.*) Базофили су значајан извор *IL-4* који је неопходан за *TH2* диференцијацију наивних Т ћелија (*Ree R, 2014.*)

Лимфоидне ћелије урођеног имунитета у плућима које продукују *TH2* цитокине описане су први пут 2001. године као *non-B, non-T* ћелије које се активирају и умножавају *in vivo* после администарције *IL-25* (*Fort MM, 2001.*), а што је праћено повећањем серумске концентрације *IgE, IgG1* и *IgA*, уз повећану продукцију мукуса, хиперплазију маст ћелија и еозинофилијом у плућима (*DeKruyff RH, 2014.*) Ове ћелије су назване природне помоћничке ћелије (*natural helper cell*), нуоцити или ћелије урођеног имунитета типа 2 (*DeKruyff RH, 2014.*) Нуоцити типа 2 стимулирани су *IL-25, IL-33* и *TSLP* порекла из епителних ћелија (*Ree R, 2014.*) У респираторном тракту нуоцити типа 2 секретују у незрелој форми *IL-9*, а касније *IL-5* и *IL-13* (*Wilhelm C, 2011.*), и одговорни су за инфламацију током вирусних инфекција, као и у настанку риносинуситиса и астме, (*Kim HY 2010.*), док су у кожи одговорни за развој атопијског дерматитиса (*DeKruyff RH, 2014.*) Полуживот нуоцита типа 2 је дужи од живота *TH2* ћелија, тако да се ове ћелије сматрају главним извором *IL-5* у периферним ткивима, чиме контролишу еозинофилну хомеостазу у плућима и у периферној крви (*Nussbaum JC 2013.*) Нуоцити који продукују *IL-5* и *IL-13* утврђени су у плућима (*Kim H, 2014.*), и

у спутуму оболелих од астме, што није био случај код здравих особа (*Allakhverdi Z, 2007*).

У плућима асматицара, *iNKT* ћелије секретују велике количине *IL-4* и *IL-13*, односно потенцирају *TH2* одговор (*Lloyd CM, 2010*). Међутим, улога *iNKT* ћелија у развоју астме је контроверзна (*Matangkasombut P 2009*). Новије студије указују на постојање подгрупе *iNKT* ћелија које могу деловати имуносупресиивно и у плућима могу имати протективну улогу на развој БХР уз супресију инфламације (*Chang YJ, 2011*). Хипотеза хигијене указује да изостанак инфекција у раном детињству може бити повезан са каснијим развојем алергије и астме, па постоје мишљења да се протективни ефекат вирусних и бактеријских инфекција огледа уствари у експанзији *iNKT* ћелија које секретују *INF γ* у плућима током развоја. Наиме, ове ћелије су нормално одсутне у плућима одрасле јединке и не може се утврдити њихово постојање чак и када се јединке изложе истим микроорганизмима којим су изложене рано у животу, али се њихов значај првенствено огледа у индукцији имунорегулације током развоја плућа (*DeKruyff RH, 2014*).

1.7. Фенотипови болести доњих дисајних путева у дечијем узрасту

Визинг подразумева постојање полифоног звука у експиријуму који се јавља услед опструкције протока ваздуха кроз мале (периферне) дисајне путеве, а у дечијем узрасту један је од клиничких/дијагностичких параметара различитих болести доњих дисајних путева као што су бронхиолитис, бронхитис и астма (*Watts KD, 2007*). Три и више визинга у лутератури се разматра као рецидивнтни визинг и повезује се са вирусним инфекцијама и бронхијалном хиперреактивношћу (*Martinez FD 1995*). Међутим, под термином бронхијалне хиперреактивности (БХР) подразумева се стање у коме су дисајни путеви осетљиви на провокативне факторе, и то не само на вирусе (респираторни синцицијални вирус - *RSV*, хумани метапнеумовирус, хумани риновирус - *hRV*, вирус параинфлуенце и инфлиенце, аденовирус), већ и на инхалаторне алергене (кућна прашина, гриње, животињски епител, буђ, полени), дувански дим, аерозагађење (озон, сумор-диоксид, мале честице, чађ, ендотоксини и микотоксини у прабини), јаке мирисе (парфеми, лакови за косу, хемијска средства у домаћинству), професионалне иритансе (боје, лакови, формалдехиди, пестициди и инсектициди), хладан и сув ваздух, хипервентилацију (физичка активност, плач, смех) и коморбидитетна стања (ринитиси, синзитиси, гастроезофагеални рефлукс) (*Liu AH, 2007*). Код деце са атопијом

манифестација БХР-а удружена је са развојем перзистентне инфламације, аберантне репарације и ремоделовања у дисајним путевима, а што представља генезу астме (Liu AH, 2007). Код деце узраста до годину дана која су испољила рецидивантни визинг није утврђено постојање задебљања базалне мембране као иницијалног микроскопског знака ремоделовања дисајних путева (па БХР може бити и транзиторно стање које деца превазилазе касније током живота), а као ризични период за почетак ремоделовања разматра се друга година, са променама у структури дисајних путева које се развијају до шесте године живота, када се астма најчешће дијагностикује и када су структуралне промене ирверзибилне (Saglani S 2005, Bush A, 2008, Liu AH, 2007, Levy B, 2015). Клиничко испитивање БХР-а код деце узраста до две године онемогућено изостанком адекватне методологије и етичким принципима (Lagerkvist BJ, 2004), па су подаци о повезаности визинга у раном детињству и каснијег испољавања астме најчешће добијени из лонгитудиналних студија.

Кохортна Tucson студија (Taussig LM, 2003), започета 1980. године, обухватала је 1246 деце од тренутка рођења до адолесцентног периода, са циљем разјашњавања сложених односа између могућих фактора ризика и развоја акутних и хроничних респираторних поремећаја, нарочито астме, у каснијем детињству и у одраслом добу. Наиме, у овој студији дефинисана су три основна типа визинга у дечијем узрасту:

- 1) **Транзиторни визинг одојчади** се јавља у пар епизода код деце до треће године живота. У ову категорију спада више од 80% деце са визингом у првој години, 60% у другој и 30% до 40% деце са визингом у трећој години живота. Ова деца немају податак о постојању астме у породици, немају атопијски дерматитис као ни еозинофилију, немају висок ниво *IgE*, нити друге параметре алергије. Основни фактори ризика за испољавање транзиторног визинга је слабија функција плућа пре испољене болести доњих дисајних путева, односно мали калибар дисајних путева, мушки пол, изложеност кисеонику на рођењу и изложеност дуванском диму. Ова деца не испољавају визинг после треће године живота.
- 2) **Неатопијски визинг** јавља се код деце и после треће године живота и најчешће је последица вирусних инфекција. Деца без атопије која су имала болест доњих дисајних путева са дијагностикованом *RSV* инфекцијом су 3-5 пута чешће имала визинг до шесте године живота, али овај ризик је значајно опадао са годинама и практично *RSV* инфекција није имала значај за појаву визинга у 13. години

живота. Деца са *RSV* изазваним болестима доњих дисајних путева имала су и мању плућну функцију у 6. и у 11. години живота.

- 3) **Атопијски визинг** јавља се код деце која имају атопију у првих 6 година живота, као први симптом касније настале астме. Код ове деце утврђена је сензибилизација на инхалаторне алергене. Деца са атопијским визингом деле се у две групе: прву групу чине деца која су имала визинг у прве три године живота, а другу групу деца која су имала први визинг у узрасту од 3-6 година. Сва деца су била сензибилисана на инхалаторне алергене у 6. години живота, али су деца са атопијом која су имала први визинг у прве три године живота имала су лошију функцију плућа и више концентрације укупног IgE у серуму у узрасту између 6. и 11. године живота.

Нашим ранијим истраживањем је показано да у Шумадијском региону, 57,7% деце у узрасту до 2 године има испољавање симптома који би се могли повезати са алергијом, при чему 41% деце има бар једну болест доњих дисајних дисајних путева у узрасту до две године, али је 74% деце са визингом у овом узрасту без атопије (*Ilic N, 2011*). *RSV* је најзначајнији узрочник респираторних болести код деце (*Collins PL, 2011*) са инциденцом у општој популацији деце у Шумадијском округу од 12,9% у првој години и у 47% деце у другој години живота (*Relić T, 2016*). „Хипотеза хигијене“ указује да су инфекције у раном детињству повезане са смањеном инциденцијом алергијских болести (*Strachan DP, 1989*), односно да инфекције делују протективно на развој алергије, али је такође утврђено да вирусне инфекције у раном детињству могу бити фактор ризика за каснији развој астме (*Lloyd CM, 2010*). Интересовање за допринос респираторних вирусних инфекција развоју астме потиче великим делом од резултата базираних на проспективним кохортним студијама од рођења до школског узраста и на даље у којима је показано да су вирусне инфекције праћене визингом у првим годинама живота фактор ризика за појаву астме, првенствено код деце са атопијом (*Holt PG, 2012*). Иако није познато да ли инфекција има улогу фактора ризика или протективног фактора на развој астме, јасно је да је значај инфекције на програмирање имунског одговора у плућима завистан од два фактора – времена када се инфекција десила и типа микроорганизма који инфекцију изазива (*Lloyd CM, 2010*).

Респираторне вирусне инфекције, првенствено *RSV* и *hRV* се најчешће наводе као ризико-фактори развоја астме, првенствено после серија рецидивантних инфекција у одојачком периоду (*Singh AM, 2007*).

RSV је једноланчани РНК вирус са високим степеном контагиозности, али без великог цитопатогеног ефекта (*Collins PL, 2008*). Циљне ћелије *RSV* репликације су цилијарне ћелије псеудослојевитог епитела, Клара ћелије и алвеоларне ћелије типа 2 (*Derscheid PJ, 2012*), али се инфекција најчешће задржава на цилијарним ћелијама, при чему цилијарни покрети ћелија могу бити поремећени, а у тежим облицима инфекције инфициране ћелије могу бити сљуштене (*Collins PL, 2008*). Патохистолошки налаз код тежих *RSV* инфекција показује губитак цилијарног епитела (одумирање и десквамација епителних ћелија) са фокалном некрозом, уз местимичну пролиферацију бронхијалног епитела, инфилтрацију моноцита и Т лимфоцита око бронхиоларних и пулмоналних артериола и накупљање неутрофила између васкуларних структура и малих дисајних путева у којима се налази мукус (*Collins PL, 2008*).

У нашем региону смо у узрасту 5-6 месеци утврдили да су сва деца са БХР-ом била без атопије, (у њих 30% БХР је био удружен са *RSV* инфекцијом), док је у другој години живота половина деце са БХР-ом имала атопију, а у 83% деце са атопијом у другој години живота БХР је био удружен са *RSV* инфекцијом (*Relić T, 2016*). Лонгитудиналне студије су потврдиле везу између тешких бронхиолитиса изазваних *RSV* и педијатријске дијагнозе астме у школском узрасту и у раном одраслом добу (*Beigelman A, 2013*).

1.8 Астма

Астма је најчесталија хронична болест у дечијем узрасту (*Lang JE, 2013*), и водећи је разлог хоспитализације, коришћења службе хитне помоћи и изостајања из школе (*Akinbami LJ, 2009*), па има и велики економски значај због директних и индиректних медицинских трошкова укључујући и трошкове здравствене услуге, цене лекова и смањења продуктивности (*Masoli M, 2004*). Туксон студија је дала критеријуме за постојање ризика од развоја астме – *API* индекс (*Asthma predictive index*), који подразумева да ризик за развој астме имају деца са три и више визинга која су имала позитиван бар један од три мајор критеријума (астма родитеља, екцем/атопијски дерматитис и сензибилизација на инхалаторне алергене) или један/два минор критеријума (визинг без прехладе, еозинофилија >4%, алергијски ринитис и сензибилизација на алергене хране) (*Castro-Rodriges J, 2000*), а који је касније ревидиран, па је уместо алергијског ринитиса, као манифестације алергије која није карактеристична за рани узраст, и одвојене сензибилизације на инхалаторне и

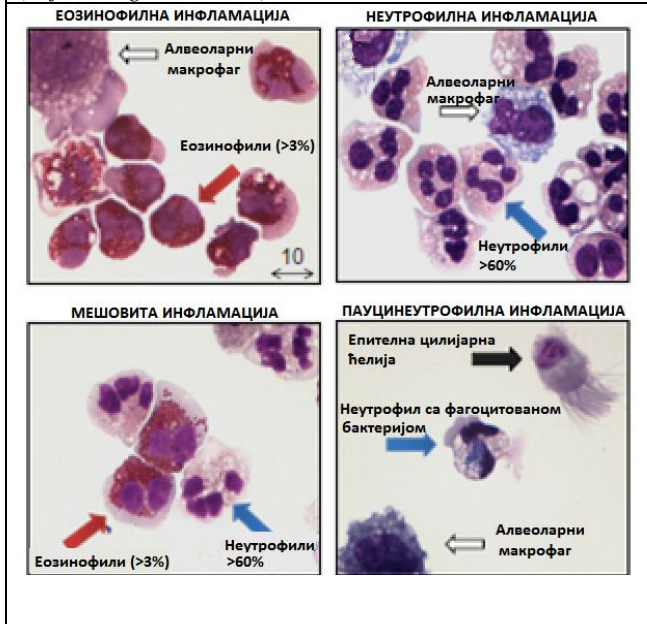
нутритивне алергене, као предикторни фактор узет податак о сензибилизацији на било који алерген (*Guilbert 2004*).

Иако се астма може развити у било ком узрасту, преко 60% свих случајева почиње пре 3. године живота, а 80% пре 6. године живота. Може доћи до ремисије болести током детињства, али су лонгитудиналне студије показале да касније у животу често постоје релапси болести (*Sly, P. 2008*). Тренутно нема лекова који би могли мењати природни ток астме (*Holgate ST, 2009*). Актуелна терапија усмерена је на смањење бронхоконстрикције применом бронходилататора и смањење инфламације у дисајним путевима применом инхалаторних гликокортикоида, као и антагонистима цистенил леукотријенског рецептора 1 који инхибишу бронхоконстрикторно и инфламацијско дејство леукотријена *C4*, *D4* и *E4*. Ни један од ових лекова нема ефекат на генезу астме, због чега актуелне препоруке указују на неопходност идентификације патогенетских механизма развоја астме уз разумевање комплексне интеракције генетских и ефекта фактора спољашње средине током развоја плућа и процеса ремоделовања (*Holgate ST, 2010*).

Астма се најчешће класификује на „атопијску“ и „неатопијску“ у односу на присуство (атопија) или одсуство (неатопијска) специфичних IgE на уобичајене алергене из спољашње средине (*Szeffler SJ, 2014*). Литературни подаци указују на учесталост астме у узрасту до две године креће се од 8,7 до 15,2%, са учесталошћу атопијске астме у 30-40% (*Arshad SH, 2001, Tariq SM, 1998*). У алергијској инфламацији постоји дисбаланс између *TH1* и *TH2* имунског одговора у коме постоји преминација продукције *TH2* цитокина као што су *IL-4* и *IL-13* (индукција измене класе имуноглобулина у Б ћелијама из *IgM* у *IgE*, повећана продукција мукуса, индукција репарације итд), *IL-5* (ангажовање еозинофила у плућима), *IL-9* (стимулација пролиферације маст ћелија). Специфична *IgE* везују се за маст ћелије и након поновне изложености алергену долази до премошћавања више *IgE* са истом специфичношћу, што доводи до дегранулације маст ћелија. Медијатори запаљења ослобођени из маст ћелија (хистамин, леукотријени, простагландин *D2*) доводе до додатног ангажовања еозинофила, *TH2* ћелија и базофила у ткиво плућа, који изазивају хроничну инфламацију у дисајним путевима (*Barnes PJ, 2008*). Перзистентна инфламација, аберантна репарација и ремоделовање у дисајним путевима, са клиничком манифестацијом бронхијалне хиперреактивности представљају генезу астме (*D'Amato G, 2015*). Иако се *TH2* одговор окривљује за хронично оштећење које за последицу има

ремоделовање, код деце која су развила астму у раном узрасту утврђено је да ремоделовање може да предходи процесима инфламације у дисајним путевима (*Blaiss MS 2009*).

Слика 9. Инфламаторни фенотипови у астми (*Vijverberg SJH, 2013*)

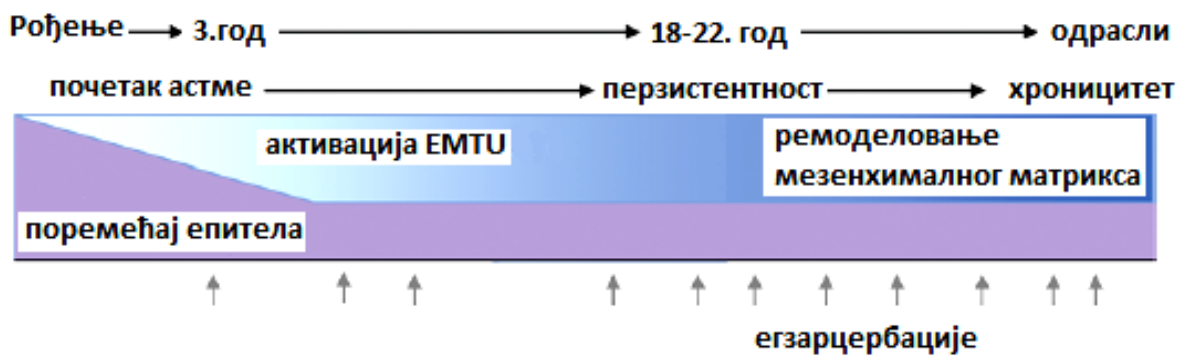


У неалергијској астми постоји доминација одговора урођеног имунског система на стално присуство респираторних вируса и бактерија, а главне ћелије које доприносе патологији у неалергијској астми су макрофаги, дендритске ћелије, гранулоцити и лимфоидне ћелије урођеног имунитета (нуоцити) (*Holtzman MJ. 2012*). На основу присуства врсте ћелија у БАЛ-у утврђено је четири типа инфламације у астми (слика 9): еозинofilна,

неутрофилна, мешана и пауцигранулоцитна (*Simpson JL, 2006*). Образац инфламације разликује се код деце и код одраслих пацијената са астмом а и репродукцибилност анализе типа инфламације је предмет дебате у стручној литератури (*Simpson JL, 2006, Wang F, 2011*).

Велики број студија које су се бавиле развојем астме указује на структурални и функционални поремећај епитела доњих дисајних путева који абнормално реагује на инхалиране честице у ваздуху што доводи до појачаног сигнализирања између епитела и мезенхимне подлоге (епително-мезенхимна трофична јединица - *EMTU*) и ћелија имунског система (*Holgate ST, 2010*) (слика 10). Измена епителног у мезенхимни фенотип под дејством цитокина у оштећењу и инфламацији може бити праћена и фиброзом, а дефинисана је као епително-мезенхимна транзиција типа 2 (за разлику од типа 1 који се дешава током ембриогенезе и није праћен фиброзом) (*Kalluri R 2009*). *IL-4* и *IL-13* повећавају експресију еотаксина у фибробластима што доводи до еозинofilне инфилтрације, а *TGFβ1* порекла из М2 активисаних макрофага стимулише продукцију екстрацелуларног матрикса (*Tagaya E 2007*).

Слика 10. Шематски приказ настанка и испољавања астме током живота (Holgate ST 2010)



EMTU – епително-мезенхимна трофична јединица

Екстрацелуларни матрикс обезбеђује механичке и интегринске сигнале прогениторима респираторног епитела (Volckaert T, 2014). Губитак контакта стем ћелија са екстрацелуларним матриксом довољан је окидач терминалне диференцијације прогенитора (Volckaert T, 2014), а појачано сигнализирање у оквиру епително-мезенхимне трофичне јединице промовише стварање микроокружења у ткиву плућа које доводи до ремоделовања ткива дисајних путева, што условљава губитак реверзибилности са редукцијом плућне функције и развојем астме (Holgate ST, 2010). Епителни фенотип може парцијално или у целости прећи у мезенхимни тип ћелија у току процеса епително-мезенхимне транзиције у коме епителне ћелије губе међућелијске везе, долази до реорганизује цитоскелета, репрограмирања сигнализирања и генске експресије која дефинише мезенхимни фенотип са повећањем мобилности појединачних ћелија што је од значаја у процесима зарастања рана и фиброзе (Lamouille S, 2014). Промена генске експресије подразумева реактивирање *Wnt*, *Notch* и *TGFβ* сигнализирања са повећаном експресијом *SNAIL1*, *TWIST1* и *ZEB* (*zinc-finger E-box-binding*) транскрипторних фактора од значаја у епително-мезенхимној транзицији типа 2. Ови фактори врше метилацију хистона на промотору за Е кадери, а смањење експресије Е кадерица дестабилише међућелијске везе, што уз смањење експресије клаудина, оклудина и дезмоплакина резултује у губитку функције епителне баријере. Паралелно смањењу Е кадерица долази до појачане експресије *N* кадерица који омогућава миграцију и комуникацију ћелије у транзицији са мезенхимним ћелијама (Lamouille S, 2014). Осим измене кадерица долази и до смањене експресије $\beta 4$ интегрин, са смањењем $\alpha\beta 4$ интегрин којима епителне ћелије адхерирају за базалну мембрану и повећањем $\alpha 3\beta 1$ интегрин преко кога се остварује контакт са ламинином и $\alpha 5\beta 1$ интегрин са фибронектином који промовише миграцију, док $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 2\beta 1$

интегрини појачавају интерреакцију са колагеном типа 1 и промовишу раскидање E-кадеринских комплекса. Експресија интегрин $\alpha\beta1$ удружена је са порастом експресије протеаза (Lamouille S, 2014). Повећање *MMP2* и *MMP9* повећава деградацију протеина екстрацелуларног матрикса и омогућава инвазију, а активација фактора диференцијације *TGF β* доводи до повећања експресије колагена и фибронектина који мењају састав и својства екстрацелуларног матрикса. Међутим, током оштећења мали трипептиди формирану у матриксу (*Arg (+); Gly (0); Asp (-)* (аргинин-глицин-аспартична киселина), смањују миграцију Клара ћелија, јер се везују за интегрине па онемогућавају ефекат фибронектина на миграцију Клара ћелија, а њихово стално присуство у хроничним оштећењима може довести поремећаја регенерације бронхиоларног епитела (Atkinson J, 2008). *TGF β* такође реактивира *TWIST* (преко смањења експресије протеина инхибитора диференцијације – *ID* који инактивирају *TWIST*), односно повећава ефекат *TWIST*-а на индукцију епително-мезенхимне транзиције (Lamouille S, 2014).

Због свега наведеног нови приступ истраживања астме указује на неопходност фокусирања на дечији узраст и факторе током раног живота који могу утицати на настанак астме, уз праћење обрасца структуралних промена током развоја и функционалног одговора дисајних путева током детињства, и касније до одраслог доба (Holgate ST, 2010).

1.9 Концентрације *CC16* у серуму

Током последњих година велики број истраживања се бави утврђивањем повезаности серумских концентрација протеина који су специфични за плућно ткиво и патолошких стања дисајних путева и плућа код деце током најранијег детињства (Lagerkvist BJ, 2004). Наиме, анатомске разлике у експресији Клара ћелија између мишева и људи онемогућавају утврђивање значаја ових ћелија у постнаталном развоју плућа кроз анималне моделе. Код мишева већина нецилијарних ћелија у читавом респираторном епителу су Клара ћелије, које чине 80% бронхиоларних ћелија, што је три пута више него што су показале ултраструктурне анализе бронхиола код људи (Hermans C, 1999). Истраживања специфичних маркера епителних ћелија дисајних путева у ћелијским културама показала су да се експресија маркера брзо губи, односно да Клара ћелијски фенотип брзо нестаје, с обзиром да долази до де-диференцијације

епителних ћелија у цилијарне ћелије или алвеоларне ћелије типа 2 (Atkinson J, 2008). Такође, мерење ткивне експресије протеина или анализа бронхоалвеоларног лавата нису етички прихватљиве методе истраживања код деце током раног детињства (Lagerkvist BJ, 2004). Због свега наведеног, развијен је нови, неинвазивни метод за детекцију субклиничких промена у респираторном епителу, који подразумева одређивање серумских концентрација протеина који су специфични за плућа (CC16, сурфактант А и Б), а који су показатељи пермеабилности или целуларног интегритета респираторне епителијалне баријере у плућима током акутних и хроничних болести плућа (Bernard A, 1997).

Концентрација CC16 у серуму расте у случају повећања пермеабилности епитела када су плућа акутно изложена аерозагађењу или се смањује у случају хроничних стања (астма, хронични бронхитис или код пушача) услед смањења продукције CC16 због смањеног броја Клара ћелија (Hermans C, 1999). Акутно оштећење респираторног тракта различитим иритансима (као што су азот и сумпордиоксиди, алдехиди, халогенизовани угљени хидрати, озон) последица је директне токсичности на епителне ћелије, и последичног повећања пермеабилности или оштећења баријере, што резултује у транзиторном повећању CC16 у серуму пре него што се појави симптоматологија, односно пре него што се оштећење може детектовати тестовима плућне функције (Bernard A 1997).

У астми постоји прогресивно епително оштећење, а патолошке промене су повезане за мале дисајне путеве где се код људи налази и највећи број Клара ћелија, па се сматра да ове ћелије имају значајну улогу у патогенези астме (Corren J, 2008, Contoli M, 2010). Мала концентрација CC16 у серуму повезана је са смањењем плућне функције (Guerra S, 2015) и редукијом броја CC16-позитивних ћелија у дисајним путевима, при чему је биоптатима бронхијалног епитела код пацијената са астмом установљен мањи број CC16 ћелија у односу на здраву контролу (Shijubo N, 1999). У више студија је показано да су мале концентрације CC16 у серуму повезане са астмом и код деце и код одраслих (Rava M, 2013, Gioldassi X 2004). Хронично респираторно оштећење редукује пролиферативни потенцијал Клара ћелија и доводи до њихове трансдиференцијације у мукус продукујуће ћелије (Shiyu S, 2011 Evans C, 2004, Atkinson J, 2008), као и до перибронхијалне фиброзе независно од миофибробластне пролиферације или диференцијације (Perl AK, 2011). Није јасно да ли овакав налаз постоји од рођења или се број CC16 ћелија у астми редукује услед постојања хроничне

инфламације (*Johansson S, 2008*). Развој субепителне фиброзе у примарним и секундарним алвеоларним септумима у току раног детињства може бити удружено са оштећењем пермеабилности алвео-капиларне мембране у великим подручјима плућа са редукцијом изласка *CC16* у циркулацију (*Hermans C, 1999*).

Иако је астма алергијска у 70-80% пацијената (*DeKruyff RH, 2014*), подаци о повезаности алергије и *CC16* нису доследни. Нижа серумска концентрација *CC16* утврђена је код деце са рекурентним визингом која су имала ризик за атопију у односу на децу са рекурентним визингом, која су била без ризика за атопију (*Wang XF, 2011*). Истраживања полиморфизма гена за *CC16* показала су удруженост генотипа са нижом серумском концентрацијом *CC16* са развојем инфламације у дисајним путевима и појавом бронхијалне хиперреактивности код деце, независно од атопије (*Laing IA, 2009*). Такође, сличне концентрације *CC16* утврђене су код пацијентата са алергијском и неалергијском астмом (*Shijubo N, 1999*). Са друге стране постоје студије у којима није утврђена повезаност малих концентрација *CC16* у серуму код деце током прве године са појавом астме или алергијског ринитиса до треће године живота у односу на здраву контролу (*Johansson S, 2008*), као ни повезаност *CC16* и астме код одраслих (*Tufvesson E, 2013*), али је мала концентрација *CC16* у серуму корелисала са хроничном опструктивном болешћу плућа (*Guerra S, 2015*). Значај *CC16* као биомаркера акутних и хроничних болести плућа и даље је предмет истраживања и стручних дебата (*Lakind JS 2007*).

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

Главни циљ

Главни циљ ове студије је да се утврди повезаност концентрације *CC16* у серуму са индивидуалним карактеристикама, болестима доњих дисајних путева и биомаркерима *TH2* одговора и имунорегулације у односу на атопију у узрасту до две године и утврђивање његовог значаја у предвиђању болести доњих дисајних путева у седмој години живота.

Специфични циљеви : утврдити разлике у концентрацији *CC16* у серуму између деце са атопијом и без атопије у односу на:

- индивидуалне карактеристике испитаника (узраст, пол, начин исхране и породичну анамезу),
- предходно манифестоване болести доњих дисајних путева и инфекцију респираторним синцицијалним вирусом,
- биомаркере *TH2* ефекторског одговора (*IgE*, *ECP*), маркер дефекта епитела као баријере (*TSLP*) и имунорегулацијске цитокине (*IL-10* и *TGFβ1*) у серуму,
- испољавање болести доњих дисајних путева у седмој години живота.

Радне хипотезе

- Деца са атопијом имају мање концентрације *CC16* у серуму у односу на децу без атопије
- Деца са атопијом и предходно манифестованим болестима доњих дисајних путева имају мање концентрације *CC16* у серуму у односу на децу са болестима доњих дисајних путева, а без атопије.
- У групи деце са атопијом постоји негативна корелација *CC16* и биомаркера ефекторског *TH2* одговора, маркера дефекта епитела као баријере и имунорегулаторних цитокина у серуму.
- Деца која су испољила болести доњих дисајних путева у седмој годни живота имала су мање концентрације *CC16* у узрасту до две године без обзира на атопију.

3. ИСПИТАНИЦИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1 Врста студије

Лонгитудинална студија кохорте здраве деце код којих је у узрасту од 5 до 24 месеца утврђивано постојање предходно манифестованих респираторних болести, атопије, концентрације протеина Клара ћелија, као и биомаркера TN2 одговора, дефекта епитела и цитокина имунорегулације у серуму, а у узрасту од 7 година анализирано је постојање дијагнозе болести доњих дисајних путева.

3.2 Популација која се истражује

У студију је укључено 163 здраве деце у узрасту од 5 до 24 месеца са територије Крагујевца у периоду од 2009-2011. године. Случајни узорак обезбеђен је укључивањем деце која су на превентивни преглед долазила једним даном у недељи (петком у Дому Здравља и понедељком у Институту за јавно здравље - ИЗЈЗ Крагујевац). Извор података о карактеристикама болести доњих дисајних путева била је база података Дома здравља Крагујевац, а из нестандардизованог анкетног упитника добијени су подаци о начину исхране и алергији у породици. Искључујући критеријуми били су: први педијатријски куративни преглед због било које болести у периоду од 3 недеље пре укључивања у студију, било која системска терапија у истом периоду и податак о предходној болести уринарног тракта. Ни једно дете у испитиваној групи није имало бронхопулмоналну дисплазију нити паразитозу. Подаци о болестима доњих дисајних путева током 2016. године прикупљани су из базе података: Дома здравља, Одељења за статистику ИЗЈЗ о хоспитализованим пацијентима у КЦ Крагујевац, пацијената Одељења за алергологију и имунологију ИЗЈЗ, као и приватне педијатријске ординације др Банковић у Крагујевцу. За 2016. годину обрађено је 161 дете просечног узраста 7 година (range 3, min 6, max 9). За двоје деце није било података ни у једној од анализираних база.

3.3 Узорковање

Деца су уз пристанак родитеља укључивана у студију на превентивном педијатријском прегледу при вакцинацији/ревакцинацији (сваког петка) или при превентивном саветодавном раду у Одељењу за алергологију и имунологију Института за јавно здравље (сваког понедељка). Крв је узимана у Дому здравља приликом редовне контроле комплетне крвне слике или у Институту за јавно здравље Крагујевац

приликом узимања крви за индиковане анализе потребне за адекватни савет у циљу превенције имунолошких болести код деце. Узорци серума су складиштени на -80 СЦ до извођења лабораторијских анализа у ИЗЈЗ Крагујевац.

3.3.1 Лабораторијске анализе

Лабораторијске анализе вршене су са шифрованим узорцима серума, без увида особе која изводи тест у предходно наведене податке. Различити број урађених анализа такође је имао карактеристике случајног узорковања обзиром да је разлог била различита количина узорка у банци серума Института за јавно здравље Крагујевац.

Утврђивање атопије извршено је код 163 деце детекцијом серумских специфичних *IgE* квалитативним мултитестом *Phadiatop infant* ($cut\ off \geq 0,35\ kUA/L$). Алергени, на које се *Phadiatop infant* – тестом утврђује присуство специфичних *IgE* су протеини: беланца, крављег млека, кикирикија, рачића, длаке мачке и пса, гриње, полена сребрне брезе, мачијег репка, амброзије и коприве (*Halvorsen R, 2009*) *Phadiatop infant* тест је рађен *in vitro* имунофлуоресцентном техником (Fluorescent Immunassay) на *Immunoscap-100* апарату (*Phadia AB, Uppsala, Sweden*). Истом техником су одређене и серумске концентрације укупних *IgE* ($n=163$) и ЕСР-а ($n=145$). Испитивану групу чинила су деца са атопијом односно деца са позитивним *Phadiatop infant*-тестом, тј деца код којих је утврђена серумска концентрацијама специфичних *IgE* у концентрацији $\geq 0,35\ kUA/L$, $n=53$. Контролну групу чинила су деца без атопије односно деца код којих специфична *IgE* антитела у серуму нису доказана у концентрацији $\geq 0,35\ kUA/L$, односно код којих је *Phadiatop infant*-тест био негативан, $n=110$.

Концентрације СС16 у серуму одређиване су квантитативним имуноензимским тестом – *Human Clara Cell protein ELISA* (*Enzyme linked immunosorbent assay*) произвођача *BioVendor Laboratorni medicina a.s Modrice, Czech Republic*. Тест је оптималан за концентрације хуманог протеина Клара ћелија 2- 100ng/ml . Према подацима произвођача антитела која се користе у овом тесту су специфична за хумани протеин Клара ћелија и не постоји укрштена реактивност са цитокинима који би могли бити присутни у хуманом серуму. Основни стандард (100ng/ml) добијен је додавањем разблаживача у лиофилизован СС16 протеин, а прављење осталих стандарда добијено је двоструким разблаживањем. У току процедуре стандарди и узорци серума су разблажени 25х оригиналним разблаживачем ($5\mu\text{l}$ узорка + $120\mu\text{l}$ разблаживач) и у количини од $100\ \mu\text{l}$ стављани у бунарчиће плоче који су обложени поликлоналним

антителима према хуманом протеину Клара ћелија. Након инкубације од 1 сата на собној температури и испирања додато је 100 μl поликлоналних антитела према хуманом протеину Клара ћелија која су обележена биотином, и после инкубације од једног сата и додато је 100 μl коњугата стрептавидина и пероксидазе (*HRP*), који је инкубиран један сат. После додавања 100 μl раствора субстрата (H_2O_2 и тетра-метил-бензидин – ТМБ) и инкубације од 10 минута у мрачној средини, реакција је стопирана са 100 μl киселине. Интензитет боје пропорционалан је нивоу концентрације хуманог протеина Клара ћелија и фотометријски се вредновала у периоду од 7-8 минута од заустављања реакције. Оптичка густина је читавана на 405nm са референтном таласном дужином од 630 nm. Серумске концентрације *CC16* добијене су софтверским програмом *4PL (4 Parameter Logistics)* методом која подразумева конструисање стандардне криве концентрација на основу оптичких густина стандарда у логаритамској скали коју чини алгоритам од најмање 4 параметра. Укупан број резултата концентрације *CC16* који су укључени у истраживање био је 163.

Концентрације *TNF α* у серуму одређиване су квантитативним имуноензимским тестом – *Human TNF α ELISA MAXTM Deluxe Sets* произвођача *BioLegend, San Diego, USA*. У бунарчићима на празној плочи у току 16 сати на $+4^{\circ}\text{C}$ инкубирана су специфична моноклонска антитела према хуманом *TNF α* . Након испирања се ради блокирања неспецифичног везивања у сваки бунарчић стављало по 200 μl оригиналног разблаживача уз инкубацију од један сат. После реконституције основног лиофилизованог стандарда хуманог *TNF α* направљени су остали стандарди двоструким разблаживањем (250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9 $\mu\text{g/ml}$ и 0 само пуфер). По 100 μl стандарда и серума додато је у бунарчиће и инкубирано је 2 сата а након испирања додато су детекциона антитела према *TNF α* . После једног сата додато је 100 μl Авидин-*HRP*, а после 30 минута и 100 μl ТМБ. Ензимска реакција је стопирана после 15 минута са 100 μl 2N H_2SO_4 . Интензитет добијене жуте боје пропорционалан је нивоу концентрације хуманог *TNF α* и фотометријски се читавала у периоду од 30 минута од заустављања реакције. Серумске концентрације *TNF α* добијене су софтверским програмом која подразумева конструисање стандардне криве концентрација на основу оптичких густина стандарда у логаритамској скали коју чини алгоритам од 7 параметра. Укупан број резултата концентрације *TNF α* који су укључени у истраживање био је 66.

Концентрације *TSLP* у серуму одређиване су квантитативним имуноензимским тестом – *Human TSLP ELISA MAXTM Deluxe Sets* произвођача *BioLegend, San Diego, USA*.

У бунарчиће на празној плочи у току 16 сати на $+4^{\circ}\text{C}$ инкубирана су специфична моноклонска антитела према хуманом *TSLP*. После испирања се ради блокирања неспецифичног везивања у сваки бунарчић стављало по 200 μl оригиналног разблаживача а плоче су инкубирале један сат. После реконституције основног лиофилизованог стандарда направљени су остали стандарди двоструким разблаживањем (250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9 pg/ml и 0 само пуфер). По 100 μl стандарда и серума додато је у бунарчиће и инкубирано је 2 сата на собној температури, а после испирања су додата детекциона антитела. После инкубације од једног сата и испирања додато је 100 μl Авидин-*HRP* а после инкубације од 30 минута и 100 μl ТМБ. Ензимска реакције је стопирана после 25 минута са 100 μl 2N H_2SO_4 . Интензитет жуте боје пропорционалан је нивоу концентрације хуманог *TSLP* и фотометријски се вредновала у периоду од 30 минута од заустављања реакције. Оптичка густина је очитавана на 450nm са референтном таласном дужином од 600 nm. Серумске концентрације *TSLP* добијене су софтверским програмом која подразумева конструисање стандардне криве концентрација на основу оптичких густина стандарда у логаритамској скали коју чини алгоритам од 6 параметра. Укупан број резултата концентрације *TSLP* који су укључени у истраживање био је 117.

Концентрације IL-10 у серуму одређиване су квантитативним имуноензимским тестом –*Human IL-10 ELISA MAXTM Deluxe Sets* произвођача *BioLegend, San Diego, USA*. У бунарчиће на празној плочи у току 16 сати на $+4^{\circ}\text{C}$ инкубирана су специфична моноклонска антитела према хуманом *IL-10*. После испирања се ради блокирања неспецифичног везивања у сваки бунарчић стављало по 200 μl оригиналног разблаживача, а плоче су се инкубирале један сат на собној температури. После реконституције основног лиофилизованог стандарда хуманог *IL-10* направљени су остали стандарди двоструким разблаживањем (250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9 pg/ml и 0 само пуфер). По 100 μl стандарда и серума додато је у бунарчиће и инкубирано је 2 сата на собној температури а након испирања додата су детекциона антитела према *IL-10* која су инкубирана један сат на собној температури. После испирања додато је 100 μl Авидин-*HRP*, и инкубиран 30 минута а затим и 100 μl ТМБ. Ензимска реакција је стопирана после 15 минута са 100 μl 2N H_2SO_4 . Интензитет жуте боје пропорционалан је нивоу концентрације хуманог *IL-10* и фотометријски се вредновала у периоду од 30 минута од заустављања реакције. Серумске концентрације *IL-10* добијене су софтверским програмом која подразумева конструисање стандардне криве

концентрација на основу оптичких густина стандарда у логаритамској скали коју чини алгоритам од 7 параметра. Укупан број резултата *IL-10* који су укључени у истраживање био је 146.

Концентрације *TGFβ1* у серуму одређиване су квантитативним имуноензимским тестом – *DRG ELISA- Kit (DRG Enzyme linked immunosorbent assay, Kit)* произвођача *DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany*. Према подацима произвођача не постоји укрштена реактивност специфичних антитела према *TGFβ1* која се користе у овом тесту са *TGFβ2* и *TGFβ3*. Према упутству произвођача пре извођења теста серуми су разблажени пуфером у односу 1:50 (10 μl серума + 490 μl оригиналног пуфера), а стандарди су добијени двоструким разблажењима са оригиналним пуфером и то: 600, 300, 150, 75, 38, 19 pg/ml и 0 – само пуфер. По процедури методологије 200 μl стандарда и узорака серума су се ацидификовала са 20 μl 1N *HCl* уз мешање на вортексу, а након 15 минута извршена је неутрализација са 20 μl 1N *NaOH*. Потребна неутрална рН вредност стандарда и узорака проверавана је за сваки узорак универзалним лакмус папиром. Стандарди и серуми са рН вредношћу између 7 и 8 су у количини од 100 μl стављани у бунарчиће плоче који су обложени поликлоналним антителима према *TGFβ1*. Након прве инкубације од 16 сати на +4°C и испирања додато је 100 μl моноклонских мишијег анти-*TGFβ1* антитела. После инкубације од 120 минута додат је коњугат - 100 μl анти-мишијих IgG антитела коњугована са биотином и после инкубације од 45 минута и испирања додаје се комплекс стрептавидина и пероксидазе (*HRP*). После 45 минута додато је 100 μl раствора субстрата (тетра-метилбензидина – ТМБ), а ензимска реакција је стопирана после 15 минута са 50 μl стоп солуције (0,5M H_2SO_4). Интензитет боје пропорционалан је нивоу концентрације *TGFβ1* и фотометријски се вреднује унутар 10 минута од заустављања реакције, а оптичка густина се читава на 450nm са референтном таласном дужином од 600 nm. Уз помоћ софтверског програма израчунавање серумске концентрације *TGFβ1* вршено је аутоматски *4PL (4 Parameter Logistics)* методом уз корекцију разблажења. Укупан број резултата концентрације *TGFβ1* који су укључени у истраживање био је 138.

Концентрације *IgA* и *IgG* према *PCB* у серуму одређиване су квантитативним имуноензимским тестом – *ELISA- Enzyme linked immunosorbent assay*, произвођача - *SERION ELISA classic, Institut Virion/Serion GmbH, Würzburg, Germany*. Серумске концентрације специфичних антитела према *PCB* израчунате су на основу вредности

оптичких густина, 4PL методом (*Single-point quantification using the 4PL method*) уз помоћ софтверског програма *SERION easy base 4PL-Softwarey evaluate*. Укупан број резултата концентрације IgA према RSV који су укључени у истраживање био је 96, а IgG према RSV био је 113.

3.3.2 Подаци о болестима доњих дисајних путева

У узрасту од 5 до 24 месеци анализом база података Дома здравља на основу Међународне класификације болести формиране су групе на основу манифестованих болести доњих дисајних путева од рођења до три недеље пре укључивања у студију и то: са болестима доњих дисајних путева (J20 – акутни бронхитис, J21 – бронхиолитис, J44.9 – хронична опструктивна болест плућа - неklasификована, J45- астма и J12-18 – упале плућа) и без болести доњих дисајних путева. Деца са дијагнозама J20 и J21 имала су акутни визинг, док су деца са дијагнозама J44.9 и J45 имала хронични визинг. Континуирани визинг три и више месеци одређен је на основу постојања првих куративних прегледа због болести доњих дисајних путева на које су се надовезивали контролни прегледи, а што се понављало у току најмање три месеца. У узрасту од 5 до 24 месеца праћене су и болести горињих дисајних путева и то: J00 – акутни ринитис, J02 – акутни фарингитис, H65 – акутна упала средњег ува, J04 – ларингитис.

Подаци о болестима доњих дисајних путева током 2016. године прикупљани су из базе података: Дома здравља, Одељења за статистику ИЗЈЗ о хоспитализованим пацијентима у КЦ Крагујевац, пацијената Одељења за алергологију и имунологију ИЗЈЗ, као и приватне педијатријске ординације др Банковић у Крагујевцу и обухватили су: J20- акутни бронхитис, J40- хронични бронхитис неklasификован, J44 – хронични опструктивни бронхитис, J44.1- хронични опструктивни бронхитис са акутном егзарцербацијом, J45 – астма, J15- бактеријска упала плућа, J18- упала плућа неутврђеног узрочника, R05 – кашаљ.

3.4 Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: Индивидуалне карактеристике: узраст (континуирана или категорисана), пол (0=мушки, 1=женски), начин исхране (0=сиса, 1=не сиса), време протекло од престанка сисања (0=сиса, 1=1-3 месеца од престанка сисања, 2= ≥ 4 месеца од престанка сисања), алергија у породици (0=не, 1=да); Болести доњих дисајних путева (категоријске варијабле): акутне бронхијалне болести (J20 и J21) (0=не,

1=да), хроничне бронхијалне болести (J44.9 и J45) (0=не, 1=да), упала плућа (J12-18) (0=не, 1=да) и континуиране варијабле : број болести доњих дисајних путева и серумске концентрације IgA и IgG према RSV; Атопија (категоријска варијабла): 0=без атопије (Phadiator infant негативан, специфична IgE <0,35kUA/l), 1=атопија (Phadiator infant позитиван , специфична IgE \geq 0,35kUA/l); Серумски биомаркери: континуиране варијабле total IgE (kU/l), ECP (μ g/l), TNF α (pg/ml), TSLP (pg/ml), IL-10 (pg/ml), TGF β 1 (ng/ml) и категоријске у односу на добијене cut off вредности..

Зависна варијабла: концентрација CC16 у серуму (ng/ml).

3.5 Снага студије и величина узорка

Снага студије је вероватноћа да се открије разлика између испитиваних група, која заиста постоји и израчуната је коришћењем статистичког програма *G*Power3*.

За χ^2 тестове: у којима је постигнута статистичка значајност са вероватноћом грешке (p) < 0,05 на узорку од 163 испитаника за учесталост акутног ринитиса у односу на атопију за број степени слободе (df) 1 и велику јачину везе ($w=0,66$) снага студије је износила 97%; на узорку од 53 испитаника деце са атопијом за учесталост акутног и хроничног визинга у односу на упалу плућа за df2 и велику јачину везе ($w=0,50$) снага студије је 91%; а на узорку деце без атопије ($n=110$) за умерену јачину везе ($w=0,3$) снага студије је 81%; на узорку од 66 испитаника за учесталост болести доњих дисајних путева у односу на пол за df1 и велику јачину везе ($w=0,65$) снага студије је 100%.

За *t*-тестове (*Mann-Whitney U test*) у којима је постигнута статистичка значајност $p < 0,05$ са икључењем грешке првог реда и са непараметарском Laplace дистрибуцијом варијабли, снага студије је износила: на узорку од 163 испитаника за разлику у укупном IgE у односу на атопију (са атопијом=53, без атопије=110), са великом јачином везе $d=0,99$, снага студије је 100%; на узорку од 29 испитаника за разлику у CC16 у односу на атопију у код женске деце која не сисају (са атопијом=16, без атопије=27), за велику јачину везе $d=0,77$, снага студије је 90,5%; на узорку од 19 испитаника за разлику у CC16 у односу на атопију деце са упалом плућа у узрасту од 8-24 месеца (са атопијом=6, без атопије=13), за велику јачину везе $d=1,04$, снага студије је 81%; и на најмањем узорку од 10 испитаника за разлику у CC16 у односу на атопију деце са упалом плућа и хроничним визингом у узрасту од 8-24 месеца (са атопијом=5, без атопије=5), за велику јачину везе $d=1,45$, снага студије је 84%.

За z тестове у којима је постигнута статистичка значајност $p < 0,05$ са икључењем грешке првог реда добијена је снага студије за тестове: 1) корелације на узорку од 110 испитаника за повезаност узраста и СС16 код деце без атопије за умерену јачину везе снага студије је 82%, а за повезаност узраста и СС16 код деце са атопијом за велику јачину везе снага студије је 80%, као и за остале корелације са мањим узорком ($n \leq 16$) а већом јачином везе ($q \geq 1,0$) и 2) логистичке регресије: при дефинисању атопије као фактора ризика за $CC16 \leq 4,8$ ng/ml са OR 3,7 на узорку од 68 деце женског пола снага студије је 83%; на узорку од 72 деце узраста 8-24 месеца снага студије је 93%

За F тестове линеарне регресије: испитивање укупног IgE као предиктора броја болести доњих дисајних путева на узорку од 110 испитаника, за слабу јачину везе $f^2 = 0,042$, снага студије је 60%, док је у групи деце са атопијом испитивање за испитивање TSLP као предиктора броја болести доњих дисајних путева за велику јачину везе $f^2 = 0,328$ снага студије је 83%; за предикторе концентрације TSLP код деце без атопије $n=87$ (дужина дојења и број фарингитиса) за велику јачину везе $f^2 = 0,203$, снага стидије је 97%, а код деце са атопијом $n=87$ (број хроничних бронхитиса) за велику јачину везе $f^2 = 0,312$, снага студије је 81%.

3.6 Статистичка обрада података

Разлика у учесталости индивидуалних карактеристика и болести доњих дисајних путева у односу на атопију рађена је χ^2 тестом и Fisher-овим тестом у случају броја испитаника у испитиваној категорији ≤ 5 . Разлике у СС16 између деце са атопијом и деце без атопије, односно између категорија испитиваних варијабли унутар групе деце са атопијом и без атопије вршено је непараметријским *Mann Whitney* тестом а уколико је разлика присутна, ROC кривом су одређиване cut off вредности концентрације СС16 у серуму. Повезаност између СС16 и испитиваних серумских биомаркера вршена је непараметрисјким тестом корелације (Spearman). Анализом главних компонената (енг. *Principal Component Analysis – PCA*) издвојени су фактори унутар којих се групишу испитиване варијабле методом директне *Oblimin* ротације, а статистичка значајност је дефинисана на основу коефицијената КМО (*Kaiser-Meyer-Olkin*) адекватности узорка или *Bartlett's* теста сферичности ($p \leq 0,050$), са варијаблама чији је комуналитет $\geq 0,200$, са исказаним факторским оптерећењем (F) у матриксу обрасца (*Pattern Matrix*). Логистичком регресијом утврђени су модели повезаности између зависне варијабле, и

сетова обележја као независних варијабли. У циљу утврђивања предсказујућих фактора за концентрације СС16 у серуму $\leq 4,8$ ng/ml испитивана обележја смо издвојили на основу повезаности обележја у факторској анализи. Модел логистичке регресије је дефинисан вредностима: B – коефицијент вероватноће, SE – стандардна грешка, W – допринос променљиве, $\text{Exp}(B)$ – количник вероватноће). Статистичка значајност модела заснива се на разлици између модела у блоку 0 (очекивани резултати анализе без иједне независне променљиве од којих се модел састоји) и блока 1 (добијени резултати анализе у коју су укључена испитивана обележја), а дефинисана је вредностима hi -квдрата - s^2 при одређеном броју степени слободе и броју случајева укључених у модел, као и нивом значајности (p). Распон процента варијансе зависне променљиве, који објашњава модел логистичке регресије дефинисан је са вредностима r^2 по *Cox*, *Snell* и *Nagelkerke*. Резултат логистичке регресије приказан је вредностима коефицијента вероватноће - Odds Ratio (OR) и интервалом поверења за тачност тврдње од 95% (CI 95%). Линеарном регресијом испитан је утицај независних променљивих на број болести доњих дисајних путева у групи деце са и без атопије, као и предиктора концентрације TSLP, односно IL-10. Значајност модела линеарне регресије дефинисана је вредностима: F –одступање збирова квадрата резултата од њихове средње вредности при одређеном броју степени слободе и броју случајева укључених у модел, као и нивом значајности (p). Предсказујући фактори објашњени су вредностима нивоа значајности, јединственог статистичког доприноса варијанси зависне променљиве и вредношћу r^2 – процентом варијансе који је објашњен тим фактором. Концентрације испитиваних биомаркера приказане су као медијане концентрација (Md), бројем испитаника (n), распоном концентрација ($range$) и интеркварталном рангу (IQR).

3.7 Етички принципи

Испитивање је спроведено у складу са етичким стандардима Хелсиншке декларације из 1975. године, ревидиране 1983. године. Студија је одобрена од стране Етичког одбора ИЗЈЗ у Крагујевцу (01-5163/10; 01-6701/17). Узимање биолошког материјала деци (крв) вршено је у здравственој установи уз сагласност родитеља под надзором педијатра, у узрасту у коме се по педијатријском протоколу стандардно проверавају хематолошки параметри крвне слике детета или анализира ризик од развоја алергијских болести.

4. РЕЗУЛТАТИ

Карактеристике испитиване популације приказане су у табелама 1 и 2.

Табела 1. Категоријске карактеристике испитиване групе

Варијабла	Категорија	Укупно (<i>N</i>)	АТОРИЈА (<i>N</i>)		<i>X</i> ² тест (<i>p</i>)
			Са атопијом	Без атопије	
Укупно		163	53	110	
Индивидуалне карактеристике					
Узраст (месеци)	5-7	91	33	58	0,251
	8-24	72	20	52	
Пол	Мушки	95	27	68	0,187
	Женски	68	26	42	
Природна исхрана у тренутку испитивања	Сиса	69	27	42	0,122
	Не сиса	94	26	68	
Алергија у породици	ДА	73	26	47	0,447
	НЕ	90	27	63	
Дијагноза болести доњих дисајних путева					
Болести доњих дисајних путева	ДА	89	28	61	0,753
	НЕ	74	25	49	
Акутне бронхијалне болести (J20, J21)	ДА	78	23	55	0,429
	НЕ	85	30	55	
Хроничне болести бронхија (J45, J44.9)	ДА	36	13	23	0,602
	НЕ	127	40	87	
Упала плућа (J12-18)	ДА	23	8	15	0,802
	НЕ				
Дијагноза болести горњих дисајних путева					
Акутни ринитис (J00)	ДА	103	24	79	0,001
	НЕ	60	29	31	
Акутна упала ждрела (J02)	ДА	69	23	46	0,849
	НЕ	94	30	64	
Ларингитис (J04)	ДА	12	2	10	0,223
	НЕ	151	51	100	

Табела 2. Континуиране карактеристике испитиване групе

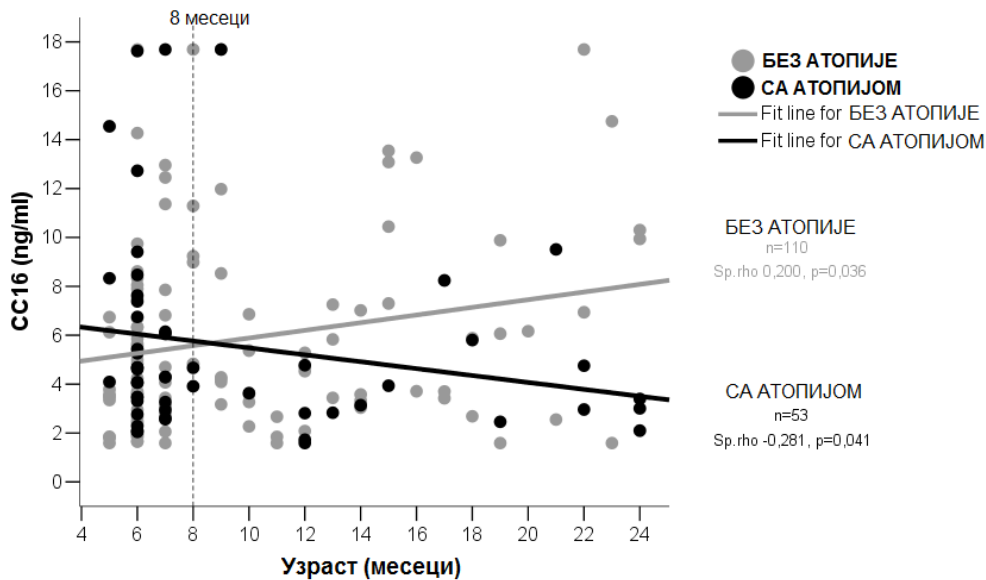
Варијабла	Укупно <i>Md</i> (<i>N</i>)	АТОРИЈА <i>Md</i> (<i>N</i>)		<i>Mann</i> <i>Whitney</i> (<i>p</i>)
		Са атопијом	Без атопије	
Индивидуалне карактеристике				
Узраст (месеци)	7 (163)	7 (53)	7 (110)	0,652
Дужина дојења (месеци)	6 (163)	6 (53)	6 (110)	0,907
Време протекло од престанка дојења	1 (163)	1 (53)	1,5 (110)	0,484
Болести доњих дисајних путева				
Број болести доњих дисајних путева	1 (163)	1 (53)	1 (110)	0,863
Узраст прве болести доњих дисајних путева	6 (89)	6 (28)	6 (61)	0,676
Време од задње болести доњих дис. путева	2 (89)	2 (28)	2 (61)	0,753
Серумски биомаркери				
CC16 (ng/ml)	4,3 (163)	4,1 (53)	4,6 (110)	0,605
Укупни IgE (kU/L)	5,1 (163)	33,1 (53)	3,7 (110)	0,000
ЕСР (μg/L)	7,3 (145)	9,7 (42)	6,5 (103)	0,004
TNFα	0,0 (66)	0,0 (66)	0,15 (50)	0,217
TSLP (pg/ml)	25,0(117)	19,7 (29)	30,0 (88)	0,086
IL-10 (pg/ml)	8,0 (146)	8,8 (43)	6,4 (103)	0,396
TGFβ1 (ng/ml)	20,5 (138)	21,5 (46)	19,7 (92)	0,527
Хуморални одговор на респираторни синцицијални вирус				
IgG RSV (U/ml)	1,2 (113)	3,4 (31)	1,1 (82)	0,022
IgA RSV (U/ml)	2,2 (96)	3,2 (21)	2,0 (75)	0,190

4.1. CC16 и индивидуалне карактеристике у односу на атопију

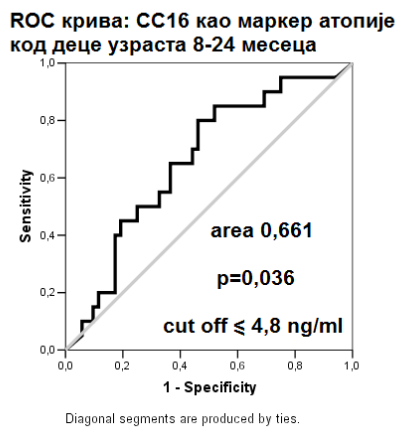
4.1.1. CC16 и узраст

Код деце са атопијом постоји позитивна корелација узраста и серумске концентрације CC16 ($r = -0,281$, $p = 0,041$, $n = 53$), док је у групи деце без атопије ова повезаност негативна ($r = 0,200$, $p = 0,036$, $n = 110$), графикон 1.

