



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Невенка Илић**

**ЗНАЧАЈ МЕРЕЊА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ПРОТЕИНА**  
**КЛАРА ЋЕЛИЈА У СЕРУМУ КОД ДЕЦЕ СА**  
**АТОПИЈСКОМ КОНСТИТУЦИЈОМ**

**-докторска дисертација-**

**Коментори**

**др сци. мед. Небојша Арсенијевић, редовни професор**

**др сци. мед. Александра Томић-Лучић, ванредни професор**

**Крагујевац, 2018.година**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Невенка Илић
Датум и место рођења: 24.08.1969. год. Пожаревац
Садашње запослење: Институт за јавно здравље Крагујевац
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Значај мерења концентрације протеина Клара ћелија у серуму код деце са атопијском конституцијом
Број страница: 189
Број: слика 11, графикона 37, табела 17
Број библиографских података: 417
Установа и место где је рад израђен: Институт за јавно здравље Крагујевац
Научна област (УДК): Имунологија, инфекција и инфламација
Ментор: др сци. мед. Небојша Арсенијевић, редовни професор др сци. мед. Александра Томић-Лучић, ванредни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 24.07.2017. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-1119/14 од 06.12.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник
2. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
1. проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник
2. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија, члан
Датум одбране дисертације: 12.03.2018. год

### **Апстракт:**

Клара ћелије су матичне ћелије респираторног епитела које диференцирају у мукоцилијарни епител. Главни циљ ове студије је утврђивање повезаности концентрација протеина Клара ћелија (CC16) у серуму са испољавањем болести доњих дисајних путева у узрасту до две године и њихов предиктивни значај на испољавање болести у седмој години живота у односу на атопију.

**Метод:** У групи здраве деце узраста 5-24 месеца анализирани су концентрације CC16 у серуму у односу на индивидуалне карактеристике, предходно испољавање болести доњих дисајних путева и концентрације биомаркера TH2 одговора, имунорегулаторних цитокина и инфекције RSV, као и у односу на испољавање болести доњих дисајних путева у узрасту од седам година.

**Резултати:** Код деце без атопије концентрације CC16 у серуму се повећавају са узрастом, док се код деце са атопијом смањују. БХР фенотип код деце са атопијом удружен је са концентрацијом  $CC16 \leq 3,4$  ng/ml. Негативна корелација CC16 и TSLP утврђена је код деце са атопијом и код деце без атопије при статистичкој елиминацији IL-10. Предиктор дијагнозе астме у 7 години код женске деце је  $CC16 \geq 6,8$  ng/ml у узрасту 5-7 месеци и  $CC16 \leq 2,9$  ng/ml у узрасту 8-24 месеца. На ризик од испољавања акутног бронхитиса у 7 години, код мушке деце без атопије указује  $CC16 \leq 3,7$  ng/ml, без пораста у инфекцији RSV. 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.

**Закључак:** У овој студији је утврђен значај концентрација CC16 у серуму као маркера БХР у узрасту до две године, као и предиктора астме код женске деце и акутног визинга код мушке деце у узрасту од седам година.

**Кључне речи:** CC16, деца, атопија, астма, биомаркер

## Summary

Clara cells are stem cells of the lung epithelium which differentiate into a mucociliary epithelium. The aim of this study is to determine correlation of serum levels Clara cells protein (CC16) with the manifestation of lower respiratory tract diseases (LRTD) in the period of up to two years of age and to establish a predictive significance of CC16 for the manifestation of LRTD at the age of seven in relation to the atopy.

**Methodology:** Longitudinal study of symptoms free children aged 5-24 months. CC16 determined by ELISA method. Serum CC16 at 5-24 months of age analyzed in relation to individual characteristics, previously manifested LRTD, as well as to the TH2 response, immunoregulatory cytokines and RSV infection, as well as in relation to the LRTD at the age of seven.

**Results:** Serum CC16 in nonatopic children is increasing with age while it is decreasing in atopic children. BHR phenotype in children with atopy is connected to the  $CC16 \leq 3,4$  ng/ml. The negative correlation between CC16 and TSLP is determined in atopic children and in nonatopic children via statistical elimination IL-10. In female children predictor for asthma at the age of 7 is  $CC16 \geq 6,8$  ng/ml at the age of 5-7 months and  $CC16 \leq 2,9$  ng/ml at the age of 8-24 months. The risk of acute bronchitis at the age of 7 in male nonatopic children is indicated by the  $CC16 \leq 3,7$  ng/ml, without an increase in the RSV infection. The risk of acute bronchitis at the age of 7 in atopic male children is indicated by  $CC16 \leq 4,3$  ng/ml and  $TGF\beta 1 \geq 27,5$  ng/ml at the age of 5-7 months of age.

**Conclusion:** This study has determined the significance of CC16 as a BHR-marker in atopic children at the age of two, and as a predictor of asthma in female children and acute wheezing in male children at the age of seven.

**Key words:** CC16, children, atopy, asthma, biomarkers

Посвећено  
**Вечности неизговореног**

У хиљаду времена и на милион стаза ка вечности...  
... са хиљаду мистерија и десет милиона година неизвесности...  
... хиљаду пута уништен... храна за звери... са милион суза, уздаха и страхова...  
...међу милион имена...исправних поступака и грешака...  
... једна је истина... једна светлост... једна мисао...  
... једина судбина у коју верујем...

Sting „A Thousand Years”

## *Захвалница*

Захваљујем се породици на љубави, разумевању и подршци

Захваљујем се ментору проф. др Небојши Арсенијевићу што ми је помогао да ово истраживање заокружим у целину достојну резултата крагујевачке школе имунологије, чији је Он утемељивач.

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	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.....	10
1.5. Имунски одговор код деце.....	12
1.6. Атопија.....	16
1.7. Типови болести доњих дисајних путева у дечијем узрасту.....	21
1.8. Астма.....	23
1.9. Концентрације протеина Клара ћелија у серуму.....	30
<b>2. ЦИЉЕВИИ ХИПОТЕЗЕСТУДИЈЕ</b> .....	32
<b>3. ИСПИТАНИЦИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	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.....	39
3.5. Снага студије и величина узорка.....	39
3.6. Статистичка обрада података.....	40
3.7. Етички принципи.....	41
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	42
<b>4.1. СС16 и индивидуалне карактеристике у односу на атопију</b> .....	44
4.1.1. СС16 и узраст.....	44
4.1.2. СС16 и пол.....	45
4.1.3. СС16 и начин исхране.....	46
4.1.4. СС16 и алергија у породици.....	48
<b>4.2. СС16 и болести доњих дисајних путева у односу на атопију</b> .....	50
4.2.1. СС16 код деце са различитим болестима доњих дисајних путева.....	52
4.2.1.1. БХР фенотип са малим концентрацијама СС16 у серуму.....	54
4.2.1.2. СС16 код деце са акутним респираторним болестима.....	57
4.2.2. Повезаност СС16 са хуморалним одговором према RSV.....	57

<b>4.3.Повезаност СС16 са биомаркерима ТН2 одговора и имунорегулације</b> .....	60
4.3.1. Испитивани биомаркери код деце са болестима доњих дисајних.....	61
4.3.1.1.Биомаркери и различите болести доњих дисајних путева.....	62
4.3.1.2. Повезаност биомаркера и броја респираторних болести.....	63
4.3.1.3.Коморбидитет акутног ринитиса и акутног визинга.....	64
4.3.2.Фактори удружени са променом СС16 у серуму.....	66
4.3.2.1.Фактор „Атопија“.....	67
4.3.2.1.1.СС16 и TGF $\beta$ 1.....	67
4.3.2.1.2. СС16 и цитокини урођене имуности (ЕСР и TNF $\alpha$ ).....	69
4.3.2.1.2.1. БХР са еозинофилном инфламацијом.....	71
4.3.2.1.2.2. Континуирани визинг у току три месеца.....	75
4.3.2.2.Фактор „ТSLP индукција“.....	79
4.3.2.2.1. Детерминанте концентрација ТSLP у серуму.....	81
4.3.2.2.1.1 Начин исхране и ТSLP у серуму.....	83
4.3.2.2.1.2 IL-10 и ТSLP у серуму.....	84
4.3.2.2.2 Алергија у породици.....	85
4.3.2.3. Атопија без алергије у породици.....	87
<b>4.4. Болести доњих дисајних путева у седмој години</b> .....	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.....	92
4.4.5. Предиктори астме у седмој години.....	93
4.4.6. Предиктори одржавања концентрација СС16 у опсегу вредности које нису удружене са повећаним ризиком за испољавање астме у седмој години.....	97
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.....	100
<b>5. ДИСКУСИЈА</b> .....	103
<b>5.1 СС16 и индивидуалне карактеристике</b> .....	103
5.1.1. СС16 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



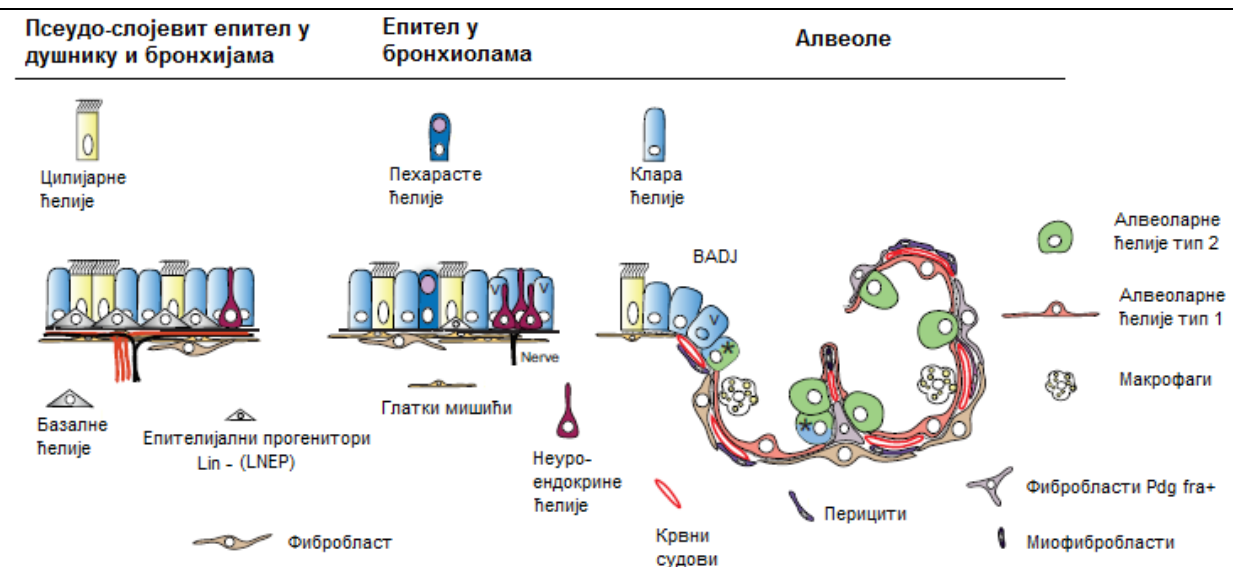
5.1.4.1. Инфекција RSV и CC16 код мушке деце са атопијом .....	107
5.1.4.2. Разлике у CC16 између полова и оксидативни стрес .....	109
<b>5.2. CC16 и болести доњих дисајних путева .....</b>	<b>110</b>
5.2.1. БХР фенотип са малом концентрацијом CC16 код деце са атопијом .....	111
5.2.2. Акутни визинг и вирусне респираторне инфекције .....	112
<b>5.3. Повезаност CC16 са испитаваним биомаркерима .....</b>	<b>116</b>
5.3.1.1. Маркери атопије код деце са болестима доњих дисајних путева .....	116
5.3.1.2. Маркери различитих типова болести доњих дисајних путева.....	119
5.3.2. Фактор „Атопија“ .....	123
5.3.2.1. CC16 и TGFβ1 код деце са атопијом .....	123
5.3.2.2. CC16 и цитокини урођене имуности .....	125
5.3.2.2.1. БХР са еозинофилном инфламацијом .....	130
5.3.2.2.2. Континуирани визинг у току од три и више месеци .....	132
5.3.2.2.3. CC16 и имунорегулаторни цитокини .....	135
5.3.3. Фактор „TSLP индукција“ .....	136
5.3.3.1. Детерминанте концентрација TSLP у серуму.....	137
5.3.3.2. TSLP и имунорегулација .....	140
5.3.3.3. Генима детерминисано повећање TSLP .....	136
<b>5.4. CC16 и болести доњих дисајних путева у седмој годни живота .....</b>	<b>143</b>
5.4.1. Предиктори акутног бронхитиса у седмој години .....	146
5.4.2. Предиктори хроничног бронхитиса у седмој години .....	147
5.4.3. Предиктори астме у седмој години .....	149
5.4.4. Хомеостаза CC16.....	152
5.4.5. Инфекција RSV и болести доњих дисајних путева у седмој години ..	154
5.4.6. Транзиторни, перзистентни и визинг са касним почетком .....	157
<b>5.5. Могућности примаране превенције .....</b>	<b>158</b>
<b>5.6. Лимитираност студије и даље пропоруке.....</b>	<b>163</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>166</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>168</b>
<b>8. ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА.....</b>	<b>186</b>

## 1. УВОД

Матичне ћелије, између осталог, карактерише њихов капацитет самообнављања и могућност да дају једну или више диференцираних ћелијских типова (1). Матичне ћелије плућа омогућавају раст и развој плућа, обнављање ткива у току нормалне плућне хомеостазе и регенерацију након оштећења (2). Епител спроводне и респираторне зоне плућа континуирано је изложен инхалацијским агенсима као што су загађивачи и микроорганизми који оштећују епител (3). Иако је познато да се процеси репарације епитела дисајних путева одвијају уз помоћ матичних или ћелија које подлежу трансдиференцијацији, ипак њихова идентификација у људским плућима и њихов значај у поремећајима репарације, који су утврђени у хроничним респираторним болестима, још увек није сасвим јасан (3).

### 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, а 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 (2,3) (слика 1).



Слика 1. Ћелије епитела у плућима миша (прилагођено према *Barkauskas CE, 2017(3)*)

Неоштећени респираторни епител се врло споро обнавља заменом цилијарних и пехарастих ћелија (4).

**Базалне ћелије**, које 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 транскрипциони фактор Тгр63 и цитокератин Krt5, интегрин  $\alpha 6$ , подопланин и трансмембрански рецептор за нервни фактор раста Ngfr (3,4). Хумане базалне ћелије су изоловане из носне слузокоже, епитела трахеје и бронхија, а после оштећења епитела диференцирају у цилијарне и пехарасте ћелије (3).

**Клара ћелије** (добиле су име по немачком анатому Макс Клари, који их је први описао као секреторне ћелије у бронхиоларном епителу људи (5)) 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 (6). Популација ових ћелија је хетерогена и њихово присуство је утврђено у неуроендокриним телашцима (енг. *Neuroendocrine Body*, NEB), у епителу споја између респираторних бронхиола и алвеола (енг. *Bronchoalveolar Duct Junction*, BADJ), као у алвеолама где је забележена коекспресија маркера како Клара ћелија тако и алвеоларних ћелија типа 2. Када нема оштећења Клара ћелије се споро самообнављају и диференцирају у цилијарне ћелије (7). Двоструко позитивне ћелије које садрже маркере 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 фаворизује диференцијацију у Клара ћелије (8). Опредељење ка алвеоларној ћелији тип 2 зависи и од присуства тромбоспондина, који секретују ендотелне ћелије плућних капилара (3). Постоје мишљења да су ове двоструко позитивне прогениторске ћелије хематопоетског порекла (8). Субпопулације Клара ћелија разликују се у потенцијалу трансдиференцијације у базалне или алвеоларне ћелије, која је зависна и од њиховог положаја дуж дисајних путева (3).

Ове ћелије секретују протеин Клара ћелија (CC16) који је у литератури познат и као: *uteroglobin* (секретује се у гравидној 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 овај молекул катаболише) (9). Протеин Клара ћелија кодира ген лоциран на 11q12.3-13.1 хромозому, а транскрипторни фактори који повећавају експресију *CC16* су: AP-1, HNF-3 $\alpha$  и 3 $\beta$  (енг. *Hepatocyte Nuclear Factor*, HNF 3 $\alpha$  и 3 $\beta$ ), T/EBP (енг. *Thyroid-specific Enhancer Binding Protein*, T/EBP)/NKX2), и TTF-1

(енг. *Thyroid Transcription Factor-1*, TTF-1); док се смањење експресије повезује са COUP-TFs (енг. *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factors*, COUP-TFs) (10). Протеин Клара ћелија је структурно је хомодимер састављен од два пептида величине од по 70 аминокиселина, међусобно повезаних ковалентним везама, а које формирају хидрофобни џеп унутар којег се могу везати липофобни лиганди као што су бифеноли, прогестерон и ретинол, док мономери CC16 везују простангландине D2 и F2 $\alpha$  редукујући њихову активност (10). Протеин је резистентан на ефекат протеаза, ниске температуре и промену рН вредности (11). Величина протеина Клара ћелија од само 15,8kDa 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 (12). Средња концентрација CC16 у серуму код одраслих људи креће се од 6,4 до 10-15 ng/ml (10,13). Осим CC16, Клара ћелије секретују и протеине сурфактанта (енг. *Surfactant Protein*, SP) А, В и D, који стабилизују сурфактант и штите га од деградације (14). SP-B као део сурфактанта има улогу у очувању површинског притиска у алвеолама, док SP-A и SP-D као део неспецифичног имунитета опсонизују угљенохидратне структуре микроорганизама, алергена и апоптоличних ћелија и повећавају оклањање ових структура из лумена дисајних путева (15,16). Клара ћелије имају улогу у физиолошком смањењу оксидативног стреса због велике експресије P450 монооксидаза, које учествују у метаболизму ксенобиотика (17).

Алвеоларни епител чине два типа **алвеоларних ћелија**: ћелије тип 2 су кубоидне ћелије које секретују сурфактант C, 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 ремоделовање ткива после оштећења (18). Популације алвеоларних ћелија тип 2 које се налазе на периферији и под плеуром имају највећи капацитет пролиферације и регенерације.

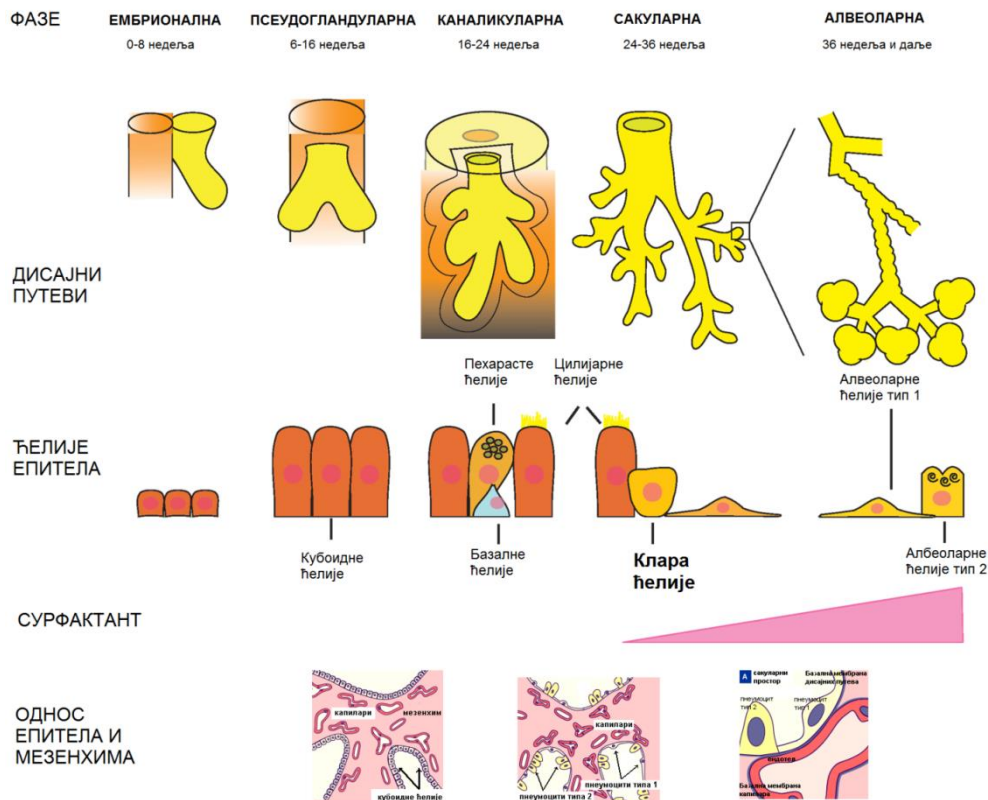
Осим алвеоларних ћелија у алвеолама се налазе и стромалне ћелије, капиларни ендотел, перицити и макрофаги.

Понашање епителних матичних ћелија плућа регулисано је сигнаlima из микроокружења који могу ове ћелије држати у стању мировања, одржавати самообнављање у овом недиферентованом облику и промовисати транзиторну пролиферацију (2). Диференцијација матичних ћелија изолованих из плућа зависи од

услова 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 (3). Есеји са хуманим матичним ћелијама од различитих донора показали су значајну варијабилност у кинетици пролиферације и диференцијације прогенитора респираторног епитела, па и у условима без оштећења постоји нарушавање баланса са превагом пехарастих над цилијарним ћелијама, (што је утврђено и у астми), као и сквамозних над мукоцилијарним ћелијама (3). Хипотеза да болести одраслих воде порекло из периода развоја (енг. *Developmental Origins of Adult Disease*) усмерила је актуелна истраживања генезе хроничних респираторних болести на развој патолошког имунског одговора и структурне промене плућа у развоју, који генеришу потенцијал за патолошки одговор на штетне агенсе касније у животу (16,19).