Графикон 1. Корелација CC16 и узраста код деце са и без атопије



Графикон 2. CC16 као маркер атопије код деце узраста 8-24 месеца



У узрасту 5-7 месеци нема разлике у CC16 између деце са атопијом и без атопије ($Md = 4,6$, $n = 33$ vs $Md = 3,9$ ng/mL, $n = 58$, $p = 0,223$), док у старијем узрасту (8-24 месеца) деца са атопијом имају ниже концентрације CC16 у серуму у односу на децу без атопије ($Md = 3,5$ ng/mL, range 1,6, IQR 1,95, $n = 20$ vs $Md = 5,3$ ng/mL, range 1,6, IQR 6,4, $n = 52$, $p = 0,036$).

Концентрација CC16 у серуму може бити маркер атопије код деце узраста 8-24 месеца (area 0,661, CI95% 0,525-0,797) за cut off $\le 4,8$ ng/ml, сензитивност 80%, специфичност 54%), графикон 2.

4.1.2. CC16 и пол

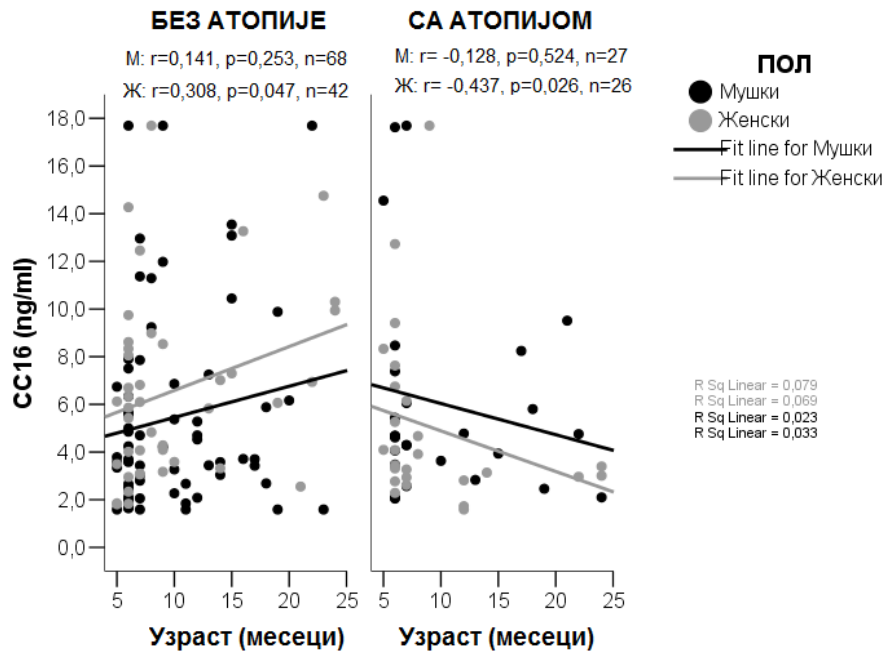
У испитиваној групи није постојала разлика у учесталости атопије у односу на пол (женска деца 38,2%, n=26/68 vs мушка деца 28,4%, n=27/95, p=0,187). Женска деца са атопијом имају мањи CC16 у односу на женску децу без атопије (p=0,031), док у групи мушке деце није утврђена разлика у CC16 у односу на атопију (p=0,253), (табела 3). У групи деце са атопијом није постојала статистички значајна разлика у CC16 између женске и мушке деце (Md=3,4 ng/ml, n=26 vs 4,7 ng/ml, n=27, p=0,210), али су женска деца без атопије имала већи CC16 (Md=6,1 ng/ml, range 15,9, IQR 5,1, n=42) у односу на мушку децу без атопије (3,7 ng/ml, range 16,1, IQR 4,3, n=68), p=0,031.

Табела 3. CC16 у односу на атопију, пол и узраст

Варијабла	Категорија	CC16 (ng/ml), Md (N)		Mann Whitney (p)
		Са атопијом	Без атопије	
Пол	Женски	3,4 (26)	6,1 (42)	0,031
	Мушки	4,7 (27)	3,7 (68)	
<i>Mann Whitney (p)</i>		0,210	0,031	
Варијабла	Категорија	CC16 (ng/ml), Md (N)		Mann Whitney (p)
		Са атопијом	Без атопије	
Женски	5-7 месеци	4,1 (16)	5,9 (23)	0,767
	8-24 месеца	3,1 (10)	6,9 (19)	0,005
<i>Mann Whitney (p)</i>		0,165	0,126	
Мушки	5-7 месеци	4,7 (26)	3,6 (42)	0,076
	8-24 месеца	4,3 (27)	4,5 (68)	0,724
<i>Mann Whitney (p)</i>		0,167	0,570	

Корелација CC16 и узраста код деце мушког и женског пола са и без атопије приказана је на графикону 3. Мушка деца са атопијом у узрасту 5-7 месеци имала су већи CC16 у односу на мушку децу без атопије, али та разлика није достигла статистичку значајност (Md=4,7 ng/ml, n=17 vs Md=3,6 ng/ml, n=35, p=0,076), а у узрасту од 8-24 месеца није било разлике у CC16 између мушке деце са и без атопије (4,3 vs 4,5 ng/ml, p=0,724). У групи женске деце у узрасту 5-7 месеци, није било разлике у CC16 између деце са и без атопије (4,1 vs 5,9 ng/ml, p=0,767), док су у узрасту 8-24 месеци, женска деца са атопијом имала мањи CC16 у односу на женску децу без атопије (Md=3,1 ng/ml, range 16,1, IQR 1,6, n=10 vs 6,9 ng/ml, range 15,1, IQR 5,9, n=19, p=0,005).

Графикон 3. Корелација СС16 и узраста код деце мушког и женског пола са и без атопије



4.1.3. СС16 и начин исхране

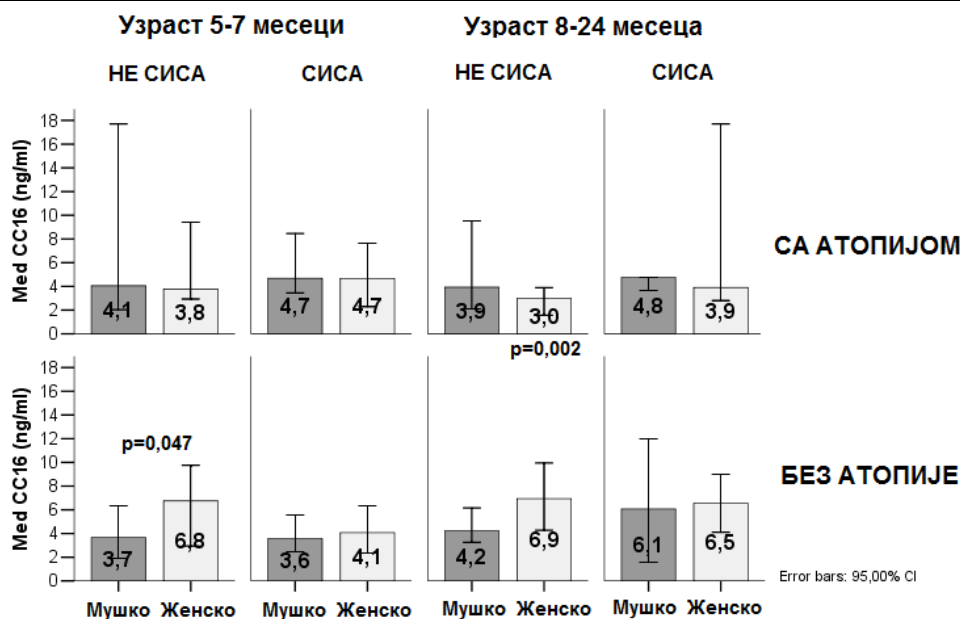
Деца која сисају су млађа од деце која су престала са сисањем (6 vs 9,5 месеци, $p \leq 0,001$; ROC крива: area 0,714, CI95% 0,636-0,791, за cut off $\geq 6,5$ месеци сензитивност 70%, специфичност 56,5%), и у групи деце са атопијом ($p=0,028$) и у групи деце без атопије ($p \leq 0,001$). У групи деце која не сисају у узрасту 8-24 месеца, деца са атопијом имала су мањи СС16 у односу на децу без атопије (3,0 ng/ml, range 7,9, IQR 2,6, vs 5,1 ng/ml, range 16,1, IQR 6,6, $p=0,023$) (табела 4).

Табела 4. СС16 у односу на атопију, исхрану, пол и узраст

Варијабла	Категорија	СС16 (ng/ml), Md (N)		Mann Whitney (p)
		Са атопијом	Без атопије	
Исхрана	Сиса	4,7 (27)	4,0 (42)	0,164
	Не сиса	3,4 (26)	4,9 (68)	0,325
Mann Whitney (p)		0,133	0,329	
Узраст				
Сиса	5-7 месеци	4,7 (20)	3,7 (32)	0,132
	8-24 месеца	4,7 (7)	6,1 (10)	0,536
Mann Whitney (p)		0,766	0,224	
Не сиса	5-7 месеци	4,0 (13)	4,8 (26)	0,648
	8-24 месеца	3,0 (13)	5,1 (42)	0,023
Mann Whitney (p)		0,139	0,272	
Пол				
Сиса	Мушки	4,7 (17)	3,7 (27)	0,233
	Женски	4,4 (10)	4,1 (15)	0,978
Mann Whitney (p)		0,570	0,723	
Не сиса	Мушки	4,0 (10)	3,7 (41)	0,758
	Женски	3,4 (16)	6,8 (27)	0,012
Mann Whitney (p)		0,737	0,016	

У групи деце која сисају није постојала разлика у СС16 између деце мушког и женског пола ни у групи деце са атопијом ($p=0,570$) ни у групи деце без атопије ($p=0,723$). У групи деце која не сисају ($n=94$), код деце са атопијом није утврђена разлика између деце мушког и женског пола у концентрацији СС16 ($p=0,737$), али је у групи деце без атопије утврђено да мушка деца која не сисају у узрасту 5-7 месеци имају мањи СС16 (3,7 ng/ml, range 6,3, IQR 4,3, $n=16$) у односу на женску децу која не сисају у истом узрасту (6,8 ng/ml, range 10,6, IQR 5,5, $n=10$, $p=0,047$), без статистички значајне разлике у групи деце без атопије која не сисају узрасту 8-24 месеца ($p=0,115$). Женска деца са атопијом која не сисају су имала мање концентрације СС16 у односу на женску децу без атопије која не сисају ($p=0,012$), што је статистички значајно само у узрастној групи 8-24 месеца (Са атопијом: 3,0 ng/ml, range 2,3, IQR 1,8, $n=6$ vs Без атопије: 6,9 ng/ml, range 15,1, IQR 6,2, $n=17$, $p=0,002$), графикон 4.

Графикон 4. СС16 у односу на пол и атопије по исхрани у различитим узрастним категоријама



4.1.4. СС16 и алергија у породици

У испитиваној групи деце није било разлике у учесталости податка о алергији у породици између деце са атопијом (49,1%, $n=26/53$) и деце без атопије (42,7%, $n=47/110$), $p=0,447$, али раздвајање података о алергији у породици на врсту болести и оболелог члана породице, показало је деца са атопијом у односу на децу без атопије чешће имају податак о алергијском ринитису у породици (32,1%, $n=17/53$ vs 13,6%, $n=15/95$) и то алергијском ринитису мајке (20,8%, $n=11/53$ vs 4,5%, $n=5/110$, $p=0,001$,

OR 5,5 CI95% 1,8-16,8), што је било статистички значајно у групи мушке деце (са атопијом: 83,3%, n=5/6 vs без атопије 24,7%, n=22/89, Fisher p=0,007; OR 15,2 CI95% 1,7-138,5), и чешће али без статистичке значајности у групи женске деце (60%, n=6/10 vs 34,5%, n=20/58, Fisher p=0,120).

Табела 5. CC16 у односу на атопију и алергију у породици

Варијабла	Категорија	CC16 (ng/ml), Md (N)		Mann Whitney (p)
		Са атопијом	Без атопије	
Алергија у породици	Да	3,8 (26)	4,5 (47)	0,199
	Не	4,7 (27)	4,7 (63)	0,692
	<i>Mann W.(p)</i>	0,171	0,840	
Са алергијом у породици	Мушко	4,0 (12)	4,5 (29)	0,470
	Женско	3,4 (14)	4,9 (18)	0,319
	<i>Mann W.(p)</i>	0,980	0,844	
Без алергије у породици	Мушко	5,8 (15)	3,6 (39)	0,049
	Женско	3,5 (12)	6,5 (24)	0,053
	<i>Mann W.(p)</i>	0,126	0,008	
Алергијски фенотип у породици				
Астма	Да	3,7 (8)	4,2 (17)	0,669
	Не	4,3 (45)	4,7 (93)	0,754
	<i>Mann W.(p)</i>	0,412	0,804	
Алергијски ринитис	Да	3,9 (17)	5,4 (15)	0,889
	Не	4,6 (36)	4,5 (95)	0,390
	<i>Mann W.(p)</i>	0,481	0,744	
Члан породице са алергијом				
Мајка	Да	3,4 (13)	4,3 (17)	0,048
	Не	4,6 (40)	4,7 (93)	0,816
	<i>Mann W.(p)</i>	0,102	0,535	
Отац	Да	4,3 (7)	4,8 (16)	0,720
	Не	4,1 (46)	4,6 (94)	0,494
	<i>Mann W.(p)</i>	0,511	0,997	
Браћа/сестре	Да	4,0 (4)	5,4 (15)	0,124
	Не	4,1 (49)	4,2 (95)	0,934
	<i>Mann W.(p)</i>	0,910	0,290	

Иако податак о алергији у породици није повезан са разликама у CC16 између деце са атопијом и без атопије, раздвајање по полу указује да у групи деце без алергије у породици, мушка деца са атопијом имају веће концентрације CC16 у односу на мушку децу без атопије, (и то у узрасту 5-7 месеци у групи деце без алергије мајке, 4,7 ng/ml, n=15 vs 3,6 ng/ml, n=31, p=0,058), док женска деца са атопијом имају мање концентрације CC16 у односу на женску децу без атопије (табела 5), (у узрасту 8-24 месеца и у групи без алергије мајке 3,1 vs 7,0 ng/ml, p=0,045, и у групи са алергијом мајке 2,6 vs 6,5 ng/ml, p=0,046). У групи мушке деце са атопијом, податак о алергији мајке удружен је са нижим концентрацијама CC16 (3,4 ng/ml, n=6) у односу на мушку децу која су имала атопију без алергије мајке (4,8 ng/ml, n=21, p=0,042), док код девојчица са атопијом, ова разлика није постојала (алергија мајке : 3,4 ng/ml, n=7 vs мајка без алергије: 3,4 ng/ml, n=19, p=1,000).

У групи деце са алергијом мајке, деца са атопијом имају ниже концентрације СС16 у односу на децу без овог података, што је било статистички значајно у узрасту 8-24 месеца ($p=0,005$) и то у подгрупи деце која нису на природној исхрани (Са атопијом: 2,8 ng/ml, range 2,2, IQR 1,75, $n=5$ vs Без атопије: 6,1 ng/ml, range 10,1, IQR 3,7, $n=9$, $p=0,002$) па $CC16 \leq 4,1$ ng/ml код детета које није на природној исхрани у узрасту 8-24 месеца и са податком о алергији мајке може указати на постојање IgE сензибилизације односно атопије (area 0,978, сензитивност 100%, специфичност 89%). У групи деце без атопије, која не сисају у узрасту 5-7 месеци и без податка о алергији мајке, мушка деца имају мањи СС16 у односу на женску децу (3,7 ng/ml, $n=13$ vs 6,8 ng/ml, $n=9$, $p=0,021$).

Логистичка регресија за индивидуалне карактеристике

Анализом главних компонената (PCA), којом су обухваћене карактеристике: узраст (0=5-7, 1=8-24 мес); пол (0=женски, 1=мушки); природна исхрана (0=не сиса, 1=сиса); породична анамнеза за алергије (0=нема, 1=има), атопија (0=без атопије, 1=са атопијом) и СС16 (0= >4,8 ng/ml, 1= $\leq 4,8$ ng/ml), објашњено је 61,5% заједничке варијансе ($p=0,003$) и издвојено је се три главна фактора: 1) Узраст (23,8% варијансе) обухвата: узраст (F -0,795) и исхрану (F 0,769); 2) Алергија (19,2% варијансе) обухвата: атопију (F 0,706), породичну анамнезу за алергију (F 0,567) и СС16 (F 0,539) и 3) Пол (18,5% варијансе) обухвата: пол (F 0,844) и СС16 (F 0,586). Логистичком регресијом испитиван је међусобни однос фактора са највећим факторским оптерећењем на постојање $CC16 \leq 4,8$ ng/ml у детерминисаним категоријама (табела 6).

Табела 6. Индивидуалне карактеристике као предиктори концентрације СС16 у серуму $\leq 4,8$ ng/ml

Узраст	Модел	Варијабле	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95% CI
5-7 месеци	B 0,29, Wald 1,8, Exp(B) 1,33 $c2(2,91)=2,0$, $p=0,366$ $r^2 = 0,022-0,029$	Атопија	0,08	0,45	0,03	0,852	1,09	0,45-2,61
		Мушки пол	0,61	0,43	1,99	0,158	1,84	0,79-4,30
		Constant	-0,09	0,37	0,05	0,817	0,92	
8-24 месеца	B 0,22, Wald 0,9, Exp(B) 1,25 $c2(2,72)=8,0$, $p=0,019$ $r^2 = 0,105-0,140$	Атопија	1,62	0,64	6,48	0,011	5,07	1,45-17,68
		Мушки пол	0,47	0,52	0,82	0,365	1,60	0,58-4,44
		Constant	-0,46	0,44	1,08	0,298	0,63	
Пол	Модел	Варијабле	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95% CI
Женска деца	B 0,00, Wald 0,0, Exp(B) 1,0 $c2(2,68)=6,5$, $p=0,038$ $r^2 = 0,092-0,122$	Атопија	1,32	0,53	6,07	0,014	3,73	1,31-10,6
		Узраст	0,22	0,52	0,19	0,666	1,25	0,45-3,45
		Constant	-0,59	0,40	2,17	0,141	0,56	
Мушка деца	B 0,45, Wald 4,6, Exp(B) 1,6 $c2(2,95)=0,3$, $p=0,854$ $r^2 = 0,003-0,004$	Атопија	0,09	0,47	0,03	0,852	1,09	0,43-2,76
		Узраст	-0,22	0,42	0,26	0,612	0,81	0,35-1,85
		Constant	0,52	0,33	2,58	0,108	1,69	

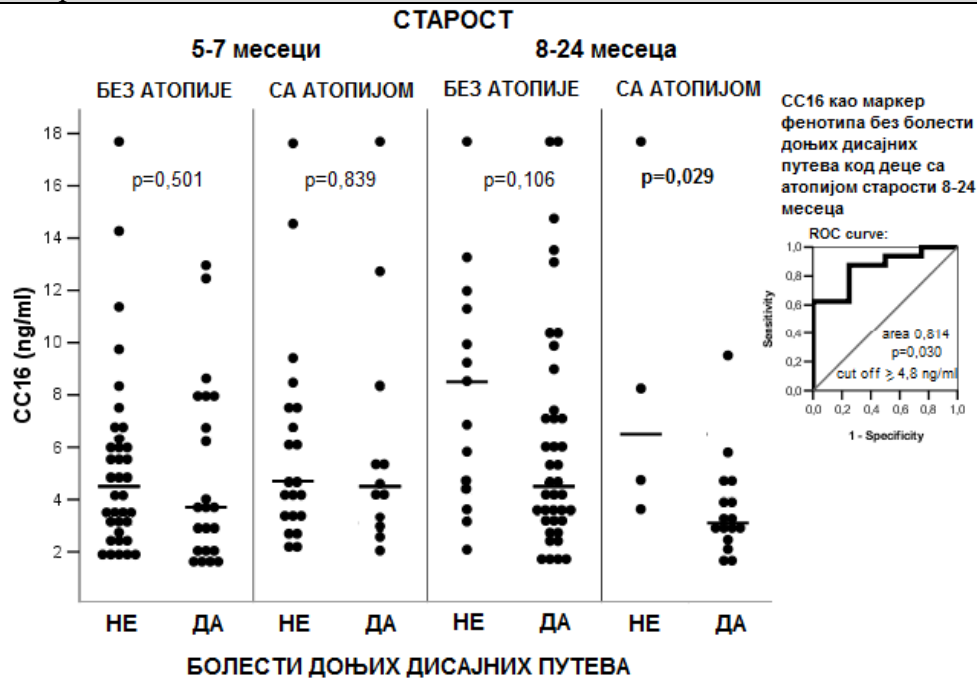
Атопија	Модел	Варијабле	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95% CI
Са атопијом	B 0,67, Wald 5,2, Exp(B) 1,9 c2(2,53)=3,1, p=0,208 r ² = 0,058-0,080	Узраст	1,08	0,66	2,67	0,102	2,95	0,81-10,79
		Мушки пол	-0,28	0,60	0,22	0,639	0,76	0,23-2,44
		Constant	0,45	0,47	0,91	0,340	1,57	
Без атопије	B 0,07, Wald 0,15, Exp(B) 1,1 c2(2,110)=6,7, p=0,036 r ² = 0,059-0,079	Узраст	-0,48	0,40	1,50	0,221	0,62	0,28-1,34
		Мушки пол	0,93	0,41	5,24	0,022	2,54	1,14-5,64
		Constant	-0,27	0,36	0,57	0,448	0,76	

4.2. CC16 и болести доњих дисајних путева у односу на атопију

У групи деце са болестима доњих дисајних путева (n=89), између деце са атопијом и деце без атопије, није било статистички значајне разлике у узрасту (10 месеци, n=28 vs 10 месеци, n=61, p=0,929), броју болести доњих дисајних путева (2x vs 2x, p=0,253), средњем узрасту у коме се манифестовала прва болест доњих дисајних путева (6 vs 6 месеци, p=0,676), нити у времену које је протекло од последње дијагнозе болести доњих дисајних путева (2 vs 2 месеца, p=0,753). Деца са болестима доњих дисајних путева била су старија од деце без овог податка (10 vs 6 месеци, p<0,001, за cut off $\geq 7,5$ месеци сензитивност 62%, специфичност 77%, ареа 0,742, CI95% 0,666-0,818) и у групи деце са атопијом (10 vs 6 месеци, p=0,001) и у групи деце без атопије (10 vs 6 месеци, p<0,001).

Деца са атопијом и болестима доњих дисајних путева у узрасту 8-24 месеца имала су мањи CC16 (3,07 ng/ml, range 7,92, IQR 1,94, n=16) у односу на децу без атопије са болестима доњих дисајних путева у истом узрасту (4,53 ng/ml, range 16,1, IQR 4,03, n=39), Mann-Whitney p=0,026. Деца са атопијом и болестима доњих дисајних путева у узрасту 8-24 месеца имала су такође мањи CC16 (3,07 ng/ml) у односу на децу са атопијом без болести доњих дисајних путева у истом узрасту (6.51 ng/ml, range 14.6, IQR 11.4, n=4), Mann-Whitney p=0.029. Код деце са атопијом старости 8-24 месеца концентрације CC16 у серуму $\geq 4,8$ ng/ml указују на фенотип без болести доњих дисајних путева (сензитивност 75%, специфичност 87,5%, ареа 0,859). Код деце са атопијом старости 5-7 месеци, није било разлике у CC16 у односу на болести доњих дисајних путева (Са болестима: 4,5 ng/ml, n=12 vs Без болести: 4,7 ng/ml, n=21, P=.839), (графикон 5).

Графикон 5. СС16 као маркер фенотипа без болести доњих дисајних путева код деце са атопијом старости 8-24 месеца



Варијабла	БОЛЕСТИ ДОЊИХ ДИСАЈНИХ ПУТЕВА	СА АТОПИЈОМ Md (n)	БЕЗ АТОПИЈЕ Md (n)	Mann Whitney p
Болести доњих дисајних путева	Укупно	4,09 (53)	4,61 (110)	0,605
	ДА	3,65 (28)	4,09 (61)	0,324
	НЕ	4,68 (25)	5,00 (49)	0,719
	Mann Whitney p	0,051	p=0,465	

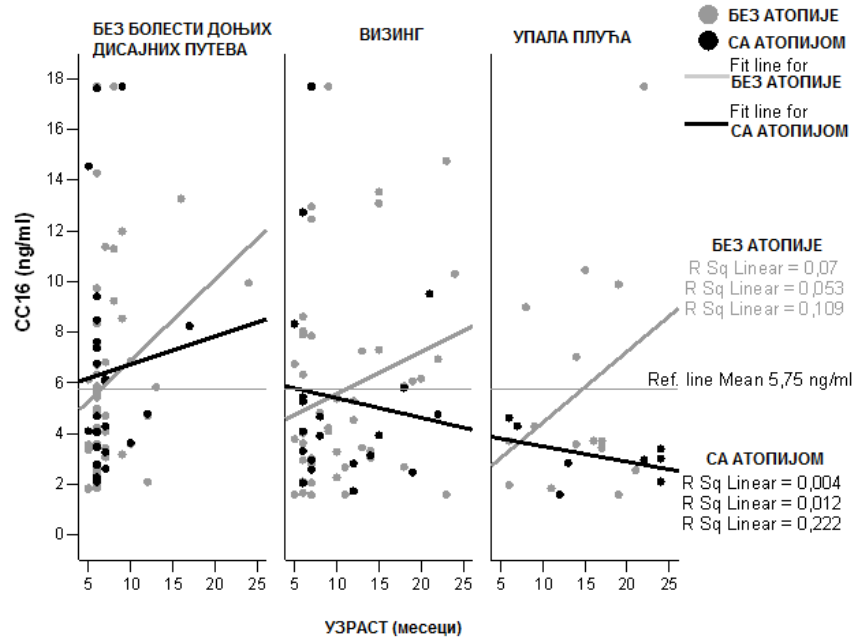
СТАРОСТ	БОЛЕСТИ ДОЊИХ ДИСАЈНИХ ПУТЕВА	СА АТОПИЈОМ Md (n)	БЕЗ АТОПИЈЕ Md (n)	Mann Whitney p
5-7 месеци	Укупно	4,61 (33)	3,90 (58)	0,223
	ДА	4,45 (12)	3,66 (22)	0,292
	НЕ	4,68 (21)	4,47 (36)	0,418
	Mann Whitney p	0,839	0,501	
8-24 месеца	Укупно	3,51 (20)	5,33 (52)	0,036
	ДА	3,07 (16)	4,53 (39)	0,026
	НЕ	6,51 (4)	8,53 (13)	0,936
	Mann Whitney p	0,029	0,106	

4.2.1. СС16 код деце са различитим болестима доњих дисајних путева

Није постојала повезаност између концентрације СС16 у серуму и броја предходно манифестованих болести доњих дисајних путева ни у групи деце са атопијом ($r = -0,147$, $p=0,455$, $n=28$) ни у групи деце без атопије ($r = 0,127$, $p=0,330$, $n=61$). На графикону 6 приказане су концентрације СС16 у категоријама деце 0=без болести доњих дисајних путева, 1=са визингом (J20, J21, J44.9, J45), 2=са упалом плућа (J12-18). Код деце без атопије постоји тенденција повећања СС16 без обзира на болести доњих дисајних путева, при чему је статистички значајан пораст утврђен у групи деце без атопије и без болести доњих дисајних путева ($r=0,354$, $p=0,013$, $n=49$). У групи деце са атопијом која су предходно испољила болести доњих дисајних путева постоји

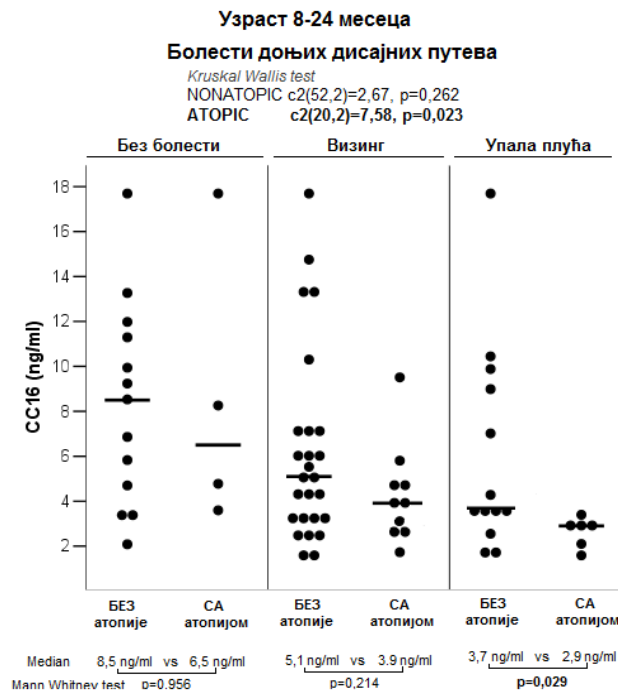
тенденција смањења CC16 са узрастом, али без статистичке значајности ($r = -0,289$, $p = 0,136$, $n = 28$).

Графикон 6. Концентрације CC16 у серуму код деце са болестима доњих дисајних путева са и без атопије у односу на узраст



На графикону 7 приказане су разлике у концентрацији CC16 између деце са атопијом и без атопије у категоријама различитих болести доњих дисајних путева, као и разлике унутар групе деце са атопијом и без атопије.

Графикон 7. CC16 у односу на атопију у различитим болестима доњих дисајних путева

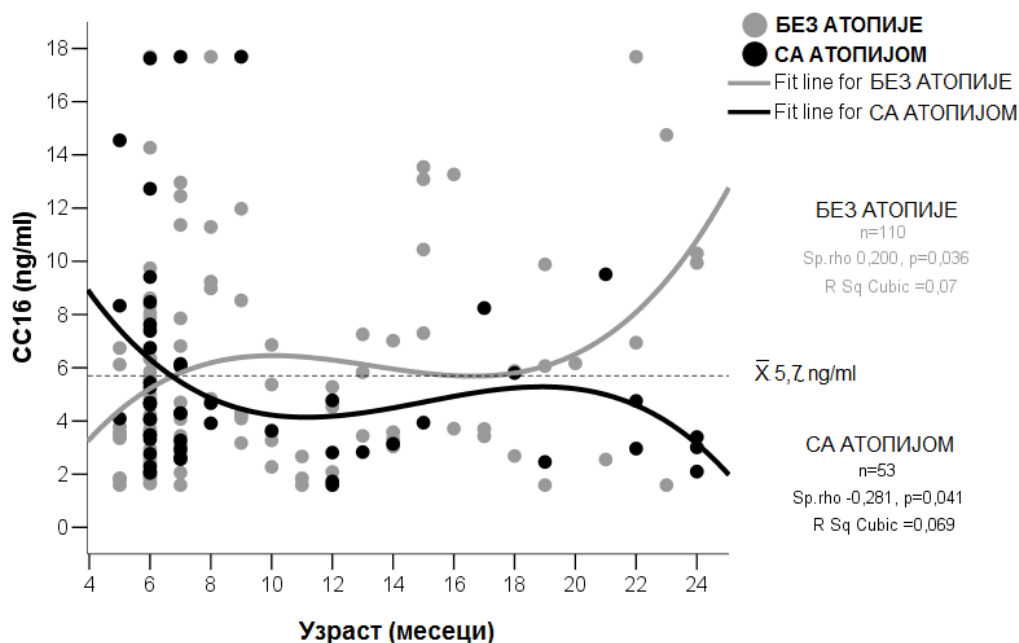


У групи деце без атопије није постојала статистички значајна разлика у СС16 у односу на врсту болести доњих дисајних путева (Kruskal Wallis $p=0,755$), док је та разлика постојала у групи деце са атопијом (Kruskal Wallis $p=0,040$), и то у узрасту од 8-24 месеца ($p=0,023$), а без разлике у узрасту од 5-7 месеци ($p=0,975$).

У групи деце старости 8-24 месеца са предходно манифестованом упалом плућа, деца са атопијом имала су мањи СС16 (2,9 ng/ml, range 1,81, IQR 1,13, $n=6$) у односу на децу без атопије (3,7 ng/ml, range 16,1, IQR 6,45, $n=13$), Mann Whitney $p=0,029$, без разлике у узрасту у коме је дијагностикована упала плућа (9,5 vs 11 месеци, $p=0,831$) или времену које је протекло од те дијагнозе (4 vs 4,5 месеци, $p=0,442$).

Концентрација СС16 $\leq 3,4$ ng/ml може бити маркер атопије у групи деце старости 8-24 месеца и предходно манифестованом упалом плућа (area 0,814, сензитивност 100%, специфичност 77%). Како би смо утврдили утицај узраста и упале плућа на утврђене ниске концентрације СС16 ($\leq 3,4$ ng/ml) код деце са атопијом применили смо униваријантну анализу варијансе ($F(3,49)=11,3$, $p<0,001$), која је показала независни утицај узраста ≥ 8 месеци ($r^2 0,122$, $p=0,012$) и интерреакције узраста и упале плућа ($r^2 0,124$, $p=0,011$) на мале концентрације СС16 код деце са атопијом, без независног значаја само прележане упале плућа ($p=0,272$).

Графикон 8. Интерполиране криве тренда корелације СС16 и узраста



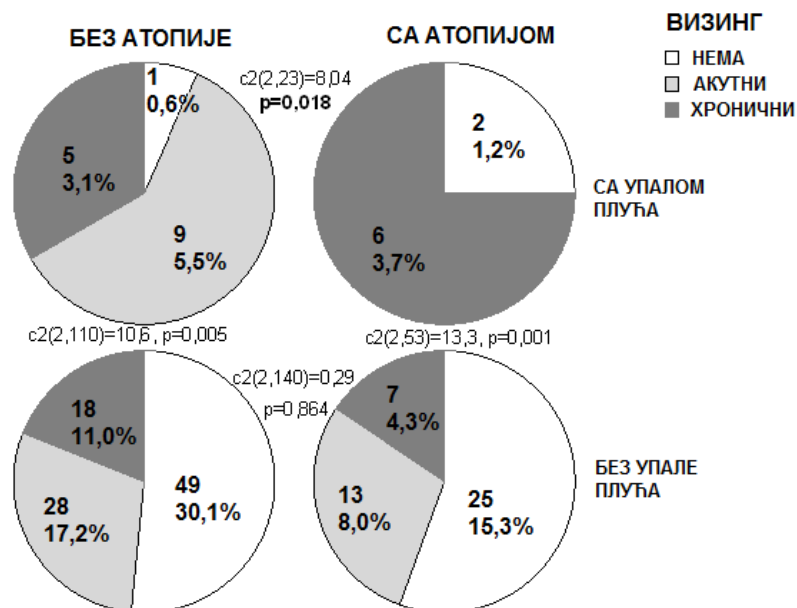
Кубично интерполиране криве тренда корелације СС16 и узраста приказане су на графикону 8. Деца са атопијом која су имала СС16 $\leq 3,4$ ng/ml била су старија у односу

на децу са атопијом и већим концентрацијама СС16 (12 vs 6 месеци, Mann Whitney $p=0,013$, area 0,700, за cut off ≥ 11 месеци сензитивност 53%, специфичност 82%).

4.2.1.1. БХР фенотип са малим концентрацијама СС16 у серуму

У групи деце са атопијом и упалом плућа ($n=8$), податак о хроничној бронхијалној болести постојао је у 75% ($n=6/8$), а упала плућа без визинга је утврђена код 25% ($n=2/8$), док је у групи деце без атопије са упалом плућа ($n=15$) постојао податак о предходно манифестованој акутној бронхијалној болести у 60% ($n=9/15$), хроничној бронхијалној болести у 33,3% ($n=5/15$), а упала плућа без визинга утврђена је у 6,7% ($n=1/15$), таблица контингенције 2x3, $p=0,018$, графикон 9.

Графикон 9. Разлике у дистрибуцији акутног и хроничног визинга у односу на упалу плућа између деце са атопијом и без атопије



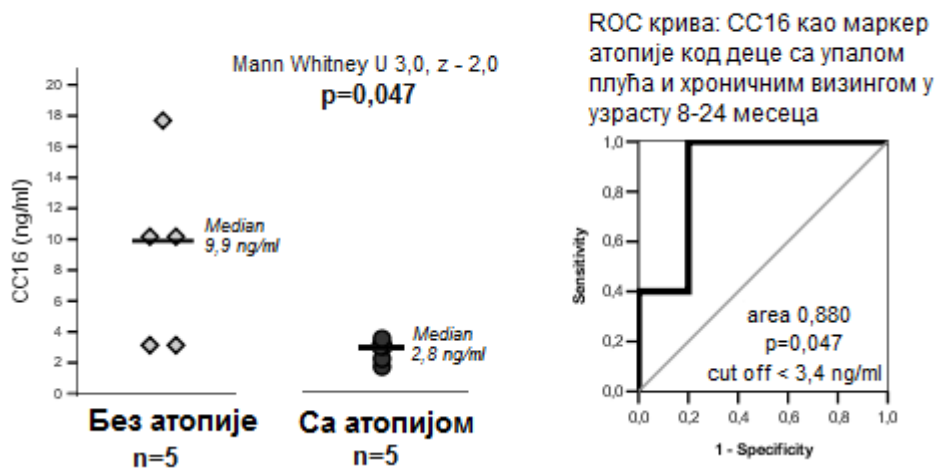
Варијабла	Категорија	СА АТОПИЈОМ, n=53			БЕЗ АТОПИЈЕ, n=110		
		Упала плућа		p	Упала плућа		p
		ИМА n=8	НЕМА n=45		ИМА n=15	НЕМА n=95	
ВИЗИНГ	Хронични	75% (6)	15,6% (7)	0,001	33,3% (5)	18,9% (18)	0,005
	Акутни	0 (0)	28,9% (13)		60% (9)	29,5% (28)	
	Без визинга	25% (2)	55,6% (25)		6,7% (1)	51,6% (49)	

Деца са атопијом, упалом плућа и хроничним визингом имају мањи СС16 у односу на децу без атопије са истим фенотипом ($p=0,068$), али је та разлика била статистички значајна само у узрасту 8-24 месеци (са атопијом : 2,8 ng/ml, range 1,81,

IQR 1,34, n=5 vs без атопије: 9,9 ng/ml, range 15,1, IQR 10,9, n=5, p=0,047). У групи деце узраста 8-24 месеци која су имала упалу плућа и хроничну бронхијалну болест, концентрација СС16 у серуму $\leq 3,4$ ng/ml може бити маркер атопије са сензитивношћу 100% и специфичношћу 80%, (ареа 0,880), графикон 10. У групи деце са атопијом узраста 8-24 месеца сва деца са упалом плућа и хроничним визингом су имала СС16 $\leq 3,4$ ng/ml (100%, n=5/5) док је у групи деце без овог фенотипа то био случај у 33,3% (n=5/15), Fisher p=0,016.

Графикон 10. СС16 као маркер атопије код деце старости 8-24 месеца која су испољила упалу плућа и хронични визинг

Деца старости 8-24 месеца са упалом плућа и хроничним визингом



Групу деце са атопијом, СС16 $\leq 3,4$ ng/ml, податак о упали плућа и хроничном визингу (n=5) дефинисали смо као “алергијски БХР фенотип са малом концентрацијом СС16 у серуму у узрасту до две године“. Деца са овим ендотипом су у односу на децу са атопијом и другим респираторним фенотиповима (n=23):

- Старија (22 vs 7 месеци, Mann Whitney p=0,013, area 0,848, за *cut off* $\geq 12,5$ месеци сензитивност 80%, специфичност 70%, за *cut off* $\geq 21,5$ месеци сензитивност 60%, специфичност 91%)
- Са првом болешћу доњих дисајних путева у старијем узрасту (9 vs 5 месеци, Mann Whitney p=0,039, area 0,800, за *cut off* $\geq 7,5$ месеци сензитивност 80%, специфичност 83%)
- Са већим бројем болести доњих дисајних путева (6x vs 2x, Mann Whitney p=0,004, area 0,891, за *cut off* $\geq 3,5x$ сензитивност 80%, специфичност 83%).

Деца са “алергијским БХР фенотипом са малом концентрацијом СС16 у серуму“ а која су имала манифестацију хроничне бронхијалне болести и упалу плућа у прве две године живота, имала су просечно прву акутну бронхијалну болест у 9. месецу живота, док су хронична бронхијална болест и упала плућа дијагностиковане истовремено (у размаку мањем од једног месеца), просечно 4 месеца после прве болести доњих дисајних путева.

У групи деце са атопијом (n=53) није постојала разлика у учесталости ендотипа “БХР фенотипа са малом концентрацијом СС16 у серуму“ између мушке (7,4%, n=2/27) и женске деце (11,5%, n=3/26), Fisher p=0,669, а иако су деца са податком о алергији мајке чешће имала овај ендотип у односу на децу без овог податка (23,1%, n=3/13 vs 5,0%, n=2/40) није постигнута статистичка значајност те разлике, (Fisher p=0,088). Ни једно дете на природној исхрани није имало овај ендотип (n=0/27), док је то био случај у 19,2% (n=5/26) деце са атопијом која су престала да доје (Fisher p=0,023), а просечно се испољио $\geq 5,5$ месеци од престанка дојења (9 vs 0 месеци, p=0,011, ROC крива: area 0,838, CI95% 0,689-0,986, сензитивност 80%, специфичност 75%).

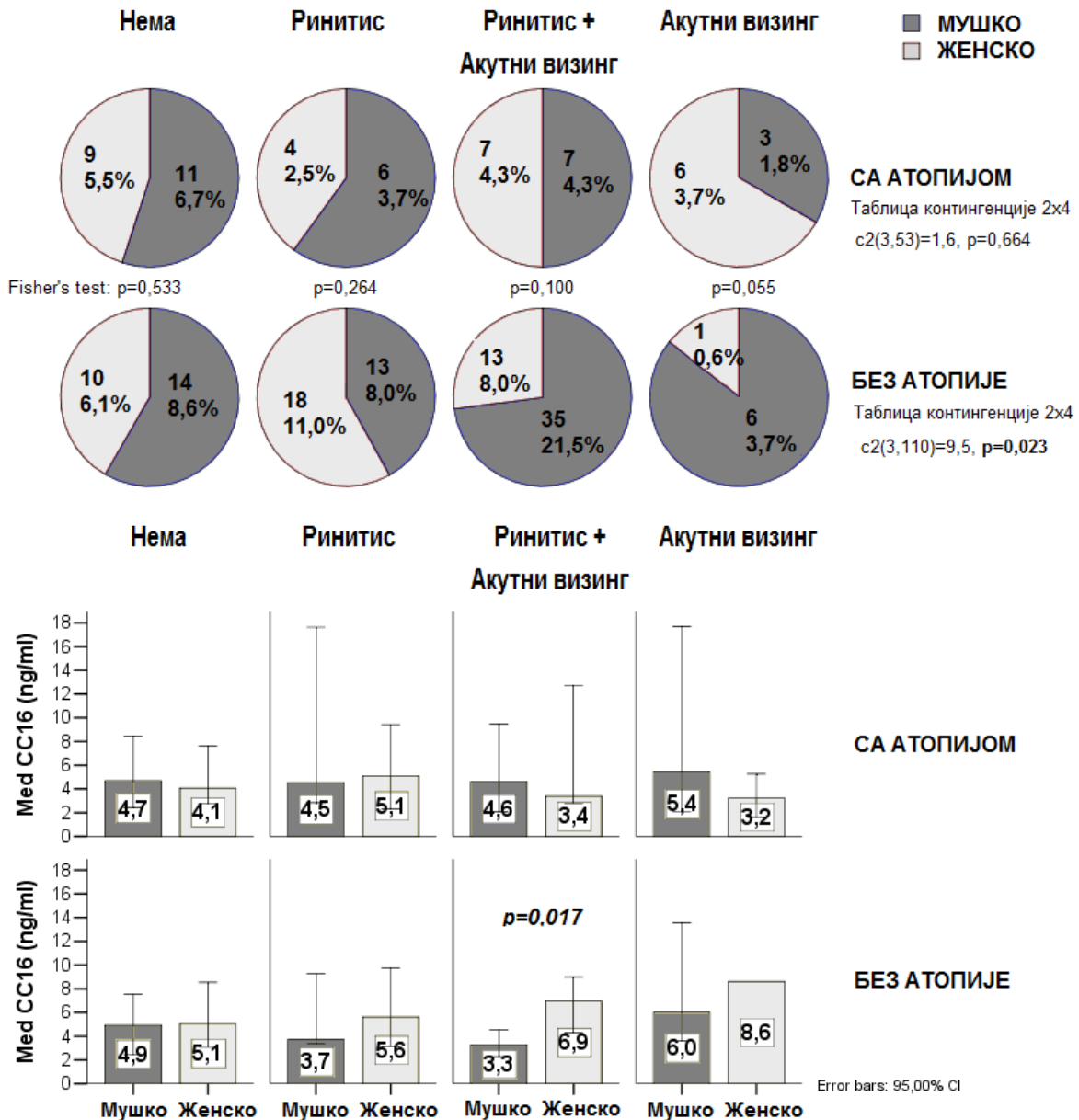
4.2.1.2 СС16 код деце са акутним респираторним болестима

Акутни ринитис је чешће дијагностикован код деце без атопије у односу на децу са атопијом (71,8%, n=79/110 vs 45,3%, n=24/53, p=0,001), и у групи мушке деце (70,6%, n=48/68 vs 48,1%, n=13/27, p=0,040) и у групи женске деце (73,8%, n=31/42 vs 42,3%, n=11/26, p=0,009). Мушка деца без атопије имала су чешће и податак о испољеним акутним бронхијалним болестима (60%, n=41/68) у односу на дечаке са атопијом (37,0%, n=10/27, p=0,040), док у групи женске деце није утврђена разлика у учесталости акутног визинга у односу на атопију (p=0,172).

Како би смо утврдили разлике у концентрацији СС16 у односу на испољени акутни ринитис и акутни визинг извршили смо категоризацију ових варијабли на: 0=без ринитиса и без акутног визинга (нема), 1=ринитис (J00), 2=ринитис + акутни визинг (J00 + J20/21), 3=акутни визинг (J20/21). У категорији деце са акутним визингом без ринитиса, женска деца су чешће била са атопијом у односу на мушку децу (Женско: 85,7%, n=6/7 vs Мушко: 33,3%, n=3/9, Fisher p=0,055), док је у групи деце са ринитисом и акутним визингом било више мушке деце без атопије, иако без статистичке

значајности те разлике (Женско:65%, n=13/20 vs Мушко:83,8%, n=35/42, p=0,100).
графикон 11.

Графикон 11. Учесталост ринитиса и акутног визинга у односу на пол код деце са и без атопије

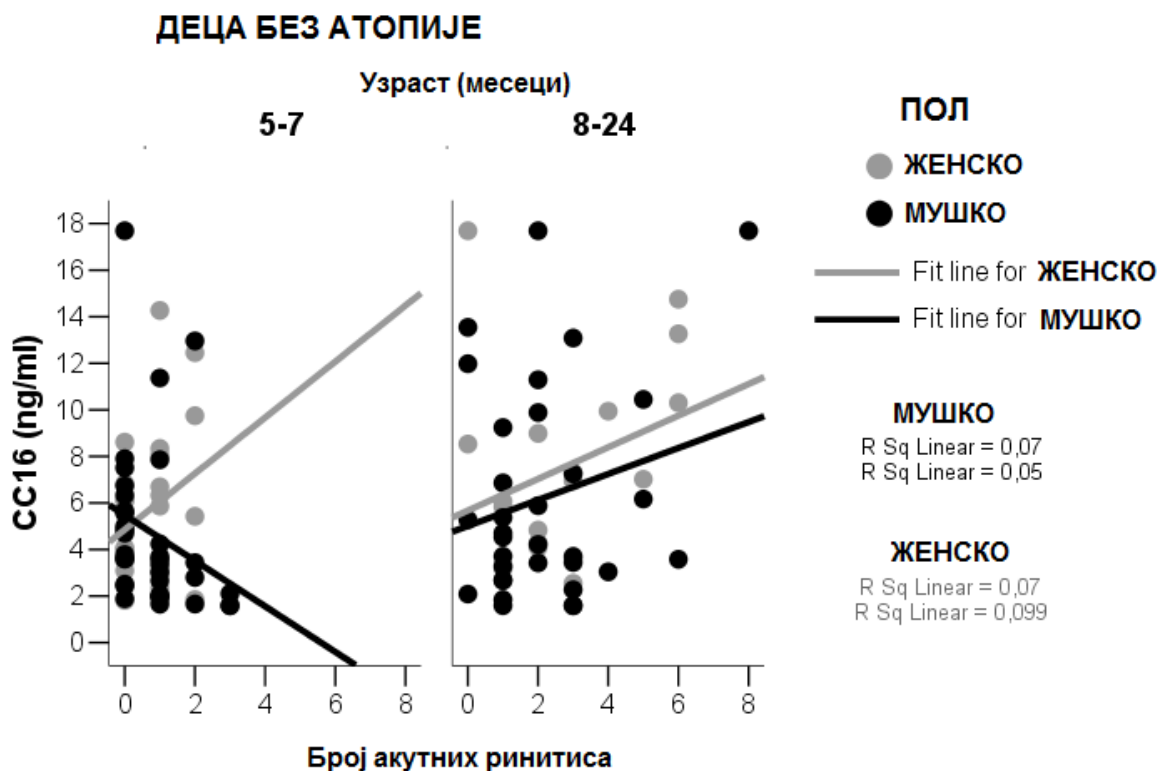


Разлика у СС16 између полова утврђена је само у категорији деце без атопије која су испољила акутни визинг удружен са ринитисом ($p=0,017$) (графикон 11), а разлика је била значајна у подгрупи деце без алергије у породици (Мушко: 2,9 ng/ml, n=22 vs Женско: 8,5 ng/ml, n=6, $p=0,017$), као и у подгрупи без хроничног визинга и/или упале плућа (Мушко: 2,7 ng/ml, n=18 vs Женско: 6,9 ng/ml, n=5, $p=0,012$).

У групи мушке деце без атопије старости 5-7 месеци, број ринитиса негативно корелише са СС16 ($r= -0,474$, $p=0,004$, n=35) (графикон 12) и позитивно са бројем

болести доњих дисајних путева и то акутног визинга ($r=0,369$, $p=0,029$, $n=35$), док у групи женске деце узраста 5-7 месеци није утврђена корелација између броја ринитиса и СС16 ($p=0,469$), као ни у групи мушке деце узраста 8-24 месеца ($p=0,783$). Статистички значајна негативна корелација између броја ринитиса и СС16 код мушке деце узраста 5-7 месеци утврђена је у групи деце која су испољила акутни визинг ($r= -0,567$, $p=0,022$, $n=16$), док у групи која није испољила акутни визинг повезаност није статистички значајна ($p=0,241$).

Графикон 12. Повезаност СС16 и броја акутних ринитиса у групи деце без атопије по полу и узрасту

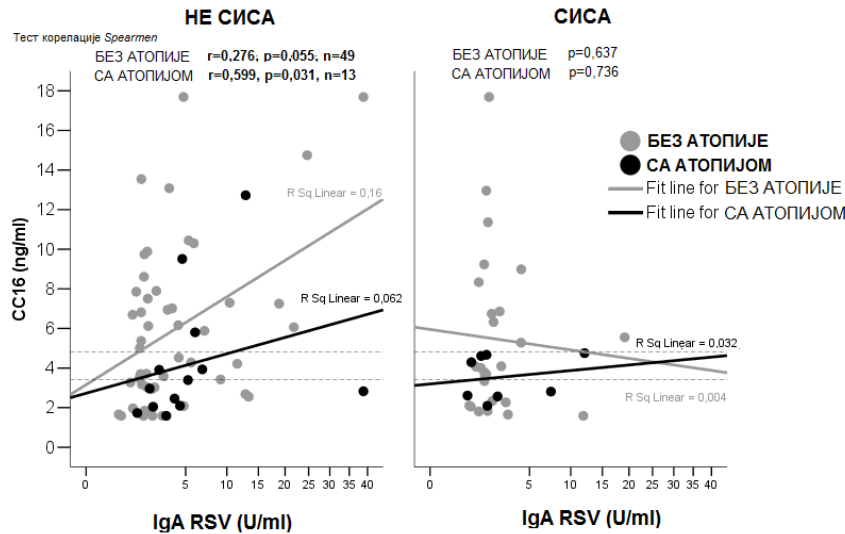


У групи мушке деце без атопије старости 5-7 месеци деца са акутним визингом у односу на децу без акутног визинга имала су ређе податак о алергији у породици ($p=12,5\%$, $n=2/16$ vs $47,4\%$, $n=9/19$, Fisher $p=0,030$), али и већи број ринитиса ($p=0,012$).

4.2.2. Повезаност СС16 са хуморалним одговором према RSV

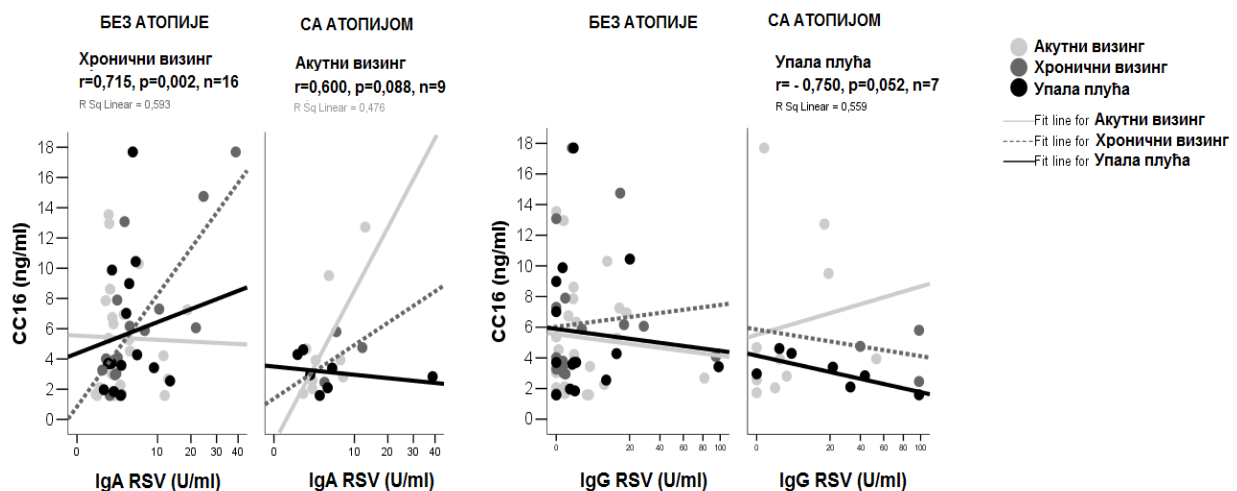
У групи деце која не сисају постоји и позитивна корелација СС16 и IgA према RSV и у групи деце са атопијом и у групи деце без атопије (Графикон 13).

Графикон 13. Повезаност *CC16* и *IgA* према *RSV* код деце која су престала са сисањем у групи са и без атопије



Када смо анализирали повезаност *CC16* са биомаркерима хуморалног одговора прем *RSV* утврдили смо да је пораст *CC16* повезан са *IgA* према *RSV* у групи деце без атопије са хроничним визингом, а у групи деце са атопијом постоји тенденција пораста у подгрупи са акутним визингом, док је пораст *IgG* према *RSV* у подгрупи деце са атопијом која су имала упалу плућа праћен смањењем *CC16*. Корелација *CC16* са *IgA* и *IgG* према *RSV* у групи деце са атопијом и без атопије у односу на различите врсте болести доњих дисајних путева приказана је на графикону 14. У групи деце без атопије која имају податак о алергији мајке *IgG* према *RSV* такође негативно корелише са *CC16* ($r= -0,552$, $p=0,051$, $n=13$).

Графикон 14. Повезаност *CC16* и *IgA* и *IgG* према *RSV* у односу на врсту болести доњих дисајних путева у групи деце са атопијом и без атопије



4.3. Повезаност CC16 са биомаркерима TH2 одговора, дефекта епитела као баријере и имунорегулације у односу на атопију

Статистички параметри испитиваних биомаркера приказани су у табели 7.

Табела 7. Статистички параметри испитиваних биомаркера

Parametr i	CC16 (ng/ml)	tIgE (kU/L)	ECP (ug/L)	TNF α (pg/ml)	TSLP (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	TGF β 1 (ng/ml)	RSV IgA	RSV IgG
N	163	163	145	66	117	146	138	96	113
Missing	0	0	18	97	46	17	25	67	50
X	5,7	34,9	12,2	2,6	32,6	8,0	21,1	4,8	10,8
SD	4,0	85,1	12,5	3,9	32,4	7,2	9,8	6,8	22,5
Std. Err X	0,3	6,7	1,0	0,5	3,0	0,6	0,8	0,7	2,1
Md	4,3	5,1	7,3	0,0	25,0	8,0	20,5	2,2	1,2
Range	16,1	486,0	50,8	14,6	171,3	28,9	44,2	38,3	98,0
Percentil									
10	2,0	2,0	2,8	0,0	1,8	0,0	8,1	1,1	0,0
25	3,0	2,7	4,4	0,0	11,6	2,0	14,4	1,5	0,2
50	4,3	5,1	7,3	0,0	25,0	8,0	20,5	2,2	1,2
75	7,3	16,0	14,7	4,6	43,9	12,7	27,7	4,8	9,5
90	12,3	107,2	29,3	8,7	77,8	18,7	33,1	12,3	31,8

Деца са атопијом (n=53) у односу на децу без атопије (n=110) имају веће концентрације укупних IgE (33,1 kU/l, range 484,7, IQR 122,2 vs 3,7 kU/l, range 23,9, IQR 3,3, p<0,001; ROC крива: area 0,937, CI95% 0,902-0,973, за cut off \geq 5,7 kU/l сензитивност 96,2%, специфичност 82,7%, за cut off \geq 16,4 kU/l сензитивност 64%, специфичност 95%), ECP-a (9,7 ug/l, range 50,4, IQR 19,1 vs 6,5 ug/l, range 50,8, IQR 9,0, p=0,004; ROC крива: area 0,654, CI95% 0,556-0,752, за cut off \geq 8,7 μ g/l сензитивност 64,3%, специфичност 66,0%) и IgG према RSV (3,4 U/ml, range 79,6, IQR 50,4 vs 1,1 U/ml, range 79,6, IQR 47,4, p=0,022; ROC крива: area 0,640, CI95% 0,520-0,759, за cut off \geq 6,6 U/ml сензитивност 45,2%, специфичност 78,1%).

4.3.1. Испитивани биомаркери код деце са болестима доњих дисајних путева у односу на атопију

Разлике у концентрацијама испитиваних биомаркера у односу на атопију у групи деце са и без болести доњих дисајних путева приказане су у табели 8. Маркер атопије у групи деце без болести доњих дисајних путева је укупни IgE \geq 5,7 kU/l (сензитивност 96%, специфичност 94%, area 0,965, CI95% 0,928-1,002), док је у групи деце са болестима доњих дисајних путева то случај са укупним IgE \geq 27,4 kU/l

(сензитивност 71%, специфичност 100%, area 0,942, CI95% 0,890-0,995), ECP \geq 9,1 ug/l (сензитивност 65%, специфичност 76%, area 0,694, CI95% 0,558-0,830) и IgG према RSV \geq 16,1 U/ml (сензитивност 50%, специфичност 87%, area 0,690, CI95% 0,539-0,840). У групи деце која су испољила болести доњих дисајних путева у узрасту 5-7 месеци, деца са атопијом у односу на децу без атопије су поред већих укупних IgE (67,1 kU/l, range 205,7, IQR 95,7, n=12 vs 3,8 kU/l, range 3,5, IQR 2,7, n=22; p<0,001) имала и мање концентрације TSLP (14,8 pg/ml, range 20,3, IQR 21,2, n=9 vs 28,4 pg/ml, range 157,7, IQR 46,8, n=16; p=0,032), док је у групи деце која су испољила болести у узрасту 8-24 месеца код деце са атопијом, осим већих укупних IgE (108,5 kU/l, range 477,1, IQR 171,2 n=16 vs 4,8 kU/l, range 23,9, IQR 6,5, n=39; p<0,001) утврђена већа концентрација ECP (9,6 ug/l, range 38,7, IQR 12,1, n=11 vs 4,9 ug/l, range 26,1, IQR 7,2, n=37; p=0,051) и IgG према RSV (27,1 U/ml, range 98, IQR 62,9, n=14 vs 1,3 U/ml, range 98, IQR 14,3, n=37; p=0,020), а нижа концентрација CC16 (3,1 ng/ml, range 7,9, IQR 1,9, n=16 vs 4,5 ng/ml, range 16,1, IQR 4,0, n=39; p=0,026).

Деца са атопијом која су испољила болести доњих дисајних путева у односу на децу са атопијом без ових болести, осим нижег CC16, имала су и веће укупне IgE (p=0,007). У групи деце без атопије, деца са испољеним болестима доњих дисајних путева имала су веће укупне IgE (p=0,004), TSLP (p=0,053), IL-10 (p=0,046), IgA према RSV (p=0,005) уз мање концентрације ECP-а (p=0,051), табела 8.

Табела 8. Разлике у концентрацијама испитиваних биомаркера у односу на атопију у групи деце са и без болести доњих дисајних путева

Болести доњих дисајних путева	Атопија	CC16 (ng/ml)	tIgE (kU/l)	ECP (ug/l)	TNF α (pg/ml)	TSLP (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	TGF β 1 (ng/ml)	RSV (U/ml)	
									IgA	IgG
Без болести	СА	4,7 (25)	15,4 (25)	9,8 (22)	0,0 (9)	16,8 (13)	4,4 (21)	23,1 (21)	1,2 (2)	1,1 (11)
	БЕЗ	5,0 (49)	2,9 (49)	7,6 (48)	0,0(21)	22,4 (38)	2,9 (44)	20,2 (32)	1,6 (22)	1,7 (27)
<i>Mann W</i>		<i>0,719</i>	<i>0,000</i>	<i>0,149</i>	<i>0,563</i>	<i>0,456</i>	<i>0,431</i>	<i>0,478</i>	<i>0,304</i>	<i>0,849</i>
Са болестима	СА	4,0 (20)	102(20)	11,4(14)	0,0 (7)	21,7(10)	9,4 (16)	20,6(17)	4,3 (12)	3,4 (13)
	БЕЗ	4,4 (46)	4,1 (46)	5,3 (41)	1,0(29)	27,0(37)	8,1 (44)	18,3(45)	2,4 (38)	0,4 (40)
<i>Mann W</i>		<i>0,324</i>	<i>0,000</i>	<i>0,010</i>	<i>0,639</i>	<i>0,095</i>	<i>0,636</i>	<i>0,923</i>	<i>0,304</i>	<i>0,012</i>
<i>Са атопијом</i>		<i>0,051</i>	<i>0,007</i>	<i>0,782</i>	<i>0,351</i>	<i>0,423</i>	<i>0,535</i>	<i>0,265</i>	<i>0,086</i>	<i>0,183</i>
<i>Без атопије</i>		<i>0,465</i>	<i>0,004</i>	<i>0,051</i>	<i>0,087</i>	<i>0,054</i>	<i>0,046</i>	<i>0,439</i>	<i>0,005</i>	<i>0,226</i>
<i>Kruskal Wallis p</i>		<i>0,220</i>	<i>0,000</i>	<i>0,006</i>	<i>0,132</i>	<i>0,053</i>	<i>0,162</i>	<i>0,470</i>	<i>0,004</i>	<i>0,055</i>

У групи деце без атопије IgA према RSV позитивно корелише са IL-10 ($r=0,258$, $p=0,031$, $n=70$), док у групи деце са атопијом није утврђена значајна корелација између IgA према RSV и IL-10 ($r= - 0,309$, $p=0,244$, $n=16$), али постоји тренд пада.

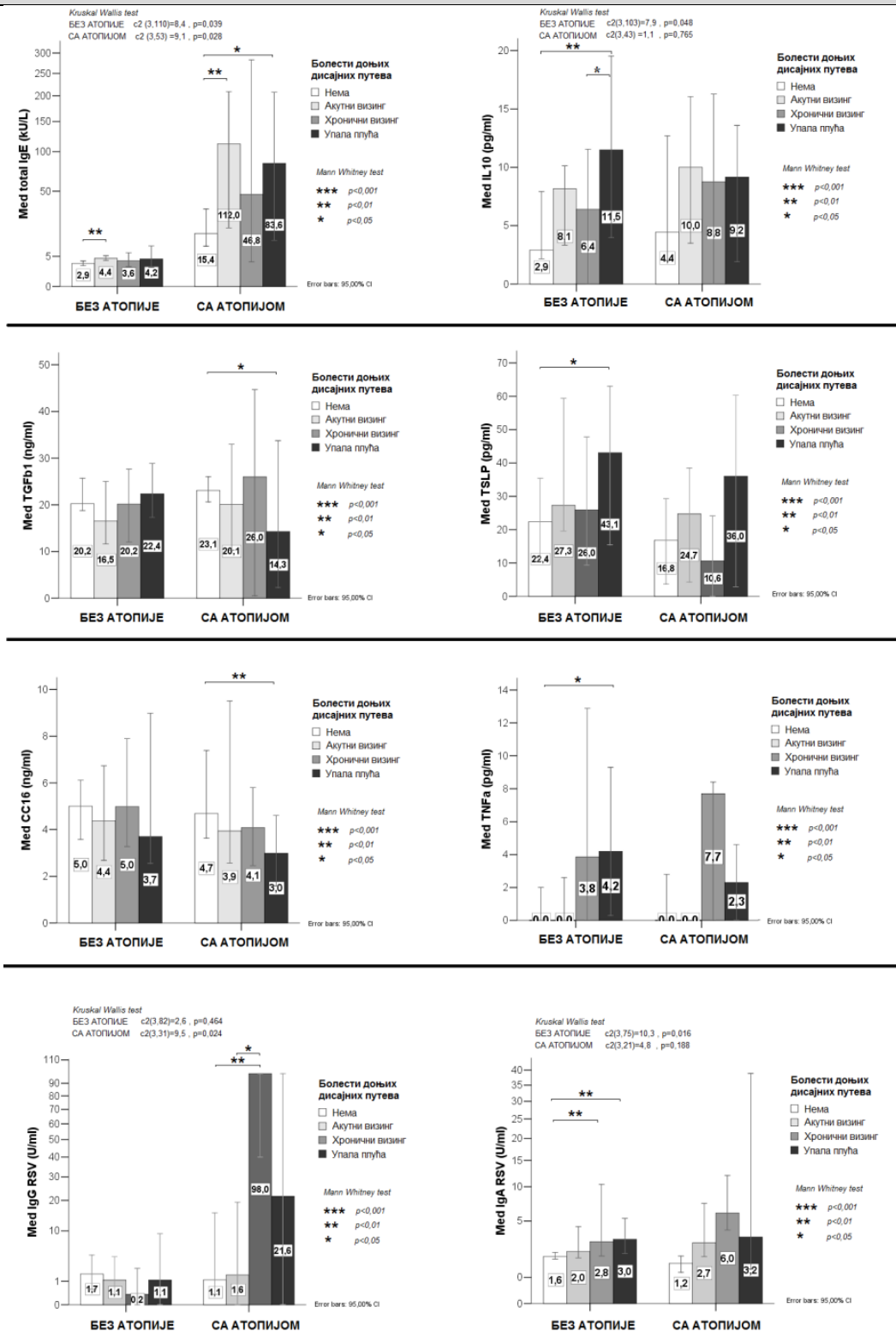
4.3.1.1. Разлике у концентрацијама биомаркера између деце са различитим болестима доњих дисајних путева

У групи деце без атопије, деца са акутним визингом у односу на децу без болести доњих дисајних путева су имала веће концентрације укупних IgE (4,4 kU/l, range 23,6, IQR 2,6, n=28 vs 2,9 kU/l, range 10,0, IQR 2,2, n=49, p=0,006; ROC: area 0,688, cut off \geq 3,7 kU/l, сензитивност 71,4% специфичност 65%), деца са хроничним визингом у односу на децу без болести доњих дисајних путева су имала веће концентрације IgA према RSV (2,8 U/ml, range 37,8, IQR 7,8, n=16 vs 1,6 U/ml, range 18,1, IQR 0,5, n=22, p=0,005; ROC: area 0,763, cut off \geq 2,1 U/ml, сензитивност 75% специфичност 86%), док деца са упалом плућа у односу на децу без болести доњих дисајних путева имају веће концентрације IL-10 (11,5 pg/ml, range 28,9, IQR 15,6, n=15 vs 2,9 pg/ml, range 27,0, IQR 11,8, n=44, p=0,010; ROC: area 0,723, cut off \geq 3,9 pg/ml, сензитивност 80% специфичност 59%), TSLP (43,1 pg/ml, range 103,0, IQR 46,0, n=13 vs 22,4 pg/ml, range 171,3, IQR 34,7, n=38, p=0,046; ROC: area 0,687, cut off \geq 41,2 pg/ml, сензитивност 54% специфичност 79%), TNF α (4,2 pg/ml, range 10,2, IQR 8,7, n=9 vs 0,0, range 11,3, IQR 3,4, n=21, p=0,040; ROC: area 0,741, cut off \geq 0,15 pg/ml, сензитивност 89% специфичност 67%) и IgA према RSV (3,0 U/ml, range 12,2, IQR 3,5, n=15 vs 1,6 U/ml, range 18,1, IQR 0,5, n=22, p=0,004; ROC: area 0,776, cut off \geq 2,0 U/ml, сензитивност 67% специфичност 86%), и у односу на децу са хроничним визингом веће концентрације IL-10 (6,4 pg/ml, range 19,3, IQR 11,6, n=17, p=0,053; ROC: area 0,700, cut off \geq 10,8 pg/ml, сензитивност 60% специфичност 70%).

У групи деце са атопијом, деца са акутним визингом су у односу на децу са атопијом без болести доњих дисајних путева имала су већи укупни IgE (112,0 kU/l, range 481,8, IQR 139,2, n=13 vs 15,4 kU/l, range 483,9, IQR 31,6, n=25, p=0,008; ROC: area 0,758, cut off \geq 63,5 kU/l, сензитивност 77% специфичност 84%), деца са хроничним визингом имају већи IgG према RSV (98,0 U/ml, range 58,0, n=3) у односу на децу без болести доњих дисајних путева (1,1 U/ml, range 28,3, IQR 8,9, n=11, p=0,005; ROC: area 1,000, cut off \geq 34,1 U/ml, сензитивност 100% специфичност 100%) и у односу на децу са акутним визингом (1,6 U/ml, range 53,3, IQR 17,6, n=10, p=0,014; ROC: area 967, cut off \geq 29,6 U/ml, сензитивност 100% специфичност 90%), и већи TNF α али без статистичке значајности разлике (p=0,145), док деца са упалом плућа у односу на децу без болести доњих дисајних путева имају веће концентрације укупних IgE (83,6 kU/l, range 196,3, IQR 177,7, n=8 vs 15,4 kU/l, n=25, p=0,044; ROC: area 0,740, cut off \geq 67,0

kU/l, сензитивност 63%, специфичност 84%), а мање концентрације TGF β 1 (14,3 ng/ml, range 31,5, IQR 15,0, n=8 vs 23,1 ng/ml, range 33,1, IQR 7,5, n=21, p=0,047; ROC: area 0,744, cut off \leq 17,8 ng/ml, сензитивност 75%, специфичност 90%) и CC16 (3,0 ng/ml, range 3,0, IQR 1,8, n=8 vs 4,7 ng/ml, range 15,6, IQR 4,5, n=25, p=0,010), графикон 15.

Графикон 15. Разлике у испитиваним биомаркерима у односу на врсту болести дисајних путева



Нижи TGFb1 утврђен је и код два детета са атопијом која су имала упалу плућа без податка о хроничном визингу у односу на децу без болести доњих дисајних путева (7,5 pg/ml, n=2 vs 23,1 pg/ml, n=21, p=0,016; ROC крива: area 0,976, cut off \leq 13,5 ng/ml, сензитивност 100%, специфичност 95%), без статистички значајне разлике у узрасту (p=0,091).

4.3.1.2. Повезаност биомаркера и броја респираторних болести

Појединачним линеарним моделима испитивана је повезаност броја болести доњих дисајних путева са биомаркерима и утврђено је у групи деце без атопије са сваком болешћу доњих дисајних путева расту концентрације:

- IgE (F(1,109)=4,8, adj r2 0,034, p=0,031; B 0,75, SE 0,3, beta 0,206, t 2,2 CI95% 0,07-1,43 и то са већим бројем акутних ринитиса (F(1,109)=6,7, adj r2 0,050, p=0,011; B 0,8, SE 0,3, beta 0,243, t 2,6 CI95% 0,2-1,4) унутар групе деце са хроничним визингом (F(1,17)=5,6, adj 0,212; p=0,031, B 1,2, CI95% 0,13-2,45) и акутних бронхијалних болести, (p=0,036, B 1,2, CI95% 0,08-2,35) унутар групе деце са хроничним визингом (F(1,17)=6,5, adj 0,244; p=0,021, B 2,3, CI95% 0,39-4,23), као и
- IL-10 (F(1,102)=7,0, adj r2 0,056, p=0,009; B 1,3, SE 0,48, beta 0,255, t 2,7 CI95% 0,3-2,2 и то са већим бројем акутних ринитиса (F(1,102)=7,1, adj r2 0,057, p=0,009; B 1,2, SE 0,44, beta 0,257, t 2,7 CI95% 0,3-2,1) и акутних бронхијалних болести (p=0,013, B 2,0, CI95% 0,4-3,7) унутар групе деце са хроничним визингом (F(1,16)=5, adj 0,219; p=0,033, B 3,4, CI95% 0,31-6,45), и унутар групе деце са упалом плућа (F(1,14)=7,2, adj 0,306; p=0,019, B 4,8, CI95% 0,92-8,65), као и са већим бројем упала плућа p=0,002, B 6,2, CI95% 2,4-10,1).

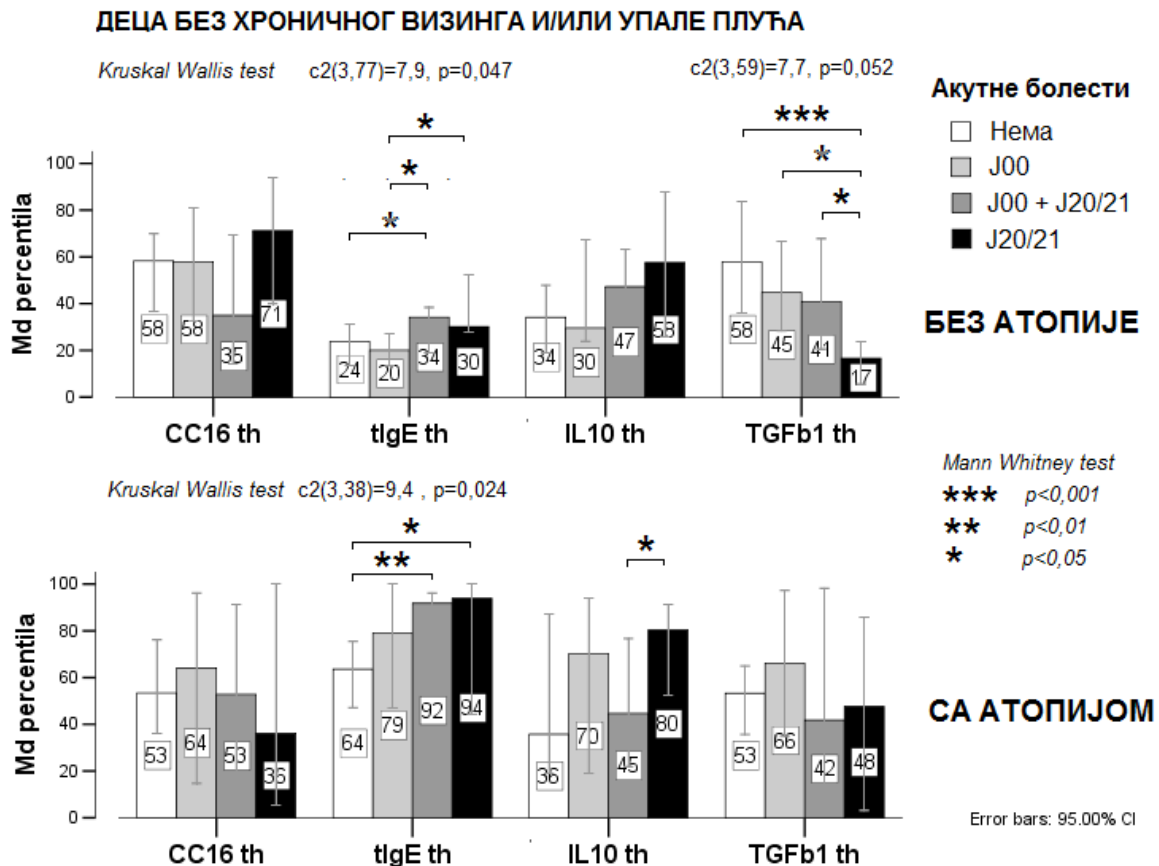
У групи деце са атопијом са сваком болешћу доњих дисајних путева расту концентрације:

- TSLP (F(1,28)=8,8, adj r2 0,219, p=0,006; B 3,8, SE 1,3, beta 0,497, t 3,0 CI95% 1,2-6,5 и то са већим бројем акутних бронхијалних болести (p=0,017, B 6,4, CI95% 1,2-11,6) и хроничних бронхијалних болести (p=0,007, B 9,3, CI95% 2,7-15,9)), као и са бројем акутних ринитиса (p=0,039, B 3,1, CI95% 0,17-6,06).
- У групи деце са атопијом са порастом броја хроничних болести расте и TNF α (F(1,15)=6,6, adj r2 0,273, p=0,022; B 2,6, SE1,0, beta 0,567, t 2,6 CI95% 0,4-4,8).

4.3.1.2. Коморбидитет акутног ринитиса и акутног визинга

Концентрације биомаркера за које је утврђена разлика између категорија акутног ринитиса (J00) и акутног визинга (J20/J21) у групи без хроничног визинга и/или упале плућа са атопијом и без атопије приказана је на графикону 16.

Графикон 16. Разлике у имунорегулаторним цитокинима у односу на испољавање акутног ринитиса и акутног визинга код деце која нису имала хронични визинг или упалу плућа



Анализа биомаркера у односу на категорије коморбидитета акутног ринитиса и акутног визинга, код деце која нису испољила хронични визинг и/или упалу плућа (без атопије $n=77$; са атопијом $n=38$) показала је да деца без атопије која имају само акутни визинг без ринитиса имају мањи $TGF\beta 1$ (12,1 ng/ml, range 11,1, IQR 8,8, $n=6$) у односу на децу са удруженим ринитисом и акутним визингом (18,8 ng/ml, range 34,7, IQR 18,3, $n=48$, $p=0,049$), ринитисом без визинга (19,8 ng/ml, range 31,1, IQR 12,0, $n=18$, $p=0,050$) и деце без ових болести (23,5 ng/ml, range 27,0, IQR 13,9, $n=14$, $p=0,001$) па $TGF\beta 1 \leq 14,5$ ng/ml може бити маркер испољеног респираторног фенотипа акутног визинга без ринитиса у групи деце без атопије (сензитивност 100%, специфичност 84%, area 0,859). Концентрације CC16 биле су најниже код деце без атопије која су имала комбинацију

акутног ринитиса и акутног визинга, али је статистички значајна разлика утврђена само у групи мушке деце без атопије у којој су деца са овим коморбидитетом имала мање концентрације СС16 у односу на мушку децу са акутним визингом (2,7 ng/ml, n=18, range 11,4, IQR 2,8 vs 6,0 ng/ml, n=4, range 9,9, IQR 7,8; p=0,050).

Деца са атопијом која су испољила ринитис и акутни визинг имала су мање концентрације IL-10 (6,0 pg/ml, range 12,2, IQR 7,9, n=6) у односу на децу са атопијом која су испољила акутни визинг без ринитиса (14,2 pg/ml, range 9,8, IQR 7,8, n=5, p=0,030). У групи деце са атопијом која су имала фенотип акутног визинга без хроничног визинга и упале плућа, број ринитиса негативно корелише са IL-10 ($r = -0,626$, p=0,036, n=11; без атопије p=0,244), док је у групи деце са атопијом која нису имала болести доњих дисајних путева број ринитиса позитивно корелише са TNF α ($r=0,750$, p=0,020, n=9; без атопије p=0,851).

4.3.2 Фактори удружени са променом СС16 у серуму

Како би смо утврдили међусобну повезаност испитиваних биомаркера, њихову повезаност са индивидуалним карактеристикама и респираторним болестима, и издвојили главне факторе унутар којих долази до груписања испитиваних варијабли у популацији деце узроста 5 до 24 месеца, применили смо *PCA*. Осам главних компонената, које групишу 19 варијабли (уклапање у компоненту за све варијабле је $\geq 0,300$) и објашњавају 77,5% заједничке варијансе (КМО 0,426, p<0,001), са коефицијентима факторског оптерећења за сваку варијаблу појединачно приказано је у табели 9. У анализи главних компонената СС16 се издваја као карактеристика унутар три фактора и то:

- 1) У оквиру фактора „атопија“ мање концентрације СС16 повезане су са мањим концентрацијама TGF β 1 код деце са атопијом и већим концентрацијама укупних IgE;
- 2) У оквиру фактора „TSLP индукција“ мање концентрације СС16 повезане су са повећаним концентрацијама TSLP и IL-10 у серуму, приликом испољавања упале плућа и акутног визинга; и
- 3) У оквиру фактора „Узраст“ веће концентрације СС16 повезане су са старијим узрастом, дужим периодом сисања, акутним визингом код деце која немају астму у породици.

Табела 9. Анализа главних компонената у популацији здраве деце узраста 5-24 месеца

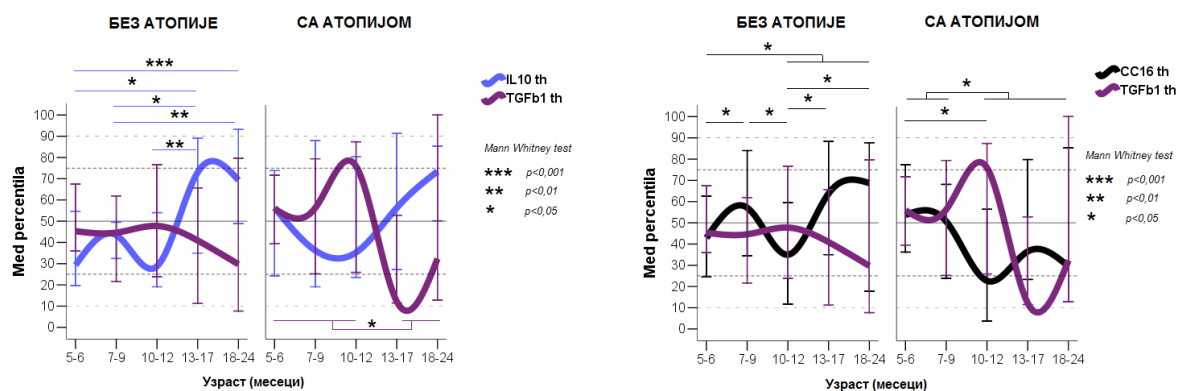
Назив фактора	Главне компоненте							
	1	2	3	4	5	6	7	8
% заједничке варијансе	X	Атопија	TSLP индукција	Астма у породици	X	Узраст	X	X
IgA RSV (U/ml)	0,876							
IgG RSV (U/ml)	0,761							
Атопија (1=Са атопијом)		-0,898						
Укупни IgE (kU/L)		-0,867						
TGFb1 (ng/ml)		0,707		-0,347	0,322			
TSLP (pg/ml)			0,773					
IL10 (pg/ml)			0,722					
Упала плућа (1=Да)			0,436		0,308			-0,381
Пол (1=женски)				-0,836				
Астма у породици (1=Да)				0,695		-0,366		
ЕСР (ug/L)					0,884			
Акутни визинг (1=Да)			0,317			0,819		
Дужина дојења (месеци)					0,313	0,746		
CC16 (ng/ml)		0,366	-0,333			0,398		
Време од престанка дојења (месеци)							-0,906	
Узраст (месеци)						0,337	-0,844	
Хронични визинг (1=Да)	0,420				0,324		-0,479	
Мајка са алергијом (1=Да)	0,380							0,758
TNF α (pg/ml)				0,463				-0,531

4.3.2.1 Фактор „Атопија“

4.3.2.2.1. CC16 и *TGFb1*

Како би смо анализирали промене CC16 у односу на имунорегулаторне цитокине у групи деце без атопије и са атопијом, перцентилне вредности ових биомаркера приказали смо у односу на узрастне категорије на графикону 17.

Графикон 17. Узрастне промене имунорегулаторних цитокина и однос CC16 и *TGFb1* код деце са атопијом и без атопије



Концентрације TGF β 1 у серуму деце у другој години живота су ниже (16,5 ng/ml, range 42,1, IQR 16,9, n=39) у односу на измерене концентрације код деце у првој години живота (20,9 ng/ml, range 43,4, IQR 11,4, n=99, p=0,028), али је ова разлика присутна само код деце са атопијом (15,9 ng/ml, range 35,3, IQR 11,6, n=11 vs 23,8 ng/ml, range 43,4, IQR 10,7, n=35, p=0,053), док код деце без атопије није достигла статистичку значајност (17,5 vs 19,9 ng/ml, p=0,177). Статистички значајан пад концентрације TGF β 1 са узрастом код деце са атопијом утврђен је само код деце женског пола (p=0,005; ROC крива: ареа 0,965, за TGF β 1 \leq 17,0 ng/ml, сензитивност 100%, специфичност 89%), без разлике у групи мушке деце са атопијом (p=0,881).

Женска деца са атопијом и TGF β 1 \leq 17,0 ng/ml у односу на женску децу са атопијом која имају више концентрације TGF β 1 чешће имају CC16 \leq 3,4 ng/ml, (100%, n=5/5 vs 41,2%, n=7/17, Fisher p=0,030), дијагнозу J04 (Laryngitis) (40%, n=2/5 vs n=0/17, Fisher p=0,043) и упалу плућа (60%, n=3/5 vs 5,9%, n=1/17, Fisher p=0,024, OR 24,0 CI95% 1,6-365,6). Мушка деца са атопијом и TGF β 1 \leq 17,0 ng/ml у односу на мушку децу са атопијом и вишом концентрацијом TGF β 1, су сличног узраста, али чешће имају болести доњих дисајних путева без горњих дисајних путева (ДД фенотип) (37,5%, n=3/8 vs 0/16, Fisher p=0,028).

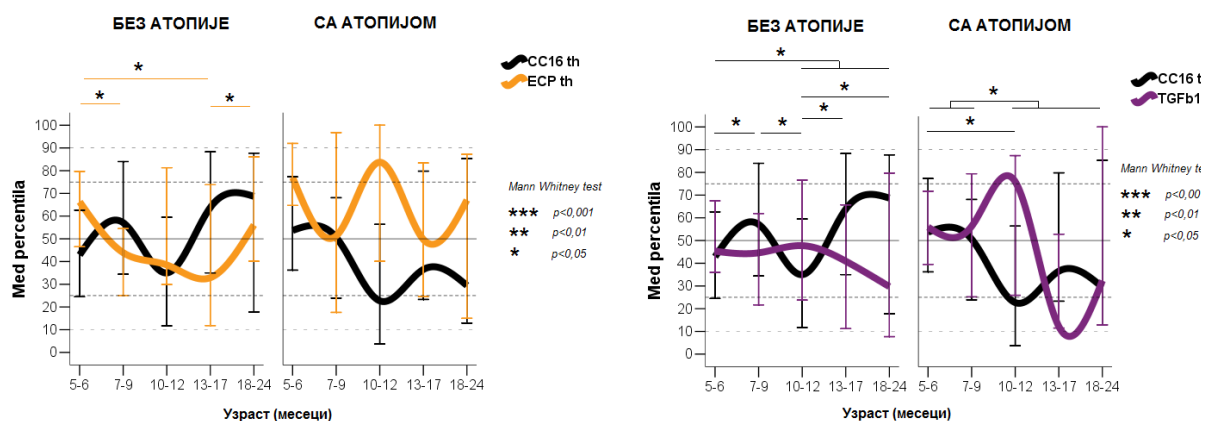
У групи женске деце са TGF β 1 > 17,0 ng/ml девојчице са атопијом у односу на женску децу без атопије имале су више концентрације укупних IgE (15,4 kU/l, range 484,7, IQR 72,5, n=17 vs 2,0 kU/l, range 12,3, IQR 2,6, n=21, p=0,001) и ECP (21,2 ug/l, range 50,0, IQR 34,4, n=11 vs 5,8 ug/l, range 50,8, IQR 9,2, n=20, p=0,020), и ређе су имала акутни ринитис (35,3%, n=6/17 vs 76,2%, n=16/21, Fisher p=0,013), али чешће податак о алергији у породици (64,7%, n=11/17 vs 33,3%, n=7/21, Fisher p=0,054), и то алергијског ринитиса мајке (29,4%, n=5/17 vs 4,8%, n=1/21, Fisher p=0,052), док у групи мушке деце са TGF β 1 > 17,0 ng/ml, дечаци са атопијом у односу на дечаке без атопије имају веће концентрације укупних IgE (72,5 kU/l, range 364,1, IQR 224,8, n=16 vs 4,0 kU/l, range 23,9, IQR 3,3, n=39, p<0,001), већи CC16 (4,7 ng/ml, range 15,5, IQR 5,5, n=16 vs 3,3 ng/ml, range 16,1, IQR 3,5, n=39, p=0,052) и IgG према RSV (7,5 U/ml, range 98,0, IQR 31,6, n=11 vs 0,8 U/ml, range 98, IQR 3,7, n=30, p=0,027), чешће су били на природној исхрани (68,8%, n=11/16 vs 35,9%, n=14/39, p=0,027) и ређе су имали акутни визинг (31,3%, n=5/16 vs 64,1%, n=25/39, p=0,027), а чешће податак о алергијском ринитису у породици (37,5%, n=6/16 vs 7,7%, n=3/39, p=0,013) и то алергијског ринитиса мајке (25%, n=4/16 vs n=0/39, p=0,005).

Како би смо утврдили које су карактеристике повезане са променом $TGF\beta 1$ у серуму применили смо тест корелације. Код деце са атопијом $TGF\beta 1$ позитивно корелише са ЕСР-ом ($r=0,381$, $p=0,022$, $n=36$), што није био случај код деце без атопије ($p=0,368$), а ова повезаност је статистички била значајна код девојчица са атопијом ($r=0,522$, $p=0,038$, $n=16$), без значајне повезаности код дечака ($p=0,660$). Модел линеарне регресије у групи деце са атопијом ($F(1,35)=17,3$, $p<0,001$, $adj\ r^2\ 0,318$) указује на повећање $TGF\beta 1$ у серуму за $0,37\ ng/ml$ при повећању ЕСР-а у серуму за $1\ ug/L$ ($B\ 0,37$, $SE\ 0,09$, $beta\ 0,581$, $t\ 4,2$, $p<0,001$, $CI95\% 0,19 - 0,55$).

4.3.2.2.2. *CC16* и цитокини урођене имуности (*ЕСР* и *TNF α*)

Однос перцентилних вредности $TGF\beta 1$, *ЕСР* и *CC16* у односу на узраст код деце без атопије и деце са атопијом приказан је на графикаону 18.

Графикон 18. Узрастне промене ЕСР-а и однос са *CC16* и $TGF\beta 1$ код деце са атопијом и без атопије



Пораст концентрације ЕСР-а и $TGF\beta 1$ у узрасту 10-12 месеци праћен је статистички значајним падом *CC16*, код деце са атопијом, при чему су мале концентрације $TGF\beta 1$ у другој години живота удружене са малим концентрацијама *CC16*.

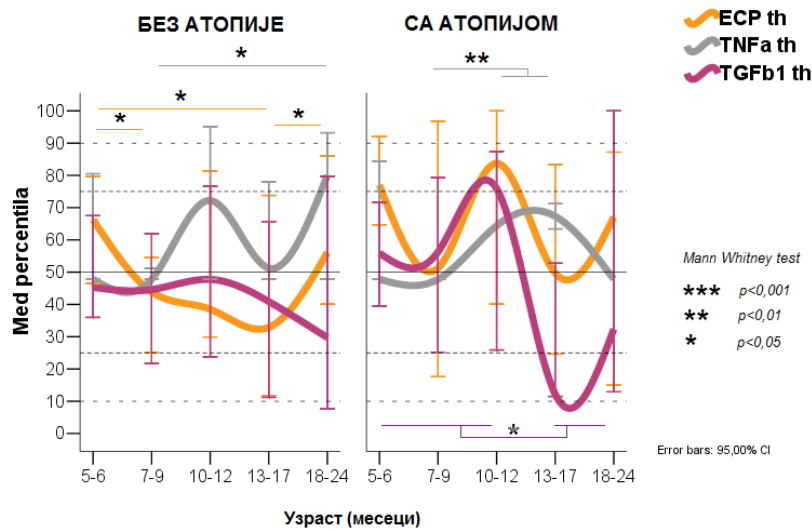
С обзиром да су статистички значајан пад концентрације $TGF\beta 1$ у другој години живота и удруженост малих концентрације $TGF\beta 1$ и *CC16* утврђени само код деце са атопијом, парцијалном корелацијом смо испитивали повезаност биомаркера $TH2$ одговора са *CC16* независно од концентрације $TGF\beta 1$ (табела 10). Када смо искључили ефекат $TGF\beta 1$, добили смо статистички значајну негативну корелацију ЕСР-а са *CC16* у групи деце без атопије (али само у подгрупи са $CC16 \geq 4,8\ ng/ml$ ($r= -0,277$, $p=0,044$)),

док је код деце са атопијом постојала тенденција смањења СС16 са повећањем свих ТН2 биомаркера, од којих је повезаност са ИЛ-10 била значајна и са највећом јачином повезаности. Код деце са атопијом утврђена је негативна корелација ЕСР-а и СС16 у групи која не сиса у узрасту 8-24 месеца ($r = -0,624$, $p = 0,054$, $n = 10$).

Табела 10. Парцијална корелација СС16 и биомаркера ТН2 одговора по елиминацији утицаја ТGFβ1 у групи деце са атопијом и без атопије

Control Variables		БЕЗ АТОПИЈЕ				СА АТОПИЈОМ			
		tIgE	ЕСР	TSLP	IL10	tIgE	ЕСР	TSLP	IL10
TGFβ1 (ng/ml)	r	0,000	-0,204	-0,137	-0,018	-0,306	-0,299	-0,274	-0,351
	p	0,500	0,043	0,125	0,439	0,068	0,073	0,093	0,043
	n	70	70	70	70	23	23	23	23
	r		0,097	0,229	0,357		-0,077	0,330	0,343
tIgE	p		0,209	0,026	0,001		0,357	0,054	0,047
	n		70	70	70		23	23	23
	r			0,190	0,096			0,175	0,478
ЕСР	p			0,055	0,211			0,201	0,008
	n			70	70			23	23
	r				0,436				0,619
TSLP	p				0,000				0,000
	n				70				23

Затим смо испитивали повезаност биомаркера урођеног имунитета и то ЕСР-а (ТН2 одговор) и TNFα (ТН1/ТН17 одговор). И код деце са атопијом и без атопије постоји пораст TNFα у другој години живота у односу на узраст 7-9 месеци (са атопијом 7-9 месеци: 0,0 pg/ml, n=6 vs 10-17 месеци: 3,4 pg/ml, range 1,8, n=3; p=0,009, без атопије 7-9 месеци: 0,0 pg/ml, range 8,7, IQR 0,5, n=15 vs 13-17 месеци: 6,7 pg/ml, range 10,2, IQR 4,9, n=5, p=0,050), али је код деце са атопијом то праћено и статистички значајним падом ТGFβ1 у другој години живота. Односи ЕСР-а, TNFα и ТGFβ1 у односу на узраст код деце без атопије и деце са атопијом приказани су на графикону 19. Смањење ЕСР-а са порастом TNFα утврђено је код мушке деце са атопијом ($r = -0,566$, $p = 0,056$, $n = 9$), док је код женске деце са атопијом утврђено је смањење ЕСР-а са узрастом ($r = -0,463$, $p = 0,023$, $n = 19$), и бројем акутних болести доњих дисајних путева ($r = -0,493$, $p = 0,016$, $n = 19$). У групи деце без атопије смањење ЕСР-а праћено порастом TNFα утврђено је код женске деце ($r = -0,457$, $p = 0,019$, $n = 21$), али је и код мушке деце утврђено смањење ЕСР-а са узрастом ($r = -0,314$, $p = 0,007$, $n = 62$), бројем прегледа због болести горњих дисајних путева ($r = -0,285$, $p = 0,012$, $n = 62$), и то акутног ринитиса ($r = -0,241$, $p = 0,030$, $n = 62$), акутних фарингитиса ($r = -0,238$, $p = 0,031$, $n = 62$), и ларингитиса ($r = -0,241$, $p = 0,030$, $n = 62$), као IgA према RSV ($r = -0,315$, $p = 0,017$, $n = 45$).

Графикон 19. Перцентилне вредности ЕСР-а, TNF α и TGF β 1 у односу на узраст код деце без атопије и деце са атопијом

Код деце без атопије, поред очекивано нижих концентрација ЕСР-а током друге половине прве године и почетком друге године у односу на узраст 5-6 месеци, уочава се и неочекивани пораст ЕСР-а у узрасту 18-24 месеца (7,3 ug/ml, range 25,1, IQR 13,6, n=13) у односу на узраст 13-17 месеци (4,4 ug/ml, range 10,9, IQR 6,7, n=14, p=0,038).

4.3.2.2.2.1 БХР са еозинофилном инфламацијом

Када смо анализирали концентрације испитиваних биомаркера у односу на коморбидитет болести доњих дисајних путева код деце без атопије, утврдили смо већу концентрацију ЕСР-а код деце без атопије која су испољила упалу плућа и хронични визинг у односу на децу без атопије која су имала упалу плућа и акутни визинг (p=0,029), као и у односу на децу са хроничним визингом без упале плућа (p=0,050) (табела 11).

Табела 11. Концентрације испитиваних биомаркера у односу на коморбидитет болести доњих дисајних путева код деце без атопије

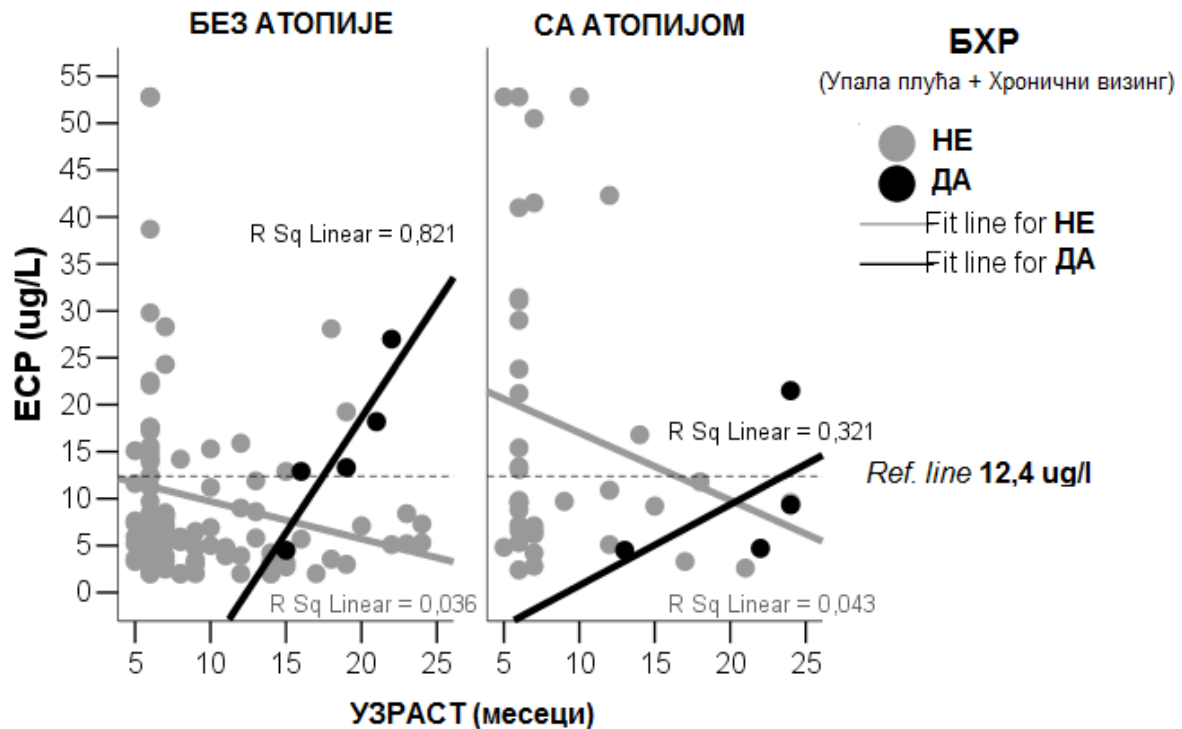
ДЕЦА БЕЗ АТОПИЈЕ										
Упала плућа	Визинг	CC16	tIgE	ЕСР	TNF α	TSLP	IL-10	TGF β 1	RSV IgA	RSV IgG
ДА	Акутни визинг	3,6 (9)	3,9 (9)	3,4 (9)	2,4 (6)	44,6 (9)	9,1 (9)	24,0 (9)	3,0 (9)	0,9 (9)
	Хронични визинг	9,9 (5)	4,2 (5)	13,3 (5)	4,4 (3)	20,7 (4)	13,2 (5)	21,5 (5)	4,8 (5)	1,5 (5)
Mann Whitney		0,083	0,606	0,029	0,548	0,503	0,364	0,364	0,606	0,364
НЕ	Акутни визинг	4,4 (28)	4,4 (28)	5,8 (25)	0,0(12)	27,3 (23)	8,1 (27)	16,5 (27)	2,0 (12)	1,1 (23)
	Хронични визинг	5,0 (18)	3,6 (18)	5,2 (16)	3,9 (8)	26,0 (14)	6,4 (17)	20,2 (18)	2,8 (16)	0,2 (17)
Mann Whitney		0,350	0,735	0,552	0,305	0,526	0,611	0,610	0,201	0,371
Акутни визинг		0,475	0,542	0,079	0,213	0,536	0,494	0,052	0,507	0,711
Хронични визинг		0,538	0,857	0,050	0,776	0,959	0,048	0,745	0,842	0,218

У групи деце без атопије са упалом плућа, деца која су имала упалу плућа и хронични визинг у односу на децу са упалом плућа и акутним визингом била су старија ($p=0,012$), имала су већи ЕСР ($p=0,029$) и виши СС16, али без статистичке значајности ($p=0,083$ – статистички значајна разлика у СС16 утврђена је у групи мушке деце без атопије са упалом плућа, где су дечаки са хроничним визингом и упалом плућа имали већи СС16 (10,2 ng/ml, $n=4$) у односу на дечаке са акутним визингом и упалом плућа СС16 (2,7 ng/ml, $n=4$, $p=0,010$)). Деца без атопије са упалом плућа и хроничним визингом у односу на децу са хроничним визингом без упале плућа осим што су старијег узраста ($p=0,046$) имала су виши ЕСР ($p=0,050$) и виши IL-10 ($p=0,048$). Деца без атопије са упалом плућа и акутним визингом у односу на децу са акутним визингом без упале плућа имала су више концентрације TGFb1 ($p=0,052$).

Клинички фенотип БХР „Упала плућа и хронични визинг“ утврђен је у 4,5 % деце без атопије ($n=5/105$) и 11,3% деце са атопијом ($n=6/53$), Fisher $p=0,102$. У групи деце без атопије није постојала разлика у учесталости овог фенотипа у односу на пол (М=5,9%, $n=4/68$ vs Ж 2,4%, $n=1/42$, $p=0,365$), али су деца са овим фенотипом била старија у односу на осталу децу (19,5 vs 7 месеци, $p=0,001$). У групи деце са атопијом узраста 8-24 месеца, овај клинички фенотип због удружености са ниским концентрацијама СС16, предходно смо дефинисали као ендотип „БХР са ниским СС16“, док је у групи деце без атопије узраста 8-24 месеца, исти клинички фенотип повезан са већим концентрацијама ЕСР-а (13,3 ug/l, range 22,5, IQR 13,9, $n=5$) у односу на осталу децу без атопије (5,0 ug/l, range 26,1, IQR 4,6, $n=45$, $p=0,016$) (без разлике у другим испитиваним биомаркерима), као и у односу на децу без атопије истог узраста, која су испољила друге фенотипове болести доњих дисајних путева (13,3 ug/l, $n=5$ vs 4,8 ug/ml, range 26,1, IQR 4,0, $n=32$, $p=0,014$). У узрасту 8-24 месеца ЕСР $\geq 12,4$ ug/l може указивати на постојање еозинофилне активације код деце без атопије са упалом плућа и хроничним визингом (сензитивност 80%, специфичност 87%, ареа 0,820), односно у односу на осталу децу без атопије са болестима доњих дисајних путева (сензитивност 80%, специфичност 88%, ареа 0,834). Овај фенотип смо дефинисали као ендотип „БХР са еозинофилном инфламацијом“ код деце без атопије.

Пошто, осим ЕСР-а, није било разлике у другим испитиваним биомаркерима у односу на постојање овог фенотипа, хтели смо да видимо које варијабле су повезане са променом концентрације ЕСР-а код деце без атопије.

Графикон 20. Корелација узраста и ЕСР-а код деце са атопијом и без атопије, са и без астма фенотипа



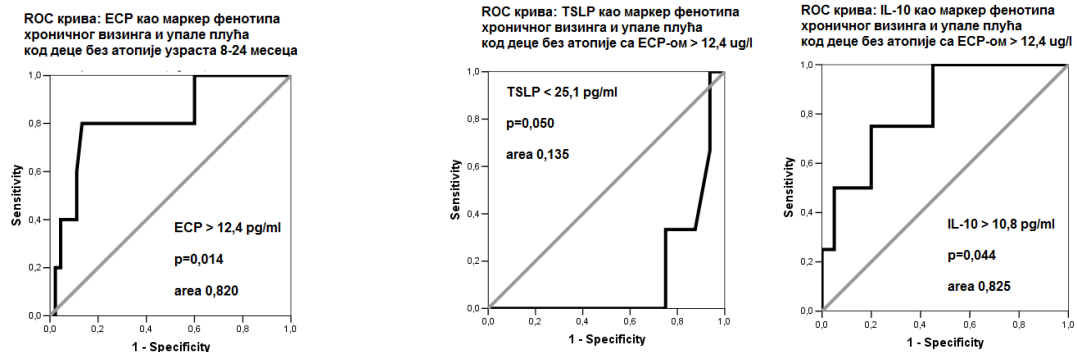
У групи деце без атопије ЕСР негативно корелише са бројем болести горњих дисајних путева ($r = -0,203$, $p = 0,040$, $n = 103$), и то акутним упалама грла ($r = -0,222$, $p = 0,024$, $n = 103$) и упалама ува ($r = -0,245$, $p = 0,013$, $n = 103$). Међутим, деца без атопије са ендотипом „БХР фенотип са еозинofilном инфламацијом“ чешће су имала рецидивантне упале грла (60%, $n = 3/5$) у односу на осталу децу без атопије (12,4%, $n = 13/105$, Fisher $p = 0,021$).

Како би смо утврдили по чему се деца без атопије са ендотипом „БХР фенотип са еозинofilном инфламацијом“ разликују од деце без атопије која такође имају ЕСР $\geq 12,4$ $\mu\text{g/l}$, али немају овај БХР фенотип, концентрације ЕСР-а категорисали смо на $0 = \text{ЕСР} < 12,4$ $\mu\text{g/l}$, $1 = \text{ЕСР} \geq 12,4$ $\mu\text{g/l}$. У групи деце без атопије са ЕСР $\geq 12,4$ $\mu\text{g/l}$, деца која су испољила фенотип упале плућа и хроничног визинга ($n = 4$) у односу на децу без овог фенотипа ($n = 24$) била су старија (20 vs 6 месеци, $p < 0,001$, ROC curve: area 0,974, cut off $\geq 15,5$ месеци, сензитивност 75%, специфичност 80%), са статистичким значајно већом концентрацијом IL-10 (15,5 pg/ml , range 25,5, IQR 21,1 vs 3,2 pg/ml , range 27,0, IQR 8,2, $p = 0,045$; ROC curve: area 0,825, cut off $\geq 10,8$ pg/ml , сензитивност 75%, специфичност 80%) и већом али статистички незначајном концентрацијом укупних IgE (5,1 vs 2,9

kU/l, $p=0,110$), а са мањом концентрацијом TSLP (16,4 pg/ml, range 10,9, vs 32,0 pg/ml range 167,1, IQR 35,6,, $p=0,047$; ROC curve: area 0,855, cut off $\leq 25,1$ pg/ml, сензитивност 100%, специфичност 75%), графикон 21.

Графикон 21. Маркери ендотипа „БХР фенотип са еозинофилном инфламацијом“ код деце без атопије

ЕСР као маркер БХР фенотипа код деце без атопије TSLP и IL-10 као маркери БХР фенотипа у групи деце без атопије са ЕСР $\geq 12,5$ ug/l



Деца без атопије која су имала фенотип са упалом плућа и хроничним визингом са еозинофилном инфламацијом - ендотип „ БХР фенотип са еозинофилном инфламацијом“ (n=5) су у односу на осталу децу без атопије са другим болестима доњих дисајних путева (n=56):

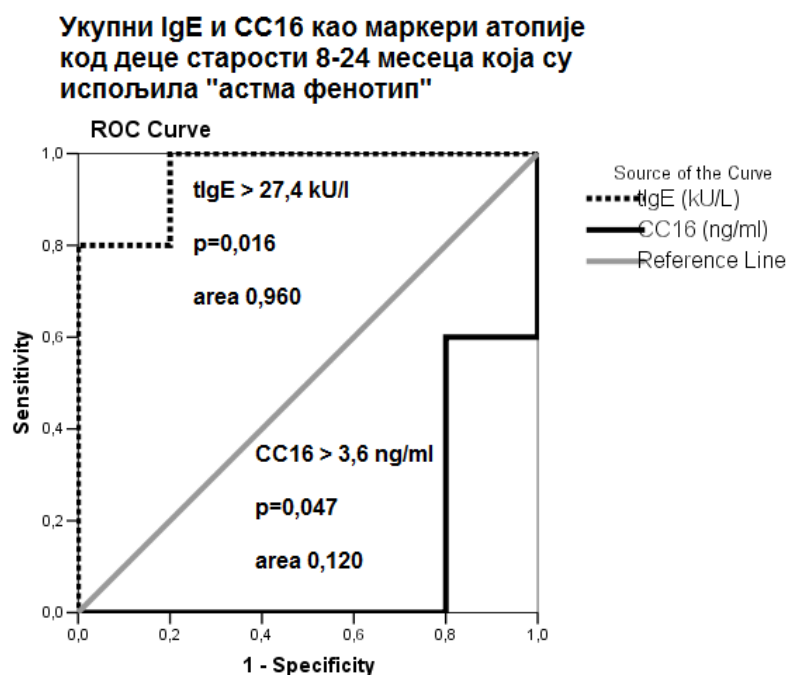
- Старија (19 vs 9,5 месеци, $p=0,004$; ROC крива: area 0,868, за cut off $\geq 14,5$ месеци сензитивност 100%, специфичност 75%) са периодом од престанка дојења (12 vs 3,5 месеци, $p=0,051$; ROC крива: area 0,764, за cut off $\geq 10,5$ месеци сензитивност 80%, специфичност 82%)
- Узраст прве упале плућа (13 vs 7 месеци $p=0,028$; ROC крива: area 0,850, за cut off ≥ 12 месеци сензитивност 80%, специфичност 90%)
- Узраст првог хроничног визинга (14 vs 8 месеци $p=0,030$; ROC крива: area 0,822, за cut off $\geq 12,5$ месеци сензитивност 80%, специфичност 78%)
- Број болести доњих дисајних путева (4 vs 1x, $p=0,002$; ROC крива: area 0,896, за cut off $\geq 2,5x$ сензитивност 100%, специфичност 71%).

Временски редослед испољавања болести доњих дисајних путева код деце без атопије са ендотипом „ БХР фенотип са еозинофилном инфламацијом“ која су била просечног узраста 19 месеци, био је: прва болест доњих дисајних путева дијагностикована је просечно у 8. месецу живота, затим се у 13. месецу испољила упала плућа, а месец дана након тога (у 14. месецу) ова деца су имала дијагнозу хроничне

болести плућа. Ни једно деце са овим фенотипом није имало мајку са алергијском болешћу.