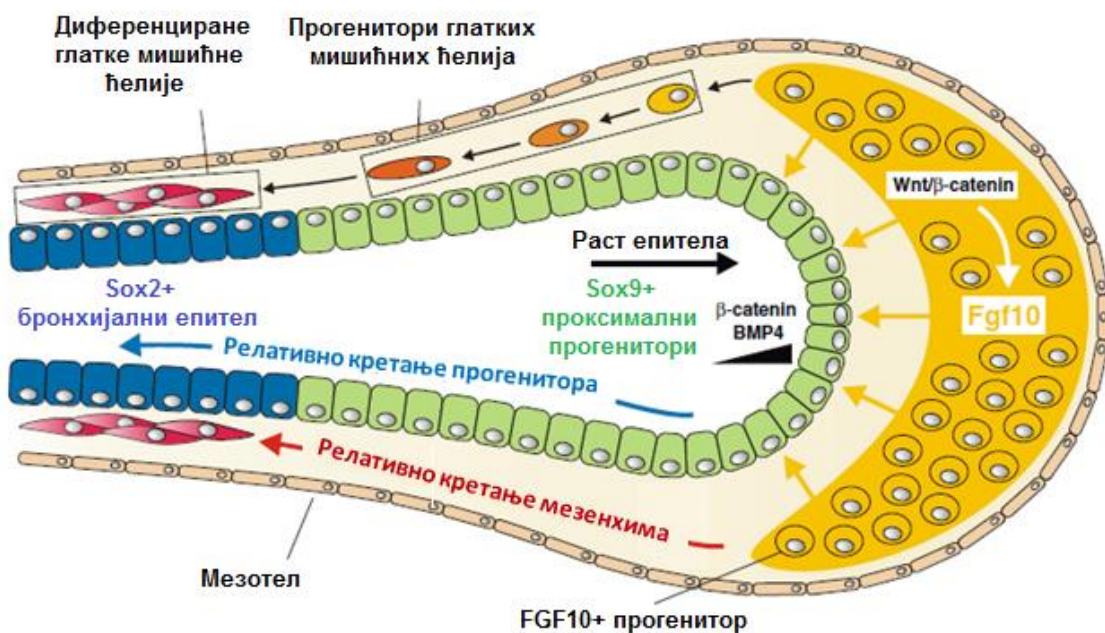
## 1.2.Развој плућа

Развој плућа пролази кроз неколико фаза током којих се грађају дисајни путеви, појављују различите матичне и диферентоване ћелије, и урастају крвни судови који са ћелијама епитела алвеола формирају ваздушно-крвну баријеру преко које се обавља размена гасова (слика 2).



Слика 2. Развој плућа (прилагођено према *Leibel S, 2016 (30)*)

У ембрионалној фази ткиво плућа издваја се пупљењем из ларинго-трахеалног усека на вентралној страни ждрела. У 33. дану гестације појављује се асиметрична деоба два главна бронха (20), који се даље гранају и расту у динамичном процесу епително-мезенхимне интерреакције типа 1 и у **псеудогландуларној фази** раздвајају се на терминалне бронхиоле (16-20 генерација грањања), при чему су до краја ове фазе *Id2*+епителне ћелије (енг. *Inhibitor of Differentiation 2, Id2*) у централним дисајним путевима слабо диферентоване (21). Фактор раста фибробласта 10 (енг. *Fibroblast Growth Factor 10, FGF10*) у мезенхиму позиционираном дистално (регулисан је Wnt сигнализирањем) делује на епителне прогениторе у којима преко  $\beta$ -катенина индукује експресију *Sox9* (енг. *Sex Determining Region Y Box 9, Sox9*), а инхибише експресију *Sox2*, што одржава изостанак диференцијације прогенитора (22,23) и има улогу у хемотакси и усмеравању грањања дисајних путева (24). 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 (2) (слика 3).



Слика 3. Епително – мезенхимна интерреакција током урастања дисајних путева (прилагођено према *Volckaert T, 2014(2)*)

Током **каналликуларне фазе** развоја плућа терминалне бронхиоле се гранају до стварања ваздушног простора алвеоларних каналића и кесица– ацинуса у чију околину урастају крвни судови. Плућни епител у псеудо-гландуларној и каналликуларној фази развоја плућа је оптимални извор матичних ћелија које имају потенцијал да

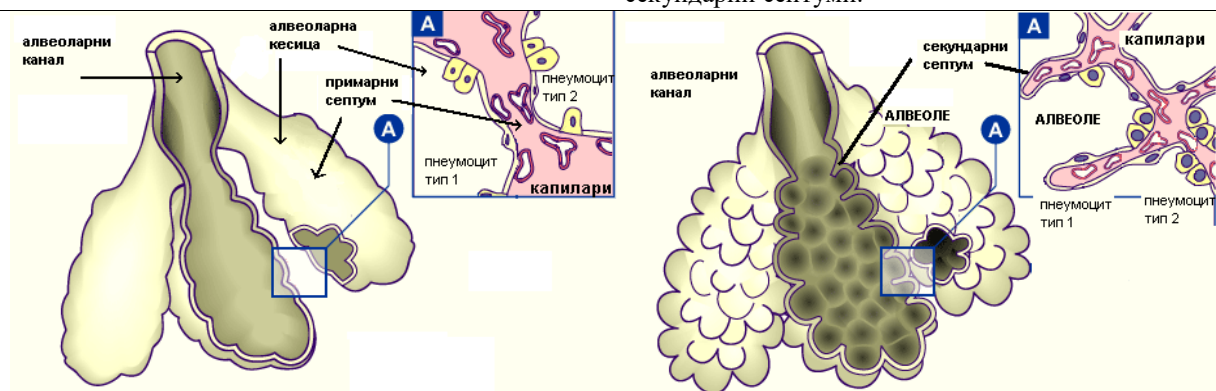
диференцирају и у дисајне путеве и у алвеоле (25). Мултипотентни прогенитори (Sox-9+, Id2+) изоловани из епитела који је у псеудо-гландуларној фази диференцирају *in vitro* иницијално у ћелије бронхиоларног епитела (Sox-2+) и то Клара ћелије (Scgb1a1+; које диференцирају у пехарасте ћелије), базалне ћелије (p63+; које диференцирају у цилијарне ћелије после смањења експресије 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 (24). Током каналикуларне фазе местимично се појављују FGF10+липофибробласти који представљају нишу за алвеоларне ћелије типа 2 (24). У току нормалне трудноће CC16 се детектује у амнионској течности од 14-16 гестационе недеље (ГН), и експоненцијално расте до 30-34 ГН, са највећим концентрацијама пре порођаја (26,27). Смањење експресије протеина чврстих међућелијских веза (клаудина 6) током развоја плућа неопходно је за прелазак из каналикуларне у сакуларну фазу, а одржавање повећане експресије удружена је са смањеном експресијом CC16 у респираторном епителу током ембриогенезе што резултује и формирању плућа са мањим бројем широких дисајних путева (28).

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, В и D, док алвеоларне ћелије типа 2 секретују сурфактант С (29). Сурфактант се састоји од глицеро-фосфолипида, 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 (30), а око ацинуса се умножавају капилари, док апоптоза мезенхимских ћелија омогућава њихово приближавање површини ацинуса, а 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 (24). За правилно диференцирање респираторног епитела неопходна је супресија секреције FGF10 из мезенхимских ћелија око проксималних делова дисајних путева (током грањања респираторних путева) што је удружено са диференцијацијом мезенхимских ћелија у глатке мишићне ћелије (регулисано Wnt/ $\beta$ -катенин сигнализацијом), као и дистално на врху ацинуса (на крају гестације и постнатално у фази алвеоларизације) (2,31).

**Алвеоларна фаза** развоја плућа подразумева трансформацију незрелих сакуларних кесица са лимитираном изменом гасова у зрело плућно ткиво са великом површином алвеола ( $75\text{m}^2$ ), које имају истањене зидове, уз истовремени развој богате капиларне мреже и екстензивном сепарацијом јединица за размену гасова (24). Из примарног алвеоларног зида миофибробласти урастају у лумен алвеола правећи секундарне преграде уз стварање еластичних влакана у њиховим врховима (24) и настанак алвеоларне сепарације (Слика 4). Ова фаза почиње око 36. недеље гестације и на рођењу формирано је око 15% алвеола, а наставак алвеоларног дељења одиграва се у току неколико година након рођења. Током детињства раст плућа обезбеђује пораст плућних функција који прати пораст у телесној висини детета, а наставља се до адолесцентног доба, када се раст завршава (20).

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.



Слика 4. Алвеоларна фаза развоја плућа (прилагођено према 32)

Традиционално се сматра да се структуралне промене у плућима током развоја завршавају формирањем алвеола и да развој плућа представља коначни и иреверзибилни процес. Међутим, неколико експерименталних истраживања указало је на могућност убрзаног развоја и раста плућа и после периода постнаталне матурације (33).

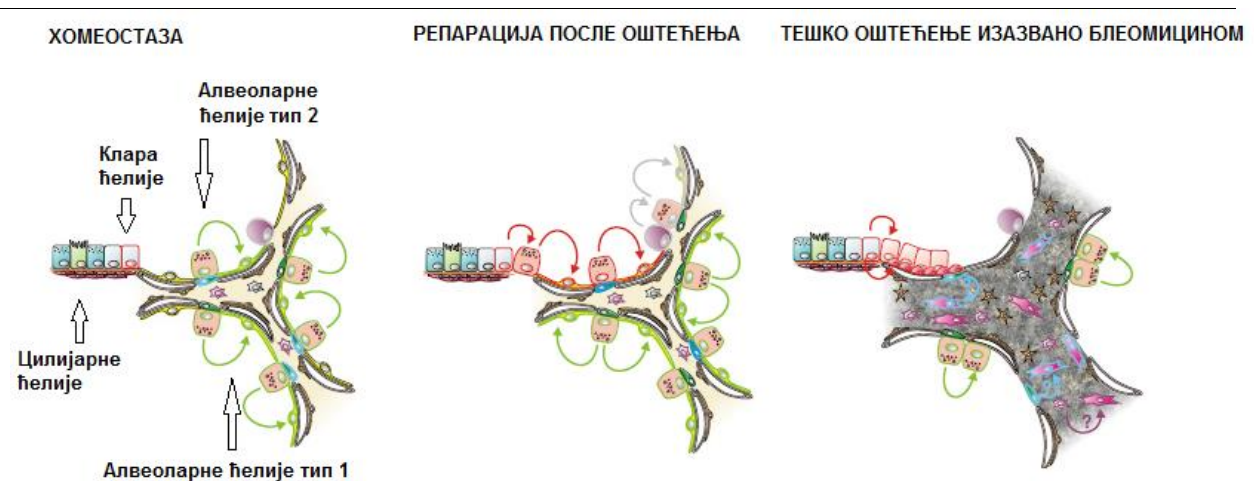
Код превремено рођене деце СС16 корелише са степеном зрелости плућа (34). Мање концентрације СС16 у плућима су измерене код деце са респираторним дистрес синдромом, као и код деце са ризиком за развој бронхопулмоналне дисплазије (35), смањењем плућне функције током детињства (36), односно поремећајим у развоју плућа које се манифестују са повећањем дисајних путева, великим ваздушним



простором и заробљавањем ваздуха тј са настанком ХОБП-а код одраслих (37,38). Интерреакција епителне јединице, стем ћелија и њихових ниша присутна је током морфогенезе, као и у процесу зарастања ране током хроничне инфламације у којој могу настати и структуралне промене са ремоделовањем дисајних путева, па се процеси развоја плућа који су паралелни процесу развоја имунског система интензивно изучавају у патогенези респираторних болести код људи (39).

### 1.3. Репарација епитела плућа после оштећења

Оштећење епитела праћено је промтном пролиферацијом и диференцијацијом матичних ћелија са регенерацијом и репарацијом епитела (2). У анималним моделима показано је да су процеси репарације респираторног епитела зависни од типа матичних ћелија чија је диференцијација укључена у регенерацију различитих делова респираторног система, као и од врсте агенса који је изазвао оштећење (слика 5).



Слика 5. Регенерација респираторног епитела након оштећења (прилагођено према Volckaert T, 2014 (2))

Оштећење епитела великих дисајних путева **нафталеном или сумпордиоксидом** преживљавају само базалне ћелије и мали број варијанти Клара ћелија (у NEB и BADA) које доприносе брзој регенерацији овог региона респираторног епитела диферентујући у мукоцилијарни епител (7). Иако се у физиолошким условима неуроендокрине ћелије одликују самообнављањем без диференцијације у друге ћелијске типове, утврђено је да након оштећења оне могу диферентовати у Клара ћелије, али је њихов допринос регенерацији минималан (40). Приликом оштећења **дифтеријским токсином** које узрокује аблацију базалних ћелија (2) и у експерименталним моделима генске модификације са селективним изумирањем

базалних ћелија, утврђено је да Клара ћелије могу да подлегну репрограмирању и да експримују маркере базалних ћелија (Tip63 и Krt5) (41,42). Међутим, експресија p63 (регулатора развоја базалних ћелија) повезан је са сквамозном метаплазијом уколико је експримиран у Клара ћелијама (43). 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 двоструко-позитивни Scgbl1+Sftpc+ прогенитори могу диференцирати и у алвеоларни и у бронхиоларни епител (2). Након оштећења изазваног блеомицином Клара ћелије могу диференцирати у алвеоларне ћелије типа 1 и 2 (44).

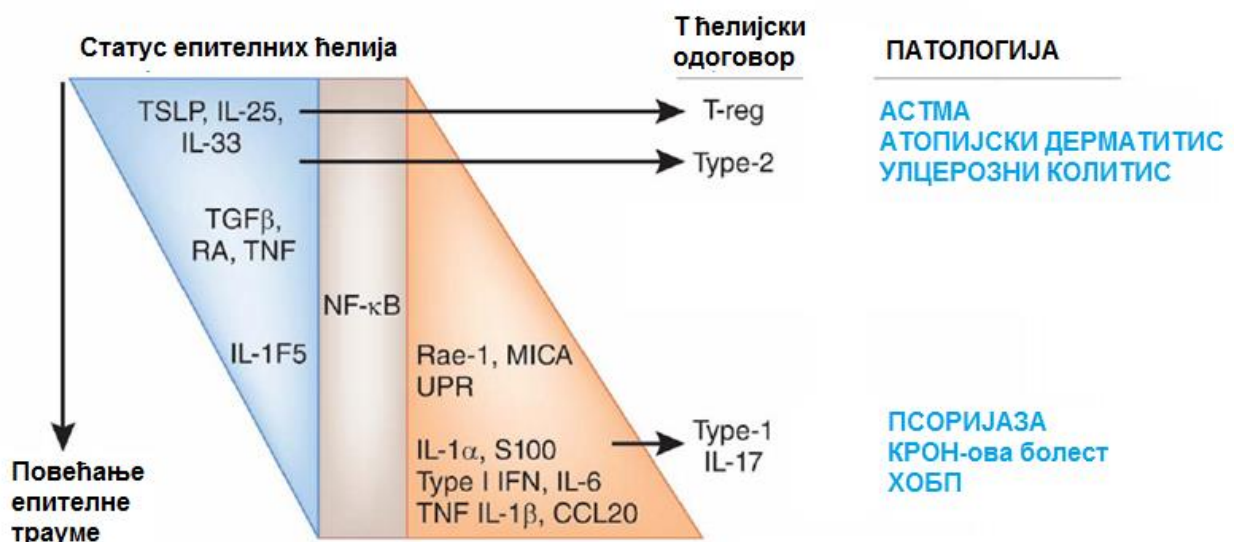
Утврђене су и матичне ћелије из костне сржи које после оштећења доспевају у плућа и диференцирају у бронхијалне епителне ћелије (45), смањујући оштећење изазвано ендотоксином (46). *Epitel-like* ћелије из костне сржи, које садрже Клара протеин, као и маркере алвеоларних ћелија типа 1 и 2 долазе до плућа после оштећења нафталеном, а могу и успешно да репопулишу дисајне путеве летално озраченог миша (47). Ова популација ћелија је екстрапулмонални резервоар стем ћелија које могу да репаришу плућни епител након оштећења (48).

После оштећења епитела, ексудација плазме доводи до стварања фибрин-фибронектин гела који покрива огољене површине базалне мембране, а која омогућава промену изгледа околних цилијарних и секреторних ћелија које се истањују и прекривају површину оштећења са сликом сквамозне метаплазије (49). Ћелије пристигле на место оштећења, преко интеракције 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 (48). Диференцијација Клара ћелија индукована је експресијом  $\beta$ -катенина, а солубилни Е-кадерин стимулише диференцијацију Клара ћелија током регенерације или оштећења бронхиоларног епитела (50,51). Клара ћелије пролиферишу и мигрирају ка зонама оштећења терминално оштећених епителних ћелија процесом хемотаксе (градијент солубилних молекула) или хаптотаксом (градијент адхезионих молекула који реагују са интегринима) (29). У току првог сата од оштећења долази до структуралних промена Клара ћелија са миграцијом хроматина, увећањем митохондрија и повећањем ендоплазматичног ретикулума, па су после 24

сата од оштећења ове ћелије увећане са великим бројем вакуола које секретују протеин Клара ћелија (52). У одговору на IL-13 Клара ћелије претежно из проксималних региона дисајних путева могу директно да диферентују у пехарасте ћелије без пролиферације (3), док на повећање удела цилијарних ћелија утиче присуство IL-6 (53).

#### 1.4. Епителна индукција имунског одговора

Током оштећења, главна карактеристика имунског система мукоза 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 (54). За функционисање респираторне мукоцилијарне баријере неопходно је одржавање чврстих веза између цилијарних ћелија, пехарастих ћелија које секретују мукус и Клара ћелија које секретују сурфактант (55). Респираторни епител реагује на микроорганизме и друге штетне стимулусе из спољашње средине који надјачавају мукоцилијарну баријеру, али и на унутрашње чиниоце, првенствено цитокине (55). Цитокине који мењају окружење матичних ћелија плућа осим имунских, продукују и ћелије епитела у плућима у одговору на оштећење или инфекцију чиме доприносе јачању имунског одговора у плућима (56).



Слика 6. Епителна индукција имунског одговора (прилагођено према Swamy M, 2010(57))

У случају изостанка стреса ћелија епитела активација нуклеарног фактора капа В (NFκB) удружена је са продукујом IL-33, IL-25 и лимфопоетина строме тимуса (TSLP) који првенствено индукују Т регулаторни (Treg) одговор, док у случају стреса, без нарушавања интегритета баријере, условљавају TH2 одговор. IL-4 и IL-13 индукују M2 (алтернативну) активацију макрофага, који су одговорни за резолуцију инфламацијског одговора углавном захваљујући великом капацитету чишћења ендцитозом, синтезом трофичних фактора који су удружени са редукцијом секреције проинфламацијских цитокина (58). Када постоји дисрегулација алармини и TH2 цитокини изазивају болести као што су астма, атопијски дерматитис или улцерозни колитис (57) (слика 6). Повећање трауме и нарушавање интегритета епитела или присуство дисрегулације индукује продукцију IL-1, IL-6, TNFα, TGFβ1, што омогућава диференцијацију наивних Т лимфоцитау TH17 правцу, односно у присуству TNFα секретује се INF тип 1 што условљава индукцију TH1 одговора са развојем болести као што су хронична опструктивна болест плућа (ХОБП), псоријаза и Кронова болест (57).

TGFβ1 је конститутивно експримован у алвеоларним макрофагима, глатким мишићима, фибробластима и епителу дисајних путева (59). Експресија TGFβ1 расте у плућима у току вирусних инфекција, као и током излагања алергену (60,61). TGF-β инхибише пролиферацију и ефекторску функцију TH1 и TH2 субпопулација лимфоцита као и класичну активацију макрофага, активацију неутрофила и ендотелних ћелија, али стимулише продукцију IgA која су потребна за имуност слузница, што све заједно промовише репарацију ткива после локалних инфламацијских реакција. TGF-β стимулише макрофаге и фибробласте да синтетишу колаген и ензиме који модификују матрикс уз промоцију ангиогенезе (54). Хронично оштећење и продужен процес репарације може да резултује смањењем репараторног потенцијала и исцрпљењем пула прогенитора, дефектном репарацијом и прогресивног ремоделовања дисајних путева и фиброзе (62).

Промене у респираторном епителу које су утврђене код пацијената са астмом су: хиперпалзија базалних ћелија, метаплазија пехарастих ћелија које се појављују у дисталним дисајним путевима где нормално ове ћелије не постоје, при чему пехарасте ћелије не пролиферишу већ настају диференцијацијом Клара ћелија (2) уз активацију субепителних миофибробласта (63). Утврђено је да хронично оштећење респираторне слузокоже редукује пролиферативни потенцијал Клара ћелија, које трансдиферентују у ћелије које продукују мукус са смањењем продукције CC16 (64), а што је удружено је

са развојем перибронхилане фиброзе (65). СС16 редукује експресију MMP9, па је активација латентног TGF $\beta$  мања (66). Макрофаги СС16-/- мишева експримују више TGF $\beta$  што за последицу има већи степен фиброзе малих дисајних путева после излагања дуванском диму (10,67). Рекомбинантни СС16 инхибише ангиогенезу, удружену са ткивним ремоделовањем (68).

Утицај Клара ћелија на алергијску инфламацију у плућима је неразјашњен. СС16 своје антиинфламацијско дејство остварује инхибицијом фосфолипазе А2 и смањењем стварања еозаноида (69). Експерименти на анималним мишијим моделима показали су, са једне стране, да одсуство СС16 прати пораст TN2 цитокина (IL-4, IL-5, IL-13) и појаву еозинофилне инфламације након инхалационе сензибилизације (70), док је са друге стране утврђено да Клара ћелије продукују еотаксин којим индукују еозинофилну инфилтрацију и да је њихова деплеција удружена са смањењем IL-4 и IL-13 у ткиву плућа (71). На ћелијским културама хуманих ћелија епитела плућа (BEAS-2B) показан је позитиван ефекат TNF $\alpha$  и INF $\gamma$ , али не и IL-4 и IL-13 на секрецију СС16 (72,73), а инкубација хуманих TN2 лимфоцита са СС16 редукује стварање TN2 цитокина (74).