У групи деце са БХР фенотипом (упала плућа + хронични визинг), узраста 8-24 месеца, разлика између деце са атопијом и без атопије била је у концентрацији СС16 (2,8 ng/ml, range 1,8, IQR 1,3 vs 9,9 pg/ml, range 15,1, IQR 10,9, $p=0,056$) и укупним IgE (179 kU/l, range 196,3, IQR 186,2 vs 4,2 kU/l, range 23,9, IQR 13,6, $p=0,016$; ROC крива: area 0,880, за cut off $\geq 27,4$ kU/l сензитивност 80%, специфичност 100%) (графикон 22).

Графикон 22. Маркери атопије код деце са БХР



У групи деце без атопије која нису испољила БХР фенотип (упала плућа + хронични визинг), ЕСР у узрасту 5-7 месеци позитивно корелише са TSLP ($r=0,443$, $p=0,004$, $n=41$), док у узрасту 8-24 месеца TSLP позитивно корелише са TNF α ($r=0,395$, $p=0,046$, $n=26$). Код деце са атопијом без овог фенотипа, у узрасту 5-7 месеци постоји позитивна корелација ЕСР-а и TGF β 1 ($r=0,426$, $p=0,043$, $n=23$), ЕСР-а и IgG RSV ($r=0,657$, $p=0,020$, $n=12$), као и негативна корелација броја акутних визинга са ЕСР ($r=-0,388$, $p=0,045$, $n=27$), и позитивна корелација хроничних визинга са TNF α ($r=0,766$, $p=0,006$, $n=11$), док у узрасту 8-24 месеца постоји негативна корелација ЕСР и броја болести доњих дисајних путева ($r=-0,644$, $p=0,033$, $n=11$).

4.3.2.2.2.2 Континуирани визинг у току три месеца

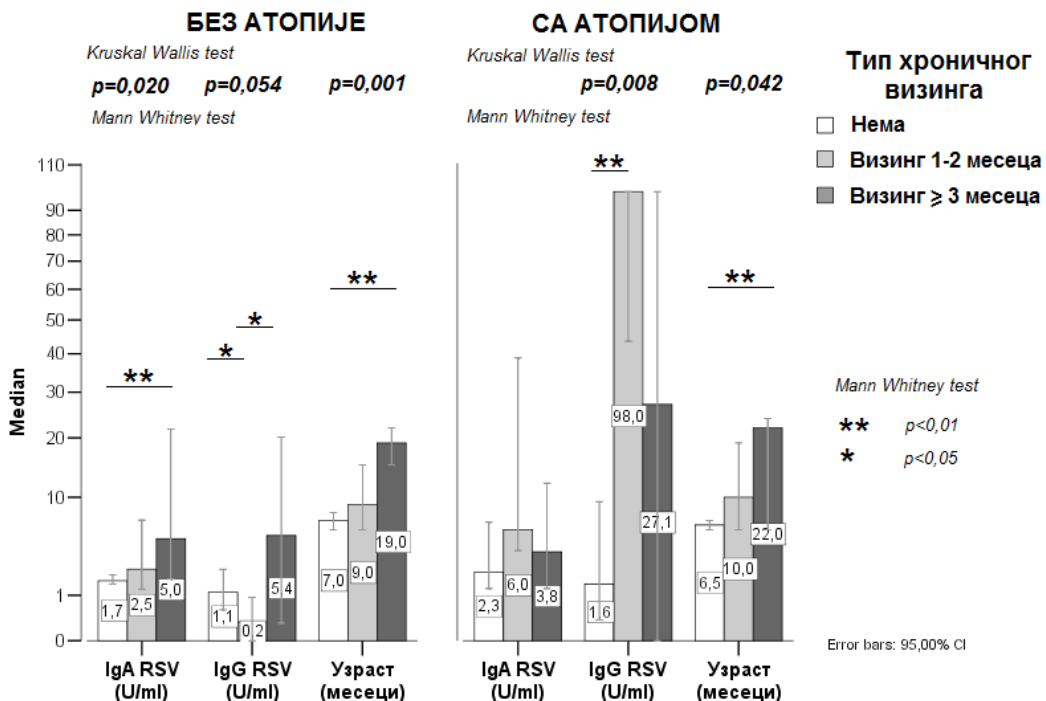
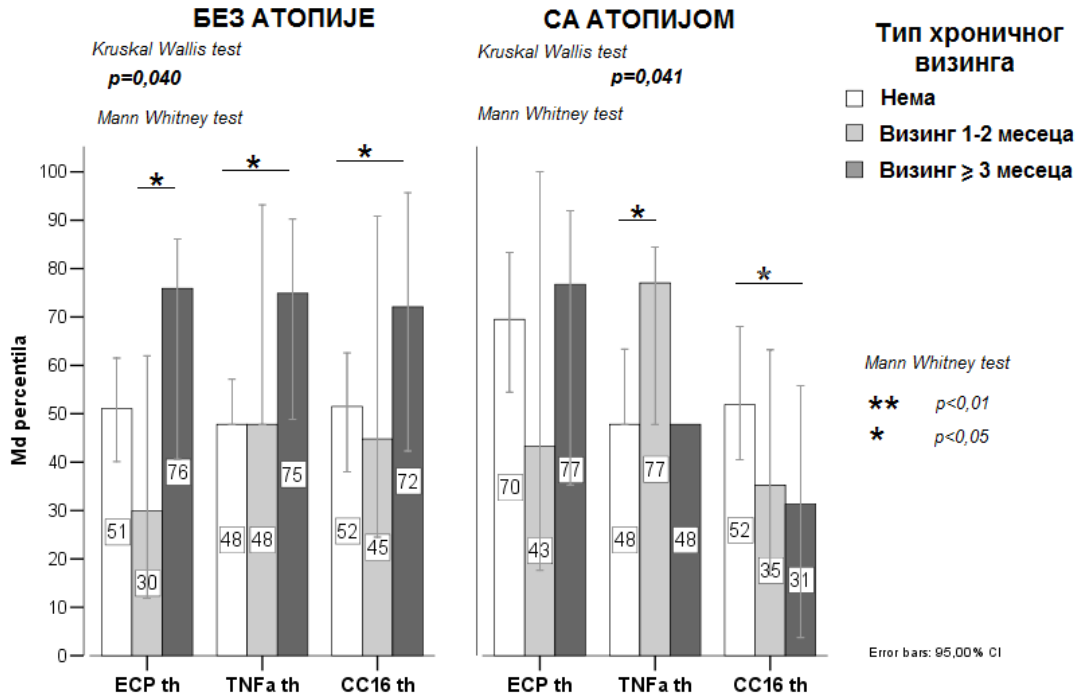
Деца са атопијом и „БХР фенотипом са малом концентрацијом СС16 у серуму“ у 80% су имала континуирани визинг у трајању од 3 и више месеци ($n=4/5$) док су сва деца без атопије са „БХР фенотипом са еозинофилном инфламацијом“ имала континуирани визинг у трајању трајању од 3 и више месеци (100%, $n=4/4$).

У групи деце без атопије, деца са континуираним визингом у току три месеца у односу на децу без овог податка, имала су већи СС16 (6,7 ng/ml vs 4,3 ng/ml, $p=0,050$; ROC крива: за cut off $\geq 6,0$ ng/ml, сензитивност 70%, специфичност 65%, ареа 0,689), већи TNF α (5,5 vs 0,0 pg/ml, $p=0,039$) и IgA према RSV (5,0 vs 1,9 U/ml, $p=0,010$), као и већи ECP (12,9 vs 6,2 ug/ml, $p=0,072$), при чему је разлика у ECP-у била статистички значајна у узрасту ≥ 11 месеци (12,9 vs 4,7 ug/l, $p=0,003$) када се очекује испољавање континуираног визинга дужег од три месеца код деце без атопије, а у ком узрасту је утврђена и разлика у СС16 (7,2 vs 4,1 ng/ml, $p=0,042$). СС16 $\geq 6,0$ ng/ml утврђен је код 70% деце без атопије која су испољила хронични визинг у трајању три и више месеци ($n=7/10$) док је то био случај са 35% деце без атопије која нису имала овај фенотип ($n=35/100$), Fisher $p=0,035$, OR 4,3 CI95% 1,05-17,81).

Разлике у концентрацијама СС16, цитокина урођеног имунитета и хуморалног одговора према RSV у односу на категорије трајања визинга (0=нема, 1= визинг у току 1-2 месеца, 2=визинг у току 3 и више месеци) приказане су на графикону 23. У групи деце без атопије деца са континуираним визингом у трајању од три и више месеци у односу на децу без хроничног визинга су старија (19 vs 7 месеци, $p<0,001$), имају веће концентрације СС16 (6,7 vs 4,5 ng/ml, $p=0,046$), TNF α (5,5 vs 0,0 pg/ml, $p=0,031$) и IgA према RSV (5,0 vs 2,5 U/ml, $p=0,008$), а у односу на децу са хроничним визингом у току 1-2 месеца, сем веће старости (19 vs 9 месеци, $p=0,012$), имају и већи ECP (12,9 vs 3,9 ug/l, $p=0,016$) и IgG према RSV (5,4 vs 0,2 U/ml, $p=0,050$). Маркери испољавања континуираног визинга у току 3 и више месеци у групи деце без атопије у односу на осталу децу без атопије, осим старости $\geq 14,5$ месеци и СС16 $\geq 6,0$ ng/ml, су и IgA према RSV $\geq 4,3$ U/ml (сензитивност 70%, специфичност 81,5%, ареа 0,753) и TNF α $\geq 0,75$ pg/ml (сензитивност 83%, специфичност 64%, ареа 0,761), док у групи деце без атопије која су испољила хронични визинг, маркери пролонгираног тока визинга 3 и више месеци су старост $\geq 18,5$ месеци (сензитивност 60%, специфичност 92%, ареа

0,804), ECP $\geq 10,7$ ug/l (сензитивност 60%, специфичност 91%, ара 0,805) и IgG према RSV $\geq 5,9$ U/ml (сензитивност 50%, специфичност 92%, ара 0,746).

Графикон 23. Разлике у концентрацијама CC16, цитокина утођеног имунитета и хуморалног одговора према RSV у односу на трајање хроничног визинга



Како би смо одредили међусобни однос $CC16 \geq 6,0$ ng/ml, $ECP \geq 10,7$ ug/l и IgG према RSV $\geq 5,9$ U/ml, као предиктора континуираног визинга у трајању од три и више

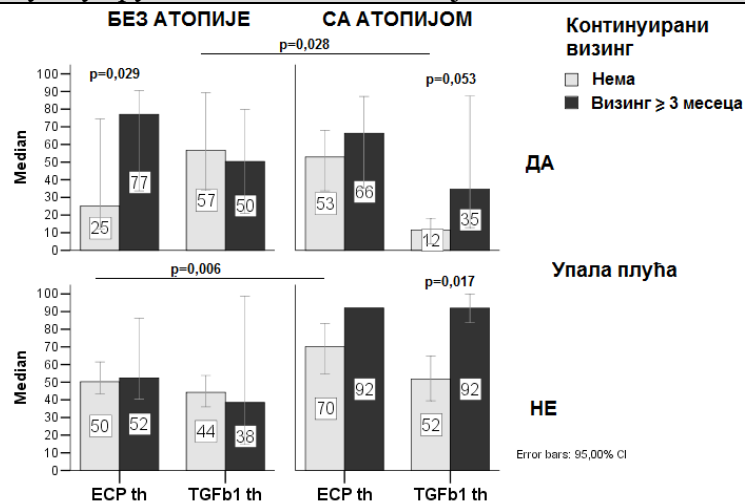
месеца код деце без атопије узраста до две године, применили смо бинарну логистичку регресију ($B = -1,9$, $SE = 0,34$, $Wald = 31,5$, $Exp(B) = 0,15$), која је статистички значајно ($F(3,77)=14,5$, $p=0,002$, $r^2 = 0,172-0,320$) издвојила сва три фактора као независне предикторе пролонгираног тока визинга код деце без атопије у прве две године живота ($CC16 \geq 6,0$ ng/ml: $B = 1,9$, $SE = 0,9$, $Wald = 4,7$, $p=0,031$, $Exp(B) = 6,4$, $CI95\% = 1,2-34,1$; $ECP \geq 10,7$ ug/l: $B = 1,9$, $SE = 0,8$, $Wald = 5,8$, $p=0,016$, $Exp(B) = 7,0$, $CI95\% = 1,4-33,8$; IgG према $RSV \geq 5,9$ U/ml: $B = 1,7$, $SE = 0,8$, $Wald = 4,2$, $p=0,039$, $Exp(B) = 5,3$, $CI95\% = 1,1-26,1$). У групи деце без атопије није било разлике у испитиваним биомаркерима између деце са $CC16 \geq 6,0$ ng/ml, док је у групи деце са атопијом и $CC16 \geq 6,0$ ng/ml утврђена мања концентрације IL-10 у односу на децу са атопијом и мањим концентрацијама $CC16$ (IL-10: $3,7$ pg/ml, $n=13$ vs $10,1$ pg/ml, $n=30$, $p=0,048$), при чему је ова разлика у IL-10 постојала у узрасту 8-18 месеци ($1,2$ vs $10,1$ pg/ml, $p=0,053$). Ни једно дете са атопијом и $CC16 \geq 6,0$ ng/ml није имало хронични визинг ($n=0/15$) док је то био случај у $34,2\%$ деце са атопијом која су имала ниже концентрације $CC16$ ($n=13/38$, Fisher, $p=0,006$), као ни упалу плућа ($n=0/15$) док је она утврђена у $21,1\%$ деце са атопијом и нижим концентрацијама $CC16$ ($n=8/38$), Fisher $p=0,055$.

У групи деце са атопијом, деца са хроничним визингом у трајању од 1-2 месеца у односу на децу без хроничног визинга имају веће концентрације $TNF\alpha$ ($6,2$ vs $0,0$ pg/ml, $p=0,040$) и IgG према RSV ($98,0$ vs $1,6$ U/ml, $p=0,002$), док деца са континуираним визингом у трајању од три и више месеци у односу на децу без хроничног визинга су старија (22 vs $6,5$ месеци, $p=0,026$) и имају мањи $CC16$ ($3,3$ vs $4,5$ ng/ml, $p=0,057$). Није утврђена статистички значајна разлика у испитиваним биомаркерима између деце са атопијом која имају хронични визинг 1-2 месеца и континуирани визинг три и више месеци. Маркери дијагнозе хроничног визинга код деце са атопијом у односу на децу са атопијом без ове дијагнозе су $TNF\alpha \geq 4,0$ pg/ml (сензитивност 75% , специфичност 100% , $area = 0,852$) и IgG према $RSV \geq 35,9$ U/ml (сензитивност 100% , специфичност 95% , $area = 0,985$), а маркери испољавања континуираног визинга у току 3 и више месеци у групи деце са атопијом у односу на децу без континуираног визинга су старост $\geq 21,5$ месеци (сензитивност 57% , специфичност $97,8\%$, $area = 0,753$) и $CC16 \leq 3,4$ ng/ml (сензитивност 71% , специфичност 70% , $area = 0,711$).

Деца са атопијом, упалом плућа и континуираним визингом у трајању три и више месеци, имала су већи $TGF\beta 1$ у односу на децу са упалом плућа без

континуираног визинга ($p=0,053$; ROC крива: за cut off $\geq 14,3$ ng/ml, сензитивност 80%, специфичност 100%, area 0,933) у узрасту од просечно 22 месеца, са истовременим испољавањем упале плућа и првог хроничног визинга у узрасту од 10 месеци. У групи деце са атопијом без упале плућа, деца која су испољила континуирани визинг у току три месеца у односу на децу без овог фенотипа, имала су такође статистички значајно веће концентрације TGF β 1 ($p=0,017$; ROC крива: за cut off $\geq 32,5$ ng/ml, сензитивност 100%, специфичност 91,7%, area 0,958), у узрасту од просечно 14 месеци, при чему је први хронични визинг испољен у узрасту од 6,5 месеци (графикон 24).

Графикон 24. ECP и TGF β 1 у односу на испољавање континуираног визинга у току 3 месеца и упале плућа у групи деце са и без атопије



У групи деце са атопијом TGF β 1 $\geq 32,5$ ng/ml има 42,9% деце са континуираним визингом у току 3 и више месеци ($n=3/7$), док је код деце без пролонгираног визинга то био случај у 10,3% ($n=4/39$), $p=0,027$, OR 6,6 CI95% 1,06-40,49). Деца са атопијом која су имала TGF β 1 $\geq 32,5$ ng/ml у узрасту 8-18 месеци имала су и мањи CC16 (1,7 ng/ml, $n=2$) у односу на децу са атопијом и мањим концентрацијама CC16 (4,4 ng/ml, $n=8$), $p=0,044$.

Како би смо утврдили физиолошки однос између испитиваних биомаркера код деце са атопијом и без атопије анализирали смо њихову повезаност у групи деце без болести доњих дисајних путева. Код деце са атопијом која нису имала болести доњих дисајних путева утврдили смо негативну корелацију CC16 са TGF β 1 ($r=-0,422$, $p=0,057$, $n=21$), као и CC16 са IL-10 ($r=-0,496$, $p=0,011$, $n=21$) и CC16 са TSLP ($r=-0,885$, $p<0,001$, $n=13$), (јединствени допринос смањењу CC16 има TSLP ($F(1,12)=8,7$, $p=0,013$, adj r^2

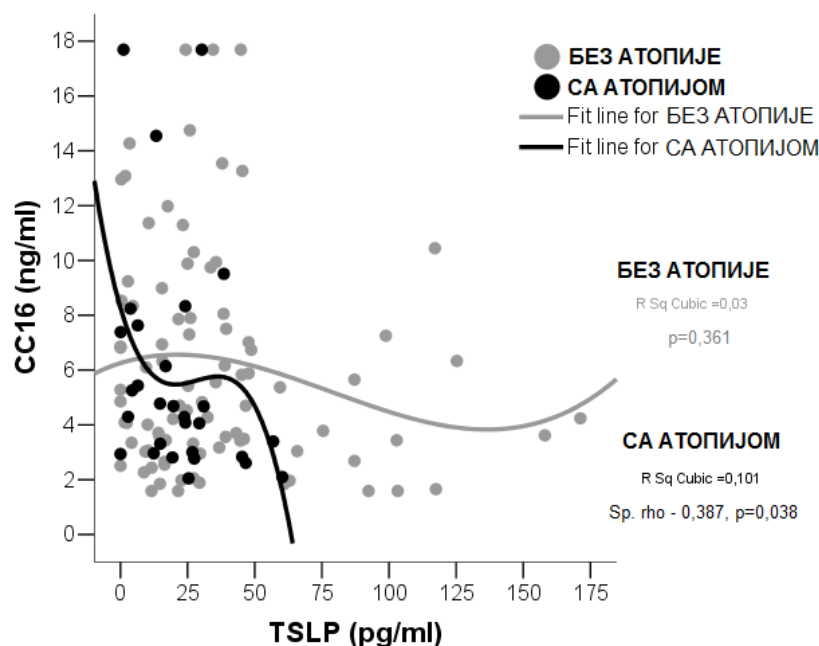
0,391; B -0,21, SE 0,07, beta -0,665, t -3,0, CI95% -0,37 до -0,05, без независног утицаја TGF β 1 и IL-10), мада је IL-10 позитивно корелисао са TSLP ($r=0,685$, $p=0,010$, $n=13$). У групи деце са атопијом и са болестима доњих дисајних путева утврђена је позитивна коелација IL-10 са укупним IgE ($r=0,435$, $p=0,043$, $n=22$), ECP ($r=0,451$, $p=0,060$, $n=18$) и TSLP ($r=0,653$, $p=0,011$, $n=14$), без значајне повезаности TSLP и CC16 ($p=0,328$), као ни IL-10 и CC16 ($p=0,447$), или TGF β 1 са CC16 ($p=0,408$).

У групи деце без атопије која нису имала болести доњих дисајних путева утврђена је позитивна корелација IL-10 са TSLP ($r=0,548$, $p=0,001$, $n=36$), док је у групи деце без атопије са болестима доњих дисајних путева утврђена позитивна корелација IL-10 са укупним IgE ($r=0,378$, $p=0,003$, $n=59$) и TSLP ($r=0,557$, $p<0,001$, $n=48$).

4.3.3. Фактор „TSLP индукција“

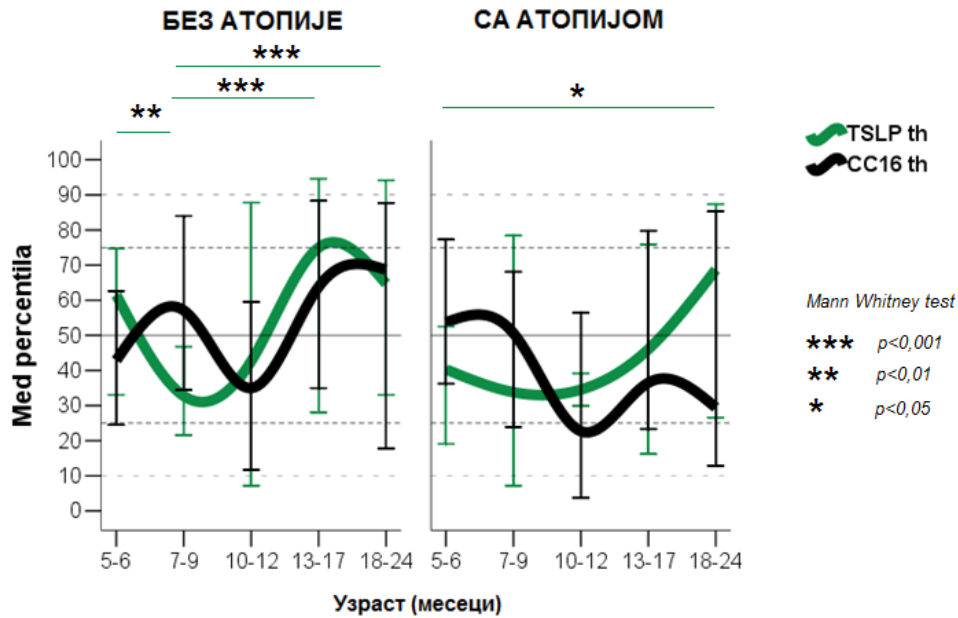
Друга главна компонента унутар које се CC16 појављује као варијабла са значајним уделом је „TSLP индукција“ у којој су мање концентрације CC16 удружене са повећањем TSLP, IL-10, упалом плућа и акутним визингом (табела – факторска анализа). У групи деце са атопијом постоји негативна корелација CC16 и TSLP ($r=-0,387$, $p=0,038$, $n=29$), док у групи деце без атопије није утврђена ова повезаност ($p=0,361$), графикон 25.

Графикон 25. Корелација CC16 и TSLP код деце са атопијом и деце без атопије



Анализа разлика у концентрацији CC16 и TSLP у односу на узраст показала је да код деце без атопије, после транзитивног пада TSLP у узрасту 7-9 месеци, постоји статистички значајан пораст TSLP у узрасту 13-17 месеци, док је код деце без атопије то случај у узрасту 18-24 месеца (графикон 26).

Графикон 26. Узрастне промене TSLP и однос са CC16 код деце са атопијом и без атопије



Деца са атопијом и ендотипом „БХР фенотип са ниским CC16“ (који смо предходно дефинисали) имају осим мањег CC16 и већи TSLP (51,1 pg/ml, range 47,9, IQR 38,8 vs 19,4 pg/ml, range 46,7, IQR 21,7, $p=0,043$), па концентрација TSLP у серуму $\geq 41,9$ pg/ml може бити маркер ендотипа БХР са ниским CC16 (сензитивност 75%, специфичност 96%, area 0,820). Деца са атопијом која имају TSLP у серуму $\geq 41,9$ pg/ml су старија од деце са мањим концентрацијама TSLP (18,5 vs 6 месеци, $p=0,025$; ROC крива: area 0,855, за cut off $\geq 12,5$ месеци, сензитивност 75%, специфичност 84%) и имају мање концентрације CC16 (2,7 vs 4,7 ng/ml, $p=0,013$), чешће имају податак о алергији мајке (75%, $n=3/4$ vs 12,0%, $n=3/25$, Fisher $p=0,020$, OR 22,0 CI95 1,7-285,9) и „БХР фенотип“ (75%, $n=3/4$ vs 4,0%, $n=1/25$, Fisher $p=0,004$, OR 72,0 CI95 3,5-1476,1). У групи деце са атопијом анализа главних компонената која је обухватила „БХР фенотип“, алергију мајке, узраст ≥ 13 месеци, $CC16 \leq 3,4$ ng/ml, $TSLP \geq 41,9$ pg/ml груписала је све варијабле у један фактор који објашњава 52% заједничке варијансе (КМО 0,634, Bartlett's $p < 0,001$) са највећим факторским оптерећењем за $TSLP \geq 41,9$ pg/ml (F 0,926), а затим „БХР фенотип“ (F 0,774), $CC16 \leq 3,4$ ng/ml (F 0,642), узраст ≥ 13 месеци (F 0,634) и мајку са алергијом (F 0,581).

4.3.3.1. Детерминанте концентрација TSLP у серуму

Како би смо утврдили детерминанте које су повезане са променом концентрације TSLP применили смо тест корелације. У групи деце са атопијом TSLP позитивно корелише са временом које је протекло од престанка дојења ($r=0,442$, $p=0,016$), као и са IL-10 ($r=0,646$, $p=0,000$) и IgG према RSV ($r=0,532$, $p=0,041$), док у групи деце без атопије TSLP такође позитивно корелише са временом које је протекло од престанка дојења ($r=0,485$, $p=0,000$) и са IL-10 ($r=0,546$, $p=0,000$), као и бројем J02 ($r=0,347$, $p=0,001$), а негативно са податком о постојању екцема у породици ($r= - 0,231$, $p=0,030$, $n=88$).

Да би смо утврдили најснажније предикторе серумске концентрације TSLP у један линеарни модел укључене су индивидуалне карактеристик: узраст, време протекло од престанка дојења и дужина дојења, као и варијабле респираторних болести: број ринитиса, фарингитиса, акутних бронхијалних болести, хроничних бронхијалних болести и упала плућа. У групи деце са атопијом, *stepwise* методом (*pairwise*) у статистички значајном моделу ($F(1,28)=8,5$, $p=0,007$, $adj\ r^2\ 0,210$) издвојен је број хроничних болести као најснажнији предиктор већих концентрација TSLP у серуму, при чему је свака болест удружена са већом концентрацијом TSLP за 9,3 pg/ml у односу на децу која немају хроничну бронхијалну болест. У групи деце без атопије у статистички значајном моделу ($F(2,87)=8,0$, $p=0,001$, $adj\ r^2\ 0,139$) издвојена су два независна предиктора TSLP и то дужина дојења, при чему је концентрација TSLP мања за 3,1 pg/ml по сваком месецу дужег дојења у односу на децу која нису дојила и као други независни предиктор број фарингитиса, при чему је свака дијагноза фарингитиса удружена са већим концентрацијама TSLP у серуму за 5,6 pg/ml у односу на децу која нису мала ову дијагнозу (табела 12А)

Табела 12. Предиктори примене концентрација TSLP у серуму

А) Индивидуалне и варијабле респираторних болести		Нестандард. коефицијент		Стандард. коефицијент	<i>t</i>	<i>Sig.</i>	95% CI for B	
Атопија	Варијабле	<i>B</i>	<i>Std. Err.</i>	<i>Beta</i>			Од	До
	(Constant)	48,93	6,80		7,12	0,000	35,42	62,45
БЕЗ АТОПИЈЕ	Дужина дојења	-3,14	0,95	-0,329	-3,30	0,001	-5,04	-1,25
	Број фарингитиса	5,62	2,22	0,253	2,5	0,013	1,21	10,03
СА АТОПИЈОМ	(Constant)	18,05	2,98		6,06	0,001	11,95	24,16
	Број хроничних визинга	9,31	3,20	0,488	2,91	0,007	2,74	15,90

Dependent Variable: TSLP(pg/ml)

У другом моделу линеарне регресије укључени су испитивани биомаркери (tIgE, ECP, IL-10, CC16, TGFβ1 и IgG према RSV). У групи деце са атопијом добијен је статистички значајан модел ($F(2,14)=22,4$, $p<0,001$, adj r^2 0,753) који је издвојио IL-10 ($p=0,001$) и IgG према RSV ($p<0,001$) као независне предикторе повећаних концентрација TSLP, (појединачно: код деце са атопијом предиктори TSLP су: IL-10 ($F(1,26)=15,6$, $p=0,001$, adj r^2 0,360; B 1,6, SE 0,41, beta 0,620, t 3,9, $p=0,001$, CI95% for B 0,8-2,5) и IgG према RSV ($F(1,14)=10,4$, $p=0,007$, adj r^2 0,401; B 0,4, SE 0,11, beta 0,666, t 3,2, $p=0,007$, CI95% for B 0,1-0,6), док је у групи деце без атопије ($F(2,65)=8,5$, $p<0,001$, adj r^2 0,192) то био случај са IL-10 ($p=0,001$) и ECP ($p=0,043$), (табела 12Б).

Табела 12. Предиктори примене концентрација TSLP у серуму

Б) Биомаркери		Нестандард. коефицијент		Стандард. коефицијент	t	$Sig.$	95% CI for B	
Атопија	Варијабле	B	$Std. Err.$	$Beta$			Од	До
	(Constant)	13,89	6,70		2,07	0,042	0,50	27,29
БЕЗ АТОПИЈЕ	IL-10 (pg/ml)	1,79	0,52	0,384	3,43	0,001	0,75	2,84
	ECP (ug/l)	0,80	0,39	0,231	2,07	0,043	0,03	1,57
	(Constant)	2,12	3,78		0,56	0,585	-6,11	-10,35
СА АТОПИЈОМ	IL-10 (pg/ml)	1,53	0,35	0,588	4,43	0,001	0,78	2,29
	IgG RSV (U/ml)	0,04	0,07	0,637	4,79	0,000	0,19	0,51

Dependent Variable: TSLP(pg/ml)

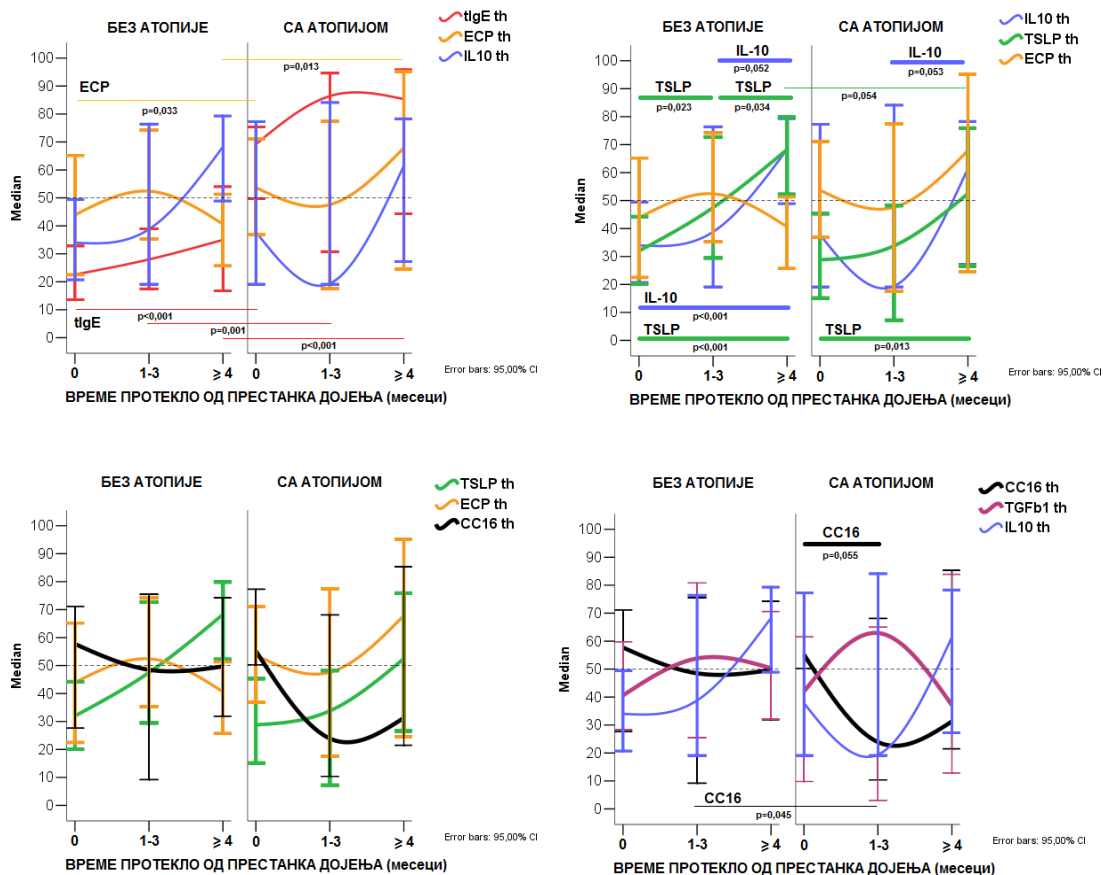
4.3.3.1.1 Начин исхране и TSLP у серуму

Разлике између перцентилних вредности испитиваних биомаркера у односу на време протекло од престанка сисања између деце са и без атопије и унутар ових група приказана је на графикону 27. Веће концентрације TSLP уочавају се код деце без атопије за 1-3 месеца од престанка сисања (25,3 pg/ml, range 125,3, IQR 30,0, $n=22$) у односу на децу која сисају (13,5 pg/ml, range 171,3, IQR 21,8, $n=32$, $p=0,023$), а пораст концентрације IL-10 \geq 4 месеца (1-3 месеца од престанка дојења: 10,1 pg/ml, range 28,9, IQR 10,4, $n=39$ vs сиса: 3,0 pg/ml, range 17,7, IQR 8,8, $n=38$, $p=0,002$). Код деце са атопијом TSLP такође расте са временом које је протекло од престанка сисања, али тај пораст је статистички значајан после 4 месеца од престанка сисања (27,5 pg/ml, range 60,3, IQR 22,4, $n=13$) у односу на децу која сисају (13,3 pg/ml, range 46,6, IQR 18,2, $n=13$, $p=0,012$). Код деце са атопијом у периоду 1-3 месеца од престанка сисања уочавају се ниже концентрације IL-10 (1,9 pg/ml, range 16,0, IQR 9,42, $n=5$) у односу на концентрације IL-10 које су измерене код деце са атопијом која су престала да сисају

пре ≥ 4 месеца (11,1 pg/ml, range 19,9, IQR 5,3, n=19, p=0,053). Код деце са атопијом статистички значајно нижи IL-10 код деце која су у периоду 1-3 месеца од престанка сисања у односу на децу која још увек сисају утврђен је у узрасту 7-12 месеци (престала пре 1-3 месеца: 1,0 pg/ml, n=4 vs сисају: 3,5 pg/ml, n=9, p=0,050), без разлике у TSLP (p=0,429), док је код деце без атопије у истом узрасту TSLP био већи (престала пре 1-3 месеца: 21,8 pg/ml, range 61,0, IQR 28,7, n=10 vs сисају: 9,9 pg/ml, range 27,3, IQR 15,7, n=16, p=0,047), без разлике у IL-10 (3,1 vs 3,7 pg/ml, p=1,000).

Код деце са атопијом ниже концентрације CC16 имала су деца која су у периоду 1-3 месеца од престанка сисања (2,9 ng/ml, n=5) у односу на децу са атопијом која још увек сисају (4,7 ng/ml, n=26, p=0,055), и у том периоду деца са атопијом имају и ниже концентрације CC16 у односу на децу без атопије у истој категорији времена које је протекло од престанка сисања (6,1 ng/ml, n=28, p=0,045).

Графикон 27 . Промена концентрација испитиваних биомаркера у односу на време које је протекло од престанка сисања



4.3.3.1.2 IL-10 и TSLP у серуму

Како би смо испитали јачину повезаности TSLP и IL-10 код деце са атопијом и без атопије применили смо линерану регресију, која је показала да код деце без атопије не постоји значајна повезаност између IL-10 и TSLP у узрасту 5-7 месеци, али је присутна позитивна корелација у узрасту 8-24 месеца (порастан IL-10 у серуму за 0,15 pg/ml са порастом TSLP 1 pg/ml), док код деце са атопијом постоји позитивна повезаност TSLP и IL-10 и у узрасту 5-7 (порастан IL-10 у серуму за 0,36 pg/ml са порастом TSLP за 1 pg/ml), и 8-24 месеца (порастан IL-10 у серуму за 0,18 pg/ml са порастом TSLP за 1 pg/ml), табела 14.

Табела 14. Јачина повезаности између TSLP и IL-10 код деце са атопијом и без атопије у узрасту 5-7 и 8-24 месеца

Атопија	Узраст	Варијабле	Нестандард. коефицијент		Стандард. коефицијент	<i>t</i>	Sig.	95% CI for B	
			<i>B</i>	<i>Std. Err.</i>				Од	До
БЕЗ АТОПИЈЕ	5-7 месеци (F(1,40)=3,3, p=0,084, adj r2 0,05)	(Constant)	4,96	1,51		3,28	0,002	1,90	8,02
		TSLP (pg/ml)	0,05	0,03	0,273	1,77	0,084	-0,01	0,11
	8-24 месеци (F(1,42)=23,3, p=0,000, adj r2 0,35)	(Constant)	3,66	1,49		2,45	0,019	0,65	6,66
		TSLP (pg/ml)	0,15	0,03	0,602	4,82	0,000	0,09	0,22
СА АТОПИЈОМ	5-7 месеци (F(1,17)=12,9, p=0,002, adj r2 0,41)	(Constant)	1,25	2,19		0,57	0,576	-3,39	5,89
		TSLP (pg/ml)	0,36	0,10	0,668	3,59	0,002	0,15	0,57
	8-24 месеци (F(1,8)=6,4, p=0,039, adj r2 0,40)	(Constant)	4,09	2,45		1,67	0,138	-1,69	9,88
		TSLP (pg/ml)	0,18	0,07	0,692	2,54	0,039	0,01	0,35

Dependent Variable: IL-10(pg/ml)

У групи деце без атопије пораст IL-10 са порастом TSLP утврђен је у групи деце која не сисају (p=0,013, B 0,08) (сиса: p=0,109), која су испољила болест доњих дисајних путева (p<0,001, B 0,11) (без болести: p=0,227), и у групи без алергије мајке (p<0,001, B 0,12) (са алергијом мајке: p=0,344).

У групи деце са атопијом позитивна корелација IL-10 и TSLP утврђена је без обзира на исхрану (не сиса: p=0,020, B 0,20; сиса: p=0,030, B 0,32), болест доњих дисајних путева (са болести: p=0,018, B 0,19; без болести: p=0,010, B 0,36), и податак о алергије мајке (да: p=0,001, B 0,32; не: p=0,046, B 0,24).

Како би смо утврдили повезаност испитиваних биомаркера у случају изостанка индукције IL-10, применили смо парцијалну корелацију са IL-10 као контролном варијаблом, што је показало да у групи деце без атопије постоји статистички значајна негативна корелација CC16 и TSLP, при чему са порастом TSLP расте и ECP, док је у групи деце са атопијом ECP растао са TGFβ1, а повећање TGFβ1 праћено је смањењем

TNF α (табела 15). У групи деце без атопије пораст IgG према RSV прати и пораст укупних IgE, док у групи деце са атопијом високи коефицијенти корелације указују да су велике концентрације TSLP и TNF α у серуму удружене са већом концентрацијом IgG према RSV.

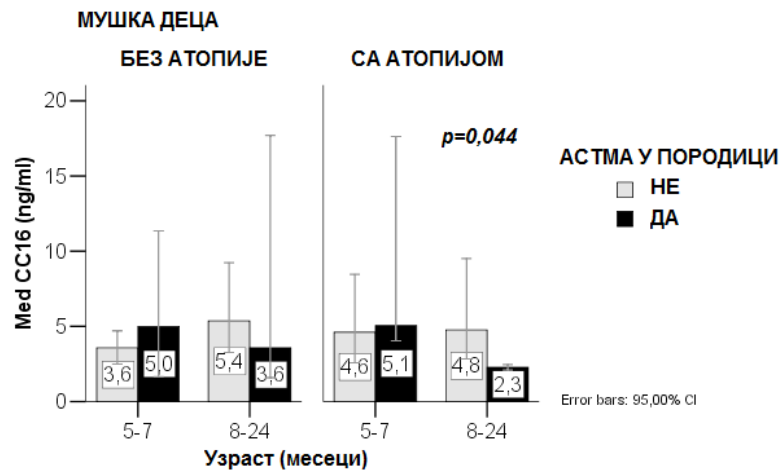
Табела 15. Парцијална корелација испитиваних биомаркера по елиминацији утицаја IL-10 у групи деце са атопијом и без атопије

Контролна варијабла IL-10		Без атопије						Са атопијом					
		tIgE	ECP	TNF α	TSLP	TGF β	IgG RSV	tIgE	ECP	TNF α	TSLP	TGF β 1	IgG RSV
CC16	r	-0,060	-0,016	-0,049	-0,203	-0,084	-0,113	0,075	-0,021	-0,204	-0,126	-0,067	-0,194
	p	0,275	0,439	0,370	0,033	0,221	0,166	0,319	0,452	0,233	0,269	0,348	0,193
	df	100	94	46	81	83,00	74	40	35	13	24	35	20
tIgE	r		-0,089	0,118	0,051	-0,078	0,187		0,026	0,202	0,037	0,091	-0,075
	p		0,196	0,213	0,323	0,240	0,053		0,439	0,236	0,428	0,297	0,371
	df		94	46	81	83	74		35	13	24	35	20
ECP	r			-0,043	0,252	0,037	0,063		0,249	-0,007	0,593	-0,091	
	p			0,387	0,011	0,368	0,296		0,185	0,486	0,000	0,348	
	df			46	81	83,00	74		13	24	33	19	
TNF α	r				0,160	-0,011	0,187			-0,068	-0,441	0,991	
	p				0,138	0,473	0,128			0,404	0,057	0,000	
	df				46	39	37			13	12	5	
TSLP	r					-0,073	0,036				-0,060	0,810	
	p					0,267	0,389				0,386	0,000	
	df					74	63				24	12	
TGF β 1	r						0,054					0,122	
	p						0,328					0,295	
	df						70					20	

4.3.3.2. Алергија у породици

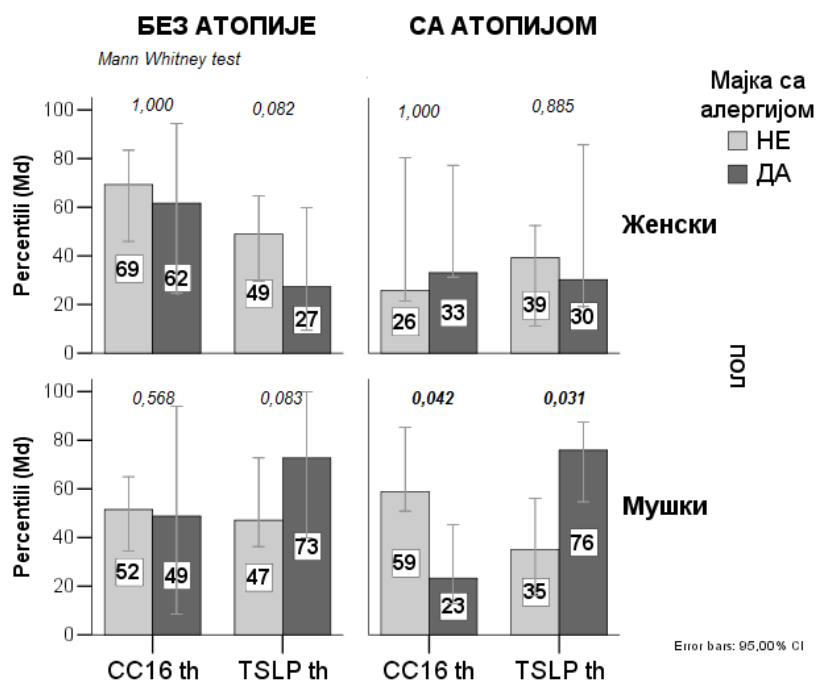
У групи деце са атопијом, податак о постојању астме у породици удружен је са већим концентрацијама TSLP ($p=0,037$; и то у узрасту 8-24 месеца, $p=0,044$, код деце која су престала са сисањем $p=0,025$). У групи мушке деце са атопијом, која су имала податак о астми у породици, у узрасту 8-24 месеца утврђене су мање концентрације CC16 у односу на децу без овог податка ($p=0,044$), графикон 28. Није постојала статистички значајна разлика у учесталости атопије између деце чија мајка има алергију (43,3%, $n=13/30$) и деце чија мајка нема алергију (30,1%, $n=40/133$), $p=0,161$. Деца са атопијом која су имала податак о алергији мајке ($n=13$) у односу на децу без атопије са овим податком ($n=17$) имала су мањи CC16 (3,4 vs 4,3 ng/ml, $p=0,049$), а већи укупни IgE (40,3 vs 3,0 kU/l, $p\leq 0,001$) и већи ECP (21,2 vs 5,8 ug/l, $p=0,008$).

Графикон 28. CC16 код мушке деце по atopији и узрасту у односу на постојање астме у породици



У групи деце са мајком са алергијом деца са atopијом у односу на децу без atopије у узрасту 5-7 месеци имала су већи укупни IgE (15,4 vs 2,0 kU/l, $p=0,001$), док је нижи CC16 утврђен је само у узрастој групи 8-24 месеца (3,1 vs 5,7 ng/ml, $p=0,005$), у ком узрасту је постојала разлика у укупним IgE (193,5 vs 3,6 kU/l, $p=0,000$), али и у TSLP (56,9 vs 25,6 pg/ml, $p=0,036$) и броју болести доњих дисајних путева (5x vs 1,5x, $p=0,031$) и то хроничног визинга (1,5x vs 0, $p=0,042$).

Графикон 29. Перцентилне вредности CC16 и TSLP по atopији и полу у односу на алергију мајке



У групи мушке деце са атопијом (n=27), дечаци који су имали мајку са алергијом (n=6) у односу на дечаке без овог податка (n=21), имали су мање концентрације СС16 (3,4 vs 4,8 ng/ml, p=0,042), а веће концентрације TSLP (45,3 vs 17,2 pg/ml, p=0,031) (графикон 29) и IgA према RSV (6,8 vs 2,3 U/ml, p=0,048), као и чешће акутни ринитис (83,3%, n=5/6 vs 38,1%, n=8/21, p=0,050) и визинг (83,3%, n=5/6 vs 33,3%, n=7/21, p=0,043).

4.3.3.3. Атопија без алергије у породици

У циљу утврђивања узрока атопије која није везана за генетику, анализирали разлике између испитиваних биомаркера између деце са и без атопије у групи која није имала податак о алергији у породици, одвојено по полу.

Када смо анализирали разлике у испитиваним биомаркерима у групи мушке деце која немају алергију у породици (n=54), али су имала атопију (n=15) у односу на мушку децу без атопије у истој групи (n=39), без разлике у узрасту (p=0,699), утврдили смо да су деца са атопијом у односу на децу без атопије са већим концентрацијама СС16 (ROC крива: area 0,674, CI95% 0,521-0,828, за cut off \geq 4,0 ng/ml, сензитивност 80%, специфичност 61,5%), већим укупним IgE (18,1 vs 3,9 kU/l, p \leq 0,001, ROC крива: area 0,926, CI95% 0,860-0,993, за cut off \geq 5,7 kU/l сензитивност 100%, специфичност 82%), са мањом концентрацијом TSLP (14,7 vs 25,0 pg/ml, p=0,047, ROC крива: area 0,720, CI95% 0,543-0,898, за cut off \leq 20,6 pg/ml, сензитивност 67%, специфичност 71%) и већом концентрацијом IgG према RSV (4,5 vs 0,8 U/ml, p=0,037, ROC крива: area 0,718, CI95% 0,543-0,893, за cut off \geq 1,2 U/ml, сензитивност 82%, специфичност 64%, а за cut off \geq 4,3 U/ml, сензитивност 56%, специфичност 86%), уз податак да су у млађем узрасту имали упалу плућа (2 vs 8 месеци, p=0,056, ROC крива: area 1,000, CI95% 1,000-1,000, за cut off \leq 2,5 месеци, сензитивност и специфичност 100%). У групи мушке деце која немају податак о алергији у породици, мушка деца са атопијом у односу на мушку децу без атопије ређе су имала акутни ринитис (40%, n=6/15 vs 74,4%, n=29/39, p=0,018) и акутне бронхијалне болести (33,3%, n=5/15 vs 64,1%, n=25/39, p=0,042), а чешће екцем (60%, n=9/15 vs 28,2%, n=11/39, p=0,030) и чешће су били по О2 на рођењу (60%, n=6/10 vs 14,8%, n=4/27, Fisher p=0,012). Међутим, у групи мушке деце без податка о алергији у породици, између мушке деце са атопијом и мушке деце без атопије само у узрасту 5-7 месеци утврђена је разлика у СС16 (са атопијом: 4,7 ng/ml,

n=11 vs без атопије: 3,2 ng/ml, n=24, p=0,052), (узраст 8-24 месеца p=0,596) и IgG према RSV (5-7 месеци, са атопијом: 1,9 U/ml, n=9 vs без атопије: 0,3 U/ml, n=17, p=0,045; узраст 8-24 месеца p=0,103).

Женска деца која нису имала податак о алергији у породици (n=36), али су имала атопију (n=12) у односу на женску децу без атопије (n=24) у истој групи, осим мањих концентрација CC16 (ROC крива: area 0,700, CI95% 0,505-0,894, за cut off \leq 4,8 ng/ml, сензитивност 75%, специфичност 71%), имала су већи укупни IgE (76,3 vs 2,3 kU/l, p \leq 0,001, ROC крива: area 0,983, CI95% 0,950-1,015, за cut off \geq 6,3 kU/l, сензитивност 100%, специфичност 92%), ECP (13,8 vs 5,9 μ g/l, p=0,016, ROC крива: area 0,788, CI95% 0,609-0,967, за cut off \geq 9,0 μ g/l, сензитивност 87,5%, специфичност 78%), као и већи број болести доњих дисајних путева (1x vs 0, p=0,022).

4.4. Болести доњих дисајних путева у седмој години

2016. године подаци о болестима доњих дисајних путева обрађени су код 161 детета просечног узраста 7 година (range 3, min. 6 - max. 9 година), од којих је 52 детета имало атопију, а код 109 није утврђена атопија у узрасту до две године. Болест доњих дисајних путева у 7. години живота (J20, J40, J44, J441, J45, J15, J18), имало је 26,1% деце (n=42/161), 28,7% дечака (n=27/94) и 22,4% девојчица (n=15/67), p=0,367. Није утврђена разлика у учесталости болести доњих дисајних путева у 7. години живота између деце са атопијом и без атопије у узрасту до две године (25%, n=13/52 vs 26,6%, n=29/109, p=0,828). Такође, није утврђена разлика у учесталости болести доњих дисајних путева у 7. години живота између деце са и без алергије у породици (25,4%, n=18/71 vs 26,7%, n=24/90, p=0,850), односно податка о постојању астме у породици (са: 21,4%, n=9/42 vs 13,4%, n=16/119, p=0,219).

4.4.1. БХР у узрасту до две године и испољавање болести доњих дисајних путева у седмој години

Учесталост болести доњих дисајних путева у 7. години живота, као и дистрибуција у односу на испољени БХР фенотип у прве две година живота приказана је у табели 16. Деца која су имала БХР фенотип (хронични визинг и упала плућа са \geq 3x болести доњих дисајних путева) у узрасту до 2 године (n=11), у просечном узрасту од 7

година чешће су имала болести доњих дисајних путева (54,5%, n=6/11) у односу на децу која нису имала овај фенотип у узрасту до 2 године (24%, n=36/150), Fisher $p=0,036$, OR 3,8 CI95% 1,1-13,2.; односно у односу на децу која су имала друге фенотипове респираторних болести у узрасту до 2 године (21,1%, n=16/76, Fisher $p=0,027$, OR 4,5 CI95% 1,2-16,7). У групи деце која су имала БХР у узрасту до две године било је 36,4% девојчица (n=4/11) и њих 75% је имало и болести доњих дисајних путева у 7. годни живота (n=3/4), док је у групи мушке деце са БХР-ом у прве две године њих 42,9% (n=3/7) испољило и болест доњих дисајних путева у 7. години. У групи деце без БХР-а 24% деце је испољило болест доњих дисајних путева у 7 години, без разлике по полу ($p=0,227$) или атопији ($p=0,987$).

Табела 16. Учесталост болести доњих дисајних путева у седмој години у односу на БХР испољен у прве две године живота

Варијабла	Категорија	Укупно (N, %)	БХР фенотип у 5-24 месеца (N)		Fisher тест (p)
			ДА	НЕ	
Укупно обрађено 2016. год		161	11	150	
Дијагноза болести доњих дисајних путева					
Болести доњих дисајних путева	ДА	42 (26,1%)	6	36	0,036
	НЕ	119	5	114	
Акутни бронхитис (J20)	ДА	32 (19,9%)	4	28	0,151
	НЕ	129	7	122	
Хроничне бронхијалне болести (J45, J44, J441)	ДА	12 (7,5%)	2	10	0,192
	НЕ	149	9	140	
Хронични бронхитиси (J44, J441)	ДА	3 (1,9%)	1	2	0,192
	НЕ	158	10	148	
Астма (J45)	ДА	10 (6,2%)	1	9	0,518
	НЕ	151	10	150	
Упала плућа (J15, J18)	ДА	3 (1,9%)	0	3	0,808
	НЕ	158	11	147	
Кашаљ (R05)	ДА	21 (13%)	2	19	0,434
	НЕ	140	9	131	

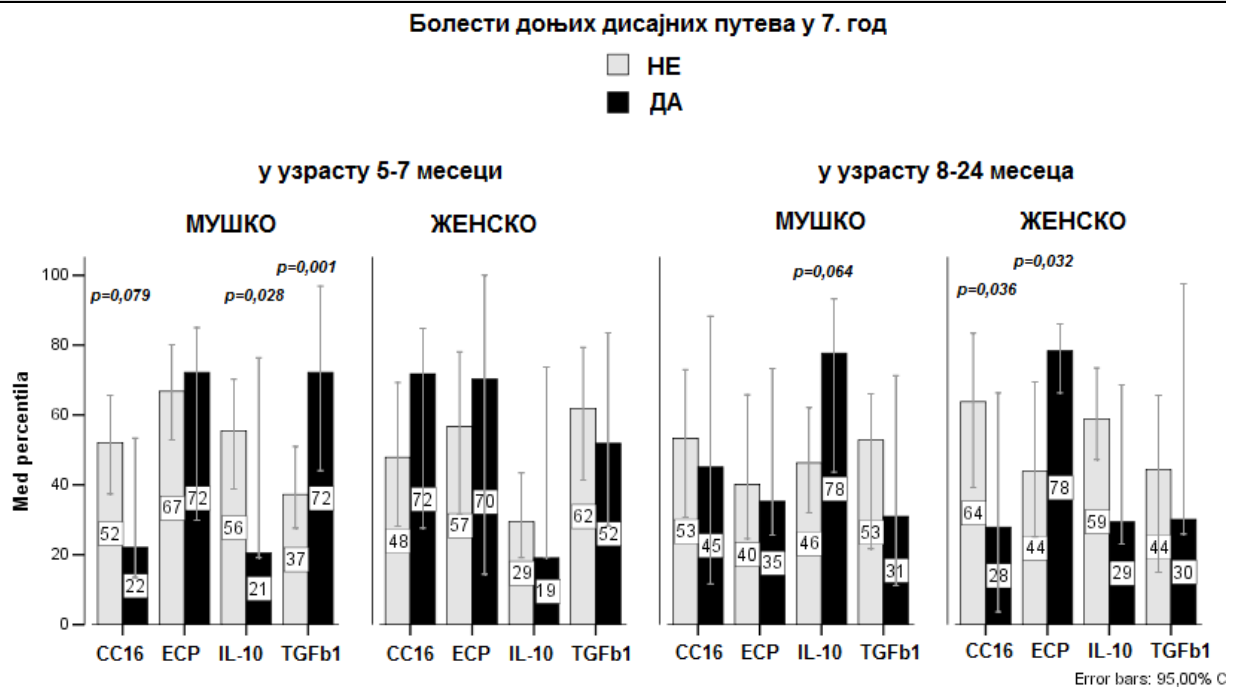
Анализа биомаркера у групи деце са БХР фенотипом у прве две године по полу показала је да у групи мушке деце која су испољила БХР у узрасту до две године, деца која су имала болести доњих дисајних путева у 7 години имала су већи СС16 (10,4 ng/ml, n=3) у односу на децу без ових болести у 7 години (3,7 ng/ml, n=4, $p=0,057$; ROC крива: за cut off СС16 $\geq 7,25$ ng/ml, сензитивност 100%, специфичност 100%, area 1,000); док је у групи мушке деце без БХР утврђена мања концентрација СС16 (3,4 ng/ml, n=24 vs 4,7 ng/ml, n=63; $p=0,024$; ROC крива: за cut off СС16 $\leq 3,6$ ng/ml, сензитивност 62,5%, специфичност 67%, area 0,667). У групи девојчица са и без БХР

није утврђена разлика у испитиваним биомаркерима у односу на испољавња болести у 7. години живота.