СС16 редукује број макрофага у плућима мишева који су изложени дуванском диму (10), инхибира продукцију IL-8 из епителних ћелија дисајних (75), на дозно-завистан начин инхибише хемотаксу хуманих полиморфонуклеара зависну од формил-метионил-леуцил-фенилаланина (енг. *formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*, fMLP) (10), редукује оксидативни стрес у полиморфонуклеарима и повећава њихову фагоцитну активност (76), модулише функцију DC преко смањења експресије OX40 лиганда, IL-23, IL-6, па у СС16 дефицијенцији постоји и појачан TN17 одговор (77).

## 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 имунске меморије. У првим годинама живота генерално постоји склоност имунског система ка индукцији имунске толерације (78), јер је током интраутериног развоја плода присутан велики број Treg са ниским степеном Т ћелијске

пролиферације и отклањање активисаних Т лимфоцита апоптозом индукованом FasL (79).

Такође, утврђено је да неутрофили новорођенчади исказују слабију хемотаксу, уз смањену експресију адхезионих молекула и редукцију експресије лактоферина, протеина који повећава пермеабилност и смањену оксидазну активност. Смањен одговор неутрофила одржава се и код одојчади, јер је функција неутрофила мања него код одраслих особа, што се објашњава редукованим пулом и смањеним пролиферативним одговором ових ћелија (80-82).

На рођењу и током прве године живота у ткиву дисајних путева налази се мали број дендритских ћелија, те су функције имунског одговора врло лимитиране услед недоступности антиген презентујућих ћелија (83). Мрежа DC развија се споро и током одојачког периода постепено расте број и функција ових ћелија, а овај процес убрзан је инхалираним микроорганизмима, првенствено вирусима (84). Код одојчади после вирусне инфекције респираторног тракта утврђено је изразито повећање густине DC у дисајним путевима, а број антиген презентујућих ћелија у мукози респираторног тракта се не враћа на базални ниво ни након неколико недеља после инфекције, што указује или на дуготрајни ефекат вирусне инфекције на хомеостазу DC у дисајним путевима у овом узрасту или се повећан број DC одржава перзистентним присуством малог броја вирусних партикула (83). Главни механизам инфламације посредоване TH2 имунским одговором и сензибилизацијом у току вирусних инфекција је последица доласка незрелих DC са повећаном експресијом FcεR1 рецептора из костне сржи, а што представља основу за активацију TH2 имунског одговора на аероалергене, у инфламацијском миљеу вирусних болести дисајних путева (85).

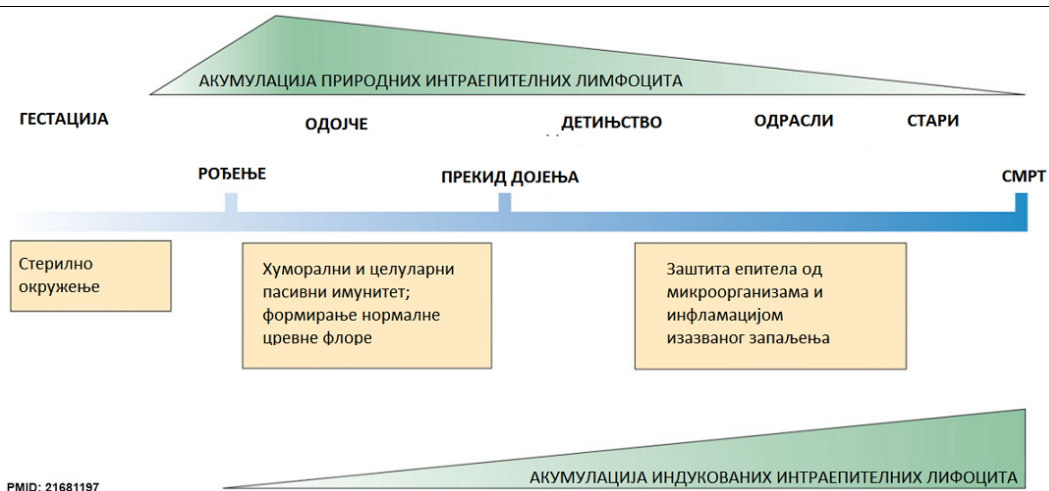
На антигену стимулацију, Т лимфоцити из тимуса (који достиже највећу целуларност у узрасту између 6-12 месеци) подлежу рапидној апоптози после активације и не успевају да диференцира у дугоживеће меморијске ћелије (86), због смањене продукција IL-4 и INF-γ која је повезана је са великим процентом наивних Т лимфоцита са једне стране и са великим процентом Treg са друге стране (87). IL-2 (фактор раста за Treg лимфоците) не доводи до повећане продукције INF-γ, што и одговара налазу мањег броја TH1 ефекторских меморијских лимфоцита код деце у односу на одрасле (88). Слабији примарни TH1 одговор због мање продукције IL-12 из DC, мање експресије костимулацијских молекула на CD4<sup>+</sup> ћелијама у току активације, мање експресије транскриптоног фактора STAT4, веће метилације гена за INFγ (88),

као и мање продукције TNF $\alpha$  (89), условљава доминацију TH2 одговора у одојачком периоду. Уколико је и дошло до диференцијације у TH1 ћелије, након поновљене стимулације антигеном оне подлежу апоптози, док TH2 ћелије пролиферишу и продукују IL-4 и IL-13 који додатно доприносе апоптози TH1 лимфоцита (87). Стабилни број TH2 меморијских лимфоцита постоји тек у другој половини прве године живота (86), а развој имунског система током одојачког периода врло често се поистовећује са прогресивним сазревањем TH1 одговора (87). CD8<sup>+</sup> Т ћелијски одговор је присутан на рођењу, али је утврђен функционални дефицит и мањи број цитотоксичних Т лимфоцита током раног детињства у односу на одрасле (90).

Функција В лимфоцита је снижена током првих месеци живота. В лимфоцити које учествују у препознавању Т-зависних антигена показују и смањену експресију рецептора за комплемент (CD-21), адхезионих молекула и молекула II класе HLA, редуковану експресију CD-40, костимулацијских молекула (B7-1, B7-2) и рецептора за фактор активације В ћелија (BAFF). У одговору на Т-независне антигене у одојачком периоду нарочито су значајне В-1 В-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 (87). В лимфоцити маргиналне зоне нису присутне на рођењу, њихов број се постепено повећава и достиже проценат лимфоцита у слезини одраслих након друге године живота (87). Имуноглобулин G (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 другог и четвртог месеца живота, након чега расте услед стварања дечијих IgG. У узрасту од 12 месеци продукција укупних IgG достиже 60% концентрације код одраслих (87). IgM су природна, полиреактивна антитела, које стварају В-1 В лимфоцити. Након рођења серумска концентрација IgM брзо расте, нарочито на антигену стимулацију и у 12 месеци достиже 75% концентрације код одраслих, док IgA у узрасту од 12 месеци достижу само 20% концентрација IgA у серуму одраслих. Нивои 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 (87). Стварање специфичних IgE према инхалаторним алергенима дешава се после шестог месеца живота и ова рана сензибилизација дешава се код већине деце са

атопијом која ће касније развити респираторну алергијску болест. Код деце која не развијају алергију концентрације специфичних IgE у одојачком периоду се крећу циклично од 0,01 до 0,35 kU/l (што је испод нивоа сензибилизације) односно ову групу деце чине деца без атопије (91). Цикличне промене концентрација IgE последица су конкуренције алерген-специфичних TH2 и Treg лимфоцита унутар индивидуалног алерген-специфичног меморијског пула. Код деце без атопије долази до активације и пролиферације алерген-специфичних Treg што је праћено и прекидом пролиферације TH2 лимфоцита са успостављањем толеранције и трајним смањењем продукције специфичних IgE (92).

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 (83). Развој толеранције на епителима завистан је од интраепителних лимфоцита који могу бити природни (који су прошли селекцију у тимусу и имају рецепторе за сопствене антигене) и индуковани, који су се срели са страним антигеном, а затим акумулирали у епителу (93). Природни TCR $\gamma\delta$  интраепителни лимфоцити при паралелној активацији TCR-а и инхибиторних NK рецептора продукују TGF $\beta$ 1 који индукује исказивања интегрин  $\alpha E$  (CD103) преко којих ове ћелије улазе у епител, где имају улогу у развоју IL-10 толеранције и репарацији епитела након оштећења. Овај улазак у епител дешава се у раним фазама живота, а популација ових ћелија постепено расте са узрастом у одговору на излагање спољашњим антигенима, па је њихов репертоар „персонализован“ у зависности од окружења у коме јединка живи и антигенима којима је континуирано изложена (93) (слика 7).



Слика 7. Измена интраепителних лимфоцита током живота (прилагођено према *Cheroutre H*, 2011 (93))

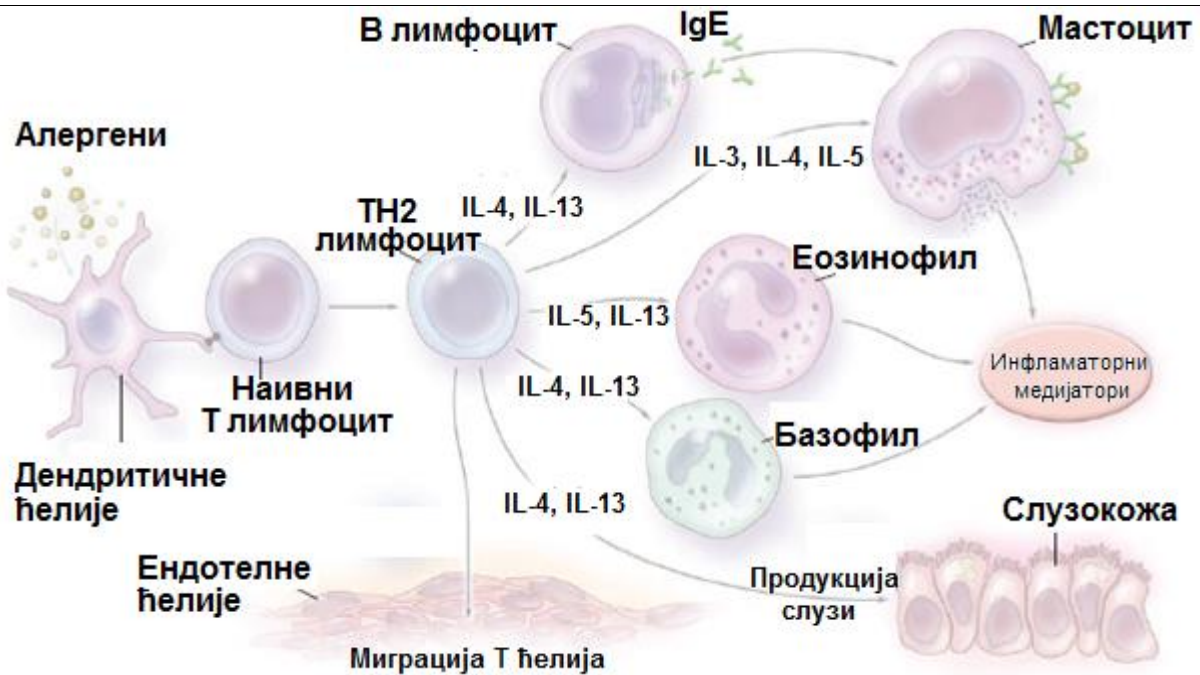


Мајчино млеко смањује осетљивост одојчета на инфекције, јер обезбеђује довољне количине IgA који везују микроорганизме на слузокожама одојчета и смањују активацију проинфламацијског одговора и лактоферина који лизира микроорганизме и редукује инфламацијски одговор (94). Мајчино млеко има директан ефекат на имунски систем новорођенчета, на сазревање ТН1 имунског одговора и стварање имунске меморије (95), јер садржи IL-1, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  и IL-8 који потпомажу у развоју ТН1 одговора и стимулишу одбрамбени потенцијал одојчета (94,97). Мајчино млеко садржи и значајне количине анти-инфламацијских компоненти као што су TGF $\beta$ 1, IL-10, еритропоетин и лактоферин који редујују прејак проинфламацијски одговор (98).

## 1.6 Атопија

Ревидирана номенклатура алергијских болести Светске здравствене организације из 2004. год подразумева да се атопијске болести искључиво повезују са сензибилизацијом мастоцита и присуством IgE, која се доказује или присуством специфичних IgE у серуму или позитивним *skin prick* кожным тестом (99). Атопија представља алергијску, IgE хиперсензитивност, а дефинисана је као генска предиспозиција за развој IgE у одговору на излагање алергену, што доприноси развоју клиничке манифестације алергијске болести (100).

Главне карактеристике алергије су: 1) генска предиспозиција; 2) алергени, 3) презентација алергена преко дендритских ћелија и активација ТН2 лимфоцита, као и продукција IgE на уобичајене антигене из спољашње средине, на које здраве особе не реагују, 4) специфични IgE који се везују за Fc рецепторе на мастоцитима (сензибилизација) и приликом поновног излагања истом антигену долази до дегранулације и ослобађања медијатора, који су одговорни за испољавање различитих клиничких манифестација (кожне манифестације алергије, алергије на храну, алергијски ринитис, астма и системска анафилакса), 5) клиничке манифестације непосредне преосетљивости, у раној фази, последица су васкуларних и глатко мишићних реакција у току неколико минута од излагања алергену, док је у касној фази непосредне преосетљивости присутна инфламација узрокована цитокинима за два до четири сата након излагања алергену (101).



Слика 8. TH2 одговор (прилагођено према *Frew AJ, 2008 (102)*)

За ћелијски имунски одговор на алергене одговорни су Т лимфоцити који током активације диференцирају у TH2 тип ефекторских ћелија и секретују TH2 цитокине (слика 8) (101,102) и то:

- IL-4 (промена изотипа из  $\mu$  у  $\epsilon$  тешки ланац имуноглобулина у В ћелијама, стимулација диференцијације TH2 лимфоцита, антагонистички ефекат у односу на  $\text{INF}\gamma$  са инхибицијом развоја TH1 и TH17 лимфоцита, а заједно са IL-13 учествује у алтернативној активацији макрофага и продукцији колагена)
- IL-13 (у фибробластима и макрофагима стимулише експресију арагиназе 1 и  $\text{TGF}\beta 1$  са повећаном продукцијом колагена чиме промивише фиброзу током репарације ткива у хроничним инфламацијским процесима, стимулише пролиферацију, диференцијацију и секреторну функцију пехарстих ћелија бронхијалног епитела, са повећањем продукције мукуса)
- IL-5 (стимулише раст, диференцијацију и активацију еозинофила).

Хуморални одговор на алергене подразумева пролиферацију специфичних В ћелија после 4-7 дана од првог излагања алергену, уз екстензивну промену изотипа у IgE, повећање афинитета продукованих IgE и стварање меморијских В ћелија. Након диференцијације у плазмоците које секретују антитела високог афинитета и меморијских (функционално „тихих“) ћелија, неке од дугоживећих плазма ћелија напуштају лимфни чвор и мигрирају у костну срж или инфламирано ткиво (103).

Када алерген премости молекуле IgE повезане са FcεRI рецепторима на мембрани мастоцита започиње њихова активација. Мастоцит експримује око 300 000 FcεRI, а агрегација око 100 рецептора је довољна за детектабилни одговор (104). Код особа које имају атопијску конституцију на мембрани мастоцита 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 са друге стране везани IgE на мембрани мастоцита су различите специфичности, па ни један појединачни антиген не може довести до премошћавања оног броја IgE молекула који је довољан за активацију ћелије (104,105). Активација мастоцита подразумева у самом почетку ослобађање **биогених амина** и азот-оксида што се клинички манифестује црвенилом и отоком слузница и коже (уртикарија) уз контракцију глатких мишића у цревима и дисајним путевима. Ипак, бронхоконстрикција у астми траје много дуже него што је потребно за елиминацију хистамина, па се сматра да овај биогени амин нема великог значаја у том алергијском фенотипу (105).

Активирани мастоцити синтетишу и секретују **липидне медијаторе** који настају хидролизом мембранских фосфолипида као што је арахидонска киселина под дејством фосфолипазе A2, а настали међупродукти (под дејством ензима циклооксигеназе и липооксигеназе) испољавају следеће биолошке ефекте: а) Простангландин D<sub>2</sub> делује као вазодилататор и бронхоконстриктор, потенцира хемотаксу неутрофила и њихову акумулацију на месту инфламације, б) Леукотријени узрокују пролонгирану бронхоконстрикцију (LTC<sub>4</sub>), дуготрајне уртике и црвенило по кожи, ц) Фактор активације тромбоцита (PAF) изазива бронхоконстрикцију, повећање пермеабилности крвих судова са вазодилатацијом, а у касној фази реакције преостељивости може активирати леукоците и допринети инфламацији (106).

Синтеза и секреција **citoкина** из мастоцита настаје након активације транскрипторних фактора NF-κB и AP-1 који индукују транскрипцију гена за IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNFα итд. TNFα, порекла из TLR активираних мастоцита, доводи до продукције проинфламацијских citoкина и хемокина и експресије адхезионих молекула на ендотелу и доприноси настанку неутрофилно-моноцитне инфилтрације (107). Код атопичара, премошћавање IgE и активација мастоцита преко FcεRI омогућује, поред наведених citoкина, и продукцију и секрецију TSLP што аутокринно повећава експресију TSLPR чиме се развија TSLP зависни одговор (108). На

дендридским ћелијама TSLP индукује експресију костимулацијских молекула (CD40, CD80), молекула II класе HLA и OX40L, а овако активирани DC индукују диференцијацију наивних T у TH2 лимфоците (109).

Еозинофили настају у костној 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. Еозинофили синтетишу више од 28 цитокина, хемокина и фактора раста, од којих су најзначајнији катјонски протеини-главни базични протеин (енг. *Major Basic Protein*, MBP) и еозинофилни катјонски протеин (енг. *Eosinophil Cationic Protein*, ECP), лизозомне хидролазе, као и еозинофилне пероксидазе и каталазе (110). Накупљање еозинофила на месту инфламације одвија се преко експресије E 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. IL-5 повећава матурацију еозинофила из прогенитора у костној сржи, активира их и повећава отпуштање садржаја гранула, IL-4 појачава експресију адхезионих молекула за еозинофиле, као и продукти мастоцита као што су компонента комплемента C5a и липидни медијатори PAF и LTB<sub>4</sub> који потенцирају привлачење еозинофила на место инфламације (101).

Лимфоидне ћелије урођене имуности у плућима које продукују TH2 цитокине назване су природне помоћничке ћелије (енг. *Natural Helper Cell*), нуоцити или ћелије урођене имуности типа 2 (111). Нуоцити типа 2 стимулирани су IL-25, IL-33 и TSLP порекла из ћелија епитела (103). Незрела форма нуоцити типа 2 у респираторном тракту секретује IL-9, а у зрелој форми продукује IL-5 и IL-13 (112). 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 (113). Нуоцити који продукују IL-5 и IL-13 утврђени су у плућима и у спутуму оболелих од астме, што није био случај код здравих особа (108).

NKT су ћелије порекла из тимуса, које имају NK рецепторе и рецепторе T лимфоцита (енг. *T-cell receptor*, TCR), којима препознају липиде у комплексу са молекулима сличним HLA CD1d (енг. MCH-like molecule CD1d). NKT ћелије секретују велике количине INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-13, IL-10 и GM-CSF чиме утичу на активацију урођеног и стеченог имунитета. На мишијим моделима NKT дефицијенција је

удружена са изостанком развоја бронхијалне хиперреактивности (БХР) после излагања алергенима, озону или у току вирусних инфекција (114). У плућима асматицара, iNKT (енг. Invariant NKT with Va24,Ja28 TCR) секретују велике количине IL-4 и IL-13, односно потенцирају TH2 одговор (55). Ипак, новије студије указују на постојање подгрупе NKT ћелија које могу деловати имуносупресивно, а у плућима могу имати протективну улогу на развој БХР уз супресију инфламације (115). 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 $\gamma$  током развоја плућа. 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 (111).

Генетски детерминисана дефицијенција дендритских ћелија респираторне слузокоже (енг. *Airway Mucosal Dendritic Cells*, AMDC) може имати значајну улогу у повећању осетљивости на примарну сензибилизацију и касније испољавање симптома који су повезани са IgE<sup>High</sup>/TH2<sup>High</sup> имунофенотипом који дефинише алергијску астму (116). Наиме, AMDC су најзначајније у презентацији алергена Т лимфоцитима и индукције диференцијације специфичних TH2 или Treg лимфоцита, односно формирања одговарајућег меморијског пула. Овај процес дешава се између два екстремна стања и то са једне стране, стање доминације Treg (апсолутна толеранција без IgE продукције) и са друге стране, стање TH2 доминације (вишестука сензибилизација са великим концентрацијама IgE и великим ризиком од астме). Ипак, код највећег броја деце постоји стање у коме постоји велики број TH2 меморијских лимфоцита уз развијену толеранцију која држи TH2 меморијске ћелије у стању мировања, па изостају понављани циклуси акутне, ране IgE-FcR активације и касне ефекторска TH2 фазе, које су неопходне за амплификацију алергијске инфламације од значаја за генезу астме (91). Ово бенигно стање TH2 меморијског одговора постоји у око 40% деце (имунолошка нетолеранција), али само једна трећина ове деце испољава визинг (физиолошка нетолеранција), док је већина деце без симптома алергијског визинга (физиолошка толеранција) (117).

### 1.7. Типови болести доњих дисајних путева у дечијем узрасту

Визинг подразумева постојање полифоног звука у експиријуму који се јавља услед опструкције протока ваздуха кроз мале дисајне путеве, а у дечијем узрасту један је од клиничких/дијагностичких параметара различитих болести доњих дисајних путева као што су бронхиолитис, бронхитис и астма (118). Испољавање три и више визинга дефинише се као рецидивантни визинг и повезује се са вирусним инфекцијама и са БХР (119). Међутим, под термином 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 инфлуенце, аденовирус), већ и на инхалационе 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, гастроэзофагеални рефлукс) (120). 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 (120). 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 живота, са променама у структури дисајних путева које се развијају до шесте године живота, када се астма најчешће дијагностикује и када су структуралне промене ирверзибилне (120-123). Клиничко испитивање БХР-а код деце узраста до две године је онемогућено изостанком адекватне методологије и етичким принципима (124), па су подаци о повезаности визинга у раном детињству и каснијег испољавања астме најчешће добијени из лонгитудиналних студија.