4.4.2. Предиктори болести у седмој години у односу на пол

Обзиром на разлике у испитиваним биомаркерима у односу на пол и узраст код деце до две године, у овим категоријама смо анализирали разлике између деце која имају болести доњих дисајних путева у 7 години у односу на децу без овог податка (графикон 32).

Графикон 32. Разлике у испитиваним биомаркерима у узрасту 5-24 месеца у односу на испољавање болести доњих дисајних путева у 7. години живота по полу и категоријама узраста у коме је испитивање СС16 вршено



Предиктори испољавања болести доњих дисајних путева у 7. години живота код мушке деце су $IL-10 \leq 2,7$ pg/ml (area 0,713, сензитивност 67%, специфичност 81%) и $TGFb1 \geq 27,4$ ng/ml (area 0,810, сензитивност 58%, специфичност 91%) измерени у узрасту 5-7 месеци. Иако разлика у СС16 мерена у узрасту 5-7 месеци није достигла статистичку значајност између мушке деце са и без болести доњих дисајних путева у 7. години, ипак је утврђена већа учесталост $CC16 \leq 3,4$ ng/ml код дечака који су имали болести доњих дисајних путева у 7. години (44,4%, $n=8/18$) у односу на дечаке без ових болести у 7. години (14,7%, $n=5/34$), Fisher $p=0,023$, OR 4,6, CI95% 1,2-17,5.

Мушка деца без атопије која су тестирана у узрасту 5-7 месеци и испољила су болести доњих дисајних путева у 7. години у односу на мушку децу без атопије и без болести доњих дисајних путева у 7. години, у узрасту од 5-7 месеци су имала мањи TSLP (11,0 vs 39,2 pg/ml, $p=0,036$) и IL-10 (0,0 vs 9,2 pg/ml, $p=0,003$), а већи TGF β 1 (25,8 vs 18,3 pg/ml, $p=0,047$), док је у групи мушке деце са атопијом утврђена статистички значајна разлика само у TGF β 1 (28,3 vs 17,9 ng/ml, $p=0,006$).

Предиктори испољавања болести доњих дисајних путева у 7. години живота код женске деце су ECP $\geq 9,0$ ug/l (area 0,841, сензитивност 100%, специфичност 68%) и CC16 $\leq 3,5$ ng/ml (area 0,783, сензитивност 67%, специфичност 74%) измерени у узрасту 8-24 месеца.

4.4.3. Предиктори акутног бронхитиса у седмој години

Дијагнозу акутног бронхитиса (J20) имало је 19,9% деце у узрасту од 7 година ($n=32/161$), без разлике у присутној атопији у узрасту до две године (са атопијом: 17,3%, $n=9/52$ vs 21,1%, $n=23/109$, $p=0,573$). Акутни бронхитис у 7. години јављао се чешће, иако без статистички значајне разлике, код дечака у односу на девојчице (24,5%, $n=23/94$ vs 13,4%, $n=9/67$, $p=0,084$).

Код деце са дијагнозом акутног бронхитиса у узрасту од 7 година, у узрасту до две године измерена је мања концентрација CC16 у односу на децу без ове дијагнозе у 7. години (3,4 ng/ml, $n=32$ vs 4,7 ng/ml, $n=129$, $p=0,011$), и ова разлика је била присутна код деце без атопије у узрасту до две године ($p=0,019$; ROC крива: area 0,659, cut off $\leq 3,7$ ng/ml, сензитивност 74%, специфичност 66%), као и код мушке деце са атопијом у узрасту 5-7 месеци (2,6, $n=3$ vs 5,05, $n=14$, $p=0,047$; ROC крива: area 0,881, cut off $\leq 4,3$ ng/ml, сензитивност 100%, специфичност 79%), али су мушка деца са атопијом у узрасту од 5-7 месеци имала и веће концентрације TGF β 1 (28,5 vs 18,1 ng/ml, $p=0,004$; ROC крива: area 1,000, cut off $\geq 27,5$ ng/ml, сензитивност 100%, специфичност 100%). У групи мушке деце која су у узрасту 5-7 месеци имала CC16 $\leq 3,6$ ng/ml, њих 40,9% је имало акутни бронхитис у узрасту од 7 година ($n=9/22$), док је то био случај у 10% мушке деце са већим концентрацијама CC16 у узрасту 5-7 месеци ($n=3/30$), Fisher $p=0,011$ (OR 6,2, CI95% 1,4-26,9). Паралелно томе, ни једно мушко дете коме је у узрасту од 5-7 месеци измерен TGF β 1 $\leq 18,0$ ng/ml ($n=0/16$) није имало акутни

бронхитис у узрасту од 7 година, док је то био случај у 39,3% мушке деце којима је у узрасту 5-7 месеци измерен већи TGFb1 (n=11/28) Fisher p=0,003.

Деца са акутним бронхитисом у 7. години су у узрасту до две године чешће имали упалу плућа (25%, n=8/32 vs 11,6%, n=15/129, p= 0,054) и то J12 – Pneumonia virales (6,3%, n=2/32 vs n=0/129, Fisher p=0,039). У групи деце без атопије која су испољила упалу плућа дијагностикован је акутни бронхитис у 7. години у 46,7% (n=7/15) док је то био случај у 17% деце без атопије и без упале плућа у узрасту до две године (n=16/94), p=0,009 (OR 4,3 CI95% 1,4-13,4) и чешће су живела у граду (25,7%, n=19/74) у односу на децу са села (8,0%, n=2/25, Fisher p=0,050, OR 0,25 CI95% 0,05-1,1).

Деца са атопијом (до две године) и акутним бронхитисом у 7. години у односу на децу без акутног бронхитиса у 7. години су у узрасту до две године су имала чешће акутни ринитис (88,9%, n=8/9 vs 37,2%, n=16/43, Fisher p=0,006, OR 13,5 CI85% 1,5-118,1). У подгрупи деце са атопијом која нису имала болести доњих дисајних путева, али су испољила акутни ринитис у узрасту до две године, испољавање акутног бронхитиса у 7. години у односу на децу без акутног бронхитиса у 7. години је удружено са већим TGFb1 (36,3 ng/ml vs 22,2 ng/ml, p=0,053).

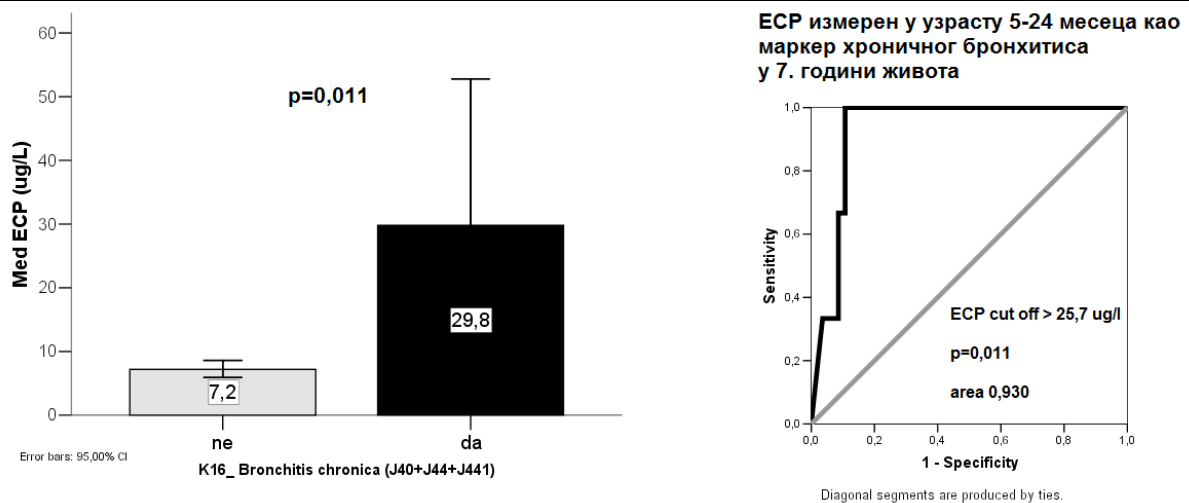
У групи деце без атопије која нису имала упалу плућа у узрасту до две године (n=94) деца која су испољила акутни бронхитис у 7 години у односу на децу која нису имала ову дијагнозу у 7 години имала су мањи CC16 (3,2 ng/ml, n=16 vs 5,4 ng/ml, n=78, p=0,033) и мањи IL-10 (0,7 pg/ml, n=14 vs 6,4 pg/ml, n=73, p=0,050), а у подгрупи без акутног ринитиса и већи TGFb1 (32,2 ng/ml, n=6 vs 18,6 ng/ml, n=14, p=0,033), и IgG према RSV (3,1 vs 0,4 U/ml, p=0,027), док у групи деце са упалом плућа није утврђена разлика у испитиваним биомаркерима у односу на испољавање акутног бронхитиса у 7 години.

Деца са атопијом у прве две године, која су 2016 год имала симптом кашља (R05) имала су ниске концентрације TSLP у узрасту до две године у односу на децу са атопијом без кашља (2,8 n=3 vs 24,1 , n=25, p=0,019). TSLP \leq 9,4 pg/ml код деце са атопијом у прве две године живота може бити маркер испољавања симптома кашља у 7. години живота са сензитивношћу 100% и специфичношћу 84% (area 0,900, CI95% 0,784-1,016). Код деце без атопије није било разлике у испитиваним биомаркерима у односу на симптом кашља (R05).

4.4.4. Предиктори хроничног бронхитиса у седмој години

Хронични бронхитис (J44, J441) у узрасту 7 година имало је 1,9% деце (n=3/161), две девојчице и један дечак, а сво троје деце је било без атопије у узрасту до две године. Деца која су у 7 години имала дијагнозу хроничног бронхитиса, у узрасту до 2 године имала су веће концентрације ЕСП (29,8 ug/ml) у односу на децу без ове дијагнозе (7,2 ug/ml), $p=0,011$; ROC cut off ЕСП $\geq 25,7$ ug/l (сензитивност 100%, специфичност 89%, area 0,930), графикон 33. У групи деце која су имала концентрације ЕСП $\geq 25,7$ ug/l и била без атопије у узрасту до две године у 37,5% је утврђено постојање хроничне бронхијалне болести у 7. години живота (n=3/8) док је то био случај у 3,2% деце која су била без атопије и са мањим концентрацијама ЕСП-а у узрасту до две године (n=3/94), Fisher $p=0,006$ (OR 18,2, CI95% 2,9-114,2).

Графикон 33. ЕСП као маркер испољавања хроничног бронхитиса у 7. години живота



Деца без атопије са ЕСП-ом $\geq 25,7$ ug/l у узрасту до две године имала су већи TSLP (46,7 pg/ml, n=5 vs 25,2 pg/ml, n=81, $p=0,037$), док деца са атопијом и ЕСП-ом $\geq 25,7$ ug/l у узрасту до две године имају већи TGFb1 (32,5 ng/ml, n=7 vs 18,0 ng/ml, n=29, $p=0,001$).

Упала плућа у 7. години није удружена са разликама у испитиваним биомаркерима у прве две године живота.

4.4.5. Предиктори астме у седмој години

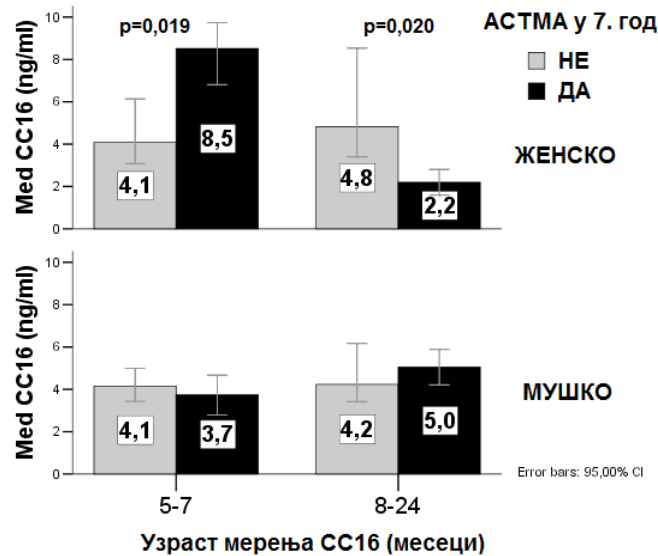
У 7. години живота астма (J45) је дијагностикована у 6,2% (n=10/161), без разлике по полу (Женско: 9,0%, n=6/67 vs Мушко: 4,3%, n=4/94, Fisher p=0,187) или атопији у узрасту до две године (Са атопијом: 9,6%, n=5/52 vs Без атопије: 4,6%, n=5/109, Fisher p=0,186). У групи деце без атопије у узрасту до две године, није било разлике између полова у дијагнози астме у 7 години (Женско: 4,8%, n=2/42 vs Мушко: 4,5%, n=3/67, Fisher p=0,642), док је у групи деце са атопијом било више девојчица са астмом, али без статистички значајне разлике у односу на дечаке (16,0%, n=4/25 vs 3,7%, n=1/27, Fisher p=0,152). Карактеристике деце са астмом у 7 години и испитиване карактеристике у прве две године приказане су у табели 17.

Табела 17. Деца са дијагнозом астме у 7 години живота

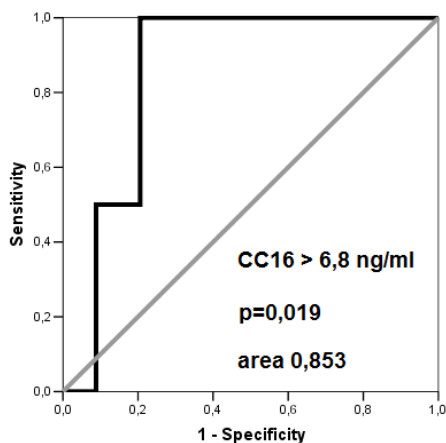
Пол	Атопија у 5-24 мес	CC16 у серуму	Узраст тестирања	Болести доњих дисајних путева у прве две године живота
1 Женско	АТОРИС	2,81	8-24	Акутне бронхијалне болести
2 Женско	АТОРИС	1,59	8-24	Упала плућа, хроничне и акутне бронх. бол
3 Мушко	NONАТОРИС	5,88	8-24	Акутне и хроничне бронхијалне болести
4 Мушко	NONАТОРИС	4,22	8-24	-
5 Женско	АТОРИС	9,41	5-7	-
6 Женско	АТОРИС	7,63	5-7	-
7 Мушко	АТОРИС	4,68	5-7	-
8 Женско	NONАТОРИС	9,74	5-7	-
9 Женско	NONАТОРИС	6,82	5-7	Акутне бронхијалне болести
10 Мушко	NONАТОРИС	2,80	5-7	-

Женска деца са дијагнозом астме у 7. години живота у односу на женску децу која нису имала ову дијагнозу, у узрасту 5-7 месеци имала су већи CC16 (8,5 ng/ml, n=4 vs 4,1 ng/ml, n=34, p=0,019; ROC крива: за cut off \geq 6,8 ng/ml сензитивност 100%, специфичност 79,4%, area 0,853), а у узрасту 8-24 месеца мањи CC16 (2,2 ng/ml, n=2 vs 4,8 ng/ml, p=0,020; ROC крива: за cut off \leq 2,9 ng/ml сензитивност 100%, специфичност 92,6%, area 0,963), без разлике у осталим испитиваним маркерима, графикон 34.

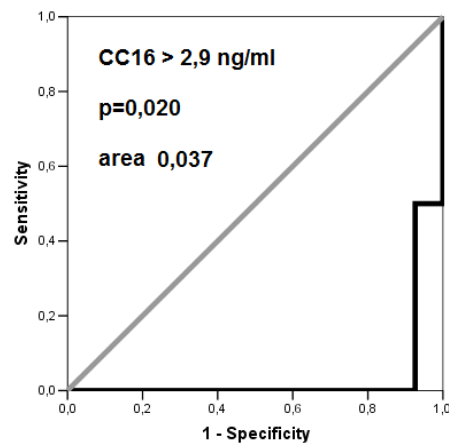
Графикон 34. CC16 у узрасту 5-7 и 8-24 месеци као маркер дијагнозе астме у 7. години живота код девојчица



CC16 у узрасту 5-7 месеци као маркер испољавања астме у 7. години живота код женске деце



CC16 у узрасту 8-24 месеца као маркер испољавања астме у 7. години живота код женске деце



Деца која су у узрасту 5-7 месеци имала $CC16 \geq 6,8$ ng/ml, у 7. години живота су имала астму у 18,2% ($n=4/22$), док је то био случај у 2,9% деце са нижим концентрацијама CC16 у овом узрасту ($n=2/68$), OR 7,3 CI95% 1,2-43,3; док је у групи женске деце са $CC16 \geq 6,8$ ng/ml дијагнозу астме у 7 години имало 36,4% ($n=4/11$) а у групи деце са нижим концентрацијама CC16 то није био случај ни код једног детета ($n=0/27$), $p=0,004$. Са друге стране девојчице које су тестиране у узрасту 8-24 месеца са $CC16 \leq 2,9$ ng/ml у 50% су имале астму у 7. години ($n=2/4$) док то није био случај ни са једном девојчицом која је у овом узрасту имала више концентрације CC16 ($n=0/25$), Fisher $p=0,015$. У узрасту 5-7 месеци ни једно женско дете које је у 7. години испољило астму није имало болести доњих дисајних путева, два је имало атопију а два је било без

атопије. У узрасту 8-24 месеца једно женско деце је имало БХР фенотип, а друго је имало акутни визинг у комбинацији са ринитисом и оба детета су имала атопију. Само једно мушко дете са атопијом у узрасту до две године је имало астму у 7 години и код њега је измерен укупни IgE 5,9 kU/l, док је код остале мушке деце са атопијом измерен укупни IgE 36,7 kU/l, $p=0,074$.

Деца са атопијом у прве две године, која су у 7. год имала дијагнозу астме у односу на децу са атопијом и без астме у узрасту од 7 година имала су у узрасту 5-24 месеца мање концентрације IL-10 у серуму (2,3 vs 10,0 pg/ml, $p=0,039$; ROC: за cut off $\leq 3,5$ pg/ml, сензитивност 100%, специфичност 72%, area 0,811), и мањи CC16 измерен у узрасту 8-24 месеца (2,2 vs 3,8 pg/ml, $p=0,059$). Сва деца са атопијом у узрасту до две године и астмом у узрасту у 7 година имала су IL-10 $\leq 3,5$ pg/ml у узрасту до две године (100%, $n=4/4$), док је код деце са атопијом која нису имала астму у 7 години живота то био случај у 28,2% ($n=11/39$), Fisher $p=0,011$. У групи деце без атопије није утврђена разлику у испитиваним биомаркерима у узрасту до две године у односу на постојање астме у 7 години, мада су деца без атопије са астмом у 7 години чешће живела на селу (75%, $n=3/4$ vs 23,2%, $n=22/95$, Fisher $p=0,049$). Једини симптом у узрасту до 2 године који се издвојио као предиктор астме у 7. години живота је анемија (са астмом 23,5%, $n=4/17$ vs 4,2%, $n=6/144$, Fisher $p=0,002$, OR 7,1, CI95% 1,8-28,3), и то код деце женског пола (60% vs 4,8%, $p=0,004$, OR 29,5, CI95% 3,4-248,8), односно код деце са атопијом (са астмом у 7. год: 44,4%, $n=4/9$ vs без астме у 7. год: 2,3%, $n=1/43$, Fisher $p=0,002$, OR 33,6, CI95% 3,1-362,8).

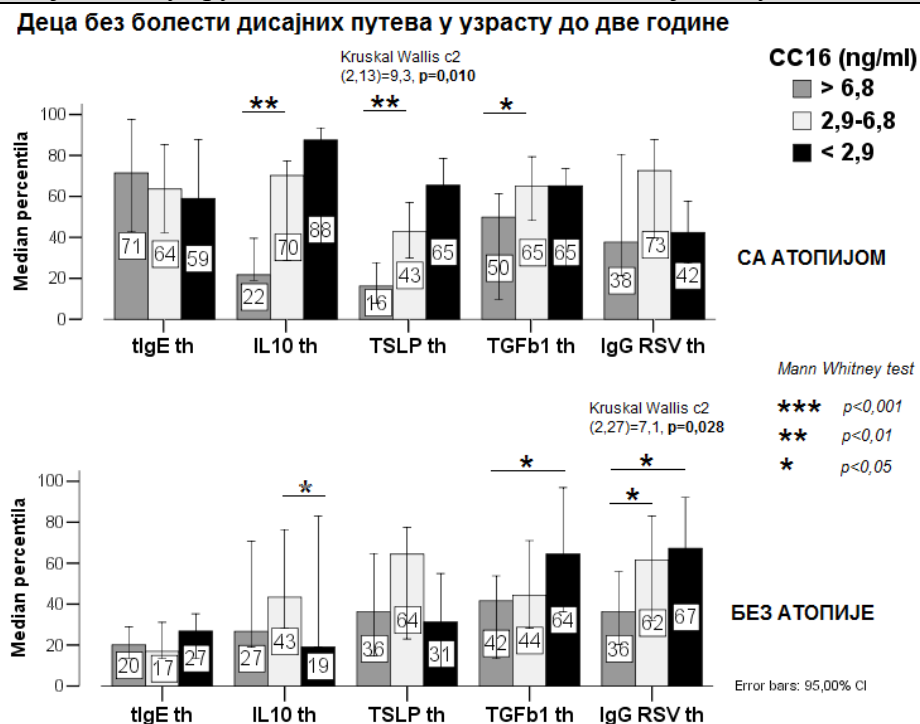
4.4.6. Предиктори одржавања концентрација CC16 у опсегу вредности које нису удружене са повећаним ризиком за испољавање астме у седмој години

С обзиром да за 60% деце која су у 7 години имала астму нисмо имали податак о болести доњих дисајних путева у узрасту у коме су тестирана (и то 10% у 8-24 месеца и 50% у узрасту 5-7 месеци) анализирали групу деце без болести до тренутка тестирања у односу на концентрације CC16. У групи деце са атопијом која нису имала болести доњих дисајних путева у узрасту до две године живота, деца са CC16 $\geq 6,8$ ng/ml у односу на децу са мањим CC16, без разлике у узрасту (6 vs 6 месеци, $p=0,669$) имала су мање концентрације TSLP (3,7 vs 25,6 pg/ml, $p=0,002$), IL-10 (1,0 vs 11,9 pg/ml, $p=0,008$), TGF β 1 (21,1 vs 25,6 ng/ml, $p=0,020$) и то у подгрупи деце која сисају (TSLP $p=0,016$, IL-

10 $p=0,013$, TGF β 1 $p=0,081$), односно мушке деце са атопијом без болести доњих дисајних путева (TSLP $p=0,036$, IL-10 $p=0,016$, без разлике у TGF β 1 $p=0,177$). У групи деце без атопије која нису имала болести доњих дисајних путева у узрасту до две године живота, деца са CC16 $\geq 6,8$ ng/ml у односу на децу са мањим CC16 била су старија (8 vs 6 месеци, $p=0,000$) и имала су мање концентрације RSV према IgG (0,5 vs 3,4, $p=0,009$) и то у подгрупи деце која су сисала у тренутку испитивања (узраст: $p=0,021$; RSV према IgG $p=0,055$) и дојила дуже од 7,5 месеци ($p=0,024$, ареа 0,778, сензитивност 50%, специфичност 100%), као и у подгрупи мушке деце без атопије (узраст: $p=0,055$; RSV према IgG $p=0,045$).

У групи деце са атопијом у узрасту до две године живота деца са CC16 $\leq 2,9$ ng/ml у односу на децу са атопијом и већим CC16 имала су више концентрације TSLP (36,4 vs 14,8 pg/ml, $p=0,011$). У групи деце без атопије која нису имала болести доњих дисајних путева и нису сисала, деца са CC16 $\leq 2,9$ ng/ml у односу на децу са већим CC16 имала су већи IgG према RSV (20,2 vs 1,4 U/ml, $p=0,053$), док је у групи деце без болести која су сисала утврђен и већи укупни IgE (4,2 vs 2,9 kU/l, $p=0,055$), уз гранично већи TGF β 1 (26,3 vs 18,9 ng/ml, $p=0,066$), а статистички значајно нижи IL-10 (0,0 vs 3,2 pg/ml, $p=0,021$), без разлике према полу.

Графикон 35. Перцентилне вредности испитиваних биомаркера у односу на концентрације CC16 у групи деце без болести доњих дисајних путева



Перцентилне вредности испитиваних биомаркера за које је утврђена разлика између категорија $0=CC16 > 6,8$, $1=CC16 2,9-6,8$, $2=CC16 < 2,9$ ng/ml у групи деце без болести доњих дисајних путева приказана је на графикону 35. У групи деце са атопијом велике концентрације CC16 смањивале су се са порастом TSLP, IL-10 и TGF β 1, док је у групи деце без атопије то био случај са IgG према RSV при чему је концентрација CC16 испод 2,9 ng/ml удружена са малим концентрацијама IL-10, а великим концентрацијама TGF β 1 у групи деце без атопије.

4.4.7. RSV инфекција и испољавање болести у 7 години живота

Како би смо утврдили маркере испољавања различитих врста болести доњих дисајних путева у 7 години живота у односу на постојање RSV инфекције у прве две године живота, категорисали смо варијабле хуморалног одговора према RSV на : $0=IgA < 2,0$ U/ml, $IgG < 6,6$ U/ml, $1= IgA \geq 2,0$ U/ml, $IgG < 6,6$ U/ml, $IgA < 2,0$ U/ml, $IgG \geq 6,6$ U/ml, $IgA \geq 2,0$ U/ml, $IgG \geq 6,6$ U/ml. Иако су код деце са атопијом чешће измерени $IgA \geq 2,0$ U/ml, IgG према RSV $\geq 6,6$ U/ml у односу на децу без атопије (47,6% vs 21,3%), није достигнута статистичка значајност разлике у учесталости категорија RSV инфекције у односу на атопију ($\chi^2(3,96)=6,3$, $p=0,099$). У групи женске деце није утврђена разлика у учесталости категорија RSV инфекције у односу на атопију ($p=0,533$). Мушка деца са атопијом чешће су имала налаз $IgA \geq 2,0$ U/ml, $IgG \geq 6,6$ U/ml у односу на мушку децу без атопије (58,3% vs 18,4%), док је ређе утврђен налаз $IgA \geq 2,0$ U/ml, $IgG < 6,6$ U/ml (16,7% vs 30,6%); $\chi^2(3,61)=8,0$, $p=0,045$.

У узрасту до две године и у групи деце без атопије и у групи деце са атопијом утврђена је већа учесталост болести доњих дисајних путева код деце са RSV инфекцијом у односу на децу без инфекције (без атопије: RSV + 89,2%, $n=33/37$ vs RSV - 52,6%, $n=20/38$, $p=0,001$; са атопијом: RSV + 100% , $n=15/15$ vs RSV - 66,7%, $n=4/6$, $p=0,019$) али та разлика није постојала у узрасту од 7 година (без атопије: RSV + 33,3%, $n=12/36$ vs RSV - 26,3%, $n=10/38$, $p=0,509$; са атопијом: RSV + 33,3% , $n=5/15$ vs RSV - 33,3%, $n=2/6$, $p=1,000$).

Код деце која нису имала RSV инфекцију у прве две године живота ($IgA < 2,0$ U/ml, $IgG < 6,6$ U/ml), деца женског пола која су имала астму у 7. години имала су веће концентрације CC16 у узрасту до 2 године у односу на женску децу која нису имала астму у 7 години (8,2 ng/ml, $n=2$ vs 3,5 ng/ml, $n=15$; $p=0,059$) и оба детета су тестирана у

узрасту од 5-7 месеци. Код деце која нису имала *RSV* инфекцију у прве две године живота ($IgA < 2,0 \text{ U/ml}$, $IgG < 6,6 \text{ U/ml}$), деца женског пола која су имала хронични бронхитис у 7. години имала су веће концентрације ЕСП у узрасту до 2 године у односу на женску децу која нису имала хронични бронхитис у 7 години ($41,3 \text{ ug/l}$, $n=2$ vs $4,8 \text{ ug/l}$, $n=13$; $p=0,038$).

Код деце која су имала *RSV* инфекцију са повећањем IgA ($IgA \geq 2,0 \text{ U/ml}$, $IgG < 6,6 \text{ U/ml}$), деца мушког пола која су имала акутни бронхитис у 7. години имала су мање концентрације СС16 у узрасту до 2 године у односу на мушку децу која нису имала акутни бронхитис у 7 години ($1,8 \text{ ng/ml}$, $n=5$ vs $5,2 \text{ ng/ml}$, $n=12$; $p=0,037$), што је било статистички значајно код деце тестиране у узрасту од 8-24 месеца ($1,8 \text{ ng/ml}$, $n=3$ vs $6,4 \text{ ng/ml}$, $n=8$; $p=0,048$; ROC крива: $\text{area } 0,896$, $\text{cut off} \leq 2,9 \text{ ng/ml}$, $\text{сензитивност } 100\%$, $\text{специфичност } 79\%$), без разлике код мушке деце тестиране у узрасту 5-7 месеци ($2,1 \text{ ng/ml}$ vs $2,5 \text{ ng/ml}$; $p=0,533$).

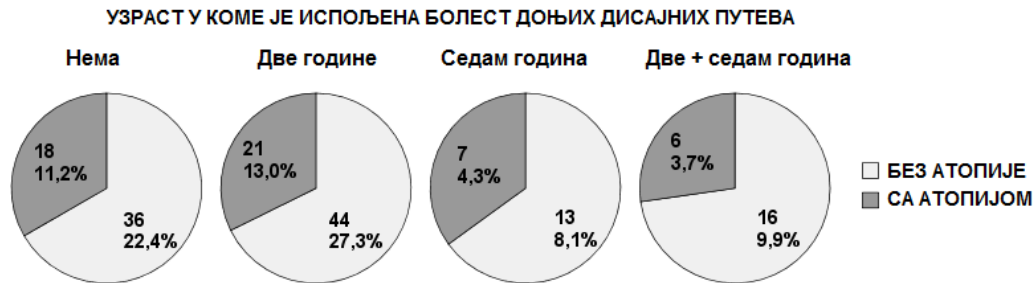
Код деце која су имала *RSV* инфекцију са повећањем IgA и IgG ($IgA \geq 2,0 \text{ U/ml}$, $IgG \geq 6,6 \text{ U/ml}$), деца женског пола која су имала акутни бронхитис у 7. години имала су веће концентрације ЕСП-а у узрасту 8-24 месеца у односу на женску децу која нису имала акутни бронхитис у 7 години ($18,2 \text{ ug/l}$, $n=3$ vs $5,1 \text{ ug/l}$, $n=5$; $p=0,036$; ROC крива: $\text{area } 1,000$, $\text{cut off} \geq 7,3 \text{ ug/l}$, $\text{сензитивност } 67\%$, $\text{специфичност } 100\%$), док су деца мушког пола која су имала акутни бронхитис у 7. години имала мање концентрације укупних IgE у узрасту 8-24 месеца у односу на мушку децу која нису имала акутни бронхитис у 7 години ($3,3 \text{ kU/l}$, $n=3$ vs $25,4 \text{ kU/l}$, $n=11$, $p=0,052$; ROC крива: $\text{area } 0,879$, $\text{cut off} \leq 4,4 \text{ kU/l}$, $\text{сензитивност } 67\%$, $\text{специфичност } 100\%$). У истој групи деце са *RSV* инфекцијом, деца женског пола која су имала кашаљ у 7. години имала су мање концентрације IL-10-а у односу на женску децу која нису имала кашаљ у 7 години ($0,7 \text{ pg/ml}$, $n=2$ vs $8,1 \text{ pg/ml}$, $n=7$; $p=0,056$), уз нижи укупни IgE ($2,5 \text{ kU/l}$ vs $13,0 \text{ kU/l}$), али та разлика није достигла статистичку значајност ($p=0,089$).

4.4.8. Разлике у испитиваним биомаркерима у односу на испољавање болести доњих дисајних путева у другој и у седмој години живота

Како би смо утврдили разлике у испитиваним биомаркерима у односу на испољавање болести доњих дисајних путева у прве две и седмој години живота, извршили смо категоризацију деце на 0=без болести доњих дисајних путева, 1=болест у

прве две године, 2= болест у 7. години живота, 3=болест и у прве две и у 7. години живота.

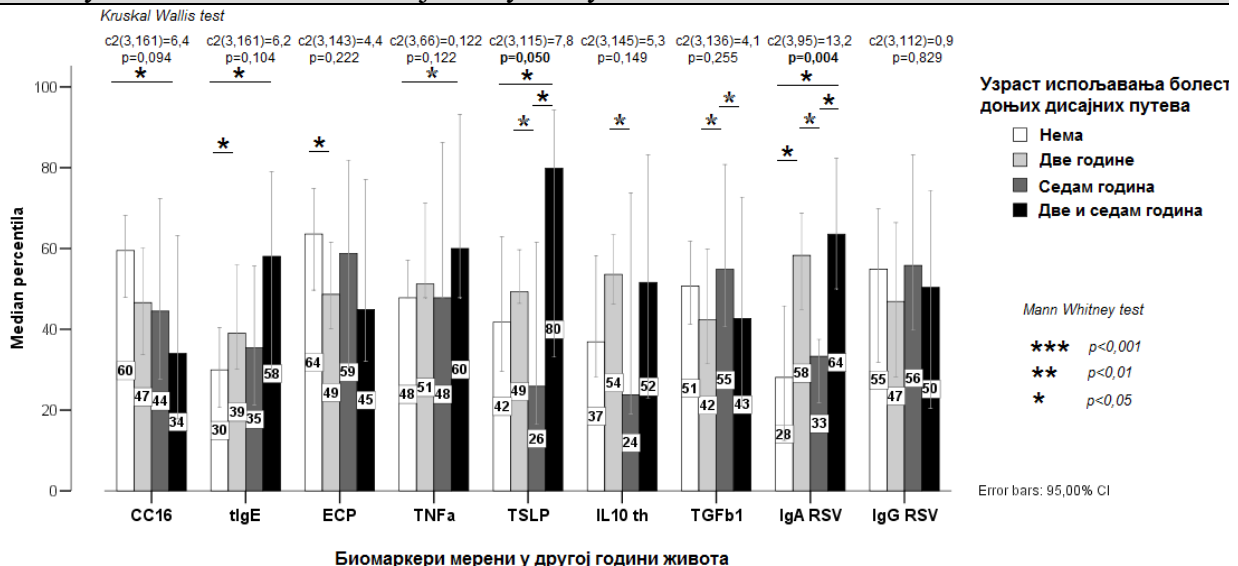
Графикон 36. Учесталост атопије у односу на узраст испољавања болести доњих дисајних путева



У испитиваној групи деце, у 7. години живота болест доњих дисајних путева је испољило 26,1% (n=42/161) и то 26,6% деце са атопијом (n=25/52) и 26,6% деце без атопије (29/109), p=0,828. Није утврђена разлика у учесталости атопије у односу на узраст испољавања болести доњих дисајних путева (Таблица контингенције $\chi^2(3,161)=0,35$, p=0,951, графикон 36.

Разлике у испитиваним биомаркерима у односу на категорије узраста када је испољена болест доњих дисајних путева приказане су на графикону 36.

Графикон 36. Разлике у испитиваним биомаркерима мереним у узрасту до две године у односу на болести доњих дисајних путева у две и седам година живота

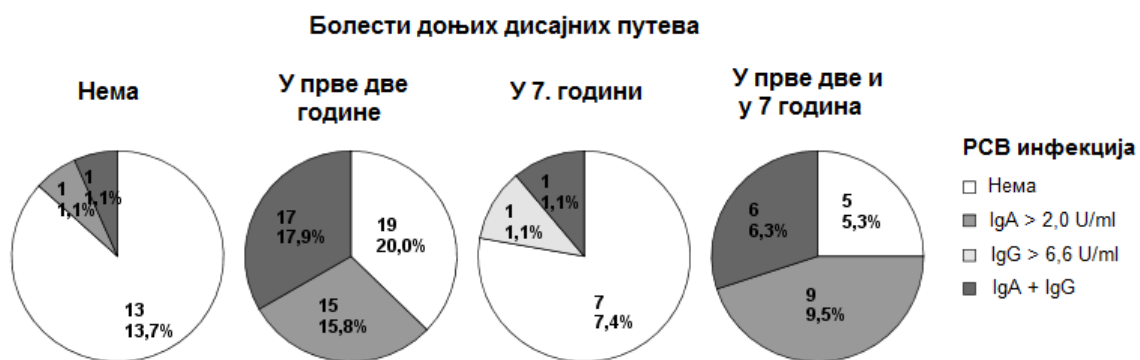


Деца која су имала болести доњих дисајних путева само у узрасту до две године у односу на децу без болести, имала су веће концентрације укупних IgE (5,4 vs 4,0 kU/l,

$p=0,049$) и IgA према RSV (2,6 vs 1,6 U/ml, $p=0,013$), али ниже концентрације ЕСР-а (6,3 vs 8,6 ug/l, $p=0,050$). Деца која су испољила болест доњих дисајних путева и у узрасту и од две и у седам година у односу на децу без болести доњих дисајних путева, у узрасту до две године имала су ниже концентрација СС16 (3,4 vs 5,2 ng/ml, $p=0,013$), али веће концентрације укупних IgE (10,0 vs 4,0 kU/l, $p=0,035$), TSLP (47,8 vs 20,9 pg/ml, $p=0,032$), TNF α (2,3 vs 0,0 pg/ml, $p=0,053$), и IgA према RSV (3,1 vs 1,6 pg/ml, $p=0,001$), без утврђене разлике у имунорегулаторним цитокинима (IL-10 $p=0,478$; TGF β 1 $p=0,691$). Деца која су испољила болести доњих дисајних путева само у седмој години живота у односу на децу која су имала болести само у другој години живота, имала су статистички гранично ниже концентрације IL-10 (1,3 vs 8,7 pg/ml, $p=0,060$), TSLP (11,6 vs 26,8 pg/ml, $p=0,073$) и IgA према RSV (1,7 vs 2,6 U/ml, $p=0,092$), а веће концентрације TGF β 1 (22,8 vs 19,2 ng/ml, $p=0,065$) у узрасту до две године, а у односу на децу која су испољила и болести у другој и у седмој години живота имала су статистички значајно мање концентрације TSLP (11,6 vs 47,8 pg/ml, $p=0,019$) и IgA према RSV (1,7 vs 3,1 U/ml, $p=0,002$), а веће TGF β 1 иако та разлика није достигла статистички значајни ниво (22,8 vs 19,4 ng/ml, $p=0,094$).

Учесталост болести доњих дисајних путева у две и у седам година у односу на категорије РСВ инфекције приказане су на графикону 37.

Табела 37. Учесталост болести доњих дисајних путева у узрасту од две и седам година у односу на РСВ инфекцију



У групи деце која нису имала RSV инфекцију, деца која су имала болести доњих дисајних путева само у 7. год у односу на децу која нису имала болести доњих дисајних путева измерен је већи TGF β 1 (28,0 ng/ml vs 19,0 ng/ml $p=0,035$, ROC крива: area 0,857, за cut off $\geq 19,8$ ng/ml, сензитивност 85,7%, специфичност 83,3%) и без разлике у учесталости атопије у односу на узраст испољавања болести ($p=0,887$). У групи деце са

RSV инфекцијом (IgA, IgG, IgA+IgG) и болестима доњих дисајних путева, деца са атопијом и болестима у другој + 7 години имала су ниже концентрације укупних IgE у односу на децу са атопијом која су имала болести само у другој години живота (28,9 kU/l, n=5 vs 170 kU/l, n=10, p=0,040; ROC крива: area 0,840, за cut off \leq 112,5 kU/l сензитивност 100%, специфичност 70%). У групи деце без атопије није утврђена разлика у испитиваним биомарекрима у односу на узраст испољених болести доњих дисајних путева у другој односно другој и седмој годни живота.

5. ДИСКУСИЈА

5.1 CC16 и индивидуалне карактеристике

5.1.1 CC16 као маркер раста плућа

Клара ћелије на бронхо-алвеоларним прелазима (енг. bronchiolar alveolar duct junction - BADI) су бронхо-алвеоларне стем ћелије (Kim CF, 2005, Perl AK, 2011), које имају значајну улогу у развоју плућа (Evans C, 2004, Atkinson J, 2008). У току развоја плућа, грађање дисталних бронхиола и алвеоларизација који се дешавају у току неколико година након рођења, регулисани су експресијом транскрипторних фактора који регулишу и диференцијацију Клара ћелија и продукцију сурфактанта у терминалним бронхиолама (Evans C, 2004). Анализа броја изолованих CCSP^{poz} ћелија из плућа овце која су по морфологи и постојању пре и постнаталне фазе алвеоларизације током развоја плућа слична хуманим плућима (Scheerlinck 2008, Derscheid PJ, 2012), показала је да се CCSP^{poz} ћелије не могу изоловати пренатално, а постнатално су изоловане у мањем броју у односу на одрасле јединке (Martineau HM, 2013). Код људи концентрација CC16 у серуму пропорционална је броју CC16-позитивних ћелија који је утврђен у биоптатима респираторног епитела (Guerra S, 2015, Shijubo N, 1999). Наши резултати су показали да код деце без атопије, са узрастом постоји континуирани пораст концентрације CC16 у серуму, па сматрамо да се CC16 може разматрати и као индикатор постнаталне фазе развоја плућа код здраве деце без атопије.

Испитивања на анималним моделима су показала да је дефицијенција CC16 праћена је порастом TH2 цитокина (IL-4, IL-5, IL-13) и појавом еозинофине инфламације након инхалаторне сензибилизације (Chen LC, 2001), а понављања оштећења респираторног епитела у току детињства код људи праћена су појачањем TH2 одговора у плућима (Lagerkvist BJ, 2004, Chen LC, 2001, Bernard A 2007, Jacobs J 2012, Laing IA, 2009). Међутим, у нашем испитивању деца са атопијом имала су веће концентрације CC16 у узрасту од 5-7 месеци, па смо мишљења да примарна дефицијенција CC16 није у основи последично јаког развоја TH2 одговора, јер су та деца већ сензибилисана и развила TH2 одговор пре смањења CC16 у серуму.

Утврђено је да респираторни епител код пацијената са астмом функционише абнормално и сензитиван је на оксидативни стрес (Holgate ST, 2010, Sakmak A 2009), а хронично оштећење и продужена активација просеца репарације, може да резултује у

смањењу репараторног потенцијала исцрпљеног пула прогенитора (*Beers MF, 2011*). Хронично оштећење респираторне слузокоже редукује и пролиферативни потенцијал Клара ћелија (*Evans C, 2004*). Смањење СС16 код деце са атопијом (*Ilic N, 2017*) вероватно је последица нежељених ефеката јачања ТН2 одговора који није током времена компензован развојем ТН1 одговора. Наиме, ТНF α и ИNF γ повећавају секрецију СС16 из респираторног епитела (*Yao XL 1998, Yao XL 1998*), па постојање ТН2 одговора који настаје у условима изостанка активације урођеног имунитета (*Abbas AK, Activation of T Lymphocytes 2012*) односно постојања примарно слабог ТН1 одговора код одојчади (услед мање продукције ИL-12 и метилације гена за ИNF γ (*Lewis, 2013- 32*), који је додатно инхибиран јачањем ТН2 одговора (*Abbas AK, Activation of T Lymphocytes 2012*) код деце са атопијом могу бити у основи смањења СС16 у серуму у узрасту ≥ 8 месеци на ниво $\leq 4,8$ ng/ml. Осим тога, ИL-4 је потентни инхибитор раста хематопоетских прогенитора, па уколико се ефекат цитокина урођеног имунитета (ТНF α , ИL-6) разматра из аспекта њиховог ефекта на стем ћелије, при чему је дефицит ИL-6 удружен са смањеним бројем прогенитора (*O'Shea JJ, 2013*), а ТНF α и ИL-6 потенцирају ефекат ИL-3 на повећање пролиферације хематопоетских прогенитора (*Lewis DB, 2013, 17-19*), онда би се смањење активације овог типа урођеног имунитета уз повећање ИL-4 код деце са атопијом могло повезати и са смањењем стем ћелијског пула на нивоу коштане сржи, односно смањењем репулације прогенитора плућног епитела током оштећења *epitel-like* ћелијама из коштане сржи које садрже Клара ћелијски протеин и маркере алвеоларних ћелија типа 1 и 2 (*Wong AP, 2009, Crosby LM, 2010*).

5.1.2 Разлике у морфогенези плућа између полова

У нашем истраживању утврдили смо да је образац промене концентрације СС16 у серуму са узрастом у смислу пораста код деце без атопије и смањења код деце са атопијом присутан и код дечака и код девојчица, иако је интензитет тих промена значајан само код девојчица. Код девојчица са атопијом постоји статистички значајан пад концентрације СС16 са узрастом, при чему се концентрације $\leq 4,8$ ng/ml могу очекивати у узрасту $\geq 6,5$ месеци, а код девојчица без атопије концентрације статистички значајно расту, па узрасту ≥ 8 месеци девојчице без атопије имају већу концентрацију СС16 у односу на девојчице са атопијом.

У групи деце без атопије у узрасту 5-7 месеци женска деца имају веће концентрације СС16 у односу на дечаке. Мушка деца имају мањи калибар дисајних путева (којим се тумачила већа учесталост транзиторног визинга код дечака током раног детињства (*Taussig LM, 2003*), док је код женске деце током интраутериног развоја утврђано раније стварање сурфактанта у односу на дечаке, а измерен је и већи проток ваздуха, односно мањи отпор протицању ваздуха код новорођенчади женског пола у односу на дечаке (*Doershuk CF, 1974*). Мањи отпор протицању ваздуха пропорционалан је већем калибру дисајних путева код девојчица, па се разлике у морфогенези могу објаснити разликама у експресији FGF10, који има улогу у одржавању неопредељених прогенитора епитела плућа у недиферентованом стању током грањања дисајних путева што се остварује индукцијом експресије Sox9 и инхибиције Sox2 потребног за диференцијацију прогенитора (*Volckaert T, 2014*). Конститутивно редукована експресија FGF10 повезује се са варијантом морфогенезе плућа која се огледа у великим и широким дисајним путевима, смањеном алвеоларизацијом, уз одсуство миофибробласта који су од значаја у формирању секундарних септума алвеола и смањеној продукцији еластина (*Ramasamy SK 2007*). Сличан налаз добија се блокадом рецептора за фибробластни фактор раста 2б (FGFR2b) а лиганди за овај рецептор од значаја су у формирању миофибробласта диференцијацијом *Pdgfra+* прогеинотора порекла из мезенхима (*Chao CM, 2016*). Могуће је да се код девојчица супресија FGF10 секреције дешава раније у односу на дечаке, или је осетљивост рецептора за FGF10 мања (потребне веће концентрације FGF10 за његов ефекат), па се диференцијација мезенхимних ћелија у глатке мишићне ћелије проксимално око ураслих делова терминалних дисајних путева дешава раније, што диктира већу ширину дисајних путева, док би ранија супресија FGF10 на врховима ацинуса условила ранију експресију Sox2 у неопредељеним прогениторима и довела до њихове диференцијације у Клара ћелије и алвеоларне ћелије типа 2 које раније почињу да продукују сурфактант, уз укупно мањи потенцијал за диференцијацију у миофибробласте у септама и липомиофибробласте који су основна потпора алвеоцитима тип 2. Утврђено је да девојчице имају мању величину и тежину плућа, као и мањи број али шире респираторне бронхиоле на рођењу у односу на дечаке (*Thurlbeck WM, 1982*), а укупни број алвеола и укупна алвеоларна површина је већа код дечака (*Carey MA, 2007*). Веће осцилације протеина Клара ћелија код женске деце могу се приписати овим разликама у морфогенези плућа која дефинише мушка плућа – уски

дисајних путеви са великом алвеоларном површином и женска плућа – широки дисајни путеви са мањом алвеоларном површином, при чему већи број Клара ћелија као претежних прогенитора мукоцилијарног епитела у широким бронхиолама секретују CC16 чије су количине у серуму веће код девојчица у односу на дечаке.

У испитиваном узрасту, много пре сексулане матурације утицај хормона није релевантан, али се не може искључити осетљивост на минималне разлике између полова. У експреиментима на мишевима показано је да андрогени инхибишу продукцију сурфактанта зависну од TGF β и EGF (*Dammann CE, 2000*), док естрогени повећавају број и величину алвеола (зависно од PDGF и GM-CSF), при чему су ови ефекти много израженији код женских, него код мушких јединки (*Massaro D, 2006, Patrone C 2003*), па је могуће да хормонски утицај има компензаторну улогу у надокнади мање алвеологенезе код женске деце.

Клара ћелије налазе се и у другим ткивима као што су утерус, простата и бубрези. Анализа Клара ћелијског протеина у преко 50 ткива показала је да је CC16 у серуму претежно порекла из респираторног тракта. CC16 порекла из других органа као што је утерус код девојчица не доприноси или врло мало утиче на серумске концентрације CC16 (*Hermans C, 1999*), тако да ткивна дистрибуција CC16 не утиче на разлике између полова које су утврђене нашим испитивањем.

5.1.3 CC16 и исхрана

Мајчино млеко обезбеђује оптималну исхрану одојчета до 6. месеца живота. Препоруке Америчке академије за педијатрију су да дојење траје до 12 месеци (*Gartner LM, 2005*), а Сведске здравствене организације да се дојење треба наставити до краја друге године ([WHO 2001](#)). Мајчино млеко смањује осетљивост одојчади на инфекције (*Oddy WH, 2000, Hanson LA, 2007*) и садржи значајне количине анти-инфламаторних компоненти као што су TGF β 1, IL-10, еритропоетин и лактоферин који редујују прејак проинфламаторни одговор (*Walker A, 2010*). У групи деце која сисају нисмо утврдили разлику у концентрацији CC16 између мушке и женске деце ни у групи деце са атопијом ни у групи деце без атопије, па сматрамо да дојење супримира ефекте инфекција и хемијски инхалираних агенаса на интегритет респираторног епитела и евентуалну активацију имунског одговора. Нижа концентрација CC16 у групи деце која не сисају код деце са атопијом у односу на децу без атопије измерена је у узрасту 8-24 месеца што указује да у условима изостанка протективних и имунорегулаторних

компоненти из мајчиног млека, фактори спољашње средине који утичу на респираторни епител доводе до смањења СС16 код дечака без атопије који не сисају у узрасту од 5-7 месеци, као и код девојчица са атопијом која не сисају у узрасту 8-24 месеца, и/или до повећања СС16 код девојчица без атопије.

5.1.4 Утицај спољашњих фактора на СС16 у серуму

На значај утицаја спољашњих фактора као што су инфекције и/или аерозагађење, на респираторни епител указују и наши резултати да је смањење у СС16 код деце са атопијом у односу на децу без атопије утврђено код деце која нису била генетски оптерећена алергијом односно нису имала алергију у породици.

5.1.4.1 РСВ инфекција и СС16 код мушке деце са атопијом

Код мушке деце без генетске предиспозиције за алергију али са постојањем атопије измерене су веће концентрације СС16 у узрасту 5-7 месеци у односу на мушку децу без атопије и без алергије у породици, а ово повећање СС16 код мушке деце са атопијом повезано је са упалом плућа у узрасту ≤ 3 месеца и IgG хуморалним одговором према RSV уз већи укупни IgE. Респираторне вирусне инфекције могу да измене баланс цитокина у плућима одојчади, (Macaubas C, 2003). RSV блокира индукцију сазревања плазмоцитних DC, сигнализирање преко TLR7 и TLR9, а неструктурни NS протеини RSV вируса, инхибирају индукцију IFN α/β тако што блокирају активацију IRF-3 (интерферон регулаторног фактора 3) и JAK/STAT сигнализацију, док RSV инфицирана мијелоидна DC прави веома мало IFN γ због мање индукције IL-12 (неопходног за индукцију IFN γ), са последично слабим антивирусним и TH1 одговором (Collins PL, 2008, Wu P, 2008). Повећана концентрација СС16 код мушке деце са атопијом, без податка о алергији у породици може бити и последица инфекције Клара ћелија и континуираног анти-апоптотичног ефеката RSV на инфициране ћелије било преко активације NF- κ B и PI3K (*fosfatidilinozitol 3 kinaza*) NS протеинима (што је повезано са дужим преживљавањем инфицираних ћелија) или преко блокаде апоптотичних TNF α сигнала који изазива SH протеин RSV (Collins PL, 2008), при чему у условима доминантног TH2 одговора постоји перзистентна инфекција. Ипак, с обзиром да је у лонгитудиналним студијама RSV бронхиолитис у одојачком периоду повезан са визингом у предшколском узрасту, али не и са астмом у

13. години на живота, могуће је да атопија, настала код деце без генетског ризика због TH2 индуковане инфламације у плућима у току RSV инфекције, не доводи до поремећаја развојних процеса у плућима, с обзиром да је измерена велика концентрација CC16 у серуму код ове деце, која су такође ређе испољавала ринитис и акутни визинг. Са друге стране, мала концентрација CC16 утврђена је код мушке деце са атопијом и податком о алергији мајке у односу на мушку децу са атопијом без алергије мајке у чијем механизму учествује и продукција TSLP (види касније).

Женска деца са атопијом у узрасту 8-24 месеца имају мање концентрације CC16 и у групи са и у групи без генетске предиспозиције, а смањење CC16 у атопији удружено је са јаким TH2 одговором и то већим концентрацијама укупних IgE и ECP-а уз већи број болести доњих дисајних путева у односу на женску децу без атопије. У нашем истраживању утврђена је негативна корелација ECP-а и CC16 код деце са атопијом која не сисају у узрасту од 8-24 месеци.

5.1.4.2 Разлике у CC16 између полова код деце без атопије и оксидативни стрес

У групи деце без атопије и без алергије у породици мушка деца у узрасту 5-7 месеци у односу на женску децу без атопије имала су ниже концентрације CC16 што указује да су примарне полне разлике у концентрацији CC16 везане за ефекат спољашњих фактора и различити образац регенерације епитела у плућима код деце без атопије. Од спољашњих фактора који могу имати утицаја на концентрације CC16 најчешће је описан ефекат хемијских агенаса у инхалираном ваздуху. Највећи број истраживања о утицају аерозагађења на Клара ћелије и регенерацију епитела, добијен је на анималном мишијем моделу оштећења респираторног епитела које је изазвано нафталеном. Нафтален је полициклични ароматични угљено-водоник који се налази у дуванском диму, емисији саобраћајних гасова, пестицидима и амбијенталном ваздуху (*Oliver JR, 2009*). Метаболизам нафталена у цитотоксични реактивни оксид врши се преко P450 изоензима 2F2, који је експримован у Клара ћелијама, што чини ове ћелије примарним метама оштећења изазваног нафталеном (*Plopper CG 1992*). На анималним мишијим моделима је показано да код женске деце постоји бржи метаболизам нафталена која је удружен са ранијим почетком и већим степеном оштећења Клара ћелија у односу на мушке јединке које су изложене истим дозама нафталена (*Oliver JR, 2009*), што може бити зависно од већег броја Клара ћелија код јединки женског пола, па веће концентрације CC16 код женске деце без атопије могу бити последица базично

већег броја и веће пролиферације Клара ћелија у очувању интегритета епитела као континуирано присутне акутне реакције на агенсе у удахнутом ваздуху. Током регенерације долази до пролиферације две врсте прогенитора и то варијанте Клара ћелија које не експримују P450 у NEB (*Rawlins EL 2006, Reynolds SD, 2000, Stripp BR, 2008*) и дупло позитивних ћелија у BADAJ (CCSP+,Psfc +) (*Rawlins EL 2006, Kim CF 2007*), али није познато да ли између полова постоји разлика у примраном месту пролиферације прогенитора Клара ћелија током регенерације (*Oliver JR, 2009*). С обзиром, да су експерименти на анималним моделима показали да после излагања дуванском диму женке мишева развијају емфизему сличне промене много брже и са већом тежином у односу на мужјак (*March TH, 2006*), што је налаз удружен са мањом експресијом FGF10, који је праћен и смањењем броја миофибробласта и липофибробласта који чине стем-ћелијску нишу за алвеоларне ћелије (*Volckaert T, 2014*), као и да се после оштећења нафталеном смањује се експресија Vmp4 и Tsp-1 што индукује диференцијацију бронхоалвеоларних стем ћелија у Клара ћелије (*Lee JH, 2014*), могуће је да се код женске деце која имају широке бронхиоле регенерација бронхиоларног епитела одвија доминантно диференцијацијом варијанти Клара ћелија из NEB, док код мушке деце која имају већу алвеоларну површину прогенитори из BADAJ и двоструко позитивни прогенитори претежно диференцирају у алвеоларне ћелија типа 2 након оштећења, што за последицу има ниже серумске концентрације CC16. У сваком случају, измерена већа концентрација CC16 код женске деце може указивати на већи број Клара ћелија у широким дисајним путевима код женске деце без атопије, као и на виши базални ниво пропустљивости бронхиоларно-алвеоларне-крвне баријере у реакцији на оштећење, док мушка деца са претежно алвеоларним типом плућа имају ниже концентрације CC16 због диференцијације Клара ћелија у алвеоларне ћелије. Не може се искључити ни могућност епителне транзиције Клара ћелија у мијелоидне ћелије код мушке деце.

Иако се већа брзина метаболизма нафталена повезује са естрогенима (*Stelck RL, 2005*), у узрасту наше испитиване групе мало је вероватан утицај хормона на разлике у измереном CC16 између женске и мушке деце без атопије у групи деце која не доје у узрасту од 5-7 месеци и која немају податак о алергији у породици. Клинички и експериментални подаци указују да жене имају већи антиоксидантни потенцијал од мушкараца који није завистан од хормона. NADPH-оксидаза индукује стварање слободних радикала и утврђена је већа концентрација субјединица NADPH код

мушкараца у односу на жене (Nox2 и Nox4), као и већа количина p47 чија је фосфорилација први корак у индукцији формирања NADPH-оксидаза комплекса на мембрани, па су мушкарци тиме предиспонирани за веће стварање супероксида односно већи оксидативни стрес (Kander MC, 2017). Осим тога супероксид дизмутаза конвертује слободне кисеоничне радикале у водоник пероксид, а експресија овог ензима у плућима жена је већа у односу на мушкарце, без утврђених разлика у нивоу каталазе која разграђује H₂O₂ на воду и кисеоник (Chen Y, 2011). Због тога мушка деца могу конститутивно бити осетљивија на токсични ефекат слободних радикала који оштећује Клара ћелије, а то за последицу има и мању концентрацију CC16 у серуму. Осим тога, слободни радикали повећавају експресију *SNAIL1*, док фактор индукован хипоксијом (*HIF1α - hypoxia-inducible factor 1α*) повећава експресију *TWIST1*, транскрипторних фактора који су од значаја за развој епително-мезенхимне транзиције (Lamouille S, 2014), па ниска концентрација CC16 може указивати на овај процес у узрасту 5-7 месеци код мушке деце без атопије. Већа продукција CC16 код женске деце без атопије, са антиинфламаторним ефектом који остварује преко инхибиције фосфолипазе A2, чиме смањује ослобађање липидних медијатора и спречава деградацију сурфактанта, доприноси смањеној осетљивости епитела у дисајним путевима што се манифестује и мањом учесталошћу болести доњих дисајних путева у код деце женског пола.

Анализа испитиваних индивидуалних карактеристика и концентрације CC16 показала је неопходност разматрања два фактора као предиктора $CC16 \leq 4,8 \text{ ng/ml}$ и то: 1) атопије (снажан TH2 одговор) као предиктора малих концентрација CC16 у групи деце узраста 8-24 месеца (повећава ризик 5x) и у групи женске деце (повећава ризик 3,7x) и 2) мушки пол у групи деце без атопије који повећава ризик од малих концентрација CC16 за 2,5x (повећан оксидативни стрес и морфолошке разлике у плућима код деце без атопије).

5.2 CC16 и болести доњих дисајних путева

Наши резултати су показали да деца са атопијом која имају $CC16 \geq 4,8 \text{ ng/ml}$ у узрасту 8-24 месеца нису испољила болести доњих дисајних путева. Иако су деца са атопијом осетљивија на вирусне инфекције (Holt PG, 2012), повећана концентрација CC16 у серуму, која је измерена код здраве деце без актуелне респираторне болести,

може се разматрати као показатељ високог анти-инфламаторног потенцијала на респираторном епителу који поништава повећану осетљивост деце са атопијом на инфекције, којим се може дефинисати атопијски фенотип без болести доњих дисајних путева у узрасту 8-24 месеца (*Ilic N, 2017*). Ипак концентрацију $CC16 \geq 4,8$ ng/ml утврдили смо код само 20% деце са атопијом у узрасту 8-24 месеца.

Подаци у литератури показују да деца са предходно манифестованим визингом имају ниже концентрације $CC16$ у серуму независно од атопије (*Yang KD 2007, Zhao G, 2013*), док наши резултати указују да мушка деца без атопије у узрасту 5-7 месеци као и женска деца са атопијом у узрасту 8-24 месеца имају мање концентрације $CC16$. Тенденција раста $CC16$ са узрастом код деце без атопије која су испољила визинг и упалу плућа, односно смањења $CC16$ код деце са атопијом која су испољила исти фенотип респираторне болести (*Ilic N, 2017*) може указати да исти ендотип (мале концентрације $CC16$ у серуму) у различитом узрасту (5-7 месеци код мушке деце без атопије и у 8-24 месеца код женске деце са атопијом) може имати различиту прогнозу зависну од пола, узраста и постојања атопије. Наиме, мали калибар дисајних путева повезан је са транзиторним визингом који се испољава током прве године код мушке деце без атопије, али не и касније у животу (*Taussig LM, 2003*), може бити повезан и са малим концентрацијама $CC16$ у раном узрасту, који касније расте па уравнотежење анти-инфламаторног потенцијала на респираторном епителу може бити у основи изостанка болести касније у животу (*Ilic N, 2017*). Транзиција ћелија из епителног у мезенхимни фенотип је реверзибилан процес (*Lamouille S, 2014*), па не искључујемо могућност да код мушке деце која не доје у узрасту 5-7 месеци постоји индукција епително-мезенхимне транзиције узрокована слободним радикалима, али да у старијем узрасту код деце без атопије долази до поновног успостављања мезенхимно-епителне транзиције без развоја ремоделовања.

5.2.1 БХР фенотип са малом концентрацијом $CC16$ у серуму код деце са атопијом

У нашем истраживању, код деце са атопијом и упалом плућа утврђена је и већа учесталост хроничног визинга у односу на децу без атопије са упалом плућа, код којих је акутни визинг био чешћи. С обзиром да је код деце са атопијом утврђена удруженост клиничке манифестације упале плућа и хроничног визинга, са $CC16 \leq 3,4$ ng/ml у серуму, при чему су ова деца била у узрасту $\geq 12,5$ месеци, прву болест доњих дисајних

путева развила су у узрасту $\geq 7,5$ месеци и имала су $\geq 4x$ болест доњих дисајних путева, овај фенотип смо дефинисали као „БХР фенотип са малом концентрацијом CC16 у серуму“ код деце са атопијом. Ова деца су имала прву акутну болест доњих дисајних путева у узрасту од 9 месеци, а након просечно четири месеца испољавали су се удружено упала плућа и хронични визинг. Хронично оштећење респираторне слузокоже редукује пролиферативни потенцијал Клара ћелија и доводи до њихове трансдиференцијације у ћелије које продукују мукус (Evans C, 2004). Утицај TN2 цитокина на секрецију CC16 су контрадикторна у литератури. Са једне стране није показан њихов утицај на продукцију CC16 (Yao XL 1998), док са друге постоје резултати да IL-4 и IL-13 појачавају експресију протеина Клара ћелија (Yamada A 2005, Kim S 2002). Конзистентнији су резултати који указују да у присуству IL-13 долази до диференцијације базалних ћелија у пехарасте ћелије, као и да је на Клара ћелијама детектован рецептор за IL-4 а његова активација је неопходна за диференцијацију Клара ћелија у мукус продукујуће ћелије (Kuperman DA, 2005). Концентрације CC16 у серуму $\leq 3,4$ ng/ml које смо измерили код деце са атопијом крајем прве године живота могу указивати на фенотип респираторног епитела у смислу мукозне метаплазије услед претежне диференцијације прогенитора епитела у пехарасте ћелије под утицајем TN2 цитокина. Због изостанка биолошких ефеката CC16 у плућима (инхибиција фосфолипазе A2, на који начин се редукује стварање еоикозаноида и продужава полуживот сурфактанта инхибишући његову хидролизу од стране фосфолипазе A2. (Mantile G, 1993), чишћење полутаната и антипротеазна активност CC16 (Shiyu S, 2011), као и смањења цилијарних ћелија у бронхиоларном епителу услед усмеравање диференцијације прогенитора у пехарасте ћелије, потпуно је компромитован неспецифични имунитет респираторне баријере, који је подложен понављаним оштећењима. Наши резултати су показали да се код деце са атопијом концентрација CC16 смањује на ниво $\leq 3,4$ ng/ml просечно у 11. месецу живота, а да су упала плућа и хронични визинг удружени са малим концентрацијама CC16 дијагностиковани у просечном узрасту 22 месеца (секундарни догађаји).

5.2.2 Акутни визинг и вирусне респираторне инфекције

У нашем истраживању акутни визинг је утврђен чешће код дечака без атопије у односу на девојчице без атопије, и то у групи деце која не сисају у узрасту 5-7 месеци.

Дечаци без атопије са акутним визингом имали су мање концентрације СС16 у односу на девојчице без атопије које су имале акутни визинг, у групи деце која су имала комбинацију акутног ринитиса и акутног визинга и у групи без алергије у породици. Управо у овој групи мушке деце узраста 5-7 месеци утврђено је да са повећањем броја ринитиса долази до пада СС16 у серуму, док испољавање акутног визинга позитивно корелише са СС16.

Изложеност деце полицикличним ароматичним угљоводонцима удружено је кашљем и визингом током прве године живота (*Al-Daghri NM, 2013*). На анималним моделима је показано да деплеција Клара ћелија индукована токсичним метаболитима нафталена створеним оксидацијом преко цитохром Р450 монооксидаза унутар Клара ћелија, изазива БХР и без присутне алергијске сензибилизације, па се нарушавање епителне баријере које ремети физиолошку функцију плућа и деплеција Клара ћелија повезује са симптомима провоцираним дуванским димом или аерозагађењем (*Sonar SS, 2012*). Варијанте Клара ћелија које се налазе у неуроендокриним телашцима и у BADJ су резистентне на оштећење токсичним метаболитима нафталеном (*Volckaert T, 2014*) и утврђено је да управо ове варијанте Клара ћелија учествују у регенерацији респираторног епитела после оштећења (*Giangreco A, 2002*) о чему смо већ говорили.

Као други значајан фактор спољашње средине удружен са визингом у дечијем узрасту су респираторне вирусне инфекције, од којих су највише проучавани *RSV* и *hRV*. Код деце која су у првој години имала једну или више епизода визинга *RSV* инфекција је утврђена у 80%. Примарна *RSV* инфекција најчешће се манифестује као блага инфекција горњих дисајних путева, а ређе су инфекцијом захваћени доњи дисајни путеви што се манифестује бронхиолитисом. Инфекција је чешћа код мушке деце код којих су утврђени и тежи облици болести (*Muenchhoff M 2014*). *RSV* је јако контагиозан, при чему и мали број вируса (1-10 pfu) инфицира базалне ћелије, средње дозе (100 pfu) изазивају инфекције и базалних и других ћелија епитела, док велике дозе (1000 pfu) доводе до ставарња синцицијума у HBEC културама (енг. Human bronchial epithelial cells) (*Persson BD, 2014*), а што је утврђено и у биоптатима деце умрле због тешке респираторне болести (*Johnson JE, 2007*). Експерименти на HBEC културама су показале да се инфекција *RSV* брзо шири у популацији базалних ћелија до 6 дана, да се вирус одржава у ћелијама епитела до 20. дана, након чега долази до повећања броја пехарастих ћелија (MUC5AC+, MUC5B+) са изменом фенотипа епитела због смањења броја цилијарних и повећања броја пехарастих ћелија (*Persson BD, 2014*). Показано је

да у условима оштећења епитела риновирус такође може да инфицира базалне ћелије (*Jakiela B*, 2008). Базалне ћелије (*Tip63+* и *Krt5+*) код људи су утврђене и у слузокожи носа као и великим дисајним путевима као што је душник, примарне и интралобуларне бронхије до четврте генерације грањања (*Hackett NR*, 2011). (*Volckaert T*, 2014). Ширење вирусне инфекције из носне слузокоже на базалне ћелије у бронхијалном епителу може довести до деплације базалних ћелија (*Persson BD*, 2014), а у том случају Клара ћелије могу диференцирати у базалне ћелије (*Volckaert T*, 2014), што може бити у основи смањења СС16 са повећањем броја ринитиса код мушке деце без атопије. Индукција INF тип 3 (IL-28A/B и IL-29) РСВ инфекцијом утврђена је само у назалном респираторном епителу (*Okabayashi T*, 2011), при чему присуство ових цитокина има значаја у измени фенотипа из доминантно цилијарног у доминантно мукус-секреторни (пехарсти) епител (*Persson BD*, 2014). Ипак, РСВ инфекција изазива рану продукцију IL-6, INF β , INF λ (IL-28A/B и IL-29) у инфицираном епителу али без индукције IL-13 у НВЕС (*Persson BD*, 2014), па механизам смањења СС16 код мушке деце без атопије која су имала ринитисе може бити осидативно оштећење слузокоже које доводи до откривања базалних ћелија за RSV и hRV (док женску децу конститутивно висок антиоксидантни потенцијал и високе концентрације СС16 штите од аерозагађењем изазваних примарних промена на епителу), након чега под дејством INF λ долази до измене фенотипа респираторног епитела у доминантно мукус-продукујући, а диференцијација Клара ћелија у пехарсте и/или базалне ћелије за последицу има мање измерене концентрације СС16 у серуму код дечака без атопије. Ова промена епителног фенотипа може да допринесе појачаној продукцији мукуса која је протективна и механички штити респираторни епител са једне стране, са друге стране се смањује број цилијарних ћелија (које су осетљиве на вирус) (*Persson BD*, 2014), али смањење СС16 које прати акутне ринитисе код мушке деце доводи до смањења антиинфламаторног потенцијала на респираторном епителу услед чега долази до инфламације у дисајним путевима и оклузије малих дисајних путева (што је анатомска карактеристика „мушких плућа“ са малим калибром дисајних путева) са клиничком манифестацијом бронхоопструкције током RSV инфекције (*Persson BD*, 2014). У нашем испитивању, појава акутног визинга код мушке деце без атопије повезана је са последичним повећањем СС16, при чему је ово повећање утврђено са порастом концентрације IgA према RSV. Позитивну повезаност СС16 и IgA према RSV утврдили смо и код деце без атопије са хроничним визингом, односно код деце са атопијом која су испољила акутни

визинг после престанка сисања, што може указати на повратни механизам повећања СС16 коме доприносе вирусне инфекције. Уколико пораст IgA према RSV разматрамо као последицу примарне, акутне RSV инфекције, а после акутног оштећења респираторни епител се регенерише без ремоделовања и фиброзе (Rawlins EL, 2009), током ког процеса Клара ћелије пролиферишу и диференцирају у цилијарне епителне ћелије у бронхиолама, као и у пнеумоците типа 2 у алвеолама, што одржава интегритет респираторног епитела после оштећења (Atkinson J, 2008) и не искључује могућност реактивације физиолошке мезенхимно-епителне транзиције која обезбеђује довољан пул Клара ћелија. Ипак, повећање IgG према RSV код деце са атопијом и упалом плућа, као и код деце без атопије која имају податак о алергији мајке повезано је са смањењем СС16, што указује да је хронично оштећење повезано са одређеним генетским детерминантама неvezаним за атопију може бити у основи исцрпљивања пула Клара ћелија током рецидивантне или тешке РСВ инфекције, а у чијем механизму учествује и активација ТН1/ТН17 одговор.

5.3 Повезаност СС16 са испитаваним биомаркерима

5.3.1.1 Маркери атопије код деце са болестима доњих дисајних путева

У овој студији присуство специфичних антитела на уобичајене алергене очекивано је удружено са повишеним укупним IgE, као и присуством еозинофилне активације, али и повишеним концентрацијама IgG према RSV ($\geq 6,6$ U/ml) у серуму. Код генетски предиспонираних особа за стварање IgE на уобичајене алергене средине (атопија), приликом првог контакта са алергеном долази до сензибилизације која подразумева синтезу специфичних IgE према том алергену и њихово везивање за Fc ϵ рецепторе на маст ћелијама у ткивима (Holgate ST, 2009). Поновљена изложеност алергену доводи до испољавања прво ране фазе преосетљивости (после 20-так минута) у којој премошћавање више специфичних IgE на површини маст ћелија узрокује њихову дегранулацију и ослобађање медијатора запљења. (Abbas AK, *IgE-Dependent Immune Responses*, 2012). Укупни IgE је већ описан као маркер атопије и у широкој је употреби као дијагностички маркер алергијске болести, али *cut off* вредности које указују на атопију варирају од студије до студије (Ilic N, 2011, Ott H 2009, Knipping K, 2017). ТН2 одговор је физиолошки присутан у одојачком периоду, јер Т ћелије

примарно диференцирају у TH2 ћелије које продукују IL-4 и IL-13 (Lewis DB 2010), па концентрације укупних IgE расту току инфекција патогеним микроорганизмима неvezано за алергију (Knipping K, 2017), али је ниво њихове продукције различит између деце са атопијом и без атопије (Jovanovic D, 2015). У групи деце која нису имала болести доњих дисајних путева једина разлика између деце са атопијом и без атопије је укупни IgE $\geq 5,7$ kU/l (основна генетска разлика у продукцији IgE), док су у групи деце која су имала болести доњих дисајних путева, атопичари имали укупни IgE $\geq 27,4$ kU/l, ECP $\geq 9,1$ ug/l и IgG према RSV $\geq 16,1$ U/ml, што указује да је имунски TH2 одговор код деце са атопијом удружен са повећаном осетљивошћу деце са атопијом према респираторним вирусним инфекцијама (Tregoning JS, 2010). У RSV инфекцији очекивана је доминација TH2 одговора, с обзиром да је ова инфекција удружена са смањеном продукцијом IFN γ што доводи до смањења активације НК ћелија, и смањења TH1 и CTL имунског одговора уз фаворизовање TH2 имунског одговора, па је у нашем истраживању и код деце без атопије утврђен пораст укупних IgE са овом инфекцијом, али је код деце са атопијом тај пораст био већи и удружен и са еозинофилном активацијом и рецидивирањем инфекције.

Код деце која су испољила болест доњих дисајних у узрасту од 5-7 месеци деца са атопијом у односу на децу без атопије су имала осим већих укупних IgE и мање концентрације TSLP што може указивати на смањени капацитет индукције имунорегулације код деце са атопијом. Испољавање болести доњих дисајних путева у узрасту 8-24 месеца праћено већим концентрацијама укупних IgE, ECP-а и IgG према RSV уз смањење CC16 код деце са атопијом. TH2 ћелије продукују IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, при чему IL-4 стимулише стварање IgE; IL-13 повећава продукцију мукуса у епителним ћелијама респираторног тракта; IL-5 регрутује и активира еозинофиле (Rosenberg HF, 2009), а IL-10 додатно инхибира секрецију INF γ TH1 ћелија, али потпомаже продукцију IgA и IgG4. (Abbas AK, 2012. *Regional Immunity*, Jeannin P 1998). IL-5 је цитокин који активира еозинофиле и повећава отпуштање садржаја гранула из еозинофила. Па је у касној фази одговора (после 3-6 сати) присутна је еозинофилна инфламација (Abbas AK, *Activation of T Lymphocytes* 2012). Из гранула еозинофила ослобађа се ECP, рибонуклеаза која разграђује једноланчане РНК, која има цитостатску активност због дестабилизације липида у мембрани ћелија (Bystrom J, 2011). Инкубација ћелијских линија K562, HL-60 и A431 са великим дозама ECP-а после четри дана довела је до инхибиције пролиферације за 50% (Maeda T, 2002), а на HeLa

ћелијама ЕСР изазива смрт ћелија после 24 сата која је посредована стварањем интрацелуларних слободних радикала и активацијом каспазе 3 (Navarro S, 2008), па се сем цитотоксичног ефекта ЕСР-а на хематолошке прогениторе из коштане сржи може очекивати исти ефекат на прогениторе респираторног епитела што је праћено смањењем СС16 у серуму код деце са атопијом која су имала болести доњих дисајних путева у односу на децу са атопијом без ових болести. Мала концентрација СС16 код деце са атопијом може бити последица постојања мукусног фенотипа респираторног епитела који је настао индукцијом IL-13 у имунским ћелијама након RSV инфекције (Johnson TR, 1999, Castilow EM 2008), односно директног ефекта IL-4 на Клара ћелије које диферентују у пехарасте ћелије (Kuperman DA, 2005). Код деце без атопије, болести доњих дисајних путева удружене су са такође порастом укупних IgE, али и са смањењем ЕСР-а, без промене у СС16 па не искључујемо могућност да је доминација IL-4^{High}IL-5^{Low} TH2 одговора код деце без атопије удружена са изостанком нежељеног ефекта TH2 одговора на развој плућа. Код деце без атопије болести доњих дисајних путева удружене су и са порастом TSLP и IL-10 (што указује на последични развој имунотолеранције) и паралелно са порастом IgA према RSV, односно јачање механизма имунског одговора према вирусима на респираторној слузокожи. IL-10 смањује експресију TH1 цитокина, ХЛА молекула класе II и костимулаторних молекула на макрофагима, а појачава преживљавање и пролиферацију Б ћелија као и продукцију антитела (Knipping K, 2017), класе IgA и IgG4 (Abbas AK, B Cell Activation and Antibody Production 2012), али је у нашем истраживању утврђена позитивна корелација између IL-10 и IgA према RSV само у групи деце без атопије. Индукција измене тешког ланца из μ у α индукована је присуством TGF β 1 (Abbas AK, B Cell Activation and Antibody Production 2012, Stavnezer J 2009), па смо мишљења да је управо TGF β 1 порекла из M2 активираних макрофага повезан са IgA одговором према RSV код деце са атопијом.

5.3.1.2 Маркери различитих болести доњих дисајних путева

Анализа испитиваних биомаркера по типу болести доњих дисајних путева показала потпуно другачији образац и разлику у величини промене испитиваних биомаркера у односу на број и врсту респираторних болести између деце са атопијом и без атопије.

Већи укупни IgE измерен је у обе групе код деце са акутним бронхијалним болестима у односу на децу без болести доњих дисајних путева, али је у групи деце без атопије укупни IgE $\geq 3,7$ kU/l указивао на испољени акутни визинг, док је у групи деце са атопијом то била концентрација укупних IgE $\geq 63,5$ kU/l. Деца без атопије са хроничним визингом у односу на децу без болести доњих дисајних путева имала су IgA према RSV $\geq 2,1$ U/ml, док су деца са атопијом и хроничним визингом имала IgG према RSV ≥ 34 U/ml у односу на децу са атопијом без болести. (дубина оштећења). Маркери предходно испољене упале плућа код деце без атопије у односу на децу без атопије и без болести су: IL-10 $\geq 3,9$ pg/ml, TSLP $\geq 41,2$ pg/ml, TNF α $\geq 0,15$ pg/ml и IgA према RSV $\geq 2,0$ U/ml, док је IL-10 $\geq 10,8$ pg/ml маркер испољавања упале плућа код деце без атопије. Велика концентрација IL-10 разматра као предиктивни фактор ризика за рецидивантни визинг код деце (Burgess SL, 2016) IL-10 инхибише експресију костимулатора и ХЛА молекула класе 2 на ДТ и макрофагима, као и продукцију IL-12 у активисаним ДТ и макрофагима, чиме се супримира индукција INF γ који је неопходан за ТН1, и цитотоксични NK и CD8+Т ћелијски одговор (Abbas AK 2012, Zielinski CE 2012). Утврђено је да деца са визингом у току прве године живота имају повећану секрецију IL-10 из макрофага, као и пораст односа IL-10/IL-12 што указује на инхибицију развоја ТН1 и CD8+Т ћелијског одговора прејаким IL-10 регулацијом која повећава осетљивост деце на вирусне инфекције (Lou W, 2012), али и да ексцесивна секреција IL-10 супримира фагоцитозу и презентацију антигена Т ћелијама па може бити удружена и са дужим током и тежом клиничком сликом респираторне инфекције hRV или RSV (Bartz H, 2002). Упала плућа је код деце без атопије, у нашој испитиваној групи, чешће удружена са акутним визингом, што тумачимо повећаном осетљивошћу на вирусне инфекције услед великих концентрација IL-10, али је акутни ток вероватно одређен и већим концентрацијама СС16 код деце без атопије које су измерене у старијем узрасту када је утврђено и испољавање упале плућа.

Већи број акутних ринитиса и акутног визинга у групи деце без атопије повезан је са већим укупним IgE (за 0,8 kU/l са сваким ринитисом и за 1,2 kU/l са сваким акутним визингом), и то у групи деце без атопије која су имала хронични визинг (код којих је и сваки ринитис био праћен порастом укупних IgE за 1,2 kU/l, односно са сваким акутним визингом за 2,3 kU/l). Осим укупних IgE, код деце без атопије са већим бројем респираторних болести растао је и IL-10 у серуму и то са сваким акутним ринитисом за 1,2 pg/ml, са сваким акутним визингом за 2,0 pg/ml (са акутним визингом

у групи деце са хроничним визингом за 3,4 pg/ml) и са сваком упалом плућа за 6,2 pg/ml (и са сваким акутним визингом у групи деце са упалом плућа за 4,8 pg/ml). Уколико се изузме прекомерни пораст IL-10 у серуму ($\geq 10,8$ pg/ml код упале плућа), који може бити повезан са инхибицијом TH1 имунског одговора и повећаном осетљивошћу на инфекције (Sabat R 2010, Skovbjerg S, 2010), мали и умерен пораст IL-10 код деце без атопије са респираторним инфекцијама може се разматрати и из аспектa индукције толерогеног меморијског пула на периферији који обезбеђује заустављање неадекватног имунског одговора на широк спектар агенаса (и микроорганизама) које се налазе у окружењу (Rook GAW, 2014). Код људи је идентификована CD4⁺CD25⁻IL-7R α ⁻ популација ћелија (Tr1) које не експримују FoxP3 ни рецептор за IL-2, али оставрују имунорегулаторне ефекте преко продукције IL-10 (Zielinski CE 2012). Ове ћелије се у *in vitro* условима генеришу из наивних Т ћелија у присуству толерогених сигнала (Apetoh L, 2010), али стабилност ових ћелија као и врста и ниво толерогених сигнала који су потребни за генерисање ових ћелија код људи *in vivo* није позната.

У групи деце са атопијом већи број респираторних болести повезан је са повећањем TSLP (са сваким акутним ринитисом за 3,1 pg/ml, са сваким акутним визингом за 6,4 pg/ml, а са сваким хроничним визингом утврђен је пораст TSLP за 9,3 pg/ml, као и TNF α за 2,6 pg/ml). TSLP је високо експримован из кертиноцита и епитела дисајних путева у току алергијске инфламације, па се сматра да је TSLP кључни регулатор алергијских болести (Chauhan A 2015, Siracusa MC 2011). Мијелоидне дендритске ћелије активирание у присуству TSLP, поред TH2 цитокина и еотаксина, могу да продукују и IL-8, (Liu YJ 2007, Ito T 2005), а наши резултати указују да је пораст TNF α са порастом TSLP удружен само са хроничним визингом код деце са атопијом, односно великим концентрацијама TSLP. Пошто је просечна концентрација TSLP у серуму код деце са атопијом без болести доњих дисајних путева 16,8 pg/ml, а концентрација TSLP у серуму $\geq 41,9$ pg/ml је маркер алергијског БХП фенотипа са малим концентрацијама CC16, онда се према нашим анализама ова концентрација TSLP у серуму може очекивати после осам акутних ринитиса и/или четири акутних бронхијалних болести код деце са атопијом.

У епителним ћелијама оболелих од астме у односу на здраве особе утврђена је слична базална експресија TSLPR, а TNF α и RSV инфекција значајно повећавају експресију TSLPR код асматицара више него што је то случај код здраве контроле, при чему је степен експресије TSLPR пропорционалан броју егзарцербација и тежини астме

(*Miazgowicz MM, 2013*). У нашем истраживању деца са атопијом и хроничним визингом имала су велике концентрације IgG према RSV, док је са сваким хроничним визингом расла и концентрација TNF α , као и TSLP. Хумане епителне ћелије дисајних путева које експримују TSLPR и IL-7R α у присуству TSLP продукују CCL17 (*Miazgowicz MM, 2013*) који је хемоатрактант за TH2 ћелије (*Soumelis V 2002*). Цитокини TH2 одговора као што су IL-4 и TGF β 1 (из алтернативно активираних макрофага) су потентни инхибитори раста хематопоетских прогенитора (*Lewis DB 2013*), што може бити у основи повећаних концентрација укупних IgE $\geq 67,0$ kU/l и CC16 $\leq 3,4$ ng/ml код деце са атопијом која су испољила упалу плућа. Међутим у групи деце са атопијом и упалом плућа, смањење CC16 праћено је и смањењем TGF β 1 $\leq 17,8$ ng/ml.

5.3.2 Фактор атопија

5.3.2.1 CC16 и TGF β 1 код деце са атопијом

У нашем истраживању смо током прве године код деце са атопијом утврдили високе концентрације TGF β 1, које су била највеће у узрасту од 10-12 месеци, када долази до статистичког пада CC16 код деце са атопијом, али и наглим падом TGF β 1 $\leq 17,0$ ng/ml у другој години живота код деце са атопијом, који је статистички значајан код женске деце и удружен је са мањим концентрацијама CC $\leq 3,4$ ng/ml, као и чешћим предходним дијагнозама ларингитиса и упале плућа у односу на женску децу са атопијом и вишим концентрацијама TGF β 1, док је код мушке деце са атопијом и малим концентрацијама TGF β 1 у односу на мушку децу са атопијом и већим концентрацијама TGF β 1 утврђена већа учесталост болести доњих одвојено од болести горњих дисајних путева, као и упала плућа која није праћена хроничним визингом код деце са атопијом. Оди и сарадници су такође утврдили повећан ризик за испољавање визинга код одојчади са ниским концентрацијама TGF β 1 (*Oddy WH, 2003*). TGF β 1 стимулише експресију FoxP3, па је диференцијација FoxP3+ Т рег на периферији зависна од овог цитокина (*Abbas AK 2012*). Елиминација TGF β 1 или блокирање TGF β 1 сигнала доводи до системске инфламаторне болести услед дисфункције функционалних Т рег (*Abbas AK 2012*). TGF β индукује експресију α v β 6 интегрин преко кога алвеоларни макрофаги чврсто пријањају за епителне ћелије у стању мировања (*Takabayshi K 2006*). У случају губитка ове адхезије (нарушавања интегритета баријере), алвеоларни макрофаги развијају функцију фагоцитозе и секреције проинфламаторних цитокина што доводи до

стања инфламације у плућима (*Takabayshi K 2006*). TGF β 1 такође повећава својства епитела као баријере повећавајући (на SMAD независтан начин) деградацију RhoA што је потребно за очување интегритета чврстих међућелијских веза (*Ozdamar B, 2005*), а чиме онемогућава и ефекат проинфламаторних цитокина на епител, и одговоран је за супресију имунског одговора услед повећаног стварања Трег на периферији, па услед системског смањења TGF β 1 може доћи до развоја БХР-а код деце са атопијом. Двоструки ефекат TGF β 1 на међућелијске везе у смислу очувања и антагонизовања ефекта проинфламаторних цитокина са једне стране и њиховог деградирања у току епително-мезенхимне транзиције може бити последица места његове активације (системски или унутар епителних ћелије) и/или нивоа системске концентрације. Наиме у нашем истраживању системски пораст TGF β 1 у узрасту од 10-12 месеци може имати за последицу епително-мезенхимну транзицију типа 2 са смањењем CC16 код деце са атопијом, па ни повећање TNF α које индукује апоптозу фибробласта (реф) са последичним смањењем продукције TGF β 1 као и на пролиферацију прогенитора на нивоу коштане сржи (*Lewis 2013*) није довољно да успостави повратни процес физиолошке мезенхимно-епителне транзиције која је од значаја у развоју плућа.

Укупни IgE разматра се као маркер имунске дисрегулације настале као последица смањеног броја Т ћелија услед дефекта тимуса (*Di George Sy*) или постојања олигоклоналности Т ћелија (*RAG1, RAG2, Artemis* дефицити) а који се манифестују првенствено оштећењем органа који се континуирано обнављају (коштана срж, кожа, црева) (*Carneiro-Sampaio M, 2013*). Најтежи примери дисрегулације су *IPEX* синдромом (енг. *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X linked syndrome*) који представља дефект у стварању Foxp3, главног транскрипторног фактора природних Трег, и манифестује се ентеропатијом, лезијама коже, цитопенијама итд, као и Оменов синдром (олигоклоналност Т ћелија) који се манифестује екцемом, ентеропатијом и лимфопролиферативним синдромом (*Carneiro-Sampaio M, 2013*). У литератури је показана удруженост алергије на храну и смањења TGF β 1 уз редукцију Т рег ћелија (*Pérez-Machado MA 2003, Krogulska A 2011*). Адоптивни трансфер CD4+CD25+Трег ћелија резултује у супресији главних карактеристика алергијског одговора као што су продукција TH2 цитокина, еозинофилна инфламација и БХР (*Kearley J 2008*). Чак и у случају постојања хроничног алергијског запаљења трансфер ових ћелија доводи и до смањења инфламације и до спречавања процеса ремоделовања дисајних путева (*Kearley J 2008*).

5.3.2.2 CC16 и цитокини урођене имуности

У нашем истраживању смо утврдили позитивну корелацију ЕСР-а и TGFβ1 код деце са атопијом, са максимумом концентрација оба цитокина у узрасту од 10-12 месеци (када постоји и статистички значајан пад CC16 у серуму), при чему је код деце са атопијом утврђена негативна корелација ЕСР-а и CC16 у групи која не сиса у узрасту 8-24 месеца. Код деце без атопије такође је утврђено смањење CC16 услед повећања ЕСР-а, али само када се статистички искључи ефекат TGFβ1. Овакав налаз указује на директни цитотоксични ефекат ЕСР-а на бронхиоларни епител и/или његове прогениторе код деце без атопије везан примарно за мале концентрације TGFβ1 који је главни инхибитор активације еозинофила (Rich 2013 [реф](#)), док су код деце са атопијом високе концентрације TGFβ1 вероватно одговорне за епително-мезенхимну транзицију, при чему је у основи негативног ефекта ЕСР-а на Клара ћелије цитотоксични ефекат на прогениторе и/или деградација miRNA неопходних за индукцију мезенхимно-епителне транзиције током развоја плућа. Протеини који се налазе у гранулама еозинофила су токсични и могу оштетити нормално ткиво током инфламације. Ензимска активност катјонских полипептида из гранула еозинофила није довољно позната, иако се зна да делују токсично не само на бактерије и хелминте, такође и на нормално ткиво, а еозинофилне пероксидазе и каталазе учествују у настанку токсичне хипохромне и хипохлорне киселине које доприносе оштећењу (Abbas AK, *IgE-Dependent Immune Responses*, 2012). Код деце без атопије негативна корелација између CC16 и ЕСР-а утврђена је такође код деце која су имала високе концентрације CC16 ($\geq 4,8$ ng/ml), па сматрамо да је продукција еотаксина из Клара ћелија и инфилтрација еозинофилима која је зависна од интактних Клара ћелија у респираторном епителу (Sonar SS, 2012) уствари један од повратних механизма контроле раста плућа. Код деце са атопијом у условима изостанка утицаја TGFβ1 највећа јачина везе утврђена је између смањења CC16 и повећања IL-10, при чему је IL-10 порекла из TH2 одговора са највећом јачином везе са TSLP. Међутим, утврђена негативна корелација CC16 и TH2 биомаркера код деце са атопијом може се посматрати и из аспекта да је за повећање CC16 у серуму неопходно смањење TH2 одговора код деце са атопијом, односно да се ради о повратном механизму омогућавања раста плућа код деце са доминантним TH2 одговором.

Пад ЕСР-а и код деце са атопијом и код деце без атопије утврђен је са старијим узрастом и са већим бројем болести горњих дисајних путева, а утврђена је и негативна корелација ЕСР-а и TNF α код мушке деце са атопијом и женске деце без атопије. Код деце са атопијом током друге године долази до израженог пада TGF β 1 уз умерени пад ЕСР-а, па је смањење концентрације TGF β 1 у серуму код деце са атопијом у првој половини друге године живота бар делом повезан са падом активности еозинофила, али због истовремено утврђеног повећања концентрација TNF α не може се искључити утицај развоја TH17 одговора током друге године живота.

О узроцима смањења FoxP3+ Т рег у литератури постоје контраверзна мишљења. Са једне стране показано је да се хумане FoxP3+ Т рег у проинфламаторном окружењу могу конвертовати у TH1 или TH17 ћелије, али са друге стране је утврђена и стабилност регулаторне активности FoxP3+ Т рег чак и ако оне стичу капацитет продукције IFN- γ и IL-17 (Zielinski CE 2012). На смањење експресије FoxP3 може утицати неутрализација IL-2, без конверзије „бивших“ FoxP3+ ћелија у конвенционалне Т ћелије (Zielinski CE 2012). У нашем истраживању, код деце са атопијом велика јачина везе између ЕСР-а и TGF β 1 утврђена је по искључењу ефекта IL-10, док је пад TGF β 1 праћен порастом TNF α који је повезан и са високим концентрацијама IgG код RSV код деце са атопијом. С обзиром да је РСВ инфекција повезана са неутрофилном инфламацијом (Collins PL, 2008), а код деце са атопијом смо утврдили негативну повезаност TGF β 1 и TNF α у условима статистичког изостанка ефекта IL-10, овакав налаз указује на могућност развоја TH17 одговора на инфекцију током прве половине друге године код деце са атопијом.

Пораст TGF β 1 порекла из M2 активисаних макрофага у TH2 имунском одговору очекује се у току ретракције имунског одговора. Међутим уколико није дошло до елиминације антигена, па он бива препознат од стране наивне Т ћелије, а у присуству TGF β 1 и других проинфламаторних цитокина (IL-6, IL-1 и др), долази до настанка TH17 подгрупе CD4+Т ћелија које снажно стимулишу неутрофилно запаљење и имају деструктиван ефекат на нормално ткиво (Abbas AK, *Effector Mechanisms of Cell-Mediated Immunity*, 2012), што је према нашим резултатима изражено у условима изостанка IL-10 имунорегулације. TNF α и IL-17, као и IL-13 повећавају експресију RhoA – GTP-азе повезане са контрактилношћу глатко-мишићних ћелија, што за последицу има хиперреактивност бронхијалног стабла (Erle DJ 2014).

5.3.2.2.1 БХР са еозинофилном инфламацијом

Неочекивани пораст концентрација ЕСР-а код деце без атопије у узрасту од 18-24 месеца удружен је са клиником манифестацијом упале плућа и хроничног визинга. Због удружености концентрација ЕСР $\geq 12,4$ $\mu\text{g/l}$ са већим бројем болести доњих дисајних путева (≥ 3 х) код деце без атопије, уз манифестацију упале плућа и хроничног визинга просечно после месец дана од упале плућа, овај фенотип смо дефинисали као БХР са еозинофилном инфламацијом код деце без атопије који је утврђен код 3,1% деце испитиване популације и манифестован у узрасту $\geq 14,5$ месеци, односно после $\geq 10,5$ месеци од престанка сисања. Хетерогеност ТН2 одговора такође може бити у основи испољавања БХР односно $\text{IL-4}^{\text{High}}\text{IL-5}^{\text{Low}}$ ТН2 одговор може бити удружен са мукусном метаплазијом епитела код алергијске астме (при чему активација рецептора за IL-4 на Клара ћелијама индукује њихови диференцијацију у мукус продукуюће ћелије (Kuperman DA, 2005) што за последицу има мале концентрације СС16 у серуму код деце са атопијом), док је $\text{IL-4}^{\text{Low}}\text{IL-5}^{\text{High}}$ ТН2 имунски одговор удружен са одржавањем, односно амплификацијом еозинофилне инфламације (Islam SA, 2012), коју смо утврдили код деце без атопије. Код деце без атопије која имају еозинофилну инфламацију и развијају БХР измерен је $\text{IL-10} \geq 10,8$ pg/ml и $\text{TSLP} \leq 25,1$ pg/ml . Већ смо описали да је пораст IL-10 повезан са акутним ринитисом и акутним визингом у групи деце без атопије, као и да сваки акутни визинг повећава IL-10 и унутар групе деце без атопије са хроничним визингом (за 3,4 pg/ml) и упалом плућа (за 4,8 pg/ml), па смо овај пораст протумачили као вероватни механизам индукције меморијских IL-10 ћелија одговорних за развој имунолошке толеранције на епителима у одговору на инхалаторне агенсе или респираторне инфекције. Међутим, велике концентрације IL-10 због инхибиције класично активираних макрофага и супресије продукције IL-12 смањују ТН1 и цитотокични антивирусни одговор, што може бити у основи испољавања већег броја, односно тежих облика вирусних инфекција код деце (Skovbjerg S, 2010, Burgess SL, 2016), што се према нашим налазима манифестује БХР-ом. Да ли велике концентрације IL-10 могу повратно инхибирати експресију TSLP-а у епителима није познато. У сваком случају код деце без атопије која нису развила БХР са порастом TSLP расте и ЕСР-а у узрасту 5-7 месеци док у узрасту 8-24 месеца са порастом TSLP долази до пораста TNF α у серуму, а што није био случај код деце без атопије са БХР-ом. Иако се TSLP сматра главним индуктором ТН2 одговора (Chauhan

А 2015), мале концентрације које су измерене код деце без атопије са БХР-ом указују да TSLP није индуктор еозинофилног запаљења које је утврђено код ове деце, а изостанак пораста TSLP може бити у основи смањене продукције TNF α из CD4⁺ ћелија односно изостанка развоја TH1 одговора.

Код неатописчара са астмом постоје одређене патофизиолошке сличности са атописчарима у настанку бронхоопструкције, као што су инфилтрација Th2 лимфоцита, Fc ϵ RI⁺ на ћелијама, и ћелијска експресија IgE mRNA (Humbert M, 1999). На анималним моделима је показано да су Клара ћелије круцијалне за акумулацију еозинофила у плућима преко продукције еотаксина (Sonar SS, 2012). Еотаксин повећава продукцију TH2 цитокина из епителних ћелија и без присутног оштећења епитела, која је истог интензитета као и продукција ових цитокина из еозинофила током излагања алергену на који су животиње сензибилисане (Spencer LA, 2009). Алтернативни механизми настанка астме код неатописчара могу бити и неспецифична дегранулација мастоцита услед локално продукованих неуротрансмитера (Renauld JC, 2001).

5.3.2.2.2 *Континуирани визинг у току од три и више месеци*

Континуирани визинг у току три и више месеци разматра се као дијагностички критеријум за астму у прве две године живота (реф). Наши резултати указују да 80% деце са атопијом и БХР-ом са малим концентрацијама СС16 и 100% деце без атопије са БХР-ом и великим концентрацијама ЕСР-а, имају континуирани визинг у трајању од три и више месеци. Код деце без атопије са хроничним визингом који је трајао дуже од три месеца утврђена велика концентрација СС16 у серуму ($\geq 6,0$ ng/ml), која је била независни предиктор испољавања континуираног пролонгираног визина код деце без атопије. На анималним моделима је утврђено да су Клара ћелије главни произвођачи еотаксина у плућима, односно да су одговорне за ангажовање еозинофила у плућа и у условима инфламације и ван ње (Sonar, 2012), па постоји могућност да је велики број Клара ћелија у плућима одговоран за еозинофилну инфламацију са пролонгираним визингом код деце без атопије.

Мишији модели неалергијског астма фенотипа указују да неалергијски механизми могу довести до развоја астме независно од алергијске сензибилизације. На оваквим моделима је утврђен значај урођеног имунитета у развоју бар неких фенотипова неалергијске астме (Kim HY, 2010) при чему доминантну улогу имају

урођене лимфоидне ћелије и NKT ћелије (*DeKruyff RH, 2014*). Утврђено је да iNKT ћелије препознају споствене гликолипидне антигене у случају присуства алергена и изазивају активацију алергијске инфламације. У плућима асматицара, iNKT ћелије секретују велике количине IL-4 и IL-13 који потенцирају TH2 одговор који је важан за развој астме (*Lloyd SM, 2010*). Међутим, еозинофилна инфламација индукована је IL-5, а нуоцити типа 2 се сматрају главним извором IL-5 у периферним ткивима, чиме контролишу еозинофилну хомеостазу у плућима и периферној крви (*Nussbaum JC, 2013*). Током вирусне инфекције плућа у раним фазама инфекције доминира неутрофилна инфилтрација у плућима, али се у току и након чишћења вируса појављује продукција IL-5 из нуоцита типа 2 (чији је полуживот дужи од TH2 ћелија), што повећава акумулацију еозинофила у дисајним путевима (*Gorski SA 2013*). Ове ћелије су нађене у спутуму пацијената са астмом, а одсутне су код здравих особа (*Allakhverdi Z, 2007*). *In vitro* експерименти показали су ефекат ЕСР у деактивацији инфективности респираторног синцицијалног вируса ефектом рибонуклеазе, а инкубација ЕСР-а са РСВ доводи до редукције инфективности вируса у хуманом плућном епителу (*Bystrom J, 2011*). ЕСР такође инхибира пролиферацију незрелих лимфоцита и смањује продукцију антитела у Б ћелијама (*Bystrom J, 2011*). РСВ може да инфицира еозинофиле и да се репликује унутар еозинофила и индукује експресију IL-6 (*Dyer KD 2009*), што за последицу може имати повећање TNF α и удружено са IgG према RSV. TNF α је проинфламаторни цитокин који узрокује епителну дисфункцију механизмима апоптозе и реаранжмана протеина чврстих веза и актина, као и синтезе миозин-киназа и фосфорилације миозина (после активације NF κ B), што за последицу има повећање броја и величине међућелијских пора (*McKenzie JA 2007*). Бразилски аутори су код деце са РСВ инфекцијом узраста 9-12 месеци утврдили велики титар IgG1 према РСВ, што указује на развој TH1 одговора односно повећане продукције INF γ (*Queiróz DA, 2002*), који су индуковани активацијом урођеног имунитета (*Abbas AK, Activation of T Lymphocytes 2012*) У нашем истраживању смо такође утврдили да деца без атопије која су испољила хронични визинг у току три и више месеци уз веће концентрације СС16 имају и веће концентрације ЕСР-а, TNF α , као и РСВ инфекцију (која се карактерише неутрофилном инфламацијом (*Collins PL, 2008*). Утврђено је да нуоцити типа 2 секретују амфирегулин који је неопходан за очување интегритета епителијалних ћелија и у синергији са IL-22 потенцира репарацију респираторног епитела после инфекције (*Pociask DA, 2013*), па не искључујемо могућност да је развој TH17 одговора код деце

без атопије са хроничним визингом у основи повећања $TNF\alpha$. $TNF\alpha$ повећава секрецију CC16 у ћелијским културама хуманих епителних ћелија плућа (Yao XL 1998), и потенцира ефекте IL-3 на пролиферацију прогенитроа (Lewis DB 2013 17-19), али са друге стране нарушава интегритет баријере (McKenzie JA 2007). Зато би његово присуство могло бити од значаја у повећању прогениторског пула Клара ћелија са великом концентрацијом CC16 која је измерена код деце без атопије са пролонгираним током визинга. Наиме, стање терминално диферентованих ћелија повратно уравнотежује степен пролиферације прогенитора неопходне су за очување хомеостазе на плућном епителу (Volckaert T, 2014), па би проинфламаторни ефекат $TNF\alpha$ на епителне цилијарне ћелије могао онемогућавати ову повратну спрегу у контактної инхибицији пролиферације прогенитора локално у плућима, што би уз паралелни ефекат $TNF\alpha$ на стимулацију пролиферације хематопоеетских прогенитора уз инхибицију развоја гранулоцита (Lewis DB 2013 17-19), за последицу могло имати локално повећање броја Клара ћелија, које затим продукују еотаксин којим индукују еозинофилну инфилтрацију (Sonar SS, 2012), па измерене концентрације $CC16 \geq 6,0$ ng/ml код деце без атопије повећавању ризик од хроничног визинга у току три и више месеци (који је увек присутан код деце са БХР-ом и еозинофилном инфламацијом код деце без атопије) за 6,4х. Међутим, $CC16 \geq 6,0$ ng/ml представља и независни предиктор испољавања БХР-а код деце без атопије (у односу на ЕСР и IgG према RSV). У мишијим моделим астме утврђена је активација Wnt сигнализирања у ћелијама глатких мишића, док су FGF10 и Notch сигнализирање удружени са хиперплазијом пехарастих ћелија, при чему су оба пута удружена са одржавањем Клара ћелија онемогућавајући њихову терминалну диференцијацију у цилијарне ћелије (Tsao PN, 2009), што може бити у основи епителне дисфункције код деце без атопије која је праћена БХР-ом (услед малог броја цилијарних ћелија) са једне стране и великим концентрацијама CC16 (услед нагомилавања Клара ћелија) са друге стране.

За разлику од деце без атопије, код које је пораст $TNF\alpha$ и IgG према RSV утврђен код деце са хроничним визингом који траје ≥ 3 месеца у просечном узрасту од 19 месеци, код деце са атопијом пораст $TNF\alpha$ и IgG према RSV уочен је и код деце са краћим трајањем хроничног визинга (1-2 месеца) у просечном узрасту од 10 месеци када је утврђен и пад CC16 код деце са атопијом, па је визинг ≥ 3 месеца праћен малим концентрацијама $CC16 \leq 3,4$ ng/ml у серуму у просечном узрасту од 22 месеца. За разлику од деце без атопије, код деце са атопијом утврдили смо позитивну корелацију

ЕСР-а и TGF β 1, са статистички значајним падом концентрација TGF β 1 у серуму у другој години живота који је удружен са малим концентрацијама СС16 и испољавањем БХР-а. Међутим, испољавање пролонгираног тока визинга код деце са атопијом било удружено са великим концентрацијама TGF β 1 и то у групи деце без упале плућа $\geq 32,5$ ng/ml у просечном узрасту од 14 месеци, односно у групи деце са упалом плућа $\geq 14,3$ ng/ml у просечном узрасту од 22 месеца, што није било праћено и статистички значајним порастом ЕСР-а, па сматрамо да ТН2 одговор није у основи пораста TGF β 1 код ове деце. Велике концентрације TGF β 1 $\geq 32,5$ ng/ml (које 6,6х повећавају ризик од пролонгираног тока визинга код деце са атопијом) уз мале концентрације СС16 у узрасту 8-18 месеци утврдили смо код 20% деце са атопијом. У астми код деце и одраслих утврђене су повишене концентрације серумског TGF- β у односу на здраве особе (Manuyakorn W 2008). TGF- β контролише ћелијску пролиферацију и диференцијацију са значајним ефектом у процесима зарастања рана, а због потврђеног ефекта на хиперплазију и хипертрофију глатких мишићних ћелија у бронхијама, разматра се и као главни биомаркер ремоделовања дисајних путева у астми (Makinde T, 2007). Могуће је да код деце са атопијом и пролонгираним током визинга уствари постоји рано ремоделовање дисајних путева у коме TGF β 1 доводи до активације епително-мезенхимне трофичне јединице што промовише стварање микроокружења у ткиву плућа које доводи до ремоделовања ткива дисајних путева и условљава губитак реверзибилности са редукцијом плућне функције и развојем астме (Holgate ST, 2010). TGF β 1 доводи до промена у мезенхиму са активацијом фибробласта, ексцесивном депозицијом екстрацелуларног матрикса, фиброзирања и хиперплазије глатких мишићних ћелија (Volckaert T, 2014), услед чега је пропусност баријере мања и за СС16, па ниске концентрације СС16 у серуму могу указивати и на развој ремоделовања дисајних путева (Hermans C, 1999).

Управо чињеница да је хронична инфламација у плућима потпомогнута структуралним компонентама ремоделовања кроз активацију епителне јединице стем ћелија и њихових ниша, указале су на сличности између процеса зарастања ране и морфогенезе (Holgate ST, 2007). ТН2 одговор је значајан у зарастању рана с обзиром да IL-10 инхибише класично активисане макрофаге и продукцију IL-12, IL-4 испољава антагонистички ефекат на INF γ са инхибицијом развоја ТН1 и ТН17 ћелија и са IL-13 учествује у алтернативној активацији макрофага уз стимулацију TGF β 1 и фибробластних фактора раста што доводи до продукције колагена током репарације

тквива, индукује пролиферацију, диференцијацију и секреторну функцију пехарстих ћелија бронхијалног епитела са стварањем заштитиног слоја мукуса уз продукцију IgA под дејством IL-5 и TGF β (Abbas AK, *Regional Immunity*, 2012, Persson BD, 2014). У нашем испитивању испољавање болести доњих дисајних путева праћено је јачањем TH2 одговора, при чему је код деце са атопијом постојала позитивна корелација IL-10 са укупним IgE, ECP и TSLP, док је код деце без атопије утврђена позитивна корелација IL-10 са укупним IgE и TSLP.

5.3.2.2.3 CC16 и имунорегулаторни цитокини код деце без болести доњих дисајних путева

У нашем испитивању смо такође утврдили да код деце са атопијом која нису имала болести доњих дисајних путева (што сматрамо физиолошким стањем у испитивању односа испитиваних биомаркера), постоји негативна корелација између TGF β 1 и CC16 што би могло да указује на индукцију терминалне диференцијације Клара ћелија под дејством TGF β 1 у одсуству оштећења плућа. Током развоја плућа TGF β инхибира експресију FGF10 у мезенхималним стромалним ћелијама плућа услед чега долази до повећане експресије Sox2 и индукције диференцијације прогенитора респираторног епитела (Volckaert T, 2014), при чему се у присуству TH2 одговора и IL-4 диференцијација Клара ћелија усмерава ка мукус-продукујућим ћелијама. Овакав налаз указује да се код деце са атопијом промене у концентрацији CC16 дешавају пре испољавања болести доњих дисајних путева, док са болестима доњих дисајних путева јача TH2 одговор, а пораст концентрације CC16 повезан је са хуморалним одговором према РСВ, па се не може искључити позитиван ефекат вирусне инфекције на развој плућа у условима доминантног TH2 одговора код деце са атопијом.

Раст детета и истезање коже могли би бити у основи активације NF κ B у епителним ћелијама које нису у стресу са последичном продукцијом TSLP који у том случају првенствено индукује Т регулаторни одговор (Swamy M, 2010). Утврђено је да је већи пораст у телесној маси током одојачког периода удружен са већом учесталешћу респираторних болести у току детињства и да представља фактор ризика за испољавање астме у предшколском узрасту независно од брзине феталног раста (Duijts L 2012, Sonnenschein AM 2012). Негативна корелација CC16 са имунорегулацијским цитокинима и најјача повезаност смањења CC16 са порастом TSLP код деце без болести доњих дисајних путева, могла би указивати на могуће постојање физиолошког

механизма контроле раста плућа који је повезан са експресијом TSLP. На анималним мишијим моделима показано је да је пораст у телесној маси праћен примарно порастом у величини (хипертрофијом) адипоцита код TH2 врста, и порастом у броју (хиперплазијом) ћелија код врста са TH1 имунским одговором (*Jovicic N, 2015*), па би хипертрофични образац раста ткива удружен са TH2 имунским одговором могао бити у основи израженијег повратног ефекта механизма контроле раста ткива на мањи број прогенитора плућа код деце са атопијом и у одсуству оштећења.

5.3.3 Фактор TSLP индукција

Факторска анализа испитиваних карактеристика у овом истраживању, показала је да у узрасту до две године, осим са узрастом и атопијом, постоји и независна повезаност малих концентрација CC16 са већим концентрацијама TSLP и IL-10 у серуму. У нашем истраживању негативна корелација између CC16 и TSLP постојала је само у групи деце са атопијом. У групи деце са атопијом TSLP $\geq 41,9$ pg/ml у серуму је повезан са 72х већим ризиком од БХП-а при чему су у истом фактору груписани CC16 $\leq 3,4$ ng/ml, узраст ≥ 13 месеци и алергија мајке. Нема литературних података о ефектима TSLP на Клара ћелије. На анималним моделима је показано да системска прекомерна експресија TSLP из кератиноцита може бити окидач бронхијалне хиперреактивности код мишева (*Demehri 2009*), при чему су поремећаји диференцијације епидерма који резултују у дефекту коже као баријере узрок повећане експресије TSLP и TH2 инфламације у кожи (*Ziegler SF, 2012*). Једно од објашњења механизма атопијског марша (старосна прогресија алергијске болести од атопијског дерматитиса ка астми) подразумева да вирусне инфекције коже индукују повећану транскрипцију TSLP у кожи уз инфилтрацију нуоцита типа 2 са развојем атопијског дерматитиса и индукцијом TH2 одговора уз системски пораст циркулишућих IgE, метаплазију респираторног епитела у пехарасте тип, продукцију мукуса и развој инфламације у бронхиолама (*Bergot AS 2015*). Међутим, постоје резултати да концентрација TSLP у серуму не корелише са бројем еозинофила у крви, ни са серумском концентрацијом укупних IgE, односно да TSLP може имати улогу у развоју дерматитиса али не и атопије (*Lee EB, 2010*). Са друге стране, постоје мишљења да TSLP из коже индукује системски TH2 одговор али да није потребан за развој инфламације у дисајним путевима (*Ziegler SF, 2012*).