Кохортна *Tucson* студија (125), 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. У овој групи деце није утврђено постојање астме у породици, она немају атопијски дерматитис, као ни еозинофилију, ни високе концентрације IgE у серуму. Основни фактори ризика за испољавање транзитивног 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** се јавља 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-ој години живота. Деца са RSV изазваним болестима доњих дисајних путева имала су и мању плућну функцију у 6-ој и у 11-ој 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 инхалационе 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 инхалационе 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. (125).

Хипотеза хигијене указује да су инфекције у раном детињству повезане са смањеном инциденцијом алергијских болести (126), односно да инфекције делују протективно на развој алергије, али је такође утврђено да вирусне респираторне инфекције у раном детињству могу бити фактор ризика за каснији развој астме (55). 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 (127). 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 зависан од два фактора—времена када се инфекција десила и типа микроорганизма који инфекцију изазива (55). RSV и hRV се најчешће наводе као ризико-фактори развоја астме, првенствено после серија рецидивантних инфекција у одојачком периоду (128).

RSV је једноланчани РНК вирус са високим степеном контагиозности, али без великог цитопатогеног ефеката (129). Циљне ћелије RSV репликације су цилијарне ћелије псеудослојевитог епитела, Клара ћелије и алвеоларне ћелије типа 2 (130), али инфекција најчешће захвата цилијарне ћелије (са смањењем, цилијарних покрета), а у тежим облицима инфекције инфициране ћелије могу бити сљуштене (129). Патохистолошки налаз код тежих RSV инфекција показује губитак цилијарног епитела (одумирање и десквамација ћелија епитела) са фокалном некрозом, уз местимичну пролиферацију бронхијалног епитела, инфилтрацију моноцитима и Т лимфоцитима око бронхиоларних и пулмоналних артериола и накупљање неутрофила између васкуларних структура и малих дисајних путева у којима се налази мукус (129).

Лонгитудиналне студије су потврдиле везу између тешких бронхиолитиса изазваних RSV и педијатријске дијагнозе астме у школском узрасту и у раном одраслом добу (131).

## 1.8 Астма

Астма је најчесталија хронична болест у дечијем узрасту (132), и водећи је разлог хоспитализације, коришћења службе хитне помоћи и изостајања из школе (133), па има и велики економски значај због директних и индиректних медицинских трошкова укључујући и трошкове здравствене услуге, цене лекова и смањења продуктивности (134). Тренутно нема лекова који би могли мењати природни ток астме (135). Актуелна терапија усмерена је на смањење бронхоконстрикције применом бронходилататора и смањење инфламације у дисајним путевима применом инхалационих гликокортикоида, као и антагонистима цистенил леукотријенског рецептора 1 који инхибишу бронхоконстрикторно и инфламацијско дејство LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> и E<sub>4</sub>. Ни један од ових лекова нема ефекта на генезу астме, због чега актуелне препоруке указују на неопходност индентификације патогенетских механизма развоја астме уз разумевање комплексне интерреакције генских и ефекта фактора спољашње средине током развоја плућа и процеса ремоделовања (136).

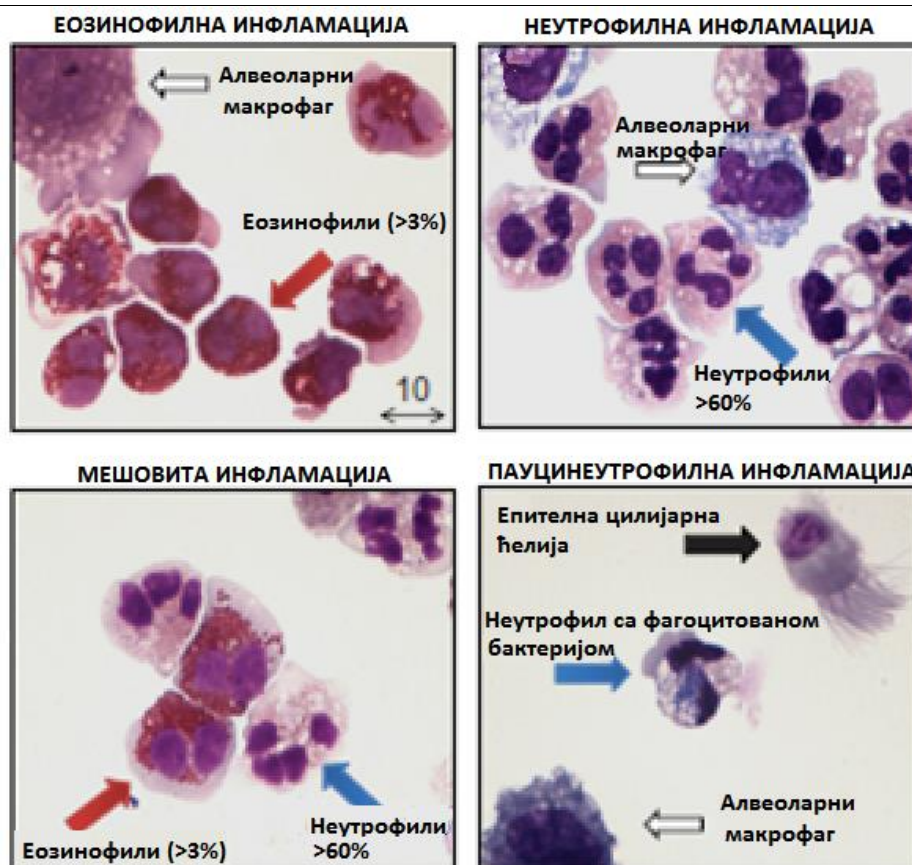


Тусон студија је дала критеријуме за постојање ризика од развоја астме – API индекс (енг. *Asthma Predictive Index*, API), који подразумева да ризик за развој астме имају деца са три и више визинга која су имала позитиван бар један од три главна критеријума (астма родитеља, екцем/атопијски дерматитис и сензибилизација на инхалационе алергене) или један до два споредна критеријума (визинг без прехладе, еозинофилија >4%, алергијски ринитис и сензибилизација на алергене хране) (137), а који је касније ревидиран, па је уместо алергијског ринитиса, као манифестације алергије која није карактеристична за рани узраст, и одвојене сензибилизације на инхалационе и нутритивне алергене, као предикторни фактор узет податак о сензибилизацији на било који алерген (138).

Иако се астма може развити у било ком узрасту, преко 60% свих случајева почиње пре треће, а 80% пре шесте године живота. Може доћи до ремисије астме током детињства, али су лонгитудиналне студије показале да касније у животу често постоје релапси болести (139). Ток дечије астме повезује се са узрастом када су се појавили први симптоми и то: 0-3 године (рани почетак) и 3-6 година (каснији почетак). Деца код којих су се симптоми јавили после треће године, или код којих визинг почиње у прве три, а одржава се и до шесте године (перзистентни визинг) имају већи ризик од постојања астме и у одраслом добу у односу на децу са транзиторним визингом који је присутан само у узрасту до три године (140). Визинг и астма у детињству повезани су са поремећајем у развоју плућа који представља и главни предиктор развоја хроничних респираторних болести у одраслом добу. Астма одраслих такође се на основу почетка симптома класификује на астму са раним почетком (пре 12. године, удружена са атопијом) и астму са касним почетком (после 12. године живота, ефекат спољашњих фактора) (140).

Астма се најчешће класификује на „атопијску“ и „неатопијску“ у односу на присуство (атопија) или одсуство (неатопијска) специфичних IgE на уобичајене алергене из спољашње средине (141). Подаци из литературе указују да се учесталост астме у узрасту до две године креће од 8,7 до 15,2%, са учесталосту атопијске астме у 30-40% (142,143). Алергијски клинички типови дечије астме дефинисани су на основу типа сензибилизације на благу алергијску астму (моно-сензибилизација на грињу у 74% и са добром прогнозом и дечија астма са сензибилизацијом на већи број алергена (рани почетак, велики број егзарцербација, перзистентни визинг и смањење плућне функције у узрасту 3-11 година (144). У алергијској инфламацији доминација продукције TN2

цитокина и сензибилизација мастоцита специфичним IgE, њихово премошћавање алергеном и дегранулација са ослобађањем медијатора запаљења, који доводе до додатног ангажовања еозинофила, TH2 лимфоцита и базофила у ткиво плућа, изазивају хроничну инфламацију у дисајним путевима (145). 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 урођене имуности (нуоцити) (146). Перзистентна инфламација, аберантна репарација и ремоделовање у дисајним путевима, са клиничком манифестацијом бронхијалне хиперреактивности кључни су за генезу астме (147).



Слика 9. Инфламацијски типови у астми (прилагођено према *Vijverberg SJH, 2013(149)*)

На основу присуства врсте ћелија у бронхоалвеоларном лавату утврђено је четири типа инфламације у астми (слика 9): еозинофилна, неутрофилна, мешана и пауцигранулоцитна (148,149).

**Тип еозинофилне астме** дефинисан је на основу присуства еозинофила у биоптату дисајних путева или БАЛ-у, спутуму, броју еозинофила у крви или маркерима

еозинофилне инфламације. Код деце са астмом постоји повезаност атопије и интра-алвеоларног броја еозинофила (150). Еозинофилна инфламација у астми је удружена са добрим одговором на терапију, али је постојање еозинофилне инфламације код деце са астмом и поред великих доза кортикостероида повезано са вишеструком алергијском сензибилизацијом, алергијским ринитисом и атопијским дерматитисом, оштећењем плућне функције, ремоделовањем у дисајним путевима и већим ризиком од тешке астме у одраслом добу. Посебан тип дечије астме са еозинофилном инфламацијом и ремоделовањем, у одсуству ТН2 одговора и без неутрофила, најчешће је рефрактаран на терапију (151), при чему је узрок перзистентне еозинофилне инфламације непознат (140).

**Тип неутрофилне** (неалергијске, интристик) **астме** код деце карактерише се смањењем плућне функције, са више неутрофила у крви и већим концентрацијама IgA, IgG имуноглобулина, а ређе атопијом (144). У патогенези овог типа астме су вирусне инфекције које слабе локалну одбрану против опортунистичких патогена, па се у секундарној инфекцији развија имунски одговор који оштећује ткива (127). Са неутрофилном инфламацијом код деце повезује се присуство *M. catarrhalis*, *Haemophilus* или *Streptococcus* врста у дисајним путевима, као и снажан ТН1/ТН17 имунски одговор (152), постојање гастроезофагеалног рефлукса (у чак 60%) (153), а ниска рН вредност на епителима повезана је са већим бројем неутрофила у БАЛ-у током хроничних вирусних инфекција (154). Код деце са тешким рекурентним визингом и неутрофилном инфламацијом у крви и БАЛ-у утврђен је доминантни значај изложености аерозагађењу, првенствено дуванском диму (140).

**Пауцицелуларна астма** дефинише се као < 3% еозинофила и < 60% неутрофила у спутуму код деце и одраслих. Изостанак инфламације у дисајним путевима клинички се повезује са благим епизодама вирусног визинга и транзиторним визингом са добром прогнозом (119,155). Ипак, 69% ове деце има вирусом индуковани визинг и у предшколском узрасту, без ризика за астму (156) или се ради о благој астми, са нормалном плућном функцијом и без честих егзарцербација (140).

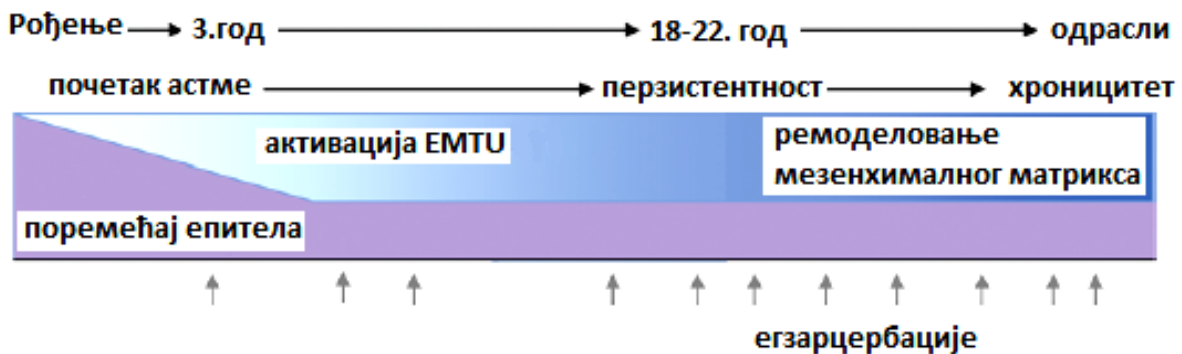
Генерално, астма са раним почетком дефинисана је као блага и тешка алергијска (еозинофилна) и тешка неалергијска (неутрофилна) са лошом плућном функцијом од детињства, док је астма одраслих са касним почетком најчешће неалергијска, и може

бити еозинофилна (удружена са хроничним риносинуситисом, назалним полипима и сензибилизацијом на стафилококни ентеротоксин) или неутрофилна (код гојазних девојчица са великим бројем неутрофила у крви и адипозном ткиву, као и повећаним концентрацијама CRP-а и IL-6 (140)). Промене у учесталости различитих типова опструктивних болести плућа у односу на узраст и врсту инфламације приказани су на слици 10.



Међутим, образац утврђене инфламације у астми разликује се код деце и код одраслих, а репродукбилност анализе типа инфламације је предмет дебате у стручној литератури (148,157). 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 путеваима (158). 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 уз појачано сигнализирање између епитела и мезенхимне подлоге (епително-мезенхимна трофична јединица, *EMTU*) и ћелија имунског система (136) (слика 11). 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) (159).



Слика 11. Шематски приказ настанка и испољавања астме током живота (прилагођено према *Holgate ST*, 2010 (136))

Екстрацелуларни матрикс обезбеђује механичке и интегринске сигнале прогенитотима респираторног епитела (2). Губитак контакта стем ћелија са екстрацелуларним матриксом довољан је окидач терминалне диференцијације прогенитора (2), а појачано сигнализирање у оквиру епително-мезенхимне трофичне јединице промовише стварање микроокружења у ткиву плућа са ремоделовањем ткива дисајних путева, што условљава губитак реверзибилности са редукцијом плућне функције и развојем астме (136). Епителни фенотип може парцијално или у целости прећи у мезенхимни тип ћелија у току процеса епително-мезенхимне транзиције у коме ћелије епитела 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 (160).

Промена генске експресије подразумева реактивирање Wnt, Notch и TGF $\beta$  сигнализирања са повећаном експресијом SNAIL1 (енг. *Snail Family Transcriptional Repressor 1*), TWIST1 (енг. *Twist Family Transcriptional Repressor 1*) и ZEB (енг. *Zinc-finger E-box-Binding, ZEB*) транскрипторних фактора од значаја у епително-мезенхимној транзицији типа 2. Ови фактори метилирају хистоне 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 (160). Осим измене кадрина долази и до смањене експресије интегрин $\beta$ 4, са смањењем интегрин $\alpha\beta$ 4 којима ћелије епитела адхерирају за базалну мембрану и повећањем интегрин $\alpha$ 3 $\beta$ 1 преко кога се остварује контакт са ламинином и интегрин $\alpha$ 5 $\beta$ 1 са фибронектином који промовише миграцију. Експресија интегрин $\alpha$ в $\beta$ 1 удружена је са порастом експресије протеаза (160). Повећање MMP2 и MMP9 повећава деградацију протеина екстрацелуларног матрикса и омогућава инвазију, а активација фактора диференцијације TGF $\beta$  повећава експресију 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 ових ћелија, а њихово стално присуство у хроничним оштећењима може пореметити регенерацију бронхиоларног епитела (29). У мишијим моделима је показано да после оштећења нафталеном, преживеле Клара ћелије продукују Wnt7b који утиче на повећану пролиферацију парабронхијалних глатких мишића који почињу да секретују FGF10. У току репопулације оштећеног епитела ектопична експресија FGF10 индукује експресију *Snail1* у Клара ћелијама и активацију EMT програма са редукцијом експресије E-кадрина и индукцијом  $\alpha$ SMA (енг.  *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*) и виметина, а ова транзитрна EMT је неопходна за експанзију и пролиферацију Клара ћелија и регенерацију оштећеног епитела. Због тога се EMT сматра уобичајеном појавом после оштећења епитела која значајно доприноси нормалној регенерацији епителне баријере (161). Још увек није разјашњено како процес транзитрне EMT прелази у ирверзибилни процес ремоделовања дисајних путева у коме је утврђено да је 30-40% фибробласта/миофибробласта порекла из епителних ћелија (162), али постоје мишљења и да фиброза није последица EMT (163).

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 на оштећење дисајних путева током детињства, и касније до одраслог доба (136).

## 1.9 Концентрације СС16 у серуму

Током последњих година велики број истраживања се бави утврђивањем повезаности концентрација протеина, специфичних за плућно ткиво, у серуму и патолошких стања дисајних путева и плућа код деце током најранијег детињства (124). 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 и чине 80% бронхиоларних ћелија, што је три пута више него што су показале ултраструктурне анализе бронхиола код људи (164). 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 ових ћелија у цилијарне или алвеоларне ћелије тип 2 (29). Такође, мерење ткивне експресије протеина или анализа бронхоалвеоларног лавата нису етички прихватљиве методе истраживања код деце током раног детињства (124). Због свега наведеног, развијен је нови, неинвазивни метод за детекцију субклиничких промена у респираторном епителу, који подразумева одређивање концентрације протеина специфичних за плућа у серуму (СС16, сурфактант А и В), а који су показатељи пермеабилности или целуларног интегритета респираторне епителне баријере током акутних и хроничних болести плућа (165).

Концентрација СС16 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) што је последица смањене продукције СС16 из све мањег броја Клара ћелија (164). Акутно оштећење респираторног тракта различитим иритансима (као што су азот- и сумпор-диоксиди, алдехиди, халогенизовани угљени хидрати, озон) последица је директне токсичности на епителне ћелије и повећања пермеабилности или оштећења баријере, што резултује у транзиторном повећању СС16 у серуму пре него што се појави симптоматологија, односно пре него што се оштећење може детектовати тестовима плућне функције (165).

У астми постоји прогресивно оштећење епитела, а патолошке промене су лоциране у малим дисајним путевима, где се код људи налази и највећи број Клара ћелија, па се сматра да ове ћелије имају значајну улогу у патогенези астме (166, 167).

Мала концентрација СС16 у серуму повезана је са смањењем плућне функције (36) и редуцијом броја СС16-позитивних ћелија у дисајним путевима, при чему је биоптатима бронхијалног епитела код пацијената са астмом установљен мањи број Клара ћелија у односу на здраву контролу (168). У више студија је показано да су мале концентрације СС16 у серуму повезане са астмом и код деце и код одраслих, као и ХОБП-ом (169,170). Хронично респираторно оштећење редукује пролиферативни потенцијал Клара ћелија и фаворизује њихову трансдиференцијацију у ћелије које продукују мукус (29,64,69), као и до перибронхијалне фиброзе независно од миофибробластне пролиферације или диференцијације (65). Није јасно да ли овакав налаз постоји од рођења или се број Клара ћелија у астми редукује услед постојања хроничне инфламације (171). Развој субепителне фиброзе у примарним и секундарним алвеоларним септумима у току раног детињства може бити удружен са оштећењем пермеабилности алвео-капиларне мембране у великим подручјима плућа са редуцијом изласка СС16 у циркулацију (164).

Иако је астма алергијска у 70-80% пацијената (111), подаци о повезаности алергије и СС16 нису доследни. Нижа серумска концентрација СС16 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 (157). Истраживања полиморфизма гена за СС16 показала су удруженост генотипа са нижом концентрацијом СС16 у серумуса развојем инфламације у дисајним путевима и појавом БХР код деце, независно од атопије (172). Такође, сличне концентрације СС16 утврђене су код пацијентата са алергијском и неалергијском астмом (168). Са друге стране постоје студије у којима није утврђена повезаност малих концентрација СС16 у серуму код деце током прве године са појавом астме или алергијског ринитиса до треће године живота у односу на здраву контролу (171), као ни повезаност СС16 и астме код одраслих (173), али је мала концентрација СС16 у серуму корелисала са хроничном опструктивном болешћу плућа (36). Значај СС16 као биомаркера акутних и хроничних болести плућа и даље је предмет истраживања и стручних дебата (174).



## 2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

Главни циљ ове студије је да се утврди значај концентрација СС16 у серуму на испољавање болести доњих дисајних путева у узрасту до две године и у предвиђању болести доњих дисајних путева у седмој години живота у односу на атопију.

У складу са главним циљем дефинисани су и следећи **специфични истраживачки задаци** у циљу утврђивања разлике у концентрацији СС16 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 (RSV)
- биомаркере ТН2 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.

### 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 у серуму, као и биомаркера TN2 одговора, цитокина имунорегулације и RSV инфекције. У узрасту од седам година анализирано је постојање дијагнозе болести доњих дисајних путева.

#### 3.2 Популација која се истражује

У студију је укључено 163 здраве деце узраста 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 Дом Здравља и понедељком у Институт за јавно здравље Крагујевац (ИЗЈЗ)). Извори података су: нестандардизовани анкетни упитник и база података Дома здравља Крагујевац. 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 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 ИЗЈЗ Крагујевац (сваког понедељка). Код деце старости 5 до 24 месеца крв је узимана у Дому здравља приликом редовне контроле комплетне крвне слике или у ИЗЈЗ Крагујевац приликом узимања крви за индикуване анализе потребне за адекватни савет у циљу превенције имунских болести код деце. Узорци серума су складиштени на  $-80\text{C}^0$  до

извођења лабораторијских анализа у лабораторији за алергијске болести 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, јер је разлог за то била различита количина узорка у банци серума ИЗЈЗ Крагујевац.