Познато је да је TSLP mRNA присутна у хуманим фибробластима, глатко-мишићним ћелијама и респираторном епителу (*Soumelis V 2002*), да пацијенти са астмом и ХОБП-ом имају већи број TSLP продукујућих ћелија у односу на здраву контролу, а да је експресија TSLP пропорционална TH2 одговору, а негативно корелише са плућном функцијом (*Ying S 2008, Ziegler SF, 2012*). На дендритским ћелијама TSLP индукује експресију костимулаторних молекула (CD40, CD80), ХЛА молекула класе 2 и ОХ40L, након чега Дћ при презентацији антигена наивним Т ћелијама индукују њихову диференцијацију у TH2 ћелије које продукују IL-4, IL-5, IL-13 и велике количине TNF α , али не и IL-10 (*Boita M 2013*). Међутим TSLP-Дћ у одсуству антигена индукују само пролиферацију CD4⁺ без диференцијације што указује на улогу ових ћелија у хомеостази Т ћелија (*Watanabe N 2004*), док се индукција TH2 одговора дешава тек након излагања алергену (*Ziegler SF, 2012*). С обзиром да смо код деце са атопијом утврдили депресију TSLP до краја друге половине друге године, изостанак адекватне пролиферације недиферентованих CD4⁺ ћелија могло би условити релативно смањење броја Трег на периферији, (што је код деце са атопијом праћено падом TGF β 1 у серуму који је завистан од смањења TH2 одговора, а не од индукције Трег), а што условљава и смањен потенцијал имунорегулације приликом излагања антигенима.

На анималним мишијим моделима конститутивно појачане селективне експресије TSLP у плућима (код којих је ген за TSLP везан за промотор сурфактанта Ц) после излагања антигену утврђена је инфилтрација плућа еозинофилима, TH2 ћелијама, ремоделовање, пехараста метаплазија са прекомерном експресијом мукуса и хиперреактивношћу бронхијалног стабла (*Headley MB 2009*), због чега се сматра да је улога TSLP нарочито значајна у процесима сензибилизације на инхалаторне алергене (*Ziegler SF, 2012*). Појачана експресија TSLP из епителних ћелија повезује се са прекомерном активацијом NF κ B преко PAR-2 (енг. proteinase activated receptor 2) у условима постојања мутације инхибитора протеаза (*Ziegler SF, 2012*). Прекид толеранције према алергенима на респираторној слузокожи настаје услед препознавања алергена преко TLR и PAR што индукује сигнализирање у епителним ћелијама са повећаном транскрипцијом и секрецијом IL-25, IL-33 и TSLP алергенима који имају протеазну активност, а што доводи до TH2 Т ћелијског имунског одговора у плућима (*Lloyd CM, 2010.*)

5.3.3.1 Детерминанте концентрација TSLP у серуму

Мање концентрације TSLP утврђене су код деце са atopијом у односу на децу без atopије у групи деце која не сисају, а пораст TSLP-а код деце са atopијом дешава се у старијем узрасту (18-24 месеца) у односу на децу без atopије (13-17 месеци), односно после дужег периода који је протеко од престанка сисања (пораст TSLP код деце са atopијом дешава се ≥ 4 месеца, а код деце без atopије за 1-3 месеца од престанка дојења). Изостанак ефекта TSLP удружен је са дефектима миграције ДТ и редукованим капацитетом пролиферације CD4+ ћелија (Ziegler SF, 2012), па је могуће да кашњење његове експресије код деце са atopијом условљава и поремећај правовремене активације адаптивног одговора на епителима (мања инфилтрација ткива толерогеним ДТ и мања пролиферација CD4+ ћелијама које продукују IL-10). На анималним моделима је утврђено да код TSLPR^{-/-} мишева постоји дефекти миграције ДТ и редукован капацитет пролиферације CD4+ ћелија, (Ziegler SF, 2012). Уколико услед недостатка TSLP није дошло до адекватне ткивне дистрибуције ДТ, током вирусних инфекција долази до инфилтрације ткива плућа незрелим дендритским ћелијама из коштане сржи са повећаном експресијом FcεR1 рецептора а што представља основу за ангажовање TH2 имунског одговора на аероалергене и активирање локалних TH2 меморијских ћелија (које су већ присутне у мукози), вирусне инфекције могу значајно да потенцирају патогеност TH2 ћелијског одговора (Holt PG, 2010).

На анималним моделима је показано да су нивои TSLP mRNA значајно снижени услед специфичне делеције ензима који су укључени у синтезу microRNA (Disher) (Biton M., 2011). Не-кодирајуће miRNA се селективно везују за информациону RNA и инхибишу транслацију или промовишу њену деградацију (Lamouille S 2013), па могу смањивати експресију SNAIL1 и ZEB транскрипторних фактора од значаја у епително-мезенхимној транзицији (Lamouille S, 2014). Смањење експресије miRNA, као што су miR-29b, miR-30 повећавају експресију SNAIL1-а (Zhang J, 2012), док је смањење miR-200 удружено са повећањем ZEB-а и последичном прогресијом епително мезенхимне транзиције (Bracken CP, 2008), па би смањење CC16 у периоду од 1-3 месеца код деце са atopијом која је удружена са изостанком пораста TSLP у овом периоду могло бити и последица неадекватне продукције miRNA са појачаном експресијом транскрипторних фактора одговорних за епително-мезенхимну транзицију. Није познато да ли су повишени нивои ECP-а због рибонуклеазне активности повезани са снижењем miRNA.

У хроничним инфламаторним болестима црева као што су Кронова болест и улцерозни колитис, измерене су ниске концентрације TSLP у деловима слузокоже црева без запаљења, па се не искључује могући поремећај хомеостазе Т ћелија и супресије TH1/TH17 одговора на баријери услед недостатка TSLP (Roan F, 2012). Инхибиција NFκB у епителним ћелијама агонистима за RXR (енг. *retinoid X receptor*) такође смањује TSLP експресију (Lee HC, 2008), али је исто сигнализирање потребно и за проинфламаторни одговор епитела са продукцијом IL-1, IL-6, TNFα из епителних ћелија, па би мање концентрације TSLP током прве године живота код деце са атопијом, односно изостанак пораста у периоду од 1-3 месеца од престанка сисања, могле бити паралелан налаз супресије TH1/TH17 одговора, а не узрок овог поремећаја.

Анализа предикторних фактора промене концентрације TSLP у серуму код деце са атопијом, показала је да свака хронична бронхијалан болест код деце са атопијом повећава експресију TSLP за 9,3 pg/ml, а повећање TSLP повезано је и са порастом концентрације IgG према RSV, али и са IL-10. RSV индукује продукцију TSLP у епителним ћелијама дисајних путева оболелих од астме, па се сматра да велика осетљивост епителних ћелија астматичара на инфективне агенсе може бити последица снажног TSLP одговора (Lee HC, 2012). Код деце са атопијом смо предходно описали пораст TNFα и IgG према RSV код деце која су испољила хронични визинг. Испитивања на култури хуманих епителних ћелија дисајних путева A549 показала су да РСВ инфекција и TNFα повећавају експресију TSLP и IL-7Rα (Miazgowiec MM, 2013). Испитивања индукције хуманих ДТ са TSLP и TLR3 лигандима утврдили су постојање диференцијације централних меморијских TH17 ћелија у условима TH2 имунског одговора (Tanaka J, 2009), па с обзиром да код деце са атопијом у условима изостанка IL-10 имунорегулације постоји смањење TGFβ1 са повећањем TNFα, могуће је да је развој TH17 одговора механизам смањења високе концентрације TGFβ1 код деце са атопијом у циљу успостављања хомеостазе раста плућа и развоја имунског система. Слабија индукција TSLP код деце са атопијом може бити удружена и са мањом продукцијом IL-2 током активације Т ћелија у процесу диференцијације Т ћелија (а који је неопходан за одржавање пула Т рег ћелија), због мањег броја ДТ и CD4+ ћелија услед нижег TSLP-а у млађем узрасту, па је мања концентрација IL-2 у основи снажније трансдиференцијације Foxp3+ Трег у TH17 ћелије (реф), код деце са атопијом. Солубини рецептор за IL-2 је такође повишен код деце са алергијом у односу на децу без алергије, па неутрализација овог цитокина може имати улогу у смањењу

концентрације TGFb1 код деце са атопијом односно индукције TH17 одговора (*Knipping K, 2017*).

Постоје мишљења да се инфламаторне TH2 ћелије индуковане са TSLP могу поделити на TH2 ћелије које продукују много TNF α и мало IL-10 и TH2 ћелије које продукују много IL-10 и мало TNF α (*Liu YJ, 2007*). Након оштећења TSLP посредована индукција TNF α који повећава пермеабилност ендотела, експресију селектина, продукцију IL-1, IL-6 и појачава фагоцитну активност макрофага, може индуковати и продукцију IL-10 који доводи до инхибиције макрофага на којима смањује експресију ХЛА класе 2, костимулатора и адхезионих молекула, док паралелна TSLP посредована индукција TH2 одговора има значаја у зарастању рана преко алтернативне активације макрофага (*O'Shea JJ, 2013*). CD4+Foxp3+ Трег које су индуковане ДЋ предходно изложеним TSLP-у (TSLP-ДЋ) 60% продукују и IL-5 и у 10% IL-4, а у 4% ове ћелије експримују GATA3 (маркер TH2 диферентованих ћелија), па се сматра да TSLP-ДЋ индукују диференцијацију TH2/Трег ћелија (*Du MR, 2014*).

У нашем истраживању утврдили смо позитивну корелацију TSLP и ECP-а код деце без атопије у узрасту 5-7 месеци, односно у условима изостанка ефекта IL-10 када је и код деце без атопије утврђена негативна повезаност TSLP и CC16, али у старијем узрасту TSLP позитивно корелише са TNF α код деце без атопије. Поред индукције TH2 одговора у присуству антигена, директни ефекат TSLP на CD8+ састоји се у индукцији цитотоксичних Т ћелија које продукују велике количине INF γ и повећању њиховог преживљавања кроз појачану експресију Bcl-2 анти-апоптолитичног протеина (*Rochman Y, 2008, Voita M 2013*). Могуће је да код деце без атопије пораст INF γ из CD8+ омогућава развој TH1 одговора на нивоу интраепителних ћелија, јер је описана трансдиференцијација једног облика нуоцита у други првенствено смањењем експресије ROR γ t у подтипу 3, када прелазе у подтип 1 (*DeKruyff RH, 2014*).

5.3.3.2 TSLP и имунорегулација

И код деце са атопијом и без атопије постоји независна корелација TSLP и IL-10, која је утврђена и у групи деце без болести доњих дисајних путева, па активирање епителних ћелија у одговору на агенсе из спољашње средине са повећањем TSLP и IL-10 може бити један од механизма развоја периферне толеранције на спољашње стимулусе којима се обезбеђује изостанак активације имунског система.

Међутим, резултати студија о утицају TSLP на имунорегулацију су контрадикторни. Са једне стране је показано да TSLP инхибише IL-10-посредовану имунорегулацију и формирање индукованих Трег на спољашње стимулусе (*Nguyen KD, 2010*), али са друге стране постоје резултати да у *in vitro* условима TSLP промовише развој Т рег у тимусу (*Mazzucchelli R., 2008*), као и Трег на периферији (*Iliev ID, 2009*) у условима изостанка стреса епителне баријере (*Swamy M, 2010*), као и да је индукција толерогених ДТ код људи зависна од присуства TSLP, што није био случај код мишева (*Iliev ID, 2009*). У медули тимуса око 50% CD4+ ћелија које имају високо-афинитетни TCR према сопственом ткиву у присуству TSLP порекла из епителних ћелија Хасалових телашаца диференцирају у Трег (*Boita M 2013*). Овај механизам вероватно подразумева постојање сопствених антигена епитела (или читавих епителних ћелија која праве Хасалова телашца) у медулу тимуса, где се врши диференцијација CD4+ реактивних ћелија на сопствене антигене у CD4+CD25+ ћелије (*Watanabe N 2005, Hanabuchi S 2010*). Код деце са атопијом, присутна је TSLP индукција IL-10 неvezано од изложености спољашњим факторима (присутна је и код деце која су на природној исхрани, и без болести доњих дисајних путева и без обзира на алергију у породици) и то у узрасту од 5-7 месеци (што није био случај код деце без атопије). Овакав налаз може указивати на континуирани долазак сопствених антигена у тимус деце са атопијом и прекомерном тимусном индукцијом Т рег, а извор оштећења сопственог ткива може бити или цитотоксични ефекат ЕСР-а (из примарно јаког ТН2 одговора) или појачана пролиферација прогенитора (висок СС16 у узрасту од 5-7 месеци), односно мезенхимно-епителна индукција по типу 1 која се можда одвија и на нивоу тимуса. Испитивање развоја толеранције при имунотерапији у мишијим моделима показала је генерацију CD4+IL-10+ Трег од којих је завистан развој толеранције на алергенски пептид, а које се налазе искључиво у плућима а не и у лимфним чворовима (*Campbell JD, 2009*). Резидентни макрофаги вероватно нису укључени у развој алерген-специфичне толеранције (*Lloyd CM, 2010*), али је утврђено да макрофаги који продукују IL-10 могу у слезини изазвати индукцију специфичних Т рег (*Janssen EM, 2002*).

Значај TSLP у индукцији имунорегулаторних механизма описан је у оквиру имунолошке толеранције плода током трудноће (*Du MR, 2014*). Утврђено је да неklasични ХЛА-Г на трофобластима појачано експримован у присуству Трег а његова функција је да активира инхибиторне рецепторе на НК ћелијама и штити трофобласте од НК-завистног убијања током урастања у материцу (*Tilburgs T, 2010*). Трофобласти

секретују TSLP који индукује ДТ (CD11c+) у децидуи да усмеравају диференцијацију CD4+ CD25- ћелија у CD4+ CD25+Foxp3+ Трег (у присуству TGFβ1), при чему ове TSLP индуковане ДТ продукују велике концентрације IL-10 и TGFβ1 (*Du MR, 2014*). Анализа инвазивности трофобласта у присуству имунорегулаторних цитокина показала је да Трег које секретују IL-10 изазивају већу инвазивност трофобласта, док Трег које секретују TGFβ1 превенирају ексцесивну инвазију трофобласта (*Du MR, 2014*). Осим тога трофобласти који су инкубирани са Трег повећавају експресију ТН2 цитокина (IL-4 и IL-10) у NK ћелијама децидуе, а смањују експресију TNFα из НК ћелија, као и INFγ из CD4+CD25- ћелија (*Du MR, 2014*).

5.3.3.3 Генетски детерминисано повећање TSLP

Генетски детерминисано повећање TSLP утврдили смо код деце са атопијом која су имала податак о астми у породици, у узрасту 8-24 месеци после престанка сисања. При томе су мушка деца са астмом у породици имала и мање концентрације CC16, односно код мушке деце са атопијом која су имала мајку са алергијом поред великих концентрација TSLP и малих концентрација CC16 измерена је и већа концентрација IgA према RSV, као и чешће постојање акутног ринитиса и визинга. Продукцију TSLP из епителних ћелија дисајних путева индукује NFκB после активације TLR (енг. Toll-like receptor), и то активација TLR2 (бактеријски липотеихоична киселина и пептидогликани), TLR3 (дволанчана РНК вируса), TLR8 (једноланчана вирусна РНК) и TLR9 (CpG мотиви вирусних и бактеријских ДНК) (*Wang Y, 2008*). Утврђено је да TSLP прво индукује продукцију IL-9 из нуоцита типа 2 (*Wilhelm C, 2011*), а ТН9 ћелије продукују поред IL-9 и IL-10 и паралелно врше инхибицију ТН1 одговора (*O'Shea JJ, 2013*). Могуће да код деце са атопијом TSLP преко продукције IL-9 из нуоцита типа 2 повећава и инфилтрацију ткива маст ћелијама, а да се паралелна експресија IL-10 огледа у повећаној TSLP-индукцији овог цитокина у узрасту 5-7 месеци код деце са атопијом што није био случај код деце без атопије.

Деплеција Трег је довољна за пролиферацију ILC-2 који продукују IL-5 и IL-13 (*Klose CS, 2016*), што је повезано са блокадом секреције IL-22 из ILC-3 и може бити удружено са додатним нарушавањем интегритета респираторне баријере (*Klose CS, 2016*). TSLP индукована OX40L експресија на ДТ индукује ТН2 поларизацију одговора приликом презентације антигена наивним Т ћелијама, док IL-4 стабилизује и појачава

TH2 одговор (*Ito T, 2005*) у условима одсуства индукције TH1 одговора (*Liu YJ, 2007*). Смањење CC16 у току детињства повезује са појачањем TH2 одговора у плућима (*Chen LC, 2001, Bernard A 2007, Jacobs J, 2012, Laing IA, 2009*), који може бити условљен и изостанком ефекта INF γ на повећану продукцију CC16 (*Yao XL 1998*). Разлике између полова у одговору на РСВ инфекцију могу бити повезана са полиморфизмом TSLP рецептора (TSLPR) који се састоји од ланца који везује TSLP и α ланац рецептора за IL-7, а ген за TSLPR се налази на хромозому Xp22.3 и Yp11.3 (*Boita M 2013*). Полиморфизам гена за TSLPR који условљава већу експресију ових рецептора при РСВ инфекцији у респираторном епителу је налаз карактеристичан за астматски епител (*Miazgowicz MM, 2013*).

5.4 CC16 и болести доњих дисајних путева у седмој годни живота

БХР клинички дефинисан као ≥ 3 болести са манифестацијом упале плућа и хроничног визинга у узрасту до две године утврђен је код 6,7% деце узраста до две године од којих је 54,5% деце имало атопију (ендотип CC16 $\leq 3,4$ ng/ml) и 45,5% је било без атопије (ендотип ECP $\geq 12,4$ ng/ml). Код деце која су испољила болести доњих дисајних путева у узрасту од 7 година није утврђена разлика у учесталости атопије. Деца са БХР у узрасту до две године имају 3,8x већи ризик од болести доњих дисајних путева у седмој години. У групи мушке деце са БХР у прве две године у 42,9% постојала је болест доњих дисајних путева и у 7 години живота, док је у групи девојчица са БХР у прве две године њих 75% имало болест и у 7. години. Овакав налаз је у складу са подацима из литературе да се са узрастом смањује инциденција болести доњих дисајних путева код мушке деце, па у пубертету постоји већа учесталост код женског пола (*Carey MA, 2007*).

Однос између самообнављања прогенитора респираторног епитела, њихове диференцијације у мукоцилијарне и алвеоларне ћелије и стање терминално диферентованих ћелија које повратно уравнотежују степен пролиферације прогенитора неопходне су за очување хомеостазе на плућном епителу. Изостанак баланса и прекомерна или недовољна пролиферација прогенитора могу бити повезани са компромитовањем интегритета ткива и плућне функције (*Volckaert T, 2014*). Активација антиапоптоличких сигнала у Клара ћелијама у РСВ инфекцији (*Collins PL, 2008*), при чему је доминантни TH2 одговор удружен са смањеним антивирусним одговором па је

присутна перзистентна инфекција (*Holt PG, 2012*), као и поремећај у диференцијацији Клара ћелија у цилијарне ћелије услед појачаног FGF10 и Notch сигнализација (*Tsao PN, 2009*) могу бити удружени са порастом њиховог броја и последичном експресијом еотаксина који је одговоран за развој еозинофилне инфламације у плућима (*Sonar SS, 2012*). У нашем истраживању концентрација $CC16 \geq 7,25$ ng/ml може бити показатељ да ће мушко дете са БХР у прве две године имати и болести доњих дисајних путева и у 7. години живота, док је у групи мушке деце која нису имала БХР у узрасту до две године то $CC16 \leq 3,6$ ng/ml. Појачана индукција диференцијације Клара ћелија у мукус продукујуће ћелије под дејством IL-13 (*Johnson TR, 1999, Castilow EM 2008, Barkauskas CE, 2017*) и активацијом рецептора за IL-4 (*Kuperman DA, 2005*) или њихова трансдиференцијација у базалне ћелије или алвеоларне ћелије типа 2 могу бити удружени са смањењем CC16 (*Laing IA, 2009*).

Мале концентрације CC16 у узрасту 5-7 месеци код мушке деце 4,6x повећавају ризик од испољавања болести доњих дисајних путева у 7. години. Мали калибар дисајних путева и повећан отпор протицању ваздуха познати су предикторни фактори испољавања како транзитивног визинга код мушке деце, тако и испољавања хроничних респираторних болести као што су астма и ХОБП касније у животу (*Aysola RS, 2008, Grainge CL 2011, van der Gugten A 2011*), али је њихово мерење компликовано и технички тешко изводљиво код деце. У нашем истраживању смо показали да CC16 може бити параметар ризика за испољавање болести доњих дисајних путева како у другој, тако и у седмој годни живота код мушке деце, па би се као доступан биомаркер у узрасту 5-7 месеци могао користити и у скринингу утврђивања ризика за испољавање болести доњих дисајних путева у седмој годни живота.

Осим малих концентрација CC16 испољавање болести доњих дисајних путева код мушке деце у 7 години живота утврдили смо и постојање малих концентрација $IL-10 \leq 2,7$ pg/ml и великих концентрација $TGF\beta 1 \geq 27,4$ ng/ml, при чему је код мушке деце без атопије овај имунорегулацијски дисбаланс праћен и ниским концентрацијама TSLP, док је код мушке деце са атопијом утврђена статистички значајна разлика само у TGF β 1. Ниске концентрације TSLP повезују се са смањеном експресијом Dsher протеина од значаја у синтези miRNA (*Biton M., 2011*). miR-300 и miR-372 смањују експресију TGF β рецептора типа 2, што омогућава мезенхимно-епителну транзицију (*Subramanyam D 2011*), а ефекат TGF β на смањење индукције плурипотентних стем ћелија, може бити у основи смањене транзиције мезенхима у епителне ћелије

(Maherali N 2009). Поремећај хомеостазе преласка мезенхимног и епителни фенотип и обрнуто услед повећане концентрације TGF β 1 и појачања његовог сигнализирања током развоја плућа може бити у основи смањења и концентрације CC16 у узрасту до две године, а рано настало ремоделовање екстрацелуларног матрикса са измењеним саставом и својствима под дејством металопротеиназа индукованих са TGF β 1 (Lamouille S, 2014) могло би бити у основи перзистирања болести доњих дисајних путева и у 7 година. Осим, индукције SMAD3-SMAD4 комплекса који инхибира експресију инхибитора диференцијације и повећава експресију TWIST-а (Kang Y 2003), TGF β такође повећава експресију убиквитина који разграђују протеине међућелијских веза, активира PI3K-AKT пут који активира mTORC1 и 2 (mammalian TOR complex 1 и 2) а што доводи до повећања величине ћелије, синтезе протеина, мобилности и транзиције епителног у мезенхимни фенотип (Lamouille S, 2014).

Уколико би смо ефекте имунорегулаторних цитокина посматрали из аспекта ефекта на трофобласте као матичних ћелија (Du MR, 2014), онда би велике концентрације TGF β 1 могле имати ефекат у превенцији ексцесивне пролиферације матичних ћелија, а мале концентрације IL-10 не би биле довољне да обезбеде њихову пролиферацију, па би овај дисбаланс био у основи и мањег броја Клара ћелија са малом концентрацијом CC16 у серуму уз поремећај у морфогенези плућа код мушке деце. Могуће је и да високе концентрације TGF β 1 у овом узрасту онемогућавају активацију имунског система и последичног повећања IL-10 у проинфламаторном одговору, уз изостанак проинфламаторни цитокина (TNF α , INF γ) на појачање секреције CC16 (Yao XL 1998).

Такође, повећана осетљивост мушке деце на оксидативни стрес са пропадањем Клара ћелија у условима високе концентрације TGF β 1 не би изазвала проинфламаторну активацију епителних ћелија и/или активацију интраепителних и ћелија урођеног имунитета, па самим тим би овакво оштећење остало непрепознато и без продукције проинфламаторних цитокина и IL-10.

Са друге стране, код женске деце која су испољила болести доњих дисајних путева у 7. години у узрасту од 8-24 месеца су измерени CC16 $\leq 3,5$ ng/ml и ECP $\geq 9,0$ ug/l, па би еозинофилна инфламација могла бити у основи поремећаја у развоју плућа код женске деце која је удружена са иререверзибилним променама и одржањем учесталости респираторних болести и у 7. години живота.

5.4.1 Предиктори акутног бронхитиса у седмој години

Акутни визинг у узрасту од 7 година утврђен је код 19,9% деце без разлике у учесталости атопије. Мање концентрације СС16 као предиктор испољавања акутног визинга у узрасту од 7 година утврђене су код мушке деце без атопије у било ком узрасту током прве две године, као и код мушке деце са атопијом у узрасту 5-7 месеци. Мушка деца која су у узрасту од 5-7 месеци, без обзира на атопију имала $CC16 \leq 3,6$ ng/ml имају 6,2x већи ризик од испољавања акутног визинга у предшколском узрасту, при чему су мушка деца са атопијом имала и велике концентрације TGF β 1 ($\geq 27,5$ ng/ml) у овом узрасту. Са друге стране мале концентрације TGF β 1 измерене у овом узрасту биле су протективне за испољавање акутног визинга у 7 години живота код мушке деце, а проинфламаторно стање услед смањења TGF β 1 током прве године живота, иако удружено са већим бројем болести доњих дисајних путева у узрасту до две године, могло би допринети правовременом развоју ТН1/ТН17 имунског одговора и имати протективни значај за испољавање болести доњих дисајних путева касније у животу у складу са „хипотезом хигијене“. Међутим, са друге стране утврдили смо да је упала плућа у прве две године предиктор испољавања акутних болести у 7 години, који повећава овај ризик за 4,3x. У групи деце са атопијом и фенотипом континуирани визинг у току три и више месеца са упалом плућа у узрасту до две године, код којих је утврђена велика концентрација TGF β 1 и мале концентрација СС16, у 40% је утврђено испољавање болести доњих дисајних путева у седмој годни живота (једно дете је имало акутни бронхитис и једно астму и оба детета су била женског пола).

Образац великих концентрација TGF β 1 и малих концентрација СС16 утврђен је и код деце без атопије која нису имала упалу плућа у прве две године живота, али су испољила акутни бронхитис у 7. години живота, а код којих су утврђене и мање концентрације IL-10 а веће концентрације IgG према RSV. Мале концентрације СС16 код мушке деце која имају смањени оксидативни потенцијал у односу на женску децу (Kander MC, 2017), живот у граду који је повезан са већом изложеношћу аерозагађењу, као и чешће RSV инфекције код градске деце (Relić T, 2016) могу допринети активацији епително мезенхимне јединице и остваривања нежељеног ефекта TGF β 1 са раним развојем ремоделовања дисајних путева, који за последицу има испољавање акутног бронхитиса у предшколском узрасту који би се у том случају могао разматрати и као фенотип дечије астме код мушке деце.

5.4.2. Предиктори хроничног бронхитиса у седмој години

Хронични бронхитис у узрасту 7 година имало је 1,9% деце и сва су била без атопије у узрасту до две године. У нашем истраживању $ECP \geq 12,4 \mu\text{g/l}$ је маркер БХР код деце без атопије у узрасту до две године, а $ECP \geq 25,7 \mu\text{g/l}$ у узрасту до две године повећава 18,2x ризик од испољавања хроничног визинга у 7. години живота код деце без атопије. Ремес и сарадници су за $ECP \geq 24,7 \mu\text{g/l}$ у старијем узрасту утврдили 2,3 x већи ризик од постојања астме у односу на здраву децу (*Remes S, 1998*). Међутим, деца која су имала БХР са еозинофилном инфламацијом у узрасту до две године испољила су болест доњих дисајних путева у 7. години у 80%, али је само 20% имало и хронични визинг, а у 60% се радило о акутном бронхитису у 7. години.

Постоје подаци који указују да ECP корелише са инфламацијом у дисајним путевима, али не и са БХР-ом, као и да велика концентрација ECP -а у серуму није предиктор алергијске астме (*Koh GC 2007*) У нашем истраживању у групи деце без атопије са еозинофилном инфламацијом предиктори испољавања БХР-а су били мале концентрације TSLP и велике концентрације IL-10, које су могле бити у основи супресије развоја TH1 одговора и повећане осетљивости ове деце на вирусне инфекције што се манифестовало БХР-ом. Супротно томе, деца без атопије која су имала $ECP \geq 25,7 \mu\text{g/l}$ (што је маркер испољавања хроничног визинга у седмој години) имала су велике концентрације TSLP-а у узрасту до две године. TSLP-ом индуковани нуоцити типа 2 који секретују IL-13 и IL-5 и одговорни су за еозинофилну инфламацију резистентни су на кортикостероидну терапију (*Ree R, 2014*). Код деце са неконтролисаним астмом постоји већа концентрација ECP -а у односу на децу са контролисаним астмом или здравом контролом (*Knipping K, 2017*), па би механизам еозинофилне инфламације повезан са раном TSLP зависном активацијом нуоцита типа 2 могао бити у основи хроничног бронхитиса у узрасту од 7 година код деце без атопије. На преживљавање нуоцита типа 2 могла би утицати и примена гликокортикоидне терапије у раном узрасту која би вршила супресију еозинофилне инфламације и развој Трег, али би и поред ове терапије опстали гликокортикоид резистентни нуоцити који би у каснијем узрасту продуковали TH2 цитокине са последичном манифестацијом хроничног бронхитиса код деце без атопије.

Код деце са атопијом и ECP -ом $\geq 25,7 \mu\text{g/l}$ утврђене су и велике концентрације TGFb1 у узрасту до две године, али 90% ове деце није испољило болести доњих

дисајних путева у узрасту од 7 година, па је могуће да TGFb1 порекла из еозинофила није показатељ ремоделовања, већ има улогу у контроли саме еозинофилне инфламације и заштити прогенитора, без нежељеног ефекта еозинофилне инфламације на плућни епител са трајним последицама. Не може се икључити могућност да је код ове деце цитотоксична активност еозинофила усмерена управо на TGFb1 продукуюће ћелије, што онемогућава развој ремоделовања. Убијање ћелија по типу некрозе у присуству ЕСР-а, могао би бити механизам стимулације урођеног имунитета и индукције неутрофилне инфламације што за последицу има развој ТН1 одговора, након чега се регулација раста плућа одвија са TNF α индукованом апоптозом миофибробластних ћелија (реф) уз индукцију мезенхимно-епителне транзиције и стимулације продукције СС16 из Клара ћелија у присуству TNF α и INF γ .

5.4.3. Предиктори астме у седмој години

У 7. години живота астма је дијагностикована у 6,2% што је у сагласности са подациома о преваленци астме у дечијем узрасту која се креће око 8% (*Moorman et al., 2007*). Астма се дефинише као комплексни и хетерогени синдромом који обухвата неколико различитих фенотипова (*DeKruyff RH, 2014*). Иако се уназад две деценије астма разматра као имунолошка болест дисајних путева за коју је одговоран ТН2 ћелијски имунски одговор, са тачно дефинисаним епидемиолошким, генетским и имунолошким факторима ризика, утврђивање каузалних фактора и њихова међусобна интерреакција која доприноси настанку астме је непозната (*Levy B, 2015*). Астма се најчешће дијагностикује у предшколском узрасту, али је за генезу астме изузетно значајна интерреакција постнаталног развоја плућа у фази алвеоларизације и сазревања имунског одговора током раног детињства (*Levy B, 2015*).

Деца која имају астму у школском узрасту рађају се са нормалном плућном функцијом, али током прве три године живота плућна функција значајно пада и максимално је редукована у 3. години живота што перзистира до одраслог доба (*Lloyd SM, 2010*). Ова чињеница је упоредива са нашим налазима да је код деце која су имала астму у 7 години живота измерена концентрација СС16 $\geq 6,8$ ng/ml у узрасту од 5-7 месеци и СС16 $\leq 2,9$ ng/ml у узрасту 8-24 месеца, али се у нашем истраживању овај налаз односи првенствено на женску децу, неvezано за атопију. И у литератури се астма све више разматра као болест узрокована алтерацијама епитела као физичне и

функционалне баријере, а не као болест везана за алергију (Volckaert T, 2014). У нашем истраживању је у узрасту од 7 година дијагнозу астме имало 36,4% девојлица са $CC16 \geq 6,8$ ng/ml у узрасту 5-7 месеци, као и 50% девојчица које су имале $CC16 \leq 2,9$ ng/ml у узрасту 8-24 месеца. Код деце са астмом утврђен је абнормалан, незрели фенотип респираторног епитела са већом продукцијом антиинфламаторних медијатора и у одсуству инфламације (Lloyd CM, 2010), што је потврђено и нашим истраживањем у коме смо утврдили да $CC16 \geq 6,8$ ng/ml у узрасту 5-7 месеци 7,3x повећава ризик од постојања астме у 7. години живота. Међутим, у литератури се овај поремећај епитела код деце са астмом повезује са смањеним нивоима $TGF\beta 1$, док су наши резултати показали да је мала концентрација $TGF\beta 1$ повезана са атопијом и удружена са са малим концентрацијама $CC16$ у другој години живота уз клиничку манифестацију упале плућа код женске и изолованих болести доњих дисајних путева код мушке деце са атопијом у прве две године живота, али не и са испољавањем болести доњих дисајних путева у 7 години код деце са атопијом.

Деца са алергијском астмом која се манифестује у прве три године живота имају редуковану плућну функцију у школском узрасту (Bisgaard H, 2012), па су промене у дисајним путевима које се дешавају током раног детињства у основи тешкох облика астме касније (Martinez FD 1995, Morgan WJ 2005). Мета-анализа која је укључила 10 релевантних студија повезаности полиморфизма $CC16$ и настанка астме, показала је да је генотип удружен са ниским концентрацијама $CC16$ у серуму удружен са повећаним ризиком од астме (Yang KD 2007, Laing IA 2009, Zhao G 2013). Наши резултати указују да је мали $CC16$ повезан са испољавањем астме само уколико је измерен у узрасту ≥ 8 месеца живота код деце са атопијом. Постојање анемије повећава ризик од постојања астме у 7. години живота за 34x у групи деце са атопијом и може указати на поремећај обнављања прогенитора плућа порекла из коштане сржи.

5.4.4 Хомеостаза $CC16$

У нашем истраживању 60% деце која су имала астму у 7 години живота није имало болест доњих дисајних путева у прве две године, али се тај проценат односио на 50% деце која су тестирана у узрасту 5-7 месеци и 10% деце која су тестирана у узрасту 8-24 месеца. Када смо у нашој испитиваној групи анализирали разлике у испитиваним биомаркерима у групи деце са атопијом без болести доњих дисајних путева у узрасту

до две године у односу на концентрације $CC16 > 6,8 \text{ ng/ml}$, $2,9-6,8 \text{ ng/ml}$ и $< 2,9 \text{ ng/ml}$, утврдили смо да и без болести доњих дисајних путева код деце са атопијом долази до смањења $CC16$ са високих на средње концентрације, паралелно са већим $TSLP$, $IL-10$ и $TGF\beta 1$ и то у групи деце која сисају. Уколико пораст $TSLP$ услед истезања коже детета које расте (где се у одсуству оштећења коже као баријере индукују T регулаторне ћелије у кожи (Swamy M, 2010), при чему је тај пораст праћен смањењем $CC16$ на умерене вредности (утврђена негативна корелација $TSLP$ и $CC16$), разматрамо као физиолошки процес контроле раста и развоја плућа онда би велике концентрације $CC16$ у узрасту 5-7 месеци код деце са атопијом могле бити последица лоше контроле раста плућа услед ниске концентрације $TSLP$ (удружено са малим $IL-10$), појачане мезенхимно епителне транзиције, а можда и одсуства диференцијације ових матичних ћелија у цилијарне ћелије што би респираторни епител код деце са атопијом учинило хронично оштећеним (без предходне клиничке манифестације болести) што условљава исцрпљивање пула Клара ћелија (са последичним испољавањем болести доњих дисајних путева у другој години живота). Одсуство проинфламаторних цитокина урођене имуности као што су $TNF\alpha$ и $IL-6$ код деце са атопијом може допринети и смањеној индукцији пролиферације хематопоетских прогенитора, јер је анемија код деце са атопијом главни предиктор астме у седмој години живота.

Код трансгених мишева са прекомерном експресијом промотера $CC10$ утврђена је већа продукција $TH2$ цитокина $IL-4$, $IL-5$, $IL-9$, $IL-13$ уз настанак еозинофилне инфламације са активацијом маст ћелија (Hayashi T 2012). У нашој испитиваној групи код деце без атопије пораст ECP -а праћен је смањењем $CC16$ само код деце код које је измерена концентрација $CC16 \geq 4,8 \text{ ng/ml}$ (контрола раста регулисана еотаксином из Клара ћелија), као и у условима елиминације $TGF\beta 1$ (када би дисрегулација могла условити прејаку негативну контролу раста плућа). Пораст ECP -а праћен порастом $TGF\beta 1$ код деце са атопијом може се посматрати и као механизам којим алергијски имунски систем индукује продукцију гранулоцитне лозе у коштаном сржи што за последицу има повећане концентрације $TNF\alpha$ (Lewis D 2013, 17-19) или је $TNF\alpha$ порекла из активисаних маст ћелија у условима прекомерне експресије $CC16$ (Hayashi T 2012) и у присуству великих концентрација $TGF\beta 1$ индукује $TH17$ одговор код деце са атопијом, код којих је нарушена $TH1/TH2$ равнотежа. Снажан $TH17$ одговор током вирусних инфекција могао би код деце са атопијом узроковати снажну инфилтрацију неутрофила у плућа (Collins PL, 2008) са последичним повећањем $TH1$ одговора и IgG

према RSV и смањењем CC16 као последице тежих, рецидивантних и хроничних оштећења респираторног епитела код деце са атопијом. У хроничним оштећењима у којима је број Клара ћелија редукован, или је експресија CC протеина смањена изостаје антиинфламаторни ефекат, макрофаги су класично активирани и понављано секретују проинфламаторне цитокине, па долази до развоја хроничне инфламације у плућима . (Snyder J,2010)

5.4.5 РСВ инфекција и болести доњих дисајних путева у седмој години

За разлику од радова који подржавају директну узрочну везу вирусног бронхиолитиса у патогенези астме, као што су шведска кохортна студија у којој је утврђено да су деца са тешким RSV бронхиолитисом имала већу преваленцу астме/рекурентног визинга (са три и више епизода) и алергијске сензибилизације у узрасту од три, седам, 13. година, као и у раном одраслом добу у односу на контролну кохортну групу (Sigurs N, 2010) и студији Thomsen и сарадника на 8280 парова близанаца у којој је на основу узрочног модела генетске варијансе утврђено да тешки RSV бронхиолитис највероватније представља генетску предиспозицију за астму (Thomsen SF, 2009), Poorisrisak et al. није пронашао разлику између монозиготних близанаца хоспитализованих услед RSV бронхиолитиса различите тежине у следећим параметрима: плућној функцији, нивоу издахнутог азот оксида, преваленци астме и коришћењу медикамената за астму у току периода праћења од 6-7 година, па су изведене епидемиолошке студије монозиготних близанаца, које не подржавају теорију да RSV бронхиолитис изазива астму (Poorisrisak P, 2010). У нашем истраживању смо утврдили да је смањење CC16 удружено са порастом IgG према RSV у групи деце са атопијом и упалом плућа, као и у групи деце без атопије са податком о алергији мајке. Међутим, такође смо утврдили да је у групи деце без атопије и без болести доњих дисајних путева у узрасту до две године и асимптоматски пораст IgG према RSV био удружен са смањењем CC16 (<2,9 ng/ml као маркером астме у узрасту од 7 година) у условима ниских концентрација IL-10. Мала цитопатогеност овог вируса у условима велике концентрације TGFb1 може бити удружена са перзистентном асимптоматском инфекцијом. Да ли је перзистентна RSV инфекција удружена са континуираним смањењем броја инфицираних Клара ћелија, а непозната од стране имунског система који је инхибиран високим концентрацијама TGFb1 или је полиморфизам ХЛА

молекула одговоран за немогућност препознавања вирусних протеина у склопу ХЛА комплекса, па изостаје индукција IL-10 регулације на епителима, **није познато**. Не може се искључити могућност постојања физиолошког механизма контроле прекомерне пролиферације и диференцијације прогенитора плућа уз помоћ антителима посредоване цитотоксичност при чему су IgG према РСВ пасивно пренешена од мајке.

У нашем истраживању иако је *RSV* инфекција била удружена са болестима доњих дисајних путева у узрасту до две године и код деце без атопије и код деце са атопијом, у узрасту од 7 година није утврђена разлика у учесталости болести доњих дисајних путева у односу на постојање ове инфекције.

У групи деце која нису имала РСВ инфекцију у узрасту до две године испољавање астме код женске деце у 7. години било је удружено са великим концентрацијама СС16 у узрасту од 5-7 месеци, а испољавање хроничног бронхитиса у 7 години код женске деце било је удружено са већим ЕСР-ом, што указује да ови механизми нису повезани са *RSV* инфекцијом.

Раније смо показали да са порастом IgA према *RSV* расте и СС16 и код деце са атопијом и код деце без атопије. Код мушке деце која су имала мале концентрације СС16 и поред IgA хуморалног имунског одговора према *RSV* постоји испољавање акутног бронхитиса у 7 години живота. Овакав налаз указује на примарно мали пул Клара ћелија код мушке деце која испољавају акутни бронхитис касније у животу, а који неповећава ни *RSV* инфекција. Осим тога смањени антиинфламаторни потенцијал на респираторном епителу услед малих концентрација СС16 може условити теже облике ове инфекције у другој годни живота, али она није разлог каснијег испољавања акутног визинга у 7. години живота.

У групи деце која су имала IgA и IgG хуморални одговор према *RSV* женска деца која су имала акутни бронхитис у 7. години имала су веће концентрације ЕСР-а у узрасту 8-24 месеца односу на децу која нису имала болести у 7. години, па изостанак пада ЕСР-а који је карактеристичан са старијим узрастом услед могућег развоја меморијског ТН2 одговора у плућима у току РСВ инфекције може бити у основи перзистирања болести доњих дисајних путева касније у животу код женске деце. Код мушке деце са акутним визингом и женске деце са кашљем у 7 години, а који су имали *RSV* инфекцију у узрасту до две године слабији ТН2 одговор може бити у основи примарно смањеног одговора зарастања рана, што је како у основи рецидивантне и/или

теже *RSV* инфекције у узрасту до две године, тако и у основи постојања симптома респираторних болести и у седмој години.

5.4.6 Прерастање болести доњих дисајних путева

Када смо анализирали разлике између деце која су испољила болести доњих дисајних путева у различитим узрастима у односу на децу без болести доњих дисајних путева, утврдили смо да деца која су испољила само болести доњих дисајних путева у прве две године имају *RSV* инфекцију и јачи TH2 одговор уз повећање укупних IgE али смањење ECP -а што није праћено испољавањем болести у седмој години.

Деца која су имала болести доњих дисајних путева и у другој и у 7. години живота имала су ниже концентрације CC16 и поред *RSV* инфекције, као и већи укупни IgE , TSLP и $\text{TNF}\alpha$, што указује са дефицијенцијом CC16 узрокује дисфункцију респираторног епитела са адекватном стимулацијом имунског одговора али изостанком адекватне репарације услед смањеног броја Клара ћелија.

Деца која су испољила болести доњих дисајних путева само у седмој години нису имала PCB инфекцију, а имунорегулаторни образац подразумевао је велике концентрације $\text{TGF}\beta 1$ уз мале концентрације TSLP и IL-10 , што може указивати на постојање услова за развој епително-мезенхимне транзиције са развојем ремоделовања уз изостанак адекватне и правовремене индукције периферне толеранције код деце без болести доњих дисајних путева током прве две године живота.

5.5 Могућности примаране превенције

Резултати епидемиолошких студија указују да је за смањење нежељених исхода дечије астме неопходна рана дијагноза и адекватна рана интервенција (*Chung HL, 2011*). Алергијске болести су неизлечиве, па актуелна фармакотерапија подразумева примену симптоматских лекова само у циљу контроле болести. Актуелне истраживања показују да се стратегије примарне превенције алергија заснивају на искључивом дојењу у току 4-6 месеци, раном излагању детета бактеријским производима (примена пробиотика), хидратација коже која смањује ризик од развоја атопијског дерматитиса, као и рано излагање алергенима хране као што су јаја и кикирики у циљу развоја толеранције код деце у ризику за развој алергије (*Van Bever HP 2016*).

Превенција и терапијска стратегија у лечењу хроничних болести једино је успешна уколико се поклапа са патофизиологијом болести (*Islam SA, 2012*). Орална примена TGF β 1 има превентивну улогу за алергијске болести код одојчади (*Nakao A., 2010*), а поређемаји са смањеним стварањем секундарних септи током алвеологенезе услед редуковане експресије FGF10 током инфламације (*Benjamin JT, 2007*), који могу бити и у основи развоја хроничне опструктивне болести плућа (*Klar J, 2001*), могу се кориговати применом ретиноичне киселине коју током развоја плућа продукују липофибробласти задужени за очување алвеоларних ћелија типа 2 (*Chao CM, 2016*).

Терапија матичним ћелијама представља нову терапијску стратегију (*Volarevic V 2011*), с обзиром да матичне ћелије нису имуногене због мале експресије ХЛА молекула класе 1 и одсуства ХЛА молекула класе 2, као и непостојања костимулатора (*Leibel S, 2016*). Ембрионалне матичне ћелије изоловане из ембриона пре имплантације имају продужену пролиферацију у плурипотентном стању у *in vitro* условима и развојни потенцијал да диференцирају у ћелије сва три клицина листа. Мезенхимне (адултне) матичне ћелије могу се изоловати из коштане сржи, крви пупчаника и масног ткива, а нађене су у многим органима и ткивима и имају улогу у обнављању оштећеног ткива, због чега се, као могући терапијски метод, користе у клиничким испитивањима аутоимуних и дегенеративних болести код одраслих (*Volarevic V 2011*). Мезенхимне матичне ћелије остварују имуномодулаторни ефекат преко међућелијског контакта или секрецијом солубилних фактора, а утврђено је да повећавају продукцију IL-10 из дендритских ћелија уз смањење проинфламаторних цитокина (INF γ и IL-12), инхибишу Т ћелијску пролиферацију преко експресије лиганда инхибиторног молекула PD1 и 2 (*programmed death 1 и 2*), а продукцијом имунорегулаторних цитокина (IL-10 и TGF β 1) повећавају број Трег и инхибишу пролиферацију IgG секретујућих Б ћелија (*Volarevic V 2011*).

Примена матичних ћелија у лечењу хроничних респираторних болести још увек је у фази испитивања. У бронхопулмоналној дисплазији постоји застој у развоју алвеола са изостанком секундарних септума у алвеолама и непотпуним формирањем матрикса, услед изостанка адекватне епително-мезенхимне интерреакције уз абнормални раст крвних судова. Као каузални фактори бронхопулмоналне дисплазије наводе се инфекције, хипероксија или траума волуменом при вештачкој вентилацији (*Leibel S, 2016*). На анималним моделима хипероксије показано је да интратрахеална трансплантација мезенхимних матичних ћелија порекла из коштане сржи може

превенирати застој у алвеоларном развоју и спречити фиброзне промене (*Chang YS, 2014*). Код превремено рођених беба са бронхопулмоналном дисплазијом примењене су мезенхимне стромалне ћелије порекла из пупчаника у 25. гестационој недељи и утврђено је смањење тежине клиничке слике без нежељених ефеката (*Chang YS, 2014*). Постоје саопштења и у побољшању плућне функције и крвног протока кроз плућа и редукције хипертрофије десног срца у случајевима идиопатске пулмоналне артеријске хипертензије после трансплантације мезенхимних матичних ћелија (*Zhu JH, 2008*).

Да ли би примена матичних ћелија код мушке деце са $CC16 \leq 3,4 \text{ ng/ml}$ у узрасту 5-7 месеци, односно код женске деце са атопијом и $CC16 \leq 2,9 \text{ ng/ml}$ у узрасту 8-24 месеца могла побољшати плућну функцију и превенирати развој респираторних болести касније у животу остаје да се види.

5.6 Лимитираност студије и даље препоруке

Дизајн студије у којој смо у популацији здраве деце узраста до две године утврдили концентрације $CC16$ и испитиваних биомаркера, као и њиховог односа са индивидуалним карактеристикама и болестима доњих дисајних путева одсликава реалну слику учесталости различитих ендотипова респираторних болести, који се могу манифестовати истим или другачијим фенотиповима у узрасту до две године, односно дефинише јасан предикторни значај одређених биомаркера у узрасту од седам година.

Ипак утврђене разлике $CC16$ зависне од узраста код деце са атопијом и без атопије указују на потребу спровођења више *case-control* студија и то : мушке деце без атопије код којих је утврђена мања концентрација $CC16$ повезана са већом учесталошћу акутног визинга; женске деце са атопијом код којих је утврђена велика концентрација $CC16$ у узрасту 5-7 месеци односно мала концентрација $CC16$ у узрасту 8-24 месеца удружена са повећањем ЕСП-а који су повезани са манифестацијом астме у седмој години; деце без атопије са великим концентрацијама ЕСП-а у узрасту 18-24 месеца а што се манифестује БХР-ом у прве две године, односно хроничним визингом у узрасту од седам година итд. Због евидентних промена у испитиваним биомаркерима у односу на клиничке манифестације и инфекције које утичу на развој имунског система и могу имати протективни утицај на развој болести касније у животу, потребно је дизајнирати будућа испитивања са лонгитудиналним праћењем развоја атопије, клиничких манифестација и испитиваних биомаркера у више узрастних тачака и то: 6., 12., 24., 36.,

48. месеци, као и у предшколском узрасту и касније, како би се добила реална динамика промена испитиваних биомаркера.

Учесталост БХР код деце узраста до две године од 6,7% захтева будуће испитивање овог фенотипа у општој популацији од 300 до 500 деце, како би се установиле евентуалне разлике по полу, начину исхране или генетском оптерећењу унутар групе деце са овим фенотипом. Због различитих ендотипова БХР код деце са и без атопије који се могу разматрати и из аспекта доминантно хуморалног односно ћелијског ТН2 одговора генетско испитивање ХЛА и цитокинског полиморфизма могло би допринети разјашњењу механизма настанка овог фенотипа код деце узраста до две године.

Даља испитивања на анималним моделима значаја *NK*, *NKT* ћелија, $\gamma\delta T$ ћелија и нуоцита у развоју плућа, могла би да разјасне однос алармина и прогенитора респираторног епитела како у самом ткиву плућа, тако и у коштаној сржи. Испитивање ефекта примене матичних ћелија на репопулацију Клара ћелија или супституционе примене СС16 током раног детињства у случајевима дефицијенције усмерили би даљи развој новог превентивног приступа у спречавању настанка астме и хроничне опструктивне болести плућа.

6. ЗАКЉУЧЦИ

- 1) Код деце са атопијом концентрације СС16 у серуму се смањују са узрастом, док се код деце без атопије повећавају, па $CC16 \leq 4,8 \text{ ng/ml}$ указује на постојање атопије у узрасту од 8-24 месеца. Смањење СС16 код деце са атопијом утврђено је код деце женског пола, деце која нису на природној исхрани, која немају алергију у породици, али и у подгрупи мушке деце која имају алергију мајке.
- 2) Акутни визинг код мушке деце без атопије повезан је са малим концентрацијама СС16 у узрасту 5-7 месеци, када постоји негативна корелација СС16 и броја ринитиса, али позитивна корелација СС16 и броја акутних визинга. СС16 у серуму расте са порастом IgA према RSV.
- 3) БХР фенотип код деце са атопијом удружен је са малом концентрацијом СС16 у серуму ($\leq 3,4 \text{ ng/ml}$), док је код деце без атопије удружен са еозинофилном активацијом (ЕСР-а $\geq 12,4 \text{ ug/l}$). $CC16 \leq 3,4 \text{ ng/ml}$ за 5,7x повећава ризик од континуираног визинга у трајању од 3 и више месеци код деце са атопијом, док $CC16 \geq 6,0 \text{ ng/ml}$ за 4,3x повећава ризик од испољавања истог фенотипа код деце без атопије.
- 4) И у групи деце са атопијом и без атопије акутни визинг је праћен повећањем укупних IgE, хронични визинг је удружен са РСВ инфекцијом, али је упала плућа код деце са атопијом удружена са малим концентрацијама СС16 и TGF β 1, док је код деце без атопије удружена са порастом IL-10 и TSLP.
- 5) И у групи деце са атопијом и у групи деце без атопије постоји пораст TSLP удружен са порастом IL-10. Код деце са атопијом постоји негативна корелација TSLP и СС16, што је код деце без атопије то присутно само при статистичкој елиминацији IL-10. Код деце са атопијом статистичка елиминација IL-10 удружена је са порастом TGF β 1 уз пораст ЕСР-а, као и са смањењем TGF β 1 уз пораст TNF α .
- 6) Није утврђена разлика у учесталости болести доњих дисајних путева у 7. години живота у односу на атопију. Предиктор дијагнозе астме у 7 години код женске деце је $CC16 \geq 6,8 \text{ ng/ml}$ у узрасту 5-7 месеци и $CC16 \leq 2,9 \text{ ng/ml}$ у узрасту 8-24 месеца. Предиктор хроничног бронхитиса који је у узрасту од 7 година испољен само код деце без атопије је ЕСР-а $\geq 25,7 \text{ ug/l}$ у узрасту до две године. На ризик од испољавања акутног бронхитиса у 7 години, код мушке деце без атопије

указује $CC16 \leq 3,7$ ng/ml, без пораста у РСВ инфекцији. На ризик од испољавања акутног бронхитиса у 7 години, код мушке деце са атопијом у узрасту 5-7 месеци указује $CC16 \leq 4,3$ ng/ml и $TGF\beta 1 \geq 27,5$ ng/ml.

- 7) Деца која су била без болести доњих дисајних путева и без RSV инфекције у прве две године живота, али су испољила болест у 7 години имала су $TGF\beta 1 \geq 19,8$ ng/ml и $ECP \geq 7,6$ μ g/l у прве две године, а без податка о алергији у породици. Слабост ТН2 одговора у РСВ инфекцији код мушке деце повезан је са испољавањем акутног визинга, а код женске деце са испољавањем кашља у 7. години живота, док еозинофилна активација у РСВ инфекцији код женске деце у узрасту 8-24 месеца повећава ризик од испољавања акутног бронхитиса у 7 години.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Activation of T Lymphocytes. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012; 206-209.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. B Cell Activation and Antibody Production. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012; 250-264.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Effector Mechanisms of Cell-Mediated Immunity. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012; 206-209.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. IgE-Dependent Immune Responses and Allergic Disease. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012; 426-43.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Immunity to Microbes. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012; 350-353.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Regional Immunity: Specialized Immune Responses in Epithelial and Immune Privileged Tissues. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012; 293-315.
7. Akinbami LJ, Moorman JE, Garbe PL, et al. Status of childhood asthma in the United States, 1980–2007. *Pediatrics*. 2009;123 Suppl 3: S131–S145.
8. Al-Daghri NM, Alokail MS, Abd-Alrahman SH, Draz HM, Yakout SM and Clerici M. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and pediatric asthma in children: a case–control study. *Environmental Health* 2013;12(1):1-6.
9. Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potentially activates mast cells. *J Exp Med* 2007 Feb;204(2):253-8.
10. Ambruso, D.R.; Bentwood, B.; Henson, P.M.; Johnston, R.B., Jr. Oxidative metabolism of cord blood neutrophils: Relationship to content and degranulation of cytoplasmic granules. *Pediatr. Res.* 1984, 18, 1148–1153.
11. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, Burns EJ, Sherr DH, Weiner HL, Kuchroo VK. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):854-61.
12. Archer F, Abi-Rizk A, Desloire S et al. Lung progenitors from lambs can differentiate into specialized alveolar or bronchiolar epithelial cells. *BMC Veterinary Research* 2013, 9:224
13. Arshad SH, Tariq SM, Matthews S, Hakim E. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years: a whole population birth cohort study. *Pediatrics* 2001; 108(2): E33.
14. Arshad SH¹, Karmaus W, Matthews S et al SPACE study group (Study of Prevention of Allergy in Children of Europe). Association of allergy-related symptoms with sensitisation to common allergens in an adult European population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2001;11(2):94-102.
15. Atkinson J, Adair-Kirk T, Kelley D, deMello D and Senior R. Clara cell adhesion and migration to extracellular matrix. *Respiratory Research* 2008; 9: 1-11.
16. Aysola RS, Hoffman EA, Gierada D, Wenzel S, Cook-Granroth J, Tarsi J, et al. Airway remodeling measured by multidetector CT is increased in severe asthma and correlates with pathology. *Chest* 2008;134(6):1183–91.
17. Barkauskas CE, Chung MI, Fioret B, Gao X, Katsura H, Hogan BL. Lung organoids: current uses and future promise. *Development.* 2017 Mar 15;144(6):986-997.
18. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3546–3556.
19. Bartz H, Buning-Pfaue F, Turkel O, Schauer U. Respiratory syncytial virus induces prostaglandin E2, IL-10 and IL-11 generation in antigen presenting cells. *Clin Exp Immunol.* 2002; 129:438–445.
20. Beers MF, Morrisey EE: The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *J Clin Invest* 2011, 121:2065–2073.
21. Beigelman A, Bacharier BL. The role of early life viral bronchiolitis in the inception of asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* 2013; 13(2): 211-6.