**Утврђивање атопије** урађено је код 163 деце детекцијом специфичних IgE у серуму квалитативним мултитестом *Phadiatop infant* (*cut off*  $\geq 0,35\text{kUA/L}$ ). 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. *Phadiatop infant* тест је рађен *in vitro* имунофлуоресцентном техником (енг. *Fluorescent Immunassay*, FIA) на *Immunocap-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  $\geq 0,35\text{kUA/L}$ ,  $n=53$ . Контролну групу чинила су деца без атопије односно деца код којих специфична IgE антитела у серуму нису доказана у концентрацији  $\geq 0,35\text{kUA/L}$ , односно код којих је *Phadiatop infant*-тест био негативан,  $n=110$ .

**Концентрације СС16 у серуму** одређиване су квантитативним имуноензимским тестом (енг. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA)– *Human Clara Cell protein ELISA*, произвођача *BioVendor Laboratorni medicina a.s Modrice, Czech Republic*. Тест је оптималан за концентрације хуманог протеина Клара ћелија  $2\text{-}100\text{ng/ml}$ . 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 ( $100\text{ng/ml}$ ) 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 25x оригиналним разблаживачем ( $5\mu\text{l}$  узорка +  $120\mu\text{l}$  разблаживач) и у количини од  $100\mu\text{l}$  стављани у бунарчиће плоче обложене поликлонским антителима према хуманом протеину Клара ћелија. Након инкубације од једног сата на собној

температури и испирања, додато је 100 $\mu$ l, биотином обележених, поликлонских антитела према хуманом протеину Клара ћелија и после инкубације од једног сата додато је 100 $\mu$ l коњугата стрептавидина и пероксидазе (*HRP*), који је инкубиран један сат. После додавања 100 $\mu$ l раствора субстрата ( $H_2O_2$  и тетра-метил-бензидина– ТМБ) и инкубације од 10 минута у мрачној средини, реакција је стопирана са 100 $\mu$ l киселине. Интензитет боје је пропорционалан концентрацији протеина Клара ћелија и фотометријски је мерен у периоду од 7-8 минута од заустављања реакције. Оптичка густина је читавана на 405nm са референтном таласном дужином од 630 nm. Серумске концентрације протеина добијене су софтверским програмом *4PL* (енг. *4 Parameter Logistics*) методе, 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 протеина Клара ћелија, који су укључени у истраживање, био је 163.

**Концентрације TNF $\alpha$  у серуму** одређиване су квантитативним имуноензимским тестом –*Human TNF $\alpha$  ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets* произвођача *BioLegend, San Diego, USA*. У бунарчићима на празној плочи у току 16 сати на +4<sup>0</sup>C инкубирана су специфична моноклонска антитела према хуманом TNF $\alpha$ . Након испирања се у сваки бунарчић стављало по 200 $\mu$ l оригиналног разблаживача ради блокирања неспецифичног везивања, уз инкубацију у току једног сат. После реконституције основног лиофилизованог стандарда хуманог TNF $\alpha$ , направљени су остали стандарди двоструким разблаживањем (250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9pg/ml и 0 - пуфер). По 100 $\mu$ l стандарда и серума додато је у бунарчиће и инкубирано је два сата, а након испирања додата су детекциона антитела према TNF $\alpha$ . После једног сата додато је 100 $\mu$ l Авидин-*HRP*, а после 30 минута и 100 $\mu$ l ТМБ-а. Ензимска реакција је стопирана после 15 минута са 100 $\mu$ l 2N  $H_2SO_4$ . Интензитет добијене жуте боје је пропорционалан нивоу концентрације хуманог TNF $\alpha$  и фотометријски се читава у периоду од 30 минута од заустављања реакције. Серумске концентрације TNF $\alpha$  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 $\alpha$ , који су укључени у истраживање, био је 66.

**Концентрације TSLP у серуму** одређиване су квантитативним имуноензимским тестом – *Human TSLP ELISA MAX<sup>TM</sup> 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 $\mu\text{l}$  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, 3,9pg/ml и 0 - пуфер). По 100 $\mu\text{l}$  стандарда и серума додато је у бунарчиће и инкубирано је два сата на собној температури, а после испирања су додата детекциона антитела. После инкубације од једног сата додато је 100  $\mu\text{l}$  Авидин-HRP, а после инкубације од 30 минута и 100 $\mu\text{l}$  ТМБ-а. Ензимска реакција је стопирана после 25 минута са 100 $\mu\text{l}$  2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Интензитет жуте боје пропорционалан је нивоу концентрације хуманог TSLP и фотометријски се вредновала у периоду од 30 минута од заустављања реакције. Оптичка густина је читавана на 450nm са референтном таласном дужином од 600nm. 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 MAX<sup>TM</sup> 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 $\mu\text{l}$  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, 3,9pg/ml и 0 - пуфер). По 100 $\mu\text{l}$  стандарда и серума додато је у бунарчиће и инкубирано је два сата на собној температури, а након испирања додата су детекциона антитела према IL-10, која су инкубирана један сат на собној температури. После испирања додат је 100 $\mu\text{l}$  Авидин-HRP и инкубиран 30 минута, а затим и 100 $\mu\text{l}$  ТМБ-а. Ензимска реакција је стопирана после 15 минута са 100 $\mu\text{l}$  2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . 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 TGF $\beta$ 1 у серуму** одређиване су квантитативним имуноензимским тестом – DRG ELISA Kit, произвођача DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany. Према подацима произвођача не постоји укрштена реактивност специфичних антитела према TGF $\beta$ 1, која се користе у овом тесту, са TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3. Према упутству произвођача пре извођења теста серуми су разблажени пуфером у односу 1:50 (10 $\mu$ l серума + 490 $\mu$ l оригиналног пуфера), а стандарди су добијени двоструким разблажењима са оригиналним пуфером и то: 600, 300, 150, 75, 38, 19pg/ml и 0 – пуфер. По процедури активације TGF $\beta$ 1, 200 $\mu$ l стандарда и узорака серума су се ацидификовала са 20 $\mu$ l 1N HCl уз мешање на вортексу, а након 15 минута извршена је неутрализација са 20 $\mu$ l 1N NaOH. Потребна неутрална pH вредност стандарда и узорака проверавана је за сваки узорак универзалним лакмус папиром. Стандарди и серуми са pH вредношћу између 7 и 8 су у количини од 100 $\mu$ l стављани у бунарчиће плоче, који су обложени поликлоналним антителима према TGF $\beta$ 1. Након прве инкубације од 16 сати на +4<sup>0</sup>C и испирања додато је 100  $\mu$ l моноклонских мишијег анти-TGF $\beta$ 1 антитела. После инкубације од 120 минута додат је коњугат - 100 $\mu$ l 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 $\mu$ l раствора субстрата (тетра-метилбензидина – ТМБ), а ензимска реакција је стопирана после 15 минута са 50 $\mu$ l стоп солуције (0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Интензитет боје пропорционалан је нивоу концентрације TGF $\beta$ 1 и фотометријски се вреднује унутар 10 минута од заустављања реакције, а оптичка густина се читава на 450nm са референтном таласном дужином од 600nm. Уз помоћ софтверског програма израчунавање серумске концентрације TGF $\beta$ 1 вршено је аутоматски 4PL (4 Parameter Logistics) методом уз корекцију разблажења. Укупан број резултата концентрације TGF $\beta$ 1, који су укључени у истраживање, био је 138.

**Концентрације IgA и IgG према RSV у серуму** одређиване су квантитативним имуноензимским тестом SERION ELISA classic, произвођача Institut Virion/Serion GmbH, Würzburg, Germany. Серумске концентрације специфичних антитела према RSV израчунате су на основу вредности оптичких густина, 4PL методом уз помоћ софтверског програма SERION easy base 4PL-Software 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 - не класификована, 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. Подаци о болестима код деце која су се лечила у приватним здравственим установама добијени су од родитеља који су анкетирани, на основу медицинске документације изабраног педијатра, мишљења дечијег пулмолога, као и усмених података о предходно испољеним болестима (педијатар је класификовао симптоме на: акутни визинг – шиштање у грудима до три недеље лечено са инхалацијама краткоделујућих бронходилататора; хронични визинг - шиштање у грудима четири и више недеља, лечено најмање инхалацијама краткоделујућих бронходилататора; ларингитис – промукао кашаљ лечен инхалацијама раствора пантотенске киселине). 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 месеци праћене су и болести горињих дисајних путева и то: J00– акутни ринитис, J02– акутни фарингитис, N65– акутна упала средњег ува, J04– ларингитис.

Подаци о болестима доњих дисајних путева **у узрасту од седам година**, 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 не класификован, 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, 2=  $\geq$  4 месеца), алергија у породици (0=не, 1=да); **Болести доњих дисајних путева** (категоријске варијабле): акутни визинг (J20 и J21) (0=не, 1=да), хронични визинг (J44.9 и J45) (0=не, 1=да), упала плућа (J12-18) (0=не, 1=да) и континуиране варијабле: број респираторних болести и концентрације IgA и IgG према RSV у серуму; **Атопија** (категоријска варијабла): 0=без атопије (Phadiatop infant негативан, специфична IgE  $<0,35\text{kUA/l}$ ), 1=атопија (Phadiatop infant позитиван, специфична IgE  $\geq 0,35\text{kUA/l}$ ); **Серумски биомаркери:** континуиране варијабле total IgE (kU/l), ECP ( $\mu\text{g/l}$ ), TNF $\alpha$  (pg/ml), TSLP (pg/ml), IL-10(pg/ml), TGF $\beta$ 1(ng/ml) и категоријске према добијеним *cut off* вредностима.

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\*Power*3.

**За  $\chi^2$  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%; 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 т-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: 100% на узорку од 163 испитаника за разлику у укупном IgE у односу на атопију (са атопијом=53, без атопије=110), са великом јачином везе  $d=0,99$ ; 90,5% 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  $d=0,77$ ; 81% 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  $d=1,04$ ; 84% 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  $d=1.45$ .

**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 СС16  $\leq 4,8\text{ng/ml}$  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 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 испитана је  $\chi^2$  тестом, а у случају  $n\leq 5$  Fisher-овим тестом. Разлике у СС16 између деце са атопијом и деце без атопије, односно између категорија испитиваних варијабли унутар ових група, вршено је непараметријским *Mann Whitney* тестом, а уколико је разлика присутна, ROC кривом су одређиване *cut off* вредности. Повезаност између СС16 и испитиваних биомаркера у серуму 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  $\geq 0,200$ , и исказано је факторско оптерећење (F) у матриксу обрасца (*Pattern Matrix*). Предсказујуће факторе за концентрације СС16 у серуму  $\leq 4,8\text{ ng/ml}$  издвојили смо

такође на основу повезаности обележја у факторској анализи. Логистичком регресијом утврђени су модели повезаности између зависне варијабле и сетова обележја као независних варијабли. 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 (добити резултати анализе у коју су укључена испитивана обележја), а дефинисана је вредностима  $hi$ -квадрата -  $s^2$  при одређеном броју степени слободe 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 релативног ризика- *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 слободe 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 одобрио Етички одбор ИЗЈЗ Крагујевац (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

Студијом је у узрасту до две године обухваћено 163 деце (41,7% девојчица,  $n=68/163$  и 58,3% дечака,  $n=95/163$ ). Атопија је утврђена код 32,5% деце ( $n=53/163$ ), без разлике између полова ( $p=0,187$ ).

Карактеристике испитиване популације деце узраста 5 до 24 месеца дефинисане као категоријске варијабле приказане су у табели 1.

Варијабла	Категорија	Укупно ( <i>N</i> )	АТОПИЈА ( <i>N</i> )		$\chi^2$ тест ( <i>p</i> )
			Са атопијом	Без атопије	
Укупно		163	53	110	
<b>Индивидуалне карактеристике</b>					
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	
<b>Дијагноза болести доњих дисајних путева</b>					
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	140	45	95	
<b>Дијагноза болести горњих дисајних путева</b>					
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 1.** Категоријске карактеристике испитиване групе. Између деце са атопијом и без атопије није утврђена разлика по узрасту, полу, начину исхране и алергији у породици. Такође, није утврђена разлика у учесталости болести доњих дисајних путева, као што су акутне и хроничне болести бронхија и упале плућа. Анализа учесталости болести горњих дисајних путева у односу на атопију, показала је да у узрасту до две године деца са атопијом ређе имају дијагнозу ринитиса (45,3%,  $n=24/53$ ) у односу на децу без атопије (71,8%,  $n=79/110$ ),  $p=0,001$

Карактеристике испитиване популације деце узраста 5 до 24 месеца дефинисане као континуиране варијабле приказане су у табели 2.

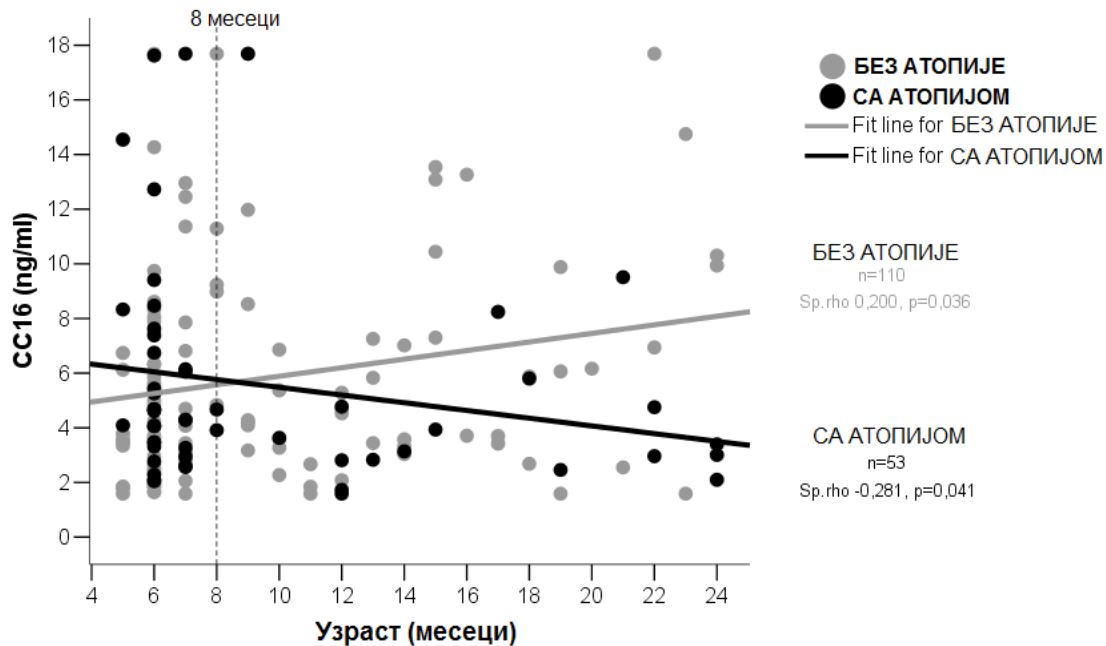
Варијабла	Укупно <i>Md (N)</i>	АТОПИЈА <i>Md (N)</i>		<i>Mann Whitney (p)</i>
		Са атопијом	Без атопије	
<b>Индивидуалне карактеристике</b>				
Узраст (месеци)	7 (163)	7 (53)	7 (110)	0,652
Дужина дојења (месеци)	6 (163)	6 (53)	6 (110)	0,907
Време протекло од престанка дојења	1 (163)	1 (53)	1,5 (110)	0,484
<b>Болести доњих дисајних путева</b>				
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
<b>Серумски биомаркери</b>				
CC16 (ng/ml)	4,3 (163)	4,1 (53)	4,6 (110)	0,605
<b>Укупни IgE (kU/L)</b>	5,1 (163)	33,1 (53)	3,7 (110)	<b>0,000</b>
<b>ЕСР (µg/L)</b>	7,3 (145)	9,7 (42)	6,5 (103)	<b>0,004</b>
TNF $\alpha$	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
TGFb1 (ng/ml)	20,5 (138)	21,5 (46)	19,7 (92)	0,527
<b>Хуморални одговор на респираторни синцицијални вирус</b>				
<b>IgG RSV (U/ml)</b>	1,2 (113)	3,4 (31)	1,1 (82)	<b>0,022</b>
IgA RSV (U/ml)	2,2 (96)	3,2 (21)	2,0 (75)	0,190

**Табела 2.** Континуиране карактеристике испитиване групе. Деца са атопијом у односу на децу без атопије имају веће концентрације укупних IgE (33,1kU/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%), ЕСР-а (9,7µg/l, range 50,4, IQR 19,1 vs 6,5µg/l, range 50,8, IQR 9,0,  $p = 0,004$ ; ROC крива: area 0,654, CI95% 0,556-0,752, за *cut off*  $\geq 8,7$ µg/l сензитивност 64,3%, специфичност 66,0%) и IgG према RSV (3,4U/ml, range 79,6, IQR 50,4 vs 1,1U/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%).

## 4.1. СС16 и индивидуалне карактеристике у односу на атопију

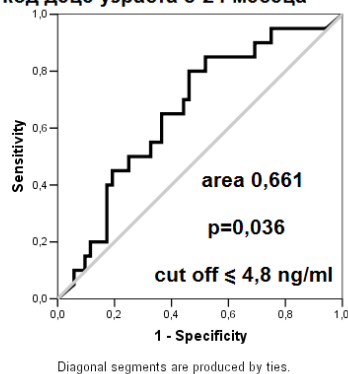
### 4.1.1. СС16 и узраст

Повезаност концентрације СС16 у серуму и узраста приказана је на графикону 1.



**Графикон 1.** Повезаност концентрације СС16 у серуму и узраста. Код деце са атопијом постоји смањење концентрације СС16 у серуму са старијим узрастом ( $r = -0,281$ ,  $p = 0,041$ ,  $n = 53$ ), док је у групи деце без атопије ова повезаност позитивна ( $r = 0,200$ ,  $p = 0,036$ ,  $n = 110$ ).

**ROC крива: СС16 као маркер атопије код деце узраста 8-24 месеца**

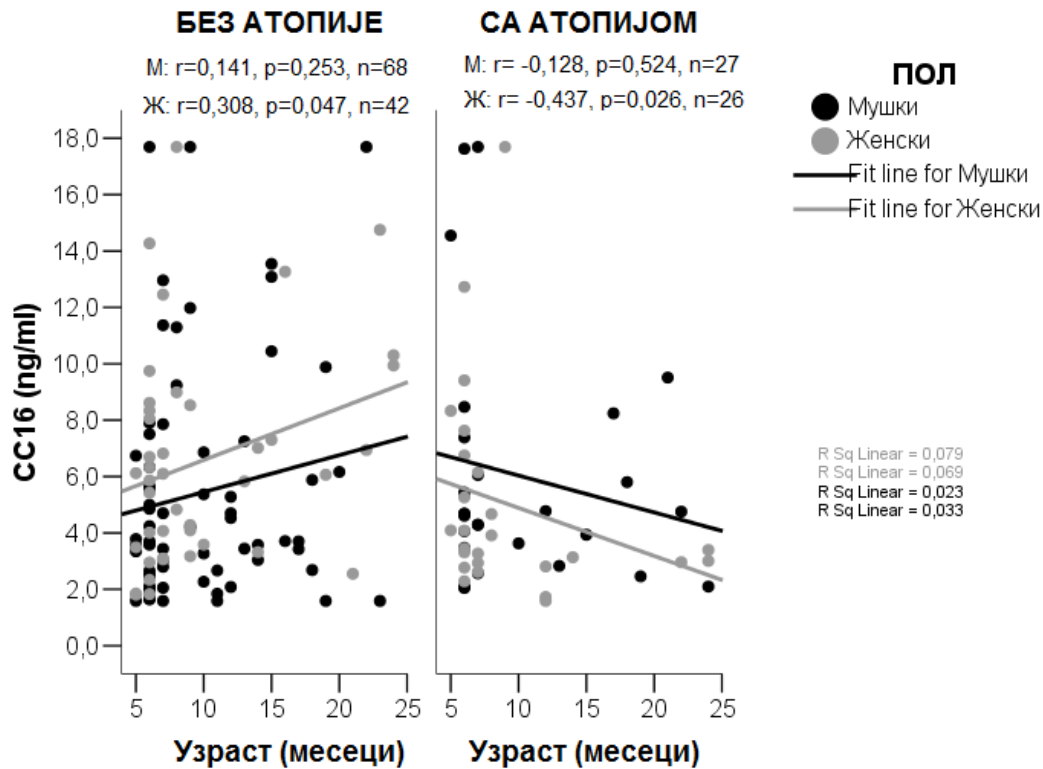


**Графикон 2.** Концентрација СС16 у серуму као маркер атопије код деце узраста 8-24 месеца. Концентрација СС16 у серуму може бити маркер атопије код деце узраста 8-24 месеца (area 0,661, CI95% 0,525-0,797) за  $cut\ off \leq 4,8 \text{ ng/ml}$ , сензитивност 80%, специфичност 54%.

У узрасту 5-7 месеци нема разлике у СС16 између деце са атопијом и без атопије ( $Md = 4,6$ ,  $n = 33$  vs  $Md = 3,9 \text{ ng/mL}$ ,  $n = 58$ ,  $p = 0,223$ ), док у старијем узрасту (8-24 месеца) деца са атопијом имају мање концентрације СС16 у серуму у односу на децу без атопије ( $Md = 3,5 \text{ ng/mL}$ , range 16,1, IQR 1,95,  $n = 20$  vs  $Md = 5,3 \text{ ng/mL}$ , range 16,1, IQR 6,4,  $n = 52$ ,  $p = 0,036$ ). ROC крива концентрација СС16 у односу на атопију код деце узраста 8-24 месеца приказана је на графикону 2.

## 4.1.2. СС16 и пол

У испитиваној групи није регистрована разлика у учесталости атопије у односу на пол (женска деца 38,2%,  $n=26/68$  vs мушка деца 28,4%,  $n=27/95$ ,  $p=0,187$ ). Повезаност концентрација СС16 у серуму и узраста код деце мушког и женског пола са и без атопије приказана је на графикаону 3.



**Графикон 3.** Повезаност узраста и концентрација СС16 у серуму код деце мушког и женског пола са и без атопије. Код деце женског пола са атопијом утврђено је статистички значајано смањење концентрације СС16 са старијим узрастом ( $p=0,026$ ) док је код женске деце без атопије постојало повећање СС16 са узрастом ( $p=0,047$ ). Код деце мушког пола није утврђена статистички значајна повезаност концентрација СС16 и узраста у односу на атопију, иако је такође постојао тренд смањења код дечака са атопијом, односно повећања код дечака без атопије.

Код женске деце са атопијом измерене су мање концентрације СС16 у односу на женску децу без атопије ( $p=0,031$ ) и то у узрасту 8-24 месеца ( $p=0,005$ ). У групи деце без атопије, дечаци имају мање концентрације СС16 у серуму у односу на девојчице без атопије ( $p=0,031$ ), табела 3. Мушка деца са атопијом у узрасту 5-7 месеци имају веће концентрације СС16 у односу на мушку децу без атопије, али та разлика није достигла статистичку значајност ( $Md=4,7\text{ng/ml}$ ,  $n=17$  vs  $Md=3,6\text{ng/ml}$ ,  $n=35$ ,  $p=0,076$ ), а у узрасту 8-24 месеца није било разлике у концентрацијама СС16 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 СС16 између деце са и без атопије (4,1 vs 5,9ng/ml,  $p=0,767$ ), док су у узрасту 8-24 месеца, женска деца са атопијом имала мање концентрације СС16 у односу на женску децу без атопије (Md=3,1ng/ml, range 16,1, IQR 1,6,  $n=10$  vs 6,9ng/ml, range 15,1, IQR 5,9,  $n=19$ ,  $p=0,005$ ).

Варијабла	Категорија	СС16 (ng/ml), Md (N)		Mann Whitney (p)
		Са атопијом	Без атопије	
Пол	Женски	3,4 (26)	6,1 (42)	<b>0,031</b>
	Мушки	4,7 (27)	3,7 (68)	0,253
<i>Mann Whitney (p)</i>		0,210	<b>0,031</b>	
Варијабла	Категорија	СС16 (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)	<b>0,005</b>
<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	

**Табела 3.** Концентрације СС16 у серуму у односу на атопију, пол и узраст. Женска деца са атопијом имају мање концентрације СС16 у серуму у односу на женску децу без атопије ( $p=0,031$ ), док у групи мушке деце није утврђена разлика у СС16 у односу на атопију ( $p=0,253$ ). У групи деце са атопијом није постојала статистички значајна разлика у концентрацијама СС16 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 веће концентрације СС16 (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,  $n=68$ ),  $p=0,031$ .

#### 4.1.3. СС16 и начин исхране

У групи деце узраста 5-7 месеци у тренутку испитивања је сисало 57,1% деце ( $n=52/91$ ), док је у узрасту 8-24 месеца то био случај у 23,6% деце ( $n=17/72$ ),  $p<0,001$ .

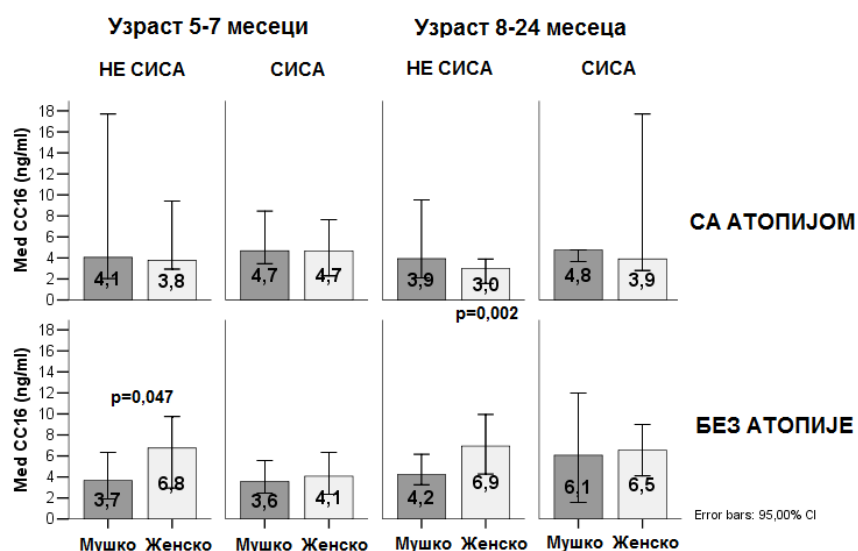
У групи деце која сисају ( $n=69$ ) између деце са атопијом ( $n=27$ ) и без атопије ( $n=42$ ) није утврђена статистички значајна разлика у концентрацијама СС16 у серуму ( $p=0,164$ ), ни у узрасту 5-7 месеци ( $p=0,132$ ), ни у узрасту 8-24 месеца ( $p=0,536$ ). У групи деце која не сисају у узрасту 5-7 месеци између деце са атопијом и без атопије није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији СС16 у серуму ( $p=0,648$ ), али су у групи деце која не сисају у узрасту 8-24 месеца, деца са атопијом имала мањи СС16 у односу на децу без атопије (3,0ng/ml, range 7,9, IQR 2,6, vs 5,1 ng/ml, range 16,1, IQR 6,6,  $p=0,023$ ) (табела 4).

Варијабла	Категорија	CC16 (ng/ml), Md (N)		Mann Whitney (p)
		Са атопијом	Без атопије	
<b>Исхрана</b>	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	
<b>Узраст</b>				
<b>Сиса</b>	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	
<b>Не сиса</b>	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	

**Табела 4.** Концентрације CC16 у серуму у односу на атопију по начину исхране и узрасту. Мања концентрација CC16 у серуму код деце са атопијом у односу на децу без атопије утврђена је у подгрупи деце која не сисају у узрасту 8-24 месеца ( $p=0,023$ ).

Разлика у концентрацији CC16 у серуму између деце са атопијом и деце без атопије у подгрупи деце која не сисају у узрасту 8-24 месеца утврђена је код женске деце (Са атопијом: 3,0ng/ml, range 2,3, IQR 1,8,  $n=6$  vs Без атопије: 6,9ng/ml, range 15,1, IQR 6,2,  $n=17$ ,  $p=0,002$ ), без разлике код мушке деце ( $p=0,755$ ).

У групи деце без атопије утврђено да мушка деца која не сисају у узрасту 5-7 месеци имају мању концентрацију CC16 у серуму (3,7ng/ml, range 6,3, IQR 4,3,  $n=16$ ) у односу на женску децу која не сисају у истом узрасту (6,8ng/ml, range 10,6, IQR 5,5,  $n=10$ ,  $p=0,047$ ), без статистички значајне разлике у групи деце без атопије која не сисају у узрасту 8-24 месеца ( $p=0,115$ ), графикон 4.



**Графикон 4.** Концентрације CC16 у серуму у односу на пол и атопију по начину исхране у различитим старосним категоријама. Женска деца са атопијом имају мање концентрације CC16 у серуму у односу на женску децу без атопије у групи деце која не сисају у узрасту 8-24 месеца ( $p=0,002$ ). Мушка деца без атопије имају мање концентрације CC16 у серуму у односу на женску децу без атопије у групи деце која не сисају у узрасту 5-7 месеци ( $p=0,047$ ).



## 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). У групи деце са алергијом у породици није утврђена разлика у концентрацији СС16 у серуму, али је податак о алергији мајке удружен са мањим концентрацијама СС16 код деце са атопијом у односу на децу без атопије ( $p=0,048$ ) (табела 5).

Варијабла	Категорија	СС16 (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
	Mann W. (p)	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
	Mann W. (p)	0,980	0,844	
Без алергије у породици	Мушко	5,8 (15)	3,6 (39)	<b>0,049</b>
	Женско	3,5 (12)	6,5 (24)	<b>0,053</b>
	Mann W. (p)	0,126	<b>0,008</b>	
<b>Члан породице са алергијом</b>				
Мајка	Да	3,4 (13)	4,3 (17)	<b>0,048</b>
	Не	4,6 (40)	4,7 (93)	0,816
	Mann W. (p)	0,102	0,535	
Отац	Да	4,3 (7)	4,8 (16)	0,720
	Не	4,1 (46)	4,6 (94)	0,494
	Mann W. (p)	0,511	0,997	
Браћа/сестре	Да	4,0 (4)	5,4 (15)	0,124
	Не	4,1 (49)	4,2 (95)	0,934
	Mann W. (p)	0,910	0,290	
<b>Респираторна алергијска болест у породици</b>				
Астма	Да	3,7 (8)	4,2 (17)	0,669
	Не	4,3 (45)	4,7 (93)	0,754
	Mann W. (p)	0,412	0,804	
Алергијски ринитис	Да	3,9 (17)	5,4 (15)	0,889
	Не	4,6 (36)	4,5 (95)	0,390
	Mann W. (p)	0,481	0,744	

**Табела 5.** Концентрације СС16 у серуму у односу на атопију и алергију у породици. У групи деце без алергије у породици мушка деца са атопијом су имала веће концентрације СС16 у односу на мушку децу без атопије ( $p=0,049$ ), док су женска деца са атопијом имала мање концентрације СС16 у односу на женску децу без атопије ( $p=0,053$ ). Међутим, постојање алергије мајке удружено је са мањим концентрацијама СС16 у серуму код деце са атопијом у односу на децу без атопије. Није утврђена разлика у концентрацијама СС16 између деце са атопијом и без атопије у односу на податак о респираторној алергијској болести у породици.

Мушка деца са атопијом имају веће концентрације СС16 у односу на мушку децу без атопије, само у групи деце без алергије мајке у узрасту 5-7 месеци (4,7 ng/ml, n=15 vs 3,6 ng/ml, n=31, p=0,058). У групи мушке деце са атопијом, податак о алергији мајке удружен је са мањим концентрацијама СС16 (3,4ng/ml, n=6) у односу на мушку децу која су имала атопију без алергије мајке (4,8ng/ml, n=21, p=0,042), док код девојчица са атопијом, ова разлика није постојала (алергија мајке: 3,4ng/ml, n=7 vs мајка без алергије: 3,4ng/ml, n=19, p=1,000). Женска деца са атопијом имају мање концентрације СС16 у серуму у односу на женску децу без атопије у узрасту 8-24 месеца, како и у групи без алергије мајке (3,1 vs 7,0ng/ml, p=0,045), тако и у групи са алергијом мајке (2,6 vs 6,5ng/ml, p=0,046).

Разлика у концентрацији СС16 између мушке и женске деце без атопије утврђена је само у подгрупи деце без алергије у породици (p=0,008) и то код деце која не сисају у узрасту 5-7 месеци и без податка су о алергији мајке (мушка деца: 3,7ng/ml, n=13 vs женска деца: 6,8ng/ml, n=9, p=0,021).

#### Логистичка регресија за индивидуалне карактеристике

Анализом главних компонената (PCA), којом су обухваћене карактеристике: узраст (0=5-7 месеци, 1=8-24 месеца); 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= >4,8ng/ml, 1= ≤4,8ng/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 СС16 ≤ 4,8ng/ml у детерминисаним категоријама (табела 6).

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 <sup>2</sup> = 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 <sup>2</sup> = 0,105-0,140	<b>Атопија</b>	<b>1,62</b>	<b>0,64</b>	<b>6,48</b>	<b>0,011</b>	<b>5,07</b>	<b>1,45-17,68</b>
		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	

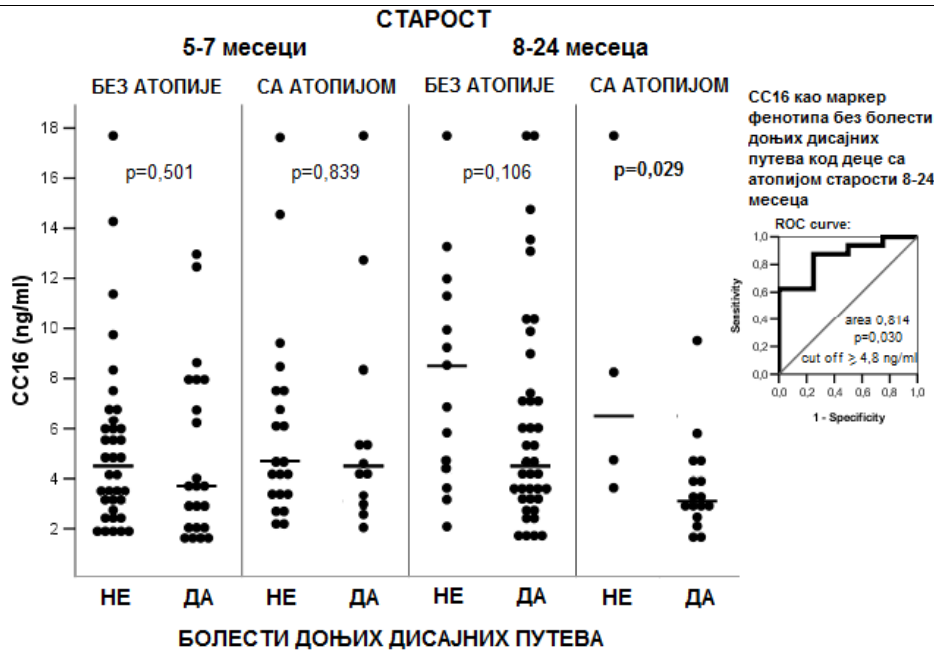
Пол	Модел	Варијабле	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95% CI
Женска деца	В 0,00, Wald 0,0, Exp(B) 1,0 c2(2,68)=6,5, p=0,038 r <sup>2</sup> = 0,092-0,122	Атопија	<b>1,32</b>	<b>0,53</b>	<b>6,07</b>	<b>0,014</b>	<b>3,73</b>	<b>1,31-10,6</b>
		Узраст	0,22	0,52	0,19	0,666	1,25	0,45-3,45
		Constant	-0,59	0,40	2,17	0,141	0,56	
Мушка деца	В 0,45, Wald 4,6, Exp(B) 1,6 c2(2,95)=0,3, p=0,854 r <sup>2</sup> = 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	В 0,67, Wald 5,2, Exp(B) 1,9 c2(2,53)=3,1, p=0,208 r <sup>2</sup> = 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	В 0,07, Wald 0,15, Exp(B) 1,1 c2(2,110)=6,7, p=0,036 r <sup>2</sup> = 0,059-0,079	Узраст	-0,48	0,40	1,50	0,221	0,62	0,28-1,34
		Мушки пол	<b>0,93</b>	<b>0,41</b>	<b>5,24</b>	<b>0,022</b>	<b>2,54</b>	<b>1,14-5,64</b>
		Constant	-0,27	0,36	0,57	0,448	0,76	

**Табела 6.** Индивидуалне карактеристике као предиктори концентрације СС16 у серуму  $\leq 4,8\text{ng/ml}$ . Атопија повећава вероватноћу да дете има СС16  $\leq 4,8\text{ng/ml}$  у групи деце узраста 8-24 месеца за 5х и у групи женске деце за 3,7х. У групи деце без атопије, мушки пол је удружен са 2,5х већим ризиком од постојања малих концентрација СС16 у серуму.

#### 4.2. СС16 и болести доњих дисајних путева у односу на атопију

У испитиваној групи деце 54,6% деце је имало бар једну болест доњих дисајних путева (n=89/163), без разлике по атопији (p=0,753). 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 (2х vs 2х, 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).

На графикону 5 приказане су концентрације СС16 у односу на атопију и болести доњих дисајних путева по узрастним категоријама. Деца са атопијом и болестима доњих дисајних путева у узрасту 8-24 месеца имала су мањи СС16 (3,07ng/ml, range 7,92, IQR 1,94, n=16) у односу на децу без атопије са болестима доњих дисајних путева у истом узрасту (4,53ng/ml, range 16,1, IQR 4,03, n=39), Mann-Whitney p=0,026.



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	

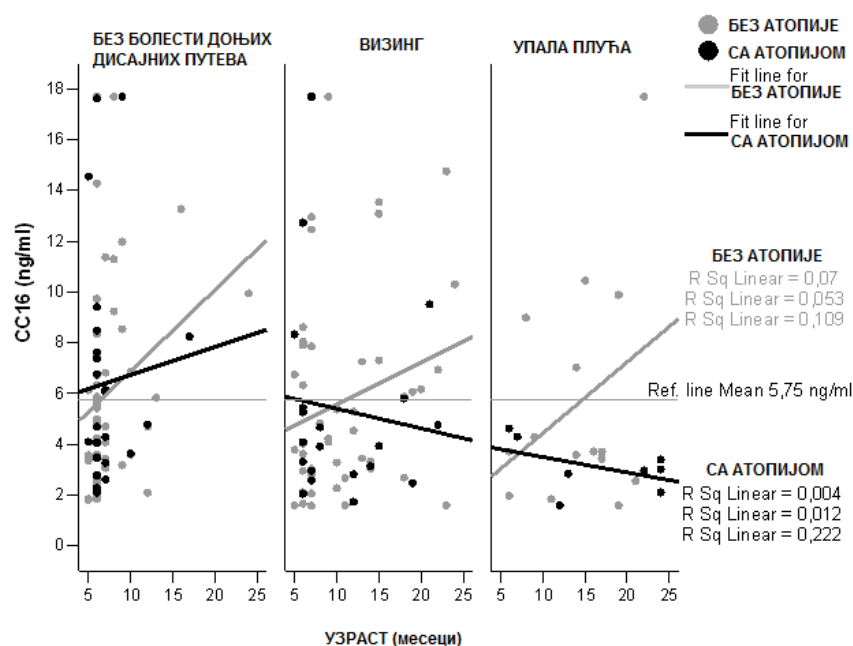
СТАРОСТ	БОЛЕСТИ ДОЊИХ ДИСАЈНИХ ПУТЕВА	СА АТОПИЈОМ Md (n)	БЕЗ АТОПИЈЕ Md (n)	Mann Whitney p
5-7 месеци	Укупно	4,61 (33)	3,90 (58)	0,223
	ДА	4,45 (12)	3,66 (22)	0,292
	НЕ	4,68 (21)	4,47 (36)	0,418
	Mann Whitney p	0,839	0,501	
8-24 месеца	Укупно	3,51 (20)	5,33 (52)	0,036
	ДА	3,07 (16)	4,53 (39)	0,026
	НЕ	6,51 (4)	8,53 (13)	0,956
	Mann Whitney p	0,029	0,106	

**Графикон 5.** Концентрација CC16 у серуму као маркер фенотипа без болести доњих дисајних путева код деце са атопијом старости 8-24 месеца. Деца са атопијом и болестима доњих дисајних путева у узрасту 8-24 месеца имала су мањи CC16 (3,07ng/ml) у односу на децу са атопијом без болести доњих дисајних путева у истом узрасту (6,51ng/ml, range 14.6, IQR 11.4, n=4), Mann-Whitney p=0,029, па концентрације CC16 у серуму  $\geq$ 4,8ng/ml указују на фенотип без болести доњих дисајних путева код деце са атопијом старости 8-24 месеци (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 (p=0,839).

Није постојала повезаност између концентрације CC16 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).

## 4.2.1. CC16 код деце са различитим болестима доњих дисајних путева

На графикону 6 приказане су концентрације CC16 у серуму у категоријама деце 0=без болести доњих дисајних путева, 1=са визингом (J20,J21,J44.9,J45), 2=са упалом плућа (J12-18).

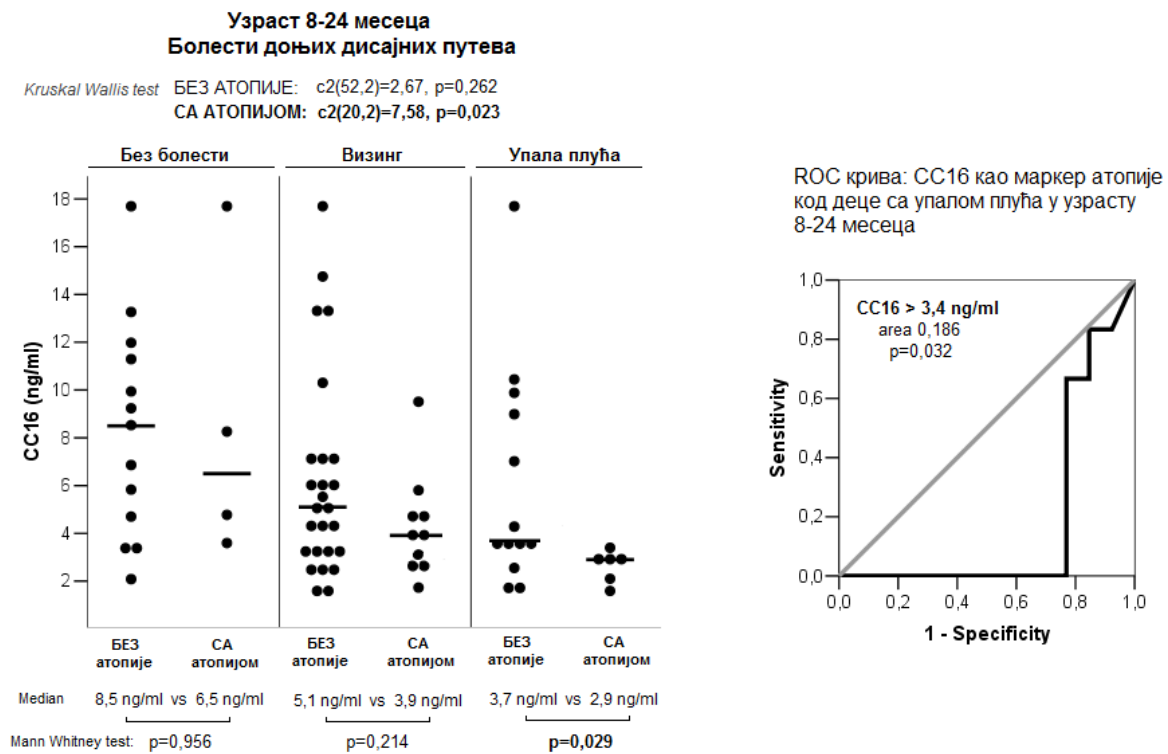


**Графикон 6.** Концентрације CC16 у серуму код деце са и без атопије и са различитим болестима доњих дисајних путева у односу на узраст. Статистички значајан пораст концентрације CC16 у серуму утврђен у групи деце без атопије која нису испољила болести доњих дисајних путева ( $r=0,354$ ,  $p=0,013$ ,  $n=49$ ), али је тенденција повећања утврђена и код деце без атопије која су испољила болести доњих дисајних путева. У групи деце са атопијом која су предходно испољила болести доњих дисајних путева постоји тенденција смањења CC16 са узрастом, али без статистичке значајности ( $r= -0,289$ ,  $p=0,136$ ,  $n=28$ ).