22. Benjamin JT, Smith RJ, Halloran BA, Day TJ, Kelly DR, Prince LS (2007) FGF-10 is decreased in bronchopulmonary dysplasia and suppressed by Toll-like receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(2):L550–558.
23. Bergot AS, Monnet N, Le Tran S, Mittal D, Al-Kouba J, Steptoe RJ, Grimaldeston MA, Frazer IH, Wells JW. HPV16 E7 expression in skin induces TSLP secretion, type 2 ILC infiltration and atopic dermatitis-like lesions. *Immunol Cell Biol.* 2015 Jul;93(6):540-7.
24. Bernard A, Carbonnelle S, Dumont X, Nickmilder M. Infant swimming practice, pulmonary epithelium integrity, and the risk of allergic and respiratory diseases later in childhood. *Pediatrics* 2007; 119:1095–1103.
25. Bernard A, Hermans C, Van Houte G. Transient increase of serum Clara cell protein (CC16) after exposure to smoke. *Occup Environ Med.* 1997 Jan;54(1):63-5.
26. Bisgaard H, Jensen SM, Bonnelykke K. Interaction between asthma and lung function growth in early life. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 1183-9.
27. Biton M¹, Levin A, Slyper M, et al. Epithelial microRNAs regulate gut mucosal immunity via epithelium-T cell crosstalk. *Nat Immunol.* 2011 Mar;12(3):239-46.
28. Blaiss MS, Kaliner MA, Baena-Cagnani CE, Dahl R, Valovirta EJ, Canonica GW. Barriers to asthma treatment in the United States: results from the global asthma physician and patient survey. *World Allergy Organ J.* 2009 Dec;2(12):303-13.
29. Blanco CE. Maturation of fetal breathing activity. *Biol Neonate.* 1994;65(3-4):182-8.
30. Blundell P. The biology of Clara cells – review paper. *Int J Molec Med Adv Sci* 2006; 2: 307-311.
31. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1585–1591.
32. Boita M, Garzaro M, Raimondo L, Riva G, Pecorari G, Landolfo V, Naeq N, Rolla G. Thymic stromal lymphopoietin in respiratory disorders: An update on signalling pathway. *OA Immunology* 2013 May 01;1(1):3.
33. Bracken CP, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2008; 68:7846–7854.
34. Broeckaert FB, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16) characteristics and prospectives lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 469-475.
35. Burgess SL, Lu M, Ma JZ, Naylor C, Donowitz JR, Kirkpatrick BD, Haque R, Petri WA Jr. Inflammatory markers predict episodes of wheezing during the first year of life in Bangladesh. *Respir Med.* 2016 Jan;110:53-7.
36. Burmeister R, Boe IM, Nykjaer A, Jacobsen C, Moestrup SK, Verroust P. A two-receptor pathway for catabolism of Clara cell secretory protein in the kidney. *J Biol Chem* 2001; 276: 13295-13301.
37. Bush A. How Early do Airway Inflammation and Remodeling Occur? *Allergol Int.* 2008; 57: 11-9.
38. Bystrom J, Amin K, Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respiratory Research* 2011; 12:10
39. Cakmak A, Zeyrek D, Atas A, Celik H, Aksoy N, Erel O. Serum prolidase activity and oxidative status in patients with bronchial asthma. *J Clin Lab Anal.* 2009;23(2):132-8.
40. Campbell JD, et al. Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. *J. Exp. Med.* 2009; 206:1535–1547.
41. Carey MA, Card JW, Voltz JW, Arbes SJ, Germolec DR, Korach KS, Zeldin DC. It's all about sex: male-female differences in lung development and disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2007 : 18(8); 308-13.
42. Carneiro-Sampaio M, Moraes-Vasconcelos D, Kokron CM, Jacob CM, Toledo-Barros M, Dorna MB, Watanabe LA, Marinho AK, Castro AP, Pastorino AC, Silva CA, Ferreira MD, Rizzo LV, Kalil JE, Duarte AJ. Primary immunodeficiency diseases in different age groups: a report on 1,008 cases from a single Brazilian reference center. *J Clin Immunol.* 2013 May;33(4):716-24.
43. Castilow EM, Meyerholz DK, Varga SM. IL-13 is required for eosinophil entry into the lung during respiratory syncytial virus vaccine-enhanced disease. *J Immunol* 2008;180: 2376–2384.
44. Castro-Rodriges J, Holberg C, Whright A, and Martinez F. A Clinical Index to Define Risk of Asthma in Young Children with Recurrent Wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 162. pp 1403–1406, 2000

45. Ceteci F, Ceteci S, Zanucco E, Thacur C, El-Nikhely N, Fink L, Seeger W, Savai R, Rappo UR. E-cadherin controls bronchiolar progenitor cells and onset of preneoplastic lesions in mice. *Neoplasia* 2012; 14: 1164-1177.
46. Chang Y-J, et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyperreactivity independent of adaptive immunity. *Nat Immunol* 2011;12:631-638.
47. Chang YS, Ahn SY, Yoo HS, Sung SI, Choi SJ, Oh WI, et al. Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial. *J Pediatr* (2014) 164(5):966.e-72.e.
48. Chao CM, Moiseenko A, Zimmer KP and Bellusci S. Alveologenesis: key cellular players and fibroblast growth factor 10 signaling. *Molecular and Cellular Pediatrics* 2016; (3)17:1-9.
49. Chauhan A, Singh M, Agarwal A, Paul N. Correlation of TSLP, IL-33, and CD4 +CD25 + FOXP3 + T regulatory (Treg) in pediatric asthma. *J Asthma* 2015; 52: 868-72.
50. Chen L-C, Zhang Z, Myers AC, Huang S-K. Cutting edge: altered pulmonary eosinophilic inflammation in mice deficient for Clara cell secretory 10-kDa protein. *J Immunol* 2001; 167(6): 3025-28.
51. Chen Y, Ji LL, Liu TY, et al. Evaluation of gender-related differences in various oxidative stress enzymes in mice. *Chinese J Physiol.* 2011; 54: 385-90.
52. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.*: 2011, 11(7):445-56
53. Chung Y, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* 2011;17:983-988.
54. Clinton C. Development of the Infant Immune Function and the Effects of Breast Milk. *Natural Medicine Journal* 2010 ; 2(8): 1-6.
55. Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res.* 2011; 162(1-2): 80-99.
56. Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol.* 2008;82(5):2040-55.
57. Contoli M, Bousquet J, Fabbri LM, et al. The small airways and distal lung compartment in asthma and COPD: a time for reappraisal. *Allergy* 2010; 65: 141-151.
58. Corren J. Small airways disease in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008; 8: 533-539.
59. Crosby LM and Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298: L715-L731, 2010
60. D'Amato G, Holgate ST, Pawankar R, Ledford DK, Cecchi L, Al-Ahmad M, et al. Meteorological conditions, climate change, new emerging factors and asthma and related allergic disorders. A statement of the World Allergy Organization. *World Allergy Organ J.* 2015 Jul 14;8(1):25. doi: 10.1186/s40413-015-0073-0.
61. Dammann CE, et al. Androgen regulation of signaling pathways in late fetal mouse lung development. *Endocrinology* 2000;141:2923-2929.
62. Danahay, H., Pessotti, A. D., Coote, J., Montgomery, B. E., Xia, D., Wilson, A., Yang, H., Wang, Z., Bevan, L., Thomas, C. et al. Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. *Cell Rep* 2015; 10:239-252.
63. DeKruyff RH, Yu S, Kim HY, Umetsu DT. Innate immunity in the lung regulates the development of asthma. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):235-48.
64. Demehri S, Morimoto M, Holtzman MJ, Kopan R. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol.* 2009 May 19;7(5):e1000067.
65. Derscheid PJ and Ackermann MP. Perinatal Lamb Model of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection. *Viruses* 2012, 4, 2359-2378.
66. Descalzi D, Folli C, Scordamaglia F, Riccio AM, Gamalero C, Canonica GW: Importance of fibroblasts-myofibroblasts in asthma-induced airway remodeling. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2007, 1:237-241.
67. Doershuk CF, et al. Specific airway resistance from the perinatal period into adulthood. Alterations in childhood pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1974;109:452-457.

68. Du MR, Guo PF, Piao HL, Wang SC, Sun C, Jin LP et al. Embryonic Trophoblasts Induce Decidual Regulatory T Cell Differentiation and Maternal–Fetal Tolerance through Thymic Stromal Lymphopoietin Instructing Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 2014, 192: 1502–1511.
69. Duijts L. Fetal and infant origins of asthma. *Eur J Epidemiol* (2012) 27:5–14.
70. Dyer KD, Percopo CM, Fischer ER, Gabryszewski SJ, Rosenberg HF: Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. *Blood* 2009, 114(13):2649-2656.
71. Eglinton BA, Robertson DM, Cummins AG. Phenotype of T cells, their soluble receptor levels, and cytokine profile of human breast milk. *Immunol Cell Biol.* 1994;72(4):306-313.
72. Eisenhauer P, Earle B, Loi R, Sueblinvong V, Goodwin M, Allen GB, Lundblad L, Mazan MR, Hoffman AM, Weiss DJ: Endogenous distal airway progenitor cells, lung mechanics, and disproportionate lobar growth following long-term postpneumonectomy in mice. *Stem Cells* 2013, 31:1330–1339.
73. Erle DJ, Sheppard D. The cell biology of asthma. *J Cell Biol.* 2014 Jun 9;205(5):621-31.
74. Evans C, Williams O, Tuvim M et al. Mucin Is Produced by Clara Cells in the Proximal Airways of Antigen-Challenged Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 382–94.
75. Firth AL, Dargitz CT, Qualls SJ, Menon T, Wright R, Singer O, Gage FM, Khanua A, Verma JM. Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111:E1723-E1730.
76. Fort MM, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001;15:985–995.
77. Frew AJ. Sublingual immunotherapy. *N Engl J Med* 2008;358:2259-64.
78. Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, et al. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2005;115(2):496-506.
79. Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol.* 2002 Jul;161(1):173-82.
80. Gioldassi XM, Papadimitriou H, Mikraki V and Karamanos NK. Clara cell secretory protein: determination of serum levels by an enzyme immunoassay and its importance as an indicator of bronchial asthma in children. *J Pharm Biomed Anal* 2004;34:823.
81. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, et al. Cord blood CD4(1)CD25(1)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood.* 2005;105(2):750-758.
82. Gorski SA¹, Hahn YS, Braciale TJ. Group 2 innate lymphoid cell production of IL-5 is regulated by NKT cells during influenza virus infection. *PLoS Pathog.* 2013 Sep;9(9):e1003615.
83. Grainge CL, Lau LC, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med* 2011;364(21):2006–15.
84. Guerra S, Halonen M, Vasquez MM, Spangenberg A, Stern DA, Morgan WJ, et al. Relation between circulating CC16 concentrations, lung function, and development of chronic obstructive pulmonary disease across the lifespan: a prospective study. *Lancet Respir Med* 2015;3(8):613-20.
85. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, Bacharier LR, et al. characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004 ;114(6):1282-7.
86. Hackett, N. R., Shaykhiev, R., Walters, M. S., Wang, R., Zwick, R. K., Ferris, B., Witover, B., Salit, J. and Crystal, R. G. (2011). The human airway epithelial basal cell transcriptome. *PLoS ONE* 6, e18378
87. Halvorsen R, Jenner A, Hagelin EM, Borres MP. Phadiatop infant in the diagnosis of atopy in children with allergy-like symptoms. *Int J Pediatr.* 2009;2009:460737.
88. Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, Arima K, Wang YH, Voo KS, Cao W and Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J. Immunol* 2010;184: 2999–3007.
89. Hanson LA. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc.* 2007 Aug;66(3):384-96.
90. Hayashi T. Molecular Mechanisms of Metaplasia, Differentiation and Hyperplasia of Goblet Cellin Allergic Asthma. *J Aller Ther* 2012; 3 (3):121.

91. Headley MB, Zhou B, Shih WX, Aye T, Comeau MR, Ziegler SF. TSLP conditions the lung immune environment for the generation of pathogenic innate and antigen-specific adaptive immune responses. *J Immunol.* 2009; 182(3):1641–7.
92. Hermans C, Bernard A. State of the art. Lung epithelium-specific proteins. Characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:646–678.
93. Hirota T, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet* 2011;43:893–896.
94. Holgate ST, Arshad HS, Roberts GC, Howarth PH, Thurner P, Davies DE. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clinical Science* 2010; 118: 439–450.
95. Holgate ST, Davies DE, Powell RM, Howarth PH, Haitchi HM, Holloway JW: Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *Eur Respir J* 2007, 29:793–803.
96. Holgate ST, Roberts G, Arshad HS, Howarth PH, Davies DE. The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 Dec;6(8):655-9.
97. Holt PG, Rowe J, Kusel M, Parsons F, Hollams EM, Bosco A, et al. Toward improved prediction of risk for atopy and asthma among preschoolers: a prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(3): 653-9.
98. Holt PG, Sly PD. Interaction between adaptive and innate immune pathways in the pathogenesis of atopic asthma: operation of a lung:bone marrow axis. *Chest* 2011; 139:1165–1171.
99. Holt PG, Strickland DH, Sly PD. Virus infection and allergy in the development of asthma: what is the connection? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12: 151–157.
100. Holtzman MJ. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. *J Clin Invest.* 2012 Aug;122(8):2741-8.
101. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today.* 1999 ;20(11):528-33.
102. Hung CH, Chen LC, Zhang Z, Chowdhury B, Lee WL, Plunkett B, Chen CH, Myers AC, Huang SK. Regulation of TH2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Sep;114(3):664-70.
103. Ilic N, Velickovic V, Djokic DI, Rankovic N, Kostic G, Petrovic M, et al. Clinical manifestations of atopy in children up to two years of age. *Vojnosanit Pregl* 2011; 68(8): 690-5.
104. Ilic N, Mihailovic N. Serum Clara cell protein and atopic phenotype in children up to 2 years of age. *J Clin Lab Anal.* 2017 Feb 1. doi: 10.1002/jcla.22151.
105. Iliev ID, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 2009;1–31.
106. Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med.* 2012 May 4;18(5):705-15. doi:10.1038/nm.2760.
107. Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005;202: 1213–23.
108. Jacobs J, Fuertes E, Krop E, Spithoven J, Tromp P, Heederik D. Swimming pool attendance and respiratory symptoms and allergies among Dutch children. *Occup Environ Med* 2012; 69: 823–830.
109. Jain, R., Barkauskas, C. E., Takeda, N., Bowie, E. J., Aghajanian, H., Wang, Q., Padmanabhan, A., Manderfield, L. J., Gupta, M., Li, D. et al. . Plasticity of Hopx(+) type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6727.
110. Jakiela B, Brockman-Schneider R, Amineva S, Lee WM, Gern JE Basal cells of differentiated bronchial epithelium are more susceptible to rhinovirus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38; 517–523.
111. Janssen EM, Wauben MH, Nijkamp FP, van EW, van Oosterhout AJ. Immunomodulatory effects of antigen-pulsed macrophages in a murine model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 27:257–264.

112. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*. 1998; 160:3555–3561.
113. Johansson S. CC16 in allergy and allergic inflammation. *PHD thesis, University of Gothenburg*, 2008.
114. Johansson SG, Lundahl J. Asthma, atopy, and IgE: what is the link? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001; 1:89–90.
115. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 May;113(5):832-6.
116. Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol* 2007; 20: 108–119.
117. Johnson TR, Graham BS. Secreted respiratory syncytial virus G glycoprotein induces interleukin-5 (IL-5), IL-13, and eosinophilia by an IL-4-independent mechanism. *J Virol* 1999;73: 8485–8495.
118. Jovanovic D, Ilic N, Miljković-Selimović B et al. *Campylobacter jejuni* infection and IgE sensitization in infant up to two years of age. *Vojnosanit Pregl* 2015; 72 (2): 140-147.
119. Jovicic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic M, Pejnovic N *Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding*. *PLoS ONE* 2015;10(7); e0134089. doi:10.1371/journal.pone.0134089
120. Kalluri R and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest* 2009; 119:1420–1428.
121. Kander MC, Cui Y, Liu Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med* 2017; (21) 5: pp. 1024-32
122. Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGFβ response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell*. 2003; 11:915–926.
123. Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Sep;122(3):617-24.
124. Kelly D, Coutts AG. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc Nutr Soc*. 2000;59:177-185.
125. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE et al. Identification of bronchoalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823–835.
126. Kim CF. Paving the road for lung stem cell biology: bronchioalveolar stem cells and other putative distal lung stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293:L1092–L1098.
127. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2010;11:577–584.
128. Kim JH, Cho T, Moon JH, Kim CR, Oh JW. Serial Changes in Serum Eosinophil-associated Mediators between Atopic and Non-atopic Children after *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014 September;6(5):428-433.
129. Kim S, Shim JJ, Burgel PR, et al. IL-13-induced Clara cell secretory protein expression in airway epithelium: role of EGFR signaling pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L67–L75.
130. Klar J, Blomstrand P, Brunmark C, Badhai J, Hakansson HF, Brange CS, Bergendal B, Dahl N (2011) Fibroblast growth factor 10 haploinsufficiency causes chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Genet* 48(10):705–709.
131. Klose CS and Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nature Immunology* 2016; 7 (17): 765-74.
132. Knipping K, Knippels LMJ, Dupont C, Garssen J. Serum biomarkers for allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2017; 28: 114–123.
133. Koh GC, Shek LP, Goh DY, Van Bever H, Koh DS. Eosinophil cationic protein: is it useful in asthma? A systematic review. *Respir Med*. 2007 Apr;101(4):696-705.
134. Kong W, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor β/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol. Cell. Biol*. 2008; 28:6773–6784.
135. Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ, Roop DR: p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev* 2004, 18:126–131.

136. Krogulska A, Borowiec M, Polakowska E, Dynowski J, Mlynarski W, Wasowska-Królikowska K. *FOXP3, IL-10, and TGF- β genes expression in children with IgE-dependent food allergy. J Clin Immunol. 2011 Apr;31(2):205-15.*
137. Kuhn C, Callaway LAS, Askin FB. *The formation of granules in the bronchiolar Clara cells of rats. II. Enzyme cytochemistry. J Ultrastruc Res 1975; 53: 66-76*
138. Kumar, P. A., Hu, Y., Yamamoto, Y., Hoe, N. B., Wei, T. S., Mu, D., Sun, Y., Joo, L. S., Dagher, R., Zielonka, E. M. et al. *Distal airway stem cells yield alveoli in vitro and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. Cell 2011 147, 525-538.*
139. Kuperman DA, Huang X, Nguyenvu L, et al. *IL-4 receptor signaling in Clara cells is required for allergen-induced mucus production. J Immunol 2005; 175: 3746–3752.*
140. Lacy P, Moqbel R. *Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2001 Feb;1(1):79-84. Review.*
141. Lagerkvist BJ, Bernard A, Blomberg A et al. *Pulmonary Epithelial Integrity in Children: Relationship to Ambient Ozone Exposure and Swimming Pool Attendance. Environ Health Perspect 2004 ; 112: 1768–1771.*
142. Laing IA, de Klerk NH, Turner SW et al. *Cross-sectional and longitudinal association of the secretoglobin 1A1 gene A38G polymorphism with asthma phenotype in the Perth Infant Asthma Follow-up cohort. Clin Exp Allergy 2009; 39(1): 62-71.*
143. Lakind JS, Holgate ST, Ownby DR et al. *A critical review of the use of Clara cell secretory protein (CC16) as a biomarker of acute or chronic pulmonary effects. Biomarkers 2007; 12(5): 445-67.*
144. Lamouille S, Subramanyam D, Belloch R, Derynck R. *Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. Curr. Opin. Cell Biol. 2013; 25:200–207.*
145. Lamouille S, Xu J and Derynck R. *Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 March ; 15(3): 178–196.*
146. Lang JE, Blake KV. *Role of biomarkers in understanding and treating children with asthma: towards personalized care. Pharmacogenomics and Personalized Medicine 2013;6: 73–84*
147. Lee EB, Kim KW, Hong JY, Jee HM, Sohn MH, Kim KE. *Increased serum thymic stromal lymphopoietin in children with atopic dermatitis. Pediatr Allergy Immunol 2010; 21:e457-60*
148. Lee HC, Headley MB, Iseki M, Ikuta K, Ziegler SF. *Cutting edge: Inhibition of NF-kappaB mediated TSLP expression by retinoid X receptor. Cutting Edge J Immunol. 2008; 181:5189–93.*
149. Lee HC, Headley MB, Loo YM, et al. *Thymic stromal lymphopoietin is induced by respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells and promotes a type 2 response to infection. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:1187–1196*
150. Lee JH, Bhang DH, Beede A, Huang TL, Stripp BR, Bloch KD, Wagers AJ, Tseng YH, Ryeom S, Kim CF. *Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis. Cell 2014, 156:440–455.*
151. Lee JY, et al. *Murine thymic stromal lymphopoietin promotes the differentiation of regulatory T cells from thymic CD4(+)CD8(-)CD25(-) naive cells in a dendritic cell-independent manner. Immunol. Cell Biol. 2008; 86:206–213.*
152. Leibel S and Post M. *Endogenous and Exogenous Stem/Progenitor Cells in the Lung and their role in the pathogenesis and treatment of pediatric lung disease. Frontiers in Pediatric 2016; 4: 36.*
153. Leibel S and Post M. *Endogenous and Exogenous Stem/Progenitor Cells in the Lung and their role in the pathogenesis and treatment of pediatric lung disease. Frontiers in Pediatric 2016; 4: 36.*
154. Levy B, Noel PJ, Freemer MM, Cloutier MM, Georas SN, Jarjour NN et al. *Future Research Directions in Asthma: An NHLBI Working Group Report. Am J Respir Crit Care Med, 2015; 192(11):1366-72*
155. Levy O. *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. Nat Rev Immunol. 2007;7:379-390.*
156. Levy, O.; Martin, S.; Eichenwald, E.; Ganz, T.; Valore, E.; Carroll, S.F.; Lee, K.; Goldmann, D.; Thorne, G.M. *Impaired innate immunity in the newborn: Newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. Pediatrics 1999, 104, 1327–1333.*
157. Lewis DB, Wilson CB. *Developmental immunology and role of host defenses in the fetal and neonatal susceptibility to infection. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editors.*

- Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 7th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 80-191.
158. Lewis DB. Maturing of the fetal and neonatal immune system. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT at al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4th ed, Elsevier Saunders, 2013, 405-414 (32).
159. Lewis DE, Harriman GR, Blutt SE. Organisation of immune system. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT at al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4th ed, Elsevier Saunders, 2013, 16-34
160. Lewis DE, Harriman GR, Blutt SE. Regulation of hematopoietic and lymphopoietic cell growth and differentiation. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT at al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4th ed, Elsevier Saunders, 2013, 17-19.
161. Liu AH, Covar RA, Spahn JD, Leung DYM. Childhood asthma. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Ed 18th, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
162. Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 238-244.
163. Lloyd CM, Saglani S. Asthma and allergy: the emerging epithelium. *Nat Med* 16: 273-274, 2010.
164. Lou W, Wang C, Wang Y, Han D, Zhang L. Responses of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) and IL-10-secreting type 1 T regulatory cells to cluster-specific immunotherapy for allergic rhinitis in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23(2):140-9. .
165. Macaubas C, de Klerk H, Holt B J, Wee C, Kendall G, Firth M et al. Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *Lancet*. 2003; 362:1192-97.
166. Maeda T, Kitazoe M, Tada H, de Llorens R, Salomon DS, Ueda M, Yamada H, Seno M: Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein. *Eur J Biochem* 2002, 269(1):307-316.
167. Maherali N, Hochedlinger K. TGF β signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr. Biol*. 2009; 19:1718-1723.
168. Makinde T¹, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol*. 2007 Jul;85(5):348-56
169. Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Singh G, Katyal SL, Mukherjee AB. Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *J Biol Chem*. 1993 Sep 25;268(27):20343-51.
170. Manuyakorn W, Kamchaisatian W, Atamasirikul K, Sasisakulporn C, Direkwattanachai C, Benjaponpitak S. Serum TGF-beta1 in atopic asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2008 26(4):185-9.
171. March TH, et al. Modulators of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in A/J mice. *Toxicol Sci* 2006;92:545-559.
172. Martineau HM, Dagleish MP, Cousens C, Underwood C, Forbes V, Palmarini M, Griffiths DJ: Cellular differentiation and proliferation in the ovine lung during gestation and early postnatal development. *J Comp Pathol* 2013, 149(2-3):225-267.
173. Martinez F. Development of Wheezing Disorders and Asthma in Preschool Children. *Pediatr* 2002; 109: 362-67.
174. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.
175. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA dissemination committee report. *Allergy*. 2004;59(5):469-478.
176. Massaro D, Massaro GD. Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimensions: alveolar sexual dimorphism in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L866-870.
177. Matangasombut P, Pichavant M, Dekruyff RH, Umetsu DT. Natural killer T cells and the regulation of asthma. *Mucosal Immunol* 2009;2:383-392.
178. Mazzucchelli R, Hixon JA, Spolski R, Chen X, Li WQ, Hall VL, Willette-Brown J, Hurwitz AA, Leonard WJ, Durum SK. Development of regulatory T cells requires IL-7Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3283-92
179. McKenzie JA, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol*. 2007 Oct;213(1):221-8.

180. Miazgowicz MM, Elliott MS, Debley JS, Ziegler SF. Respiratory syncytial virus induces functional thymic stromal lymphopoietin receptor in airway epithelial cells. *Journal of Inflammation Research* 2013;6:53–61
181. Miyata M, Hatsushika K, Ando T, Shimokawa N, Ohnuma Y, Katoh R. Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis. *Eur J Immunol* 2008 Jun;38(6):1487-92.
182. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 2010;363:1211–1221.
183. Moorman JE, Rudd RA, Johnson CA, King M, Minor P, Bailey C, Scalia MR, Akinbami LJ; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National surveillance for asthma--United States, 1980-2004. *MMWR Surveill Summ.* 2007 Oct 19;56(8):1-54.
184. Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL et al. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1253-8.
185. Morshed M, Yousefi S, Stöckle C, Simon HU, Simon D. Thymic stromal lymphopoietin stimulates the formation of eosinophil extracellular traps. *Allergy.* 2012 Sep;67(9):1127-37.
186. Muenchhoff M and Goulder PJR. Sex Differences in Pediatric Infectious Diseases. *The Journal of Infectious Diseases* 2014;209(S3):S120–6
187. Nakao A. The role and potential use of oral transforming growth factor-beta in the prevention of infant allergy. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(5):725-730.
188. Navarro S, Aleu J, Jimenez M, Boix E, Cuchillo CM, Nogues MV: The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(2):324-337.
189. Nguyen KD, Vanichsarn C, Nadeau KC. TSLP directly impairs pulmonary Treg function: association with aberrant tolerogenic immunity in asthmatic airway. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010;6:4
190. Nomori H, Kobayashi R, Iga R, Fuyuno G, Morinaga S, Torikata C. Clinicopathological examination of the relation between Clara cells and smoking. *Kyabu Geka* 1994; 47: 888-911.
191. Nussbaum JC, et al. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 2013;502:245–248.
192. Nyeng P, Norgaard GA, Kobberup S, Jensen J: FGF10 maintains distal lung bud epithelium and excessive signaling leads to progenitor state arrest, distalization, and goblet cell metaplasia. *BMC Dev Biol* 2008, 8:2.
193. O'Shea JJ, Gadina M, Siegel R. Cytokines and cytokine receptors. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT et al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4th ed, Elsevier Saunders, 2013, 16-34.
194. Oddy WH, Halonen M, Martinez FD, Lohman IC, Stern DA, Kurzius-Spencer M, et al. TGF- β in human milk is associated with wheeze in infancy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 112:723–8.
195. Oddy WH. Breastfeeding and asthma in children: findings from a West Australian study. *Breastfeed Rev.* 2000;8(1):5-11.
196. Okabayashi T, Kojima T, Masaki T, Yokota S, Imaizumi T, et al. Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res* 2011;160: 360–366.
197. Oliver JR, Kushwah R, Wu J, Cutz E, Yeger H, Waddell TK and Hu J. Gender differences in pulmonary regenerative response to naphthalene-induced bronchiolar epithelial cell injury. *Cell Prolif.* 2009; 42(5): 672–687.
198. Ott H, Stanzel S, Ocklenburg C, Merk H, Baron JM, Lehmann S. Total serum IgE as a parameter to differentiate between intrinsic and extrinsic atopic dermatitis in children. *Acta Derm Venereol* 2009; 89(3): 257-61.
199. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science.* 2005 Mar 11;307(5715):1603-9.

200. Palkowetz KH, Royer CL, Garofalo R, Rudloff HE, Schmalstieg Jr FC, Goldman AS. Production of interleukin-6 and interleukin-8 by human mammary gland epithelial cells. *J Reprod Immunol.* 1994;26(1):57-64
201. Pardo-Saganta, A., Law, B. M., Tata, P. R., Villoria, J., Saez, B., Mou, H., Zhao, R. and Rajagopal, J. Injury induces direct lineage segregation of functionally distinct airway basal stem/progenitor cell subpopulations. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 184-197.
202. Patrone C, et al. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Mol Cell Biol* 2003;23:8542–8552.
203. Pérez-Machado MA, Ashwood P, Thomson MA, Latcham F, Sim R, Walker-Smith JA, Murch SH. Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur J Immunol.* 2003 Aug;33(8):2307-15.
204. Perl AK, Riethmacher D, and Whitsett J. Conditional Depletion of Airway Progenitor Cells Induces Peribronchiolar Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 511–521.
205. Persson BD, Jaffe AB, Fearn R, Danahay H. Respiratory Syncytial Virus Can Infect Basal Cells and Alter Human Airway Epithelial Differentiation. *PLoS ONE* 2014; 9(7): e102368
206. Plopper CG, Suverkropp C, Morin D, Nishio S, Buckpitt A. Relationship of cytochrome P-450 activity to Clara cell cytotoxicity. I Histopathologic comparison of the respiratory tract of mice, rats and hamsters after parenteral administration of naphthalene. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 261:353–363
207. Pociask DA, Scheller EV, Mandalapu S, McHugh KJ, Enelow RI, Fattman CL, Kolls JK, Alcorn JF. IL-22 is essential for lung epithelial repair following influenza infection. *Am J Pathol.* 2013 Apr;182(4):1286-96
208. Poorisrisak P, Halkjaer LB, Thomsen SF, et al. Causal direction between respiratory syncytial virus bronchiolitis and asthma studied in monozygotic twins. *Chest* 2010; 138:338–344.
209. Prendergast AJ, Klenerman P, Goulder PJ. The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:636–48.
210. Qing, G.; Rajaraman, K.; Bortolussi, R. Diminished priming of neonatal polymorphonuclear leukocytes by lipopolysaccharide is associated with reduced CD14 expression. *Infect. Immun.* 1995, 63, 248–252.
211. Ramasamy SK, Mailleux AA, Gupte VV, Mata F, Sala FG, Veltmaat JM, Del Moral PM, De Langhe S, Parsa S, Kelly LK, Kelly R, Shia W, Keshet E, Mino P, Warburton D, Bellusci S: Fgf10 dosage is critical for the amplification of epithelial cell progenitors and for the formation of multiple mesenchymal lineages during lung development. *Dev Biol* 2007, 307:237–247.
212. Rava M, Tares L, Lavi I, Barreiro E, Zock JP, Ferrer A et al. Serum levels of Clara cell secretory protein, asthma, and lung function in the adult general population. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132(1):230-2.
213. Rawlins EL, Hogan BL. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development.* 2006; 133:2455–2465.
214. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y et al. The role of Scgb1a11 Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar epithelium. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 525–534.
215. Ree R, Hummelshøj L, Plantinga M, Poulsen LK and Swindle E. Allergic sensitization: host-immune fact. *Clinical and Translational Allergy* 2014; 4: 12.
216. Relić T, Ilić N, Kostić G, Jovanović D, Tambur Z, Lazarević I. Respiratory syncytial virus infection and bronchial hyperreactivity in children up to two years of age in correlation with atopy. *Vojnosanit Pregl.* 2016 Jan;73(1):59-65.
217. Remes S, Korppi M, Remes K, Savolainen K, Mononen I, Pekkanen J. Serum eosinophil cationic protein (ECP) and eosinophil protein X (EPX) in childhood asthma: the influence of atopy. *Pediatr Pulmonol.* 1998 Mar;25(3):167-74.
218. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol.* 2001 Aug;54(8):577-89.
219. Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol.* 2000; 156:269–278.
220. Roan F¹, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H, Ziegler SF. The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J Leukoc Biol.* 2012 Jun;91(6):877-86.

221. Rochman Y, Leonard WJ. The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol* 2008 Dec;1817699-705.
222. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BL: Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:12771–12775.
223. Rock, J. R., Gao, X., Xue, Y., Randell, S. H., Kong, Y.-Y. and Hogan, B. L. M. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 8Č 639-648.
224. Rook GA, Raison CL, Lowry CA. Microbial 'old friends', immunoregulation and socioeconomic status. *Clin Exp Immunol.* 2014;177(1):1-12.
225. Rosen, C., Shezen, E., Aronovich, A., Kliensky, Y. Z., Yaakov, Y., Assayag, M., Biton, I. E., Tal, O., Shakhhar, G., Ben-Hur, H. et al. Preconditioning allows engraftment of mouse and human embryonic lung cells, enabling lung repair in mice. *Nat. Med.* 2015; 21: 869-879.
226. Rosenberg HF, Dyer KD, Domachowske JB. Respiratory viruses and eosinophils: exploring the connections. *Antiviral Res.* 2009 Jul;83(1):1-9.
227. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Oct;21(5):331-44.
228. Saglani S, Malmström K, Pelkonen AS et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(7): 722-7.
229. Scheerlinck, J.P.; Snibson, K.J.; Bowles, V.M.; Sutton, P. Biomedical applications of sheep models: From asthma to vaccines. *Trends Biotechnol.* 2008, 26, 259–266.
230. Shaykhiiev R., Zuo, W.-L., Chao, I., Fukui, T., Witover, B., Brekman, A. and Crystal, R. G. (2013). EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110,12102-12107
231. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Imada A, Hirasawa M, Yamada T et al. Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:930.
232. Shiyu S, Zhiyu L, Mao Y et al. Polydatin up-regulates clara cell secretory protein to suppress phospholipase A2 of lung induced by LPS in vivo and in vitro. *BMC Cell Biology* 2011; 12 (31): 2-13.
233. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1501-7.
234. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. *Respirology.* 2006;11(1):54–61.
235. Singh AM, Moore PE, Gern JE, Lemanske RF Jr, Hartert TV. Bronchiolitis to asthma: a review and call for studies of gene-virus interactions in asthma causation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 175:108–119.
236. Siracusa MC, Saenz SA, Hill DA, et al. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature* 2011; 477: 229–33.
237. Skovbjerg S, Martner A, Hynsjö L, Hessle C, Olsen I, Dewhirst FE, Tham W, Wold AE. Gram-positive and gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic relatedness. *J Interferon Cytokine Res.* 2010 Jan;30(1):23-32.
238. Sly PD, Boner AL, Bjorksten B et al. Early identification of children likely to develop persistent asthma: atopy is an integral component of the high risk phenotype. *Lancet.* 2008 September 20; 372(9643): 1100–1106
239. Smith MK, Koch PJ, Reynolds SD. Direct and indirect roles for β -catenin in facultative basal progenitor cell differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* 2012; 302: 580-594.
240. Snyder JC, Reynolds SD, Hollingsworth JW, Li Z, Kaminski N, Stripp BR. Clara cells attenuate the inflammatory response through regulation of macrophage behavior. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Feb;42(2):161-71.
241. Sonar SS, Ehmke M, Marsh LM, Dietze J, Dudda JC, Conrad ML, Renz H and Nockher WA. Clara cells drive eosinophil accumulation in allergic asthma. *Eur Respir J* 2012; 39: 429–438

242. Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen MH, Chuang PT: Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:17531–17536.
243. Sonnenschein-van der Voort AM, Jaddoe VW, Raat H, Moll HA, Hofman A, de Jongste JC, et al. Fetal and Infant Growth and Asthma Symptoms in Preschool Children. The Generation R Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012. doi:10.1164/rccm.201107-1266OC.
244. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*. 2002; 3:673–680.
245. Spencer LA, Szela CT, Perez SA, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL, Weller PF. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol*. 2009 Jan;85(1):117-23.
246. Stavnezer J, Kang J. The surprising discovery that TGF beta specifically induces the IgA class switch. *J. Immunol*. 2009; 182:5–7.
247. Stelck RL, Baker GL, Sutherland KM, Van Winkle LS. Estrous cycle alters naphthalene metabolism in female mouse airways. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33:1597–1602.
248. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989; 299:1259–1260.
249. Stripp BR, Reynolds SD. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proc Am Thorac Soc*. 2008; 5:328–333
250. Subramanyam D, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature Biotech*. 2011; 29:443–448..
251. Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, Bernstein IM, Suratt BT, Spees JL, Weiss DJ. Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Apr 1;177(7):701-11. Epub 2007 Dec 6.
252. Swamy M, Jamora C, Havran W and Hayday A. Epithelial decision-makers : in search of the “epimmunome”. *Nat Immunol*. 2010 August ; 11(8): 656–665.
253. Szeffler SJ, Chmiel JF, Fitzpatrick AM et al. Asthma across the ages: knowledge gaps in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(1):3-13.
254. Tadokoro, T., Wang, Y., Barak, L. S., Bai, Y., Randell, S. H. and Hogan, B. L. M. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014; 111: E3641-E3649.
255. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int*. 2007 Dec;56(4):331-40
256. Takabayshi K, Corr M, Hayashi T, Redecke V, Beck L, Guiney D, Sheppard D, Raz E. Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity*. 2006 Apr;24(4):475-87.
257. Takai T. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol Int*. 2012 Mar;61(1):3-17.
258. Tanaka J, Watanabe N, Kido M, Saga K, Akamatsu T, Nishio A, Chiba T. Human TSLP and TLR3 ligands promote differentiation of Th17 cells with a central memory phenotype under Th2-polarizing conditions. *Clin Exp Allergy*. 2009 Jan;39(1):89-100.
259. Tariq SM, Matthews SM, Hakim EA, Stevens M, Arshad SH, Hide DW. The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(5): 587–93.
260. Tata, P. R. and Rajagopal, J. (2017). Plasticity in the lung: making and breaking cell identity. *Development* 144, 755-766.
261. Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Martinez FD. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(4): 661-75.
262. Thomsen SF, van der Sluis S, Stensballe LG, et al. Exploring the association between severe respiratory syncytial virus infection and asthma: a registry-based twin study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:1091–1097.
263. Thurlbeck WM. Postnatal human lung growth. *Thorax* 1982;37:564–571.
264. Tilburgs T, Scherjon SA, and Claas FH. Major histocompatibility complex (MHC)-mediated immune regulation of decidual leukocytes at the fetal-maternal interface. *J. Reprod. Immunol* 2010;85: 58–62.

265. Tregoning JS, 2010 Tregoning JS, Schwarze J. *Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology*. Clin. Microbiol. Rev. 2010; vol.(23): 74-98.
266. Tsao PN, Vasconcelos M, Izvolsky KI, Qian J, Lu J, Cardoso WV: Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development* 2009, 136:2297–2307
267. Tufvesson E, Svensson H, Ankerst J, Bjermer L. Increase of club cell (Clara) protein (CC16) in plasma and urine after exercise challenge in asthmatics and healthy controls, and correlations to exhaled breath temperature and exhaled nitric oxide. *Respir Med* 2013;107(11):1675-81.
268. University of Fribourg. *Human embryology. Phases of lung development*. Online course Swiss Virtual Camus, modul 18; last revision 2008. www.embryology.ch
269. Van Bever HP, Nagarajan S, Shek LP, Lee B-W. OPINION: Primary prevention of allergy – Will it soon become a reality? *Pediatr Allergy Immunol* 2016; 27; 6–12.
270. van der Gugten A, Korte K, van der Ent K, Uiterwaal C, Verheij T. Small airway caliber is the most important contributor of wheezing in healthy unselected newborns. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(4):553.
271. Vijverberg SJH, Hilvering B, Raaijmakers JAM, Lammers JWJ, Maitland-van der Zee AH, Koenderman L. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. *Biologics: Targets and Therapy* 2013; 7: 199–210.
272. Voehringer D, Shinkai K, Locksley RM. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity* 2004;20:267–277.
273. Volarevic V, Ljubic V, Stojkovic P, Lukic A, Arsenijevic N and Stojkovic M. Human stem cell research and regenerative medicine—present and future. *British Medical Bulletin* 2011; 99: 155–168.
274. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic M, Stojkovic M, Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Treatment of the Complications of Diabetes Mellitus. *Stem Cells* 2011;29:5–10
275. Volckaert T, Campbell A, De Langhe S: c-Myc regulates proliferation and Fgf10 expression in airway smooth muscle after airway epithelial injury in mouse. *PLoS One* 2013, 8:e71426.
276. Volckaert T and De Langhe S. Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2014, 7:8
277. Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr*. 2010;156(2 Suppl):S3-7.
278. Wang F, He XY, Baines KJ, et al. Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. *Eur Respir J*. 2011;38(3): 567–574.
279. Wang J, Sampson HA. Food allergy. *J Clin Invest*. 2011; 121:827–835.
280. Wang Y, Bai C, Li K, Adler KB, Wang X. Role of airway epithelial cells in development of asthma and allergic rhinitis. *Respir Med* 2008; 102: 949-955.
281. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, Waal-Malefyt R, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol*. 2004; 5:426–34.
282. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, and Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005; 436: 1181–85.
283. Watson, J. K., Rulands, S., Wilkinson, A. C., Wuidart, A., Ousset, M., Van Keymeulen, A., Göttgens, B., Blanpain, C., Simons, B. D. and Rawlins, E. L. (2015). Clonal dynamics reveal two distinct populations of basal cells in slowturnover airway epithelium. *Cell Rep*. 12, 90-101
284. Watts KD and Goodman DM. Wheezing in infants: Bronchiolitis In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Ed 18th, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
285. Whitsett, J. A. and Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol*. 16, 27-35.
286. Wilhelm C, et al. An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat Immunol* 2011;12:1071–1077.
287. Witherden DA, Verdino P, Rieder SE, Garijo O, Mills RE, Teyton L, Fischer WH, Wilson IA, Havran WL. The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gamma delta T cell activation. *Science*. 2010 Sep 3;329(5996):1205-10.

288. Wong AP, Keating A, Lu WY, Duchesneau P, Wang X, Sacher A, Hu J, Waddell TK. Identification of a bone marrow-derived epithelial-like population capable of repopulating injured mouse airway epithelium. *J Clin Invest* 119: 336–348, 2009.
289. Wong AP, Keating A, Waddell TK. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytherapy*. 2009;11(6):676-87.
290. Wu P, Dupont WD, Griffin MR, et al. Evidence of a causal role of winter virus infection during infancy in early childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:1123–1129.
291. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4:583–594.
292. Xu J, Woods CR, Mora AL, Joodi R, Brigham KL, Iyer S, Rojas M. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Jul;293(1):L131-41.
293. Yamada A, Sheikh F, Niimi T, et al. Induction of uteroglobin-related protein 2 (Ugrp2) gene expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 2005; 175: 5708–5715.
294. Yang KD, Ou CY, Chang JC et al. Infant frequent wheezing correlated to Clara cell protein 10 (CC10) polymorphism and concentration, but not allergy sensitization, in a perinatal cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(4): 842-8.
295. Yao XL, Ikezono T, Cowan M, Logun C, Angus CW and Shelhamer JH. Interferon-gamma stimulates human Clara cell secretory protein production by human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:L864.
296. Yao XL, Levine SJ, Cowan MJ, Logun C and Shelhamer JH. Tumor necrosis factor- α stimulates human Clara cell secretory protein production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:629.
297. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Cousins D, Zhang G, et al. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol.* 2008; 181:2790–8.
298. Zhang J, et al. miR-30 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 417:1100–1105.
299. Zhao G, Lin X, Zhou M, Zhao J. Association between CC10 +38A/G polymorphism and asthma risk: A meta-analysis. *Pak J Med Sci* 2013; 29(6): 1439-43.
300. Zheng D, Limmon GV, Yin L, Leung NH, Yu H, Chow VT, Chen J: Regeneration of alveolar type I and II cells from Scgb1a1-expressing cells following severe pulmonary damage induced by bleomycin and influenza. *PLoS One* 2012, 7:e48451
301. Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Tao QM, Zhu JH, et al. Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Pediatr Transplant* (2008) 12(6):650–5.
302. Ziegler SF. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Curr Opin Immunol.* 2010 Dec;22(6):795-9.
303. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature.* 2012;484(7395):514-8.

8. ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА**А**

A431 – *Cell Line human squamous carcinoma* - ћелијска линија хуманог карцинома епидермиса
AP-1 – Activating protein-1 - Транскрипторни фактор активирајући протеин 1 учествује у више сигналних путева који регулишу пролиферацију и преживљавање ћелије
API - Asthma predictive index – Индекс којим се предвиђа ризик од развоја астме
Arg (+); Gly (0); Asp (-) – трипептид аргинин-глицин-аспартична киселина који смањује миграцију прогенитора током оштећења ткива

В

B лимфоцити – Б лимфоцити који код човека сазревају у костној сржи, а код птица у *Bursa fabricii*, па отуда и скраћеница води порекло.
B – коефицијент вероватноће у логистичкој регресији
BADJ-Bronchoalveolar duct junction – регион који повезује бронхиоле и алвеоларне канале
BAFF - B-cell activating factor - Фактор активације Б-ћелија
Bcl-2 - B-cell lymphoma 2 – протеин који регулише апоптозу
BEAS-2B – Cell line human bronchial epithelial cells - Ћелијска култура хуманих епителних ћелија бронхија
beta – Стандардизовани коефицијент независне варијабле у линеарној регресији који се користи за израчунавање промене зависне варијабле
БХР – бронхијална хиперреактивност
БАЛ – бронхоалвеоларни лават (испирак)

С

C5a – Компонента комплемента 5а
CAR – Coxsackievirus and adenovirus receptor - Рецептор за Coxsackie вирус и аденовирус
CC16 – Протеин кога секретују Клара ћелије величине 16 килодалтона
CCSP - Club cell secretory protein – Протеин кога секретују кубичне (Клара) ћелије
CD – Cluster of differentiation - Маркер диференцијације ћелије
CI 95% - Confidence interval - Интервал поузданости (за вероватноћу тачности налаза на нивоу 95%)
c-Kit - CD117- Рецептор за стем ћелијски фактор
CCL – хемокини са два узастопна цистеина на крају протеина са аминок-групом од значаја у кретању моноцита, NK ћелија и дендритских ћелија
CXCL – хемокини са аминокиселином X између два цистеина на крају протеина са аминок-групом од значаја у кретању неутрофила и лимфоцита
CCR – Рецептор за CC хемокине
SpG – региони ДНК у којима су цитозин и гуанин у 5→3 правцу линеарно одвојени фосфатом и представљају стартне секвенце гена
CTL – cytotoxic T cell - цитотоксични Т лимфоцит

Д

d – коефицијент јачине везе у т тестовима
df - Degrees of freedom – Степени слободе
DNK - Deoxyribonucleic acid - Дезоксирибонуклеинска киселина (ДНК)
Дћ - *Dendritic cell* - Дендритична ћелија

Е

ECP – Eosinophil cationic protein – Еозинофилни катјонски протеин
EGF – Epidermal growth factor – Епидермални фактор раста
ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay - Имуни тест обележен ензимом
EMTU- Epithelial- mesenchymal trophic unit епително-мезенхимна трофична јединица

Exp(B) – Количник вероватноће промене зависне варијабле услед утицаја независне варијабле у логистичкој регресији

F

F – коефицијент факторског оптерећења варијабле унутар главне компоненте (фактора)

F – вредност која дефинише одступање збирова квадрата резултата од њихове средње вредности при одређеном броју степени слободе и броју случајева укључених у модел линеарне регресије

f^2 – коефицијент јачине везе у тестовима линеарне регресије

FasL – тип 2 трансмембранских протеина из TNF фамилије чије везивање за рецептор изазива апоптозу ћелије

FcεR1 – Високоафинитетни рецептор за IgE

FGF10 - *Fibroblast growth factor 10* - Фактор раста фибробласта 10

FGFR2b - *Fibroblast growth factor receptor 2* - рецептор за фибробластни фактор раста 2б

Fn - *Fibronectin* – Фибронектин

FoxP3 - *forkhead box P3* – транскрипторни фактор од значаја у диференцијацији регулаторних Т ћелија

G

GATA3 – транскрипторни фактор који регулише TH2 диференцијацију

GM-CSF – Фактор стимулације гранулоцитно моноцитних колонија у току хематопоезе

GTP – Гуанозин-три-фосфат

H

HBEC - *Human bronchial epithelial cells* – култура хуманих ћелија бронхијалног епитела

HCl – Хлоро-водонична киселина

ХЛА – Хумани леукоцитни антиген

HL-60 – *Cell Line human promyelocytic leukemia* - ћелијска култура хумане акутне мијелоидне леукемије у којој промијелобласти диференцирају у гранулоцитну и моноцитно-макрофагну линију

HeLa – *Cell Line human epitheloid cervix carcinoma* - хумана ћелијска култура карцинома грлића материце

HIF1α - *hypoxia-inducible factor 1α* - фактор индукован хипоксијом

H_2O_2 – Водоник - пероксид

ХОБП – Хронична опструктивна болест плућа

χ^2 тест – статистички тест анализе разлике у учесталости

I

Id2 - *Inhibitor of differentiation 2* – Инхибитор диференцијације 2

IFN γ – *Interferon gamma* - Гама интерферон

Ig - *Immunoglobulin* - Имуноглобулин

IgE - *Immunoglobulin classE* - Имуноглобулин класе Е

IgA – *Immunoglobulin classA* - Имуноглобулин класе А

IgG – *Immunoglobulin classG* - Имуноглобулин класе Г

IgM – *Immunoglobulin classM* - Имуноглобулин класе М

IL - *Interleukin* - Интерлеукин

$IL-4^{High}IL-5^{Low}$ – велика експресија интерлеукина 4 и мала експресија интерлеукина 5

ILC - *innate lymphoid cells, nuocytes* – лимфоидне ћелије урођеног имунитета, нуоцити

iNKT – *Invariante natural kiler T cell* - Ћелије са неваријабилним Т ћелијским рецептором које имају карактеристике ћелија природних убица

IQR – *Interquartial range* – Распон концентрација између квартално подељених вредности концентрација унутар испитиване категорије

IRF-3 - *Interferon regulatory factor 3* - Регулаторни фактор интерферона 3

ИЗЈЗ - Институт за јавно здравље

J

JAML - Junctional adhesion molecule-like – Молекул међућелијске везе сличан адхезивном молекулу

JAK - Janus Kinase- интрацелуларни преносилац сигнала

К

K562 – Human erythroleukemic cells - хумана ћелијска линија хроничне мијелоидне леукемије у бластној кризи која сарджи прекурсоре еритроцита, гранулоцита и моноцита, који се лако убијају НК ћелијама

КЦ – Клинички центар

kDa – килодалтон – Јединица величине протеина

КМО - *Kaiser-Meyer-Olkin* коефицијент адекватности узорка у факторској анализи

Krt5 – Кератин 5 маркер базалних ћелија респираторних епитела

Л

LPS- Lipopolysaccharide – ЛПС- Липополисахарид

LTB₄ – Леукотријен В 4

LTC₄ – Леукотријен С 4

М

mTORC - mammalian TOR complex

MAP - Mitogen Activated Protein - Протеин активиран митогеном

MBP – Major Basic Protein – Главни базични протеин

Md – Медијана

miRNA – микро рибонуклеинске киселине

ml - Милилитар

μm - Micrometer - Микрометар

MMP - металопроотеиназе

MUC5 - Mucin 5 маркер пехарастих секреторних, муцин продукујућих ћелија

mRNA – Messenger ribonucleic acid – информациона рибонуклеинска киселина

Н

n - Број испитаника

Nth – перцентилна вредност концентрација

NADP - Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NaOH – Натријум- хидроксид

NEB – Neuroendocrine body - неуроендокрино телашце

ng – нано-грам

NFκB - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells - Нуклеарни фактор измене лаког ланца капа у активисаним Б ћелијама

NLR - Nod Like Receptors – Рецептори сличанолигомеризућем домену

NK – Natural killer cell – Ћелије природне убице

Nod2 – Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2- интрацелуларни рецептор за препознавање мурамил-ди-пептида из бактерија

Notch - Neurogenic locus notch homolog protein – трансмембрански протеин од значаја у ембриогенези

Nox - NADPH oxidase – оксидазе које учествују у стварању супероксида и водоник пероксида

NS – неструктурални протеини *RSV*

О

OR- odds ratio – Показатељ релативног ризика

OX40 - OX40L – TNFR суперфамилија костимулатора од значаја у активацији Т ћелија

Р

p - Probability - Вероватноћа грешке

P450 – цитохром оксидаза - хемопротени који учествује у метаболизму хормона, витамина и ксенобиотика

PAF – *Platelet Activation Factor* – Фактор активације тромбоцита

PAR-2 - *Proteinase activated receptor 2* – протеиназама активисани рецептор 2

PCA – *Principal component analysis* – Анализа главних компонената (факторска анализа)

PDGF – *Platelet derived growth factor* – Фактор раста ослобођен из тромбоцита

Pdgfra+ platelet-derived growth factor receptor- α – сигнални пут од значаја у фази алвеолизације плућа

Phadiatop infant – Вишеструки тест за детекцију специфичних имуноглобулина класе Е

pg – пико-грам

PI3K – фосфатидил-инозитол 3 киназа

4PL- Software evaluate – Софтвер за квантификацију резултата на основу четири тачке

Q

q – коефицијент јачине везе у тестовима корелације

R

r - *Spearman's rho* - Коефицијент корелације

r^2 – коефицијент удела независне варијабле у промени зависне варијабле

range – распон између најмање и највеће концентрације у испитиваној категорији

RAG1, RAG2 - *recombination-activating genes 1,2* –активатори рекомбинације Б и Т ћелијских рецептора

RhoA –мале *GTP*-азе које припадају *Ras* фамилији од значаја у реорганизацији цитоскелета

РНК - Рибонуклеинска киселина

ROC curve - *Receiver operating characteristic curve* – израчунава могућност дискриминације бинарно класификованог система

ROR γ T - *Retinoid-Acid Receptor-related Orphan Receptor gamma* - Рецептор за ретиноичну киселину који припада породици нуклеарних рецептора, сличан орфан рецептору гама т

RSV – *Respiratory syncytial virus* - Респираторни вирус који изазива стварање синцицијума ћелија

RXR - *retinoid X receptor* – рецептор ретиноида X

S

SE – *Standard Error* - Стандардна грешка

Sig. - Вероватноћа грешке вредности *p*

Sftpc – ген који кодира сурфактант протеин Ц

Scgb – *Secretoglobin* – Синоним за протеин кога секретују Клара ћелије

SMAD - *products of the Drosophila gene 'mothers against decapentaplegic' (Mad) and the C. elegans gene Sma* – сигнални путеви и транскрипциони модулатори од значаја за *TGF β* сигнализирање

SNAIL1 - транскрипторни фактор од значаја у епително-мезенхимној транзицији

Sox - *Sex determining region Y box* – полом детерминисан регион Y

STAT4 – *Signal Transducer and Activator of Transcription protein family* – Преноцилац сигнала и активатор породице протеина транскрипције

SZO (C3O) - Светска здравствена организација

SAD (CAD) - Сједињене Америчке Државе

T

TAC1-Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor – Молекул који се понаша као трансмембрански активатор и који реагује са модулатором калцијума и лигандом за циклофилин

T-bet – *T cell transcription factor* - Т ћелијски транскрипторни фактор

TCR $\gamma\delta^+$ - *T-cell receptor $\gamma\delta^+$* -Т ћелијски рецептор који се састоји из гама и делта ланца

TGF β - *Transforming growth factor β* - Фактор трансформације раста бета

TH1 - *T-helper 1* - Субпопулација ефекторских помоћничких Т лимфоцита типа 1

TH2 - *T-helper 2* - Субпопулација ефекторских помоћничких Т лимфоцита типа 2

TH17 - *T-helper 17*- Субпопулација ефекторских помоћничких Т лимфоцита типа 17

Trp63 - Маркер базалних ћелија респираторних епитела

TLR - *Toll-like receptor* - Рецептор сличан протеину кодираном Toll - геном који је идентификован код винске мушице *Drosophila*

ТМБ – тетра-метил-бензидин

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor alpha* - Фактор некрозе тумора алфа

Treg – *Regulatory T cell* – Регулаторне Т ћелије

TSLP - *Tymic stromal limphopoetin* - Лимфопоетин строме тимуса

TSLPR - *Tymic stromal limphopoetin receptor* – Рецептор за лимфопоетин строме тимуса

TWIST1 - транскрипторни фактор од значаја у епително-мезенхимној транзицији

U

U- *units/ml* - јединице/ml

V

VLA-4- *Very Late Antigen-4* - интегрин $\alpha 4\beta 1$

W

w – коефицијент јачине везе у χ^2 тестовима

W – Wald – вредност која указује на допринос независне варијабле промени зависне варијабле у логистичкој регресији

Wnt – сигнални пут од значаја у ембриогенези

Z

ZEB (*zinc-finger E-box-binding*) – транскрипторни фактор од значаја у епително-мезенхимној транзицији