У групи деце са атопијом која су испољила болести доњих дисајних путева статистички значајна негативна корелација концентрација CC16 и узраста утврђена је само код женске деце ( $r= -0,602$ ,  $p=0,018$ ,  $n=15$ ) и то у подгрупи женске деце са атопијом и са предходно испољеним визингом ( $r= -0,734$ ,  $p=0,010$ ,  $n=11$ ).

На графикону 7 приказане су разлике у концентрацијама CC16 у серуму између деце са и без атопије која су у узрасту 8-24 месеци испољила различите врсте болести доњих дисајних путева. У групи деце без атопије није постојала статистички значајна разлика у CC16 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 ( $p=0,975$ ). Анализа разлике концентрација СС16 између деце са атопијом и без атопије показала је статистичку значајност само код деце узраста 8-24 месеца која су имала упалу плућа, 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,  $p=0,442$ ).

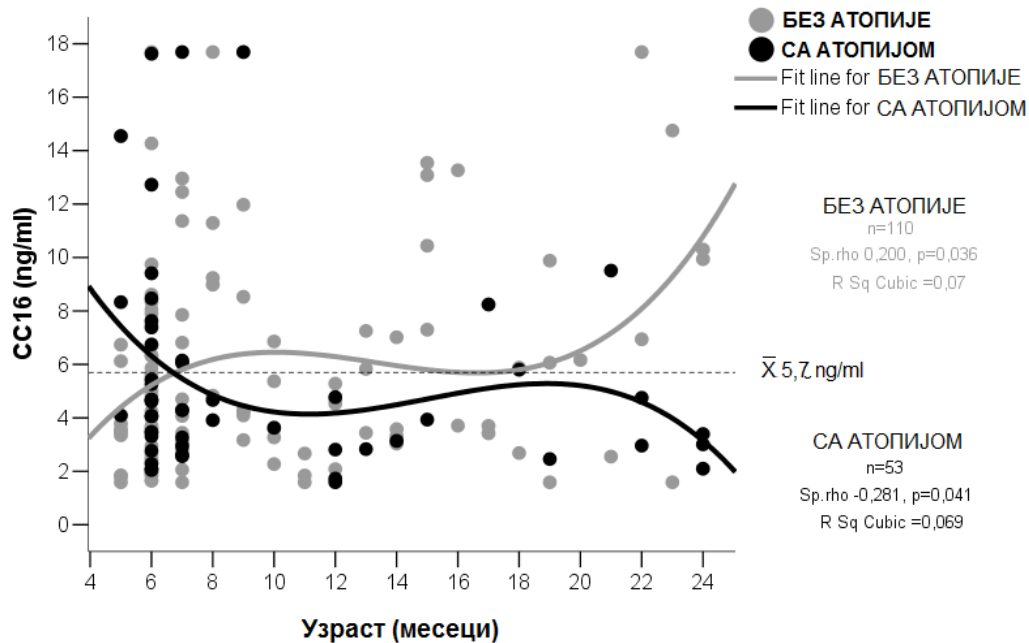


**Графикон 7.** Концентрације СС16 у односу на атопију у различитим болестима доњих дисајних путева. У групи деце старости 8-24 месеца са предходно манифестованом упалом плућа, деца са атопијом имала су мањи СС16 (2,9ng/ml, range 1,81, IQR 1,13, n=6), у односу на децу без атопије (3,7ng/ml, range 16,1, IQR 6,45, n=13), Mann Whitney  $p=0,029$ . Концентрација СС16 у серуму  $\leq 3,4$ 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 мале концентрације СС16 серуму ( $\leq 3,4$ 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  $\geq 8$  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 ( $p=0,272$ ). Деца са атопијом су имала концентрације СС16 у серуму  $\leq 3,4\text{ng/ml}$  у узрасту  $\geq 11$  месеци (сензитивност 53%, специфичност 82%,  $\text{area } 0,700$ ), док је у групи деце са атопијом и СС16  $\leq 3,4\text{ng/ml}$  упала плућа испољена  $\geq 20,5$  месеци (сензитивност 67%, специфичност 100%,  $\text{area } 0,936$ ).

Кубично интерполиране криве тренда корелације концентрације СС16 у серуму и узраста приказане су на графикону 8.

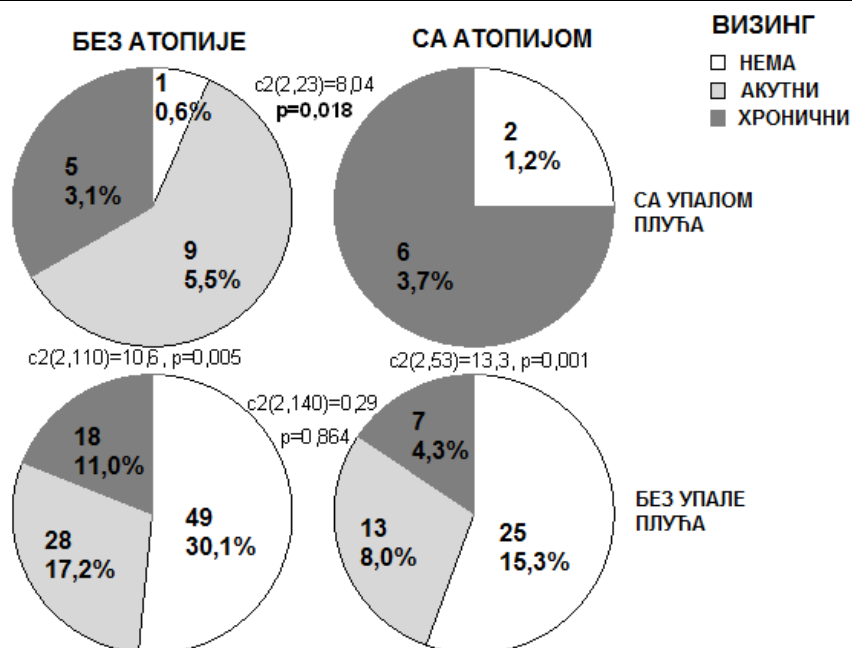


**Графикон 8.** Кубично интерполиране криве тренда корелације концентрација СС16 у серуму у односу на узраст код деце са и без атопије. У узрасту од 5 месеци деца са атопијом имала су веће концентрације СС16 у серуму у односу на децу без атопије ( $p=0,036$ ), без разлике у узрасту од 6 месеци ( $p=0,533$ ) и 7 месеци ( $p=0,815$ ), док је у узрасту  $\geq 8$  месеци утврђена нижа концентрација СС16 у серуму код деце са атопијом у односу на децу без атопије, у групи са предходно испољеним болестима доњих дисајних путева ( $p=0,026$ ) и то упале плућа ( $p=0,029$ ).

#### 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.



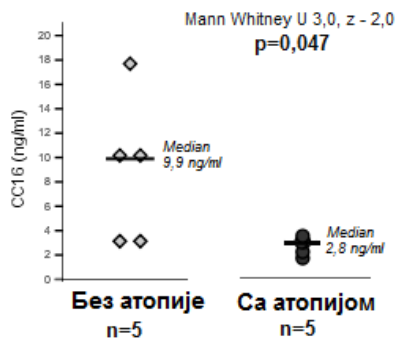
Варијабла	Категорија	СА АТОПИЈОМ, n=53			БЕЗ АТОПИЈЕ, n=110		
		Упала плућа		p	Упала плућа		p
		ИМА n=8	НЕМА n=45		ИМА n=15	НЕМА n=95	
ВИЗИНГ	Хронични	75% (6)	15,6% (7)	<b>0,001</b>	33,3% (5)	18,9% (18)	<b>0,005</b>
	Акутни	0 (0)	28,9% (13)		60% (9)	29,5% (28)	
	Без визинга	25% (2)	55,6% (25)		6,7% (1)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

**Графикон 9.** Разлике у дистрибуцији акутног и хроничног визинга у односу на упалу плућа између деце са атопијом и без атопије. У групи деце са упалом плућа, деца са атопијом у односу на децу без атопије имала су чешће хронични визинг (75% vs 33%), а ређе акутни визинг (0 vs 60%), док у групи деце без упале плућа није утврђена разлика у учесталости различитих типова визинга (p=0,864).

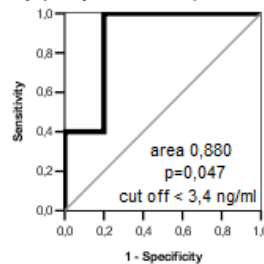
Деца са атопијом, упалом плућа и хроничним визингом имају мању концентрацију СС16 у серуму у односу на децу без атопије са истим фенотипом (p=0,068), али је та разлика била статистички значајна само у узрасту 8-24 месеци (са атопијом : 2,8ng/ml, range 1,81, IQR 1,34, n=5 vs без атопије: 9,9ng/ml, range 15,1, IQR 10,9, n=5, p=0,047), графикон 10. Групу деце са атопијом, СС16 ≤ 3,4ng/ml, податак о упали плућа и хроничном визингу (n=5) дефинисали смо као “алергијска БХР са малом концентрацијом СС16 у серуму у узрасту до две године“.



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



ROC крива: CC16 као маркер атопије код деце са упалом плућа и хроничним визингом у узрасту 8-24 месеца



## Графикон 10.

Концентрације CC16 у серуму код деце са упалом плућа и хроничним визингом у односу на атопију. Концентрација CC16 у серуму  $\leq 3,4$  ng/ml може бити маркер атопије код деце са упалом плућа и хроничним визингом у узрасту 8-24 месеца (сензитивност 100%, специфичност 80%).

Ова деца су у односу на децу са атопијом и другим врстама болести доњих дисајних путева (n=23):

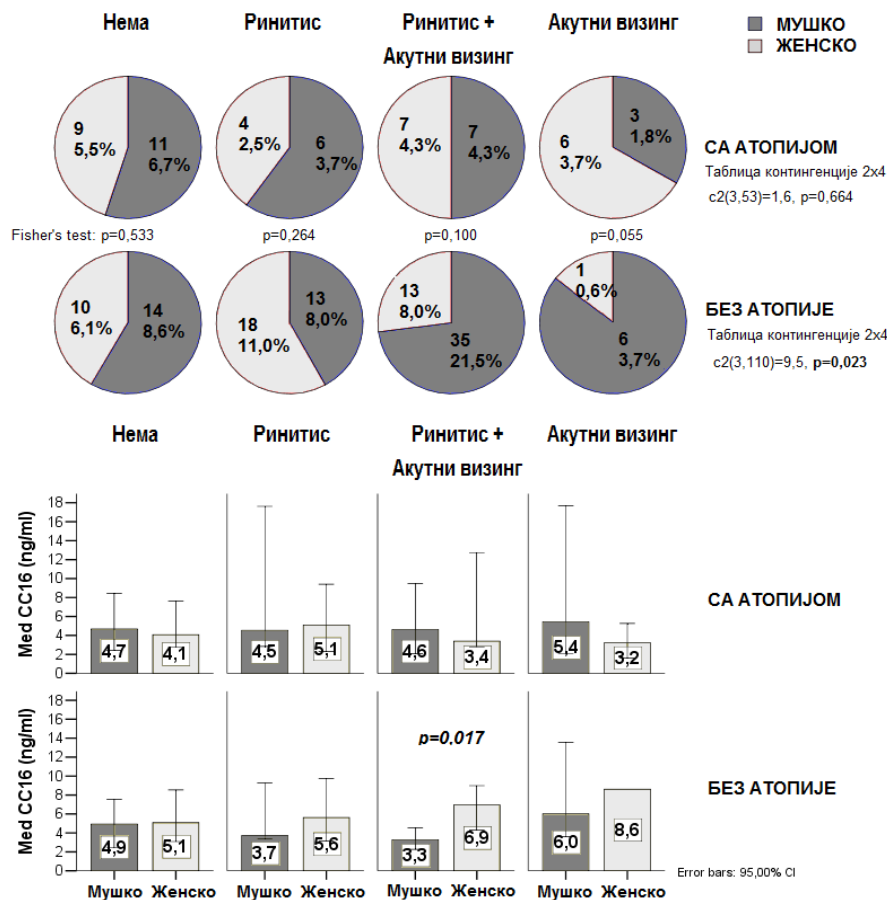
- Старија (22 vs 7 месеци, Mann Whitney  $p=0,013$ , area 0,848, за *cut off*  $\geq 12,5$  месеци сензитивност 80%, специфичност 70%, за *cut off*  $\geq 21,5$  месеци сензитивност 60%, специфичност 91%)
- Са првом болешћу доњих дисајних путева у старијем узрасту (9 vs 5 месеци, Mann Whitney  $p=0,039$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

Деца са “алергијском БХР и малом концентрацијом CC16 у серуму 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 “БХР са малом концентрацијом CC16 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 сисају (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

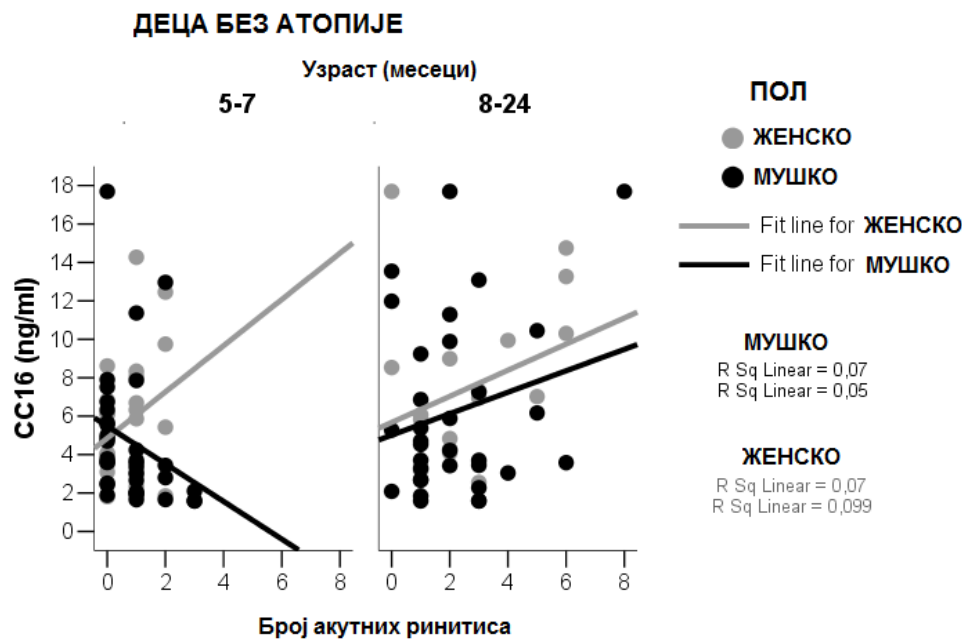
Акутни ринитис је чешће дијагностикован код деце без атопије у односу на децу са атопијом (71,8%,  $n=79/110$  vs 45,3%,  $n=24/53$ ,  $p=0,001$ ), и у групи мушке деце (70,6%,  $n=48/68$  vs 48,1%,  $n=13/27$ ,  $p=0,040$ ) и у групи женске деце (73,8%,  $n=31/42$  vs 42,3%,  $n=11/26$ ,  $p=0,009$ ). 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), графикон 11.



**Графикон 11.** Учесталост ринитиса и акутног визинга у односу на пол код деце са и без атопије. 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%,  $n=35/42$ ,  $p=0,100$ ). Разлика у СС16 између полова утврђена је само у категорији деце без атопије која су испољила акутни визинг удружен са ринитисом ( $p=0,017$ ), а разлика је била значајна у подгрупи деце без алергије у породици (Мушко: 2,9ng/ml,  $n=22$  vs Женско: 8,5ng/ml,  $n=6$ ,  $p=0,017$ ), као и у подгрупи без хроничног визинга и/или упале плућа (Мушко: 2,7ng/ml,  $n=18$  vs Женско: 6,9ng/ml,  $n=5$ ,  $p=0,012$ ).

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 статистички значајна разлика у учесталости акутног визинга у односу на атопију ( $p=0,172$ ).

У групи мушке деце без атопије старости 5-7 месеци, број ринитиса негативно корелише са СС16 ( $p=0,004$ ) (графикон 12) и позитивно са бројем болести доњих дисајних путева и то акутног визинга ( $r=0,369$ ,  $p=0,029$ ,  $n=35$ ).

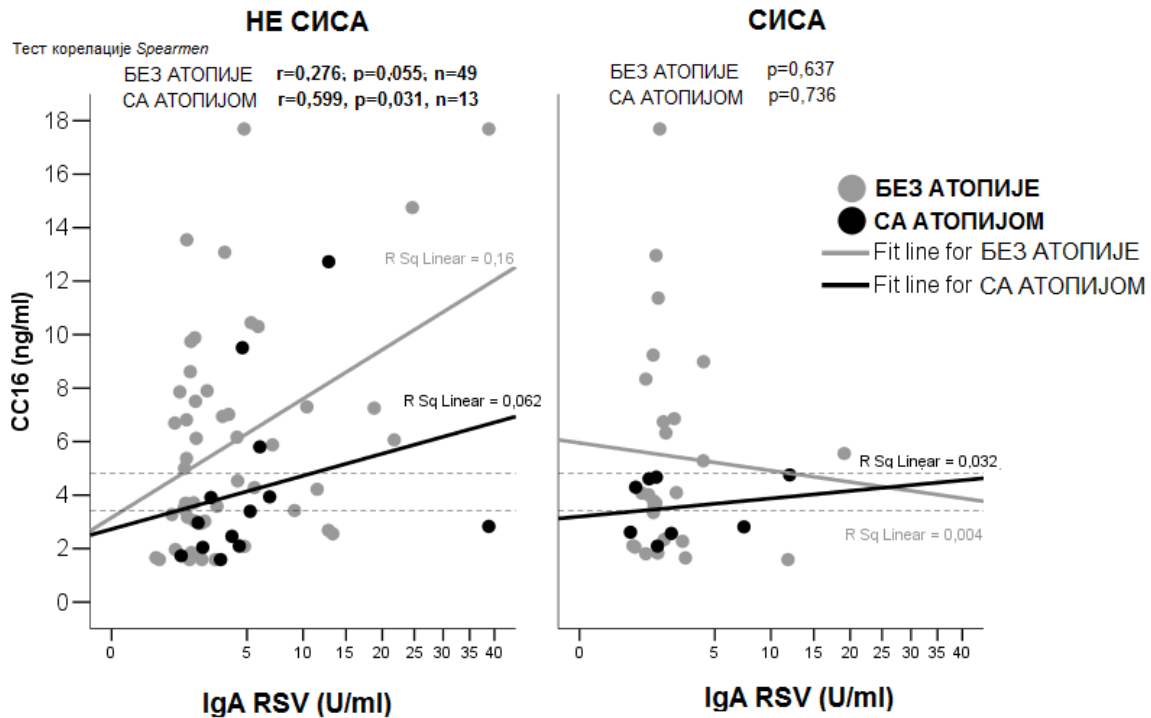


**Графикон 12.** Повезаност СС16 и броја акутних ринитиса у групи деце без атопије по полу и узрасту. У групи мушке деце без атопије старости 5-7 месеци, број ринитиса негативно корелише са СС16 ( $r= -0,474$ ,  $p=0,004$ ,  $n=35$ ) док у групи женске деце узраста 5-7 месеци није утврђена корелација 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 ( $p=0,241$ ). 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 CC16 са хуморалним одговором према RSV

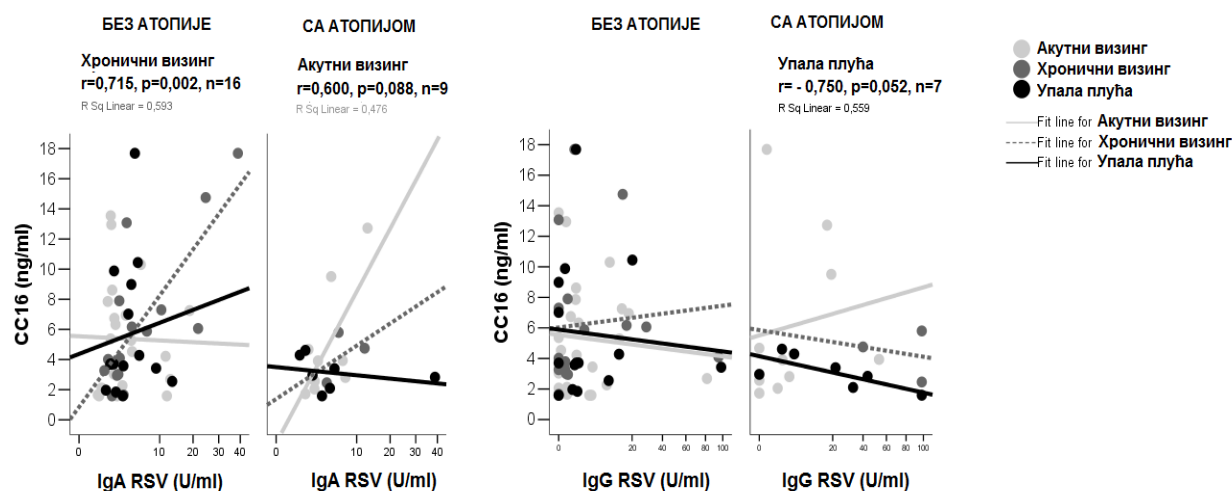
Повезаност концентрација CC16 у серуму са концентрацијама IgA према RSV приказана је на графикону 13. У групи деце која сисају није утврђена повезаност између концентрација CC16 и IgA према RSV, док је у групи деце која су престала са сисањем утврђено повећање CC16 са порастом IgA према RSV.



**Графикон 13.** Повезаност концентрације CC16 и IgA према RSV у серуму.

Код деце која не сисају утврђена је позитивна корелација између концентрација CC16 у серуму и IgA према RSV и у групи деце са атопијом ( $p=0,031$ ) и у групи деце без атопије ( $p=0,055$ ). У групи деце која сисају није било повезаности концентрације CC16 и IgA према RSV у серуму ни у групи деце са атопијом, ни у групи деце без атопије.

Повезаност концентрације CC16 у серуму са IgA и IgG према RSV у групи деце са и без атопије у односу на различите врсте болести доњих дисајних путева приказана је на графикону 14.



**Графикон 14.** Повезаност концентрација CC16 са IgA, IgG према RSV у односу на врсту болести доњих дисајних путева. Повећање концентрација CC16 у серуму удружено је са порастом IgA према RSV у групи деце без атопије са хроничним визингом и у групи деце са атопијом са акутним визингом, док је пораст IgG према RSV код деце са атопијом која су имала упалу плућа праћен смањењем концентрација CC16 у серуму.

У групи деце без атопије која имају податак о алергији мајке, IgG према RSV такође негативно корелише са CC16 ( $r = -0,552$ ,  $p = 0,051$ ,  $n = 13$ ).

#### 4.3. Повезаност CC16 са биомаркерима ТН2 одговора и имунорегулације

Статистички параметри испитиваних биомаркера приказани су у табели 7.

Parametri	CC16 (ng/ml)	tIgE (kU/L)	ECP (ug/L)	TNF $\alpha$ (pg/ml)	TSLP (pg/ml)	IL10 (pg/ml)	TGFb1 (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

**Табела 7.** Статистички параметри испитиваних биомаркера

## 4.3.1. Испитивани биомаркери код деце са болестима доњих дисајних путева

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

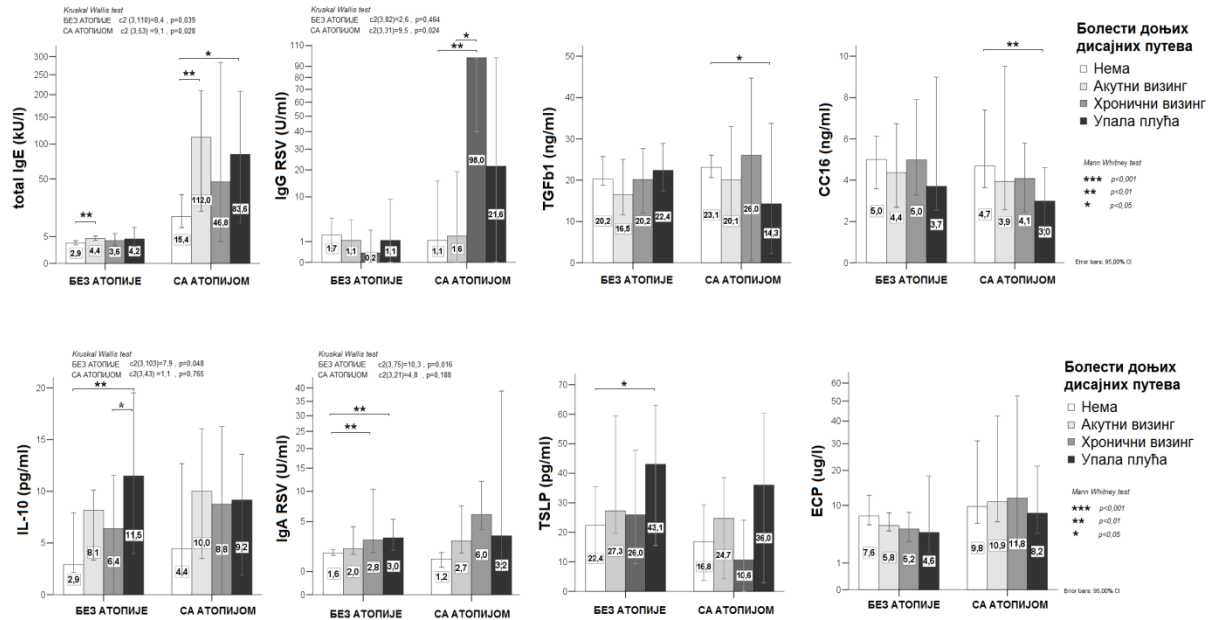
Болести доњих дисајних путева	Атопија	CC16	tIgE	ECP	TNF $\alpha$	TSLP	IL10	TGF $\beta$ 1	RSV (U/ml)	
		(ng/ml)	(kU/l)	(ug/l)	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)	(ng/ml)	IgA	IgG
Без болести	СА	4,7 (25)	15,4 (25)	9,8 (22)	0,0 (9)	16,8 (13)	4,4 (21)	23,1 (21)	1,2 (2)	1,1 (11)
	БЕЗ	5,0 (49)	2,9 (49)	7,6 (48)	0,0(21)	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>

**Табела 8.** Разлике у концентрацијама испитиваних биомаркера у односу на атопију. У групи деце **без болести доњих дисајних путева** деца са атопијом имала су веће концентрације укупних IgE (*cut off*  $\geq 5,7$  kU/l, сензитивност 96%, специфичност 94%, area 0,965), док је у групи деце **са болестима доњих дисајних путева** атопија удружена са већим концентрацијама укупних IgE (*cut off*  $\geq 27,4$  kU/l, сензитивност 71%, специфичност 100%, area 0,942), ECP-а (*cut off*  $\geq 9,1$   $\mu$ g/l, сензитивност 65%, специфичност 76%, area 0,694) и IgG према RSV (*cut off*  $\geq 16,1$  U/ml, сензитивност 50%, специфичност 87%, area 0,690). Деца **са атопијом** која су испољила болести доњих дисајних путева у односу на децу са атопијом без ових болести, осим мањег 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 концентрације укупних IgE ( $p=0,004$ ), TSLP ( $p=0,053$ ), IL-10 ( $p=0,046$ ), IgA према RSV ( $p=0,005$ ) уз мање концентрације ECP-а ( $p=0,051$ ).

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 (67,1kU/l, range 205,7, IQR 95,7,  $n=12$  vs 3,8kU/l, range 3,5, IQR 2,7,  $n=22$ ;  $p<0,001$ ) имала и мање концентрације TSLP (14,8pg/ml, range 20,3, IQR 21,2,  $n=9$  vs 28,4pg/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 (108,5kU/l, range 477,1, IQR 171,2  $n=16$  vs 4,8kU/l, range 23,9, IQR 6,5,  $n=39$ ;  $p<0,001$ ) утврђена већа концентрација ECP (9,6  $\mu$ g/l, range 38,7, IQR 12,1,  $n=11$  vs 4,9 $\mu$ g/l, range 26,1, IQR 7,2,  $n=37$ ;  $p=0,051$ ) и IgG према RSV (27,1U/ml, range 98, IQR 62,9,  $n=14$  vs 1,3U/ml, range 98, IQR 14,3,  $n=37$ ;  $p=0,020$ ), а нижа концентрација CC16 (3,1ng/ml, range 7,9, IQR 1,9,  $n=16$  vs 4,5ng/ml, range 16,1, IQR 4,0,  $n=39$ ;  $p=0,026$ ).

## 4.3.1.1. Биомаркери и различите болести доњих дисајних путева

Разлике у концентрацијама испитиваних биомаркера у односу на врсту болести доњих дисајних путева у групи деце са и без атопије приказане су на графикаону 15.



**Графикон 15.** Биомаркери у односу на врсту болести дисајних путева.

У групи деце са атопијом, деца са акутним визингом у односу на децу без болести доњих дисајних путева, имају већи укупни IgE (112,0kU/l, range 481,8, IQR 139,2, n=13 vs 15,4kU/l, range 483,9, IQR 31,6, n=25, p=0,008), деца са хроничним визингом имају већи IgG према RSV (98,0U/ml, range 58,0, n=3) у односу на децу без болести доњих дисајних путева (1,1U/ml, range 28,3, IQR 8,9, n=11, p=0,005) и у односу на децу са акутним визингом (1,6U/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 $\alpha$  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 (83,6kU/l, range 196,3, IQR 177,7, n=8 vs 15,4kU/l, n=25, p=0,044), а мање концентрације TGFb1 (14,3ng/ml, range 31,5, IQR 15,0, n=8 vs 23,1ng/ml, range 33,1, IQR 7,5, n=21, p=0,047) и CC16 (3,0ng/ml, range 3,0, IQR 1,8, n=8 vs 4,7ng/ml, range 15,6, IQR 4,5, n=25, p=0,010).

У групи деце без атопије, у односу на децу без болести доњих дисајних путева, деца са акутним визингом су имала веће концентрације укупних IgE (4,4kU/l, range 23,6, IQR 2,6, n=28 vs 2,9kU/l, range 10,0, IQR 2,2, n=49, p=0,006), деца са хроничним визингом веће концентрације IgA према RSV (2,8U/ml, range 37,8, IQR 7,8, n=16 vs 1,6U/ml, range 18,1, IQR 0,5, n=22, p=0,005), а деца са упалом плућа веће концентрације IL-10 (11,5pg/ml, range 28,9, IQR 15,6, n=15 vs 2,9pg/ml, range 27,0, IQR 11,8, n=44, p=0,010), TSLP (43,1pg/ml, range 103,0, IQR 46,0, n=13 vs 22,4pg/ml, range 171,3, IQR 34,7, n=38, p=0,046), TNF $\alpha$  (4,2pg/ml, range 10,2, IQR 8,7, n=9 vs 0,0, range 11,3, IQR 3,4, n=21, p=0,040) и IgA према RSV (3,0U/ml, range 12,2, IQR 3,5, n=15 vs 1,6U/ml, range 18,1, IQR 0,5, n=22, p=0,004); и у односу на децу са хроничним визингом већи IL-10 (6,4pg/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 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 повезаност између IgA према RSV и IL-10 ( $r= -0,309$ ,  $p=0,244$ ,  $n=16$ ).

У групи деце са атопијом маркер испољавања акутног визинга је укупни IgE  $\geq 63,5kU/l$  (сензитивност 77%, специфичност 84%, area 0,758); хроничног визинга IgG према RSV  $\geq 34,1U/ml$ , сензитивност 100% специфичност 100%, area 1,000); а упале плућа: укупни IgE  $\geq 67,0kU/l$  (сензитивност 63%, специфичност 84%, area 0,740), TGF $\beta$ 1  $\leq 17,8ng/ml$  (сензитивност 75%, специфичност 90%, area 0,744) и CC16  $\leq 3,4 ng/ml$  (сензитивност 75%, специфичност 71%, area 0,753). Нижи TGF $\beta$ 1 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 (7,5pg/ml,  $n=2$  vs 23,1pg/ml,  $n=21$ ,  $p=0,016$ ; ROC крива: area 0,976, cut off  $\leq 13,5ng/ml$ , сензитивност 100%, специфичност 95%), без статистички значајне разлике у узрасту ( $p=0,091$ ).

У групи деце без атопије, маркер испољавања акутног визинга је укупни IgE  $\geq 3,7kU/l$  (сензитивност 71,4% специфичност 65%, area 0,688); хроничног визинга IgA према RSV  $\geq 2,1U/ml$  (сензитивност 75% специфичност 86%, area 0,763); а упале плућа IL-10  $\geq 3,9pg/ml$  (сензитивност 80% специфичност 59%, area 0,723), TSLP  $\geq 41,2pg/ml$  (сензитивност 54% специфичност 79%, area 0,687), TNF $\alpha$   $\geq 0,15pg/ml$  (сензитивност 89%, специфичност 67%, area 0,741), IgA према RSV  $\geq 2,0U/ml$  (сензитивност 67% специфичност 86%, area 0,776).

#### 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:

- **укупних IgE** ( $F(1,109)=4,8$ , adj  $r^2$  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  $r^2$  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



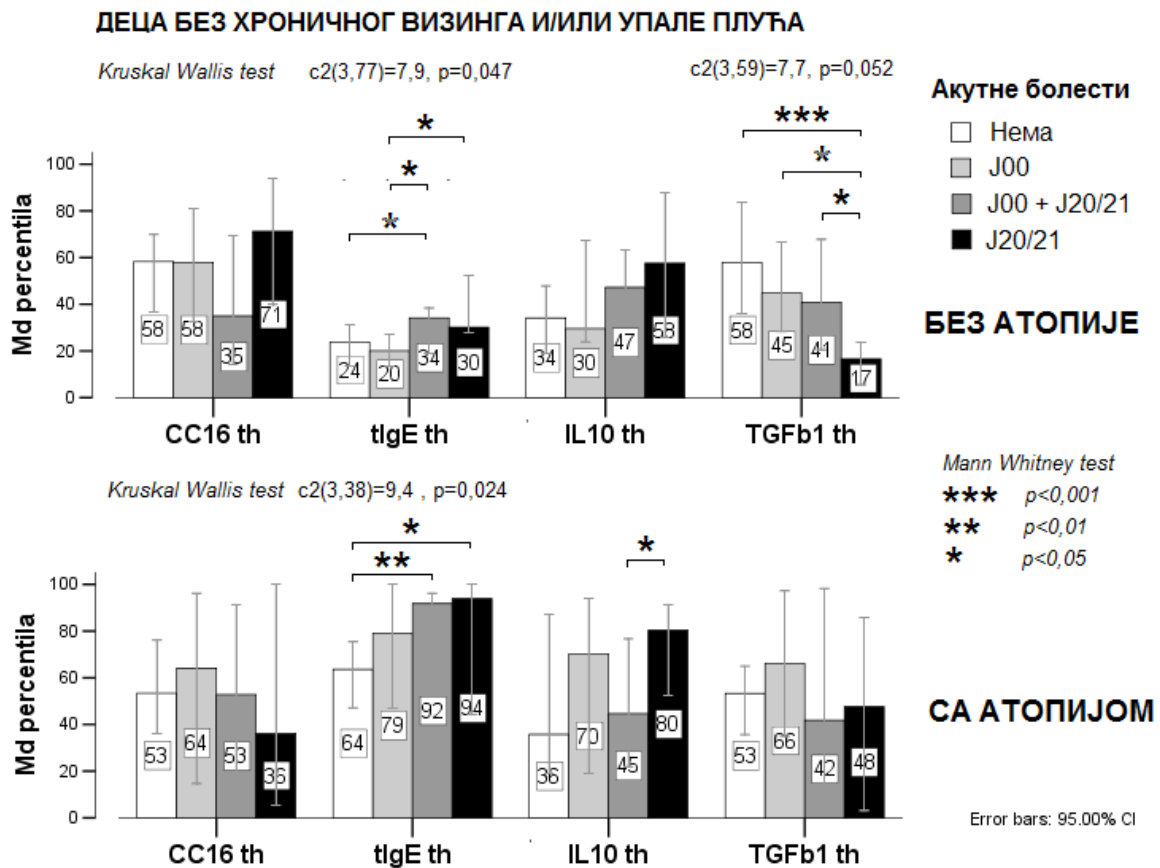
- акутних бронхијалних болести, ( $p=0,036$ ,  $B 1,2$ ,  $CI95\% 0,08-2,35$ ) унутар групе деце са хроничним визингом ( $F(1,17)=6,5$ ,  $adj 0,244$ ;  $p=0,021$ ,  $B 2,3$ ,  $CI95\% 0,39-4,23$ ), и
- **IL-10** ( $F(1,102)=7,0$ ,  $adj r^2 0,056$ ,  $p=0,009$ ;  $B 1,3$ ,  $SE 0,48$ ,  $beta 0,255$ ,  $t 2,7$   $CI95\% 0,3-2,2$  и то са већим бројем
  - акутних ринитиса ( $F(1,102)=7,1$ ,  $adj r^2 0,057$ ,  $p=0,009$ ;  $B 1,2$ ,  $SE 0,44$ ,  $beta 0,257$ ,  $t 2,7$   $CI95\% 0,3-2,1$ ) 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 респираторном болешћу расту концентрације:

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

#### 4.3.1.3. Коморбидитет акутног ринитиса и акутног визинга

Анализа биомаркера у односу на категорије коморбидитета акутног ринитиса (J00) и акутног визинга (J20/21), код деце која нису испољила хронични визинг и/или упалу плућа (без атопије  $n=77$ ; са атопијом  $n=38$ ) показала је да осим разлика у укупном IgE, код деце без атопије постоји разлика у концентрацији TGF $\beta$ 1, а код деце са атопијом у концентарцији IL-10 (графикон 16).



**Графикон 16.** Разлике у имунорегулаторним цитокинима у односу на испољавање акутних респираторних болести.

Деца без атопије која имају само акутни визинг без ринитиса имају мањи TGFβ1 (12,1ng/ml, range 11,1, IQR 8,8, n=6) у односу на децу са удруженим ринитисом и акутним визингом (18,8ng/ml, range 34,7, IQR 18,3, n=48,  $p=0,049$ ), ринитисом без визинга (19,8ng/ml, range 31,1, IQR 12,0, n=18,  $p=0,050$ ) и деце без ових болести (23,5ng/ml, range 27,0, IQR 13,9, n=14,  $p=0,001$ ) па TGFβ1 ≤14,5ng/ml може бити маркер испољеног акутног визинга без ринитиса у групи деце без атопије (сензитивност 100%, специфичност 84%, area 0,859). Деца са атопијом која су испољила ринитис и акутни визинг имала су мање концентрације IL-10 (6,0pg/ml, range 12,2, IQR 7,9, n=6) у односу на децу са атопијом која су испољила акутни визинг без ринитиса (14,2pg/ml, range 9,8, IQR 7,8, n=5,  $p=0,030$ ).

Концентрације CC16 у серуму 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 (2,7ng/ml, n=18, range 11,4, IQR 2,8 vs 6,0ng/ml, n=4, range 9,9, IQR 7,8; p=0,050).

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 $\alpha$  (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 варијабли и издвојили главне факторе унутар којих долази до груписања испитиваних варијабли у популацији деце узраста 5 до 24 месеца, применили смо РСА. 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.

Назив фактора	Главне компоненте							
	1	2	3	4	5	6	7	8
% заједничке варијансе	17,8 %	12,8 %	10,5 %	9,2 %	8,2 %	7,2 %	6,3%	5,4%
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		
<b>СС16 (ng/ml)</b>		<b>0,366</b>	<b>-0,333</b>			<b>0,398</b>		
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 $\alpha$ (pg/ml)				0,463				-0,531

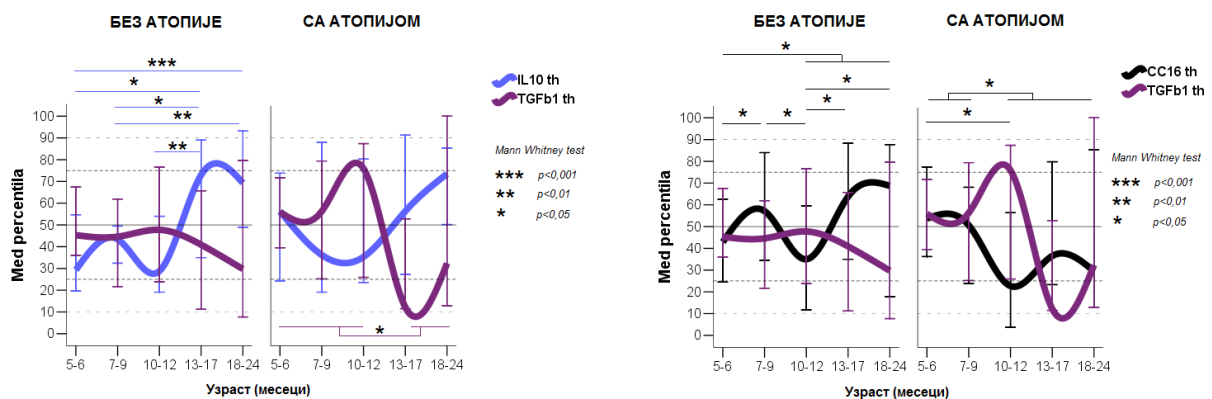
**Табела 9.** Анализа главних компонената у популацији здраве деце узраста 5-24 месеца.

У анализи главних компонената концентрација СС16 у серуму је карактеристика три фактора и то: 1) **Фактора „атопија“** у коме су мање концентрације СС16 повезане са мањим концентрацијама ТGFβ1 код деце са већим специфичним IgE (атопијом) и већим концентрацијама укупних IgE; 2) **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) **Фактора „Узраст“** веће концентрације СС16 повезане су са старијим узрастом, дужим периодом сисања, акутним визингом код деце која немају астму у породици.

#### 4.3.2.1 Фактор „Атопија“

##### 4.3.2.1.1. Концентрације СС16 и TGFβ1 у серуму

Како би смо анализирали промене СС16 у односу на имунорегулаторне цитокине у групи деце без атопије и са атопијом, перцентилне вредности ових биомаркера приказали смо у односу на старосне категорије на графикону 17.



**Графикон 17.** Концентрације имунорегулаторних цитокина и СС16 код деце са атопијом и без атопије по старосним категоријама. Статистички значајни пораст IL-10 код деце без атопије утврђен је у узрасту од 13-17 месеци а велике концентрације се одржавају и код деце у узрасту 18-24 месеца. Код деце са атопијом утврђена је промена концентрација TGFβ1 које су биле мање у узрасту 13-24 месеца у односу на млађу децу са атопијом. Концентрације СС16 се амплитудинално мењају током прве године код деце без атопије, али су у другој години статистички значајно веће, док се код деце са атопијом статистички значајан пад СС16 уочава у узрасту 10-12 месеци, а мање концентрације се одржавају током друге године живота код деце са атопијом, а изражен пад TGFβ1 праћен је минималним порастом СС16.

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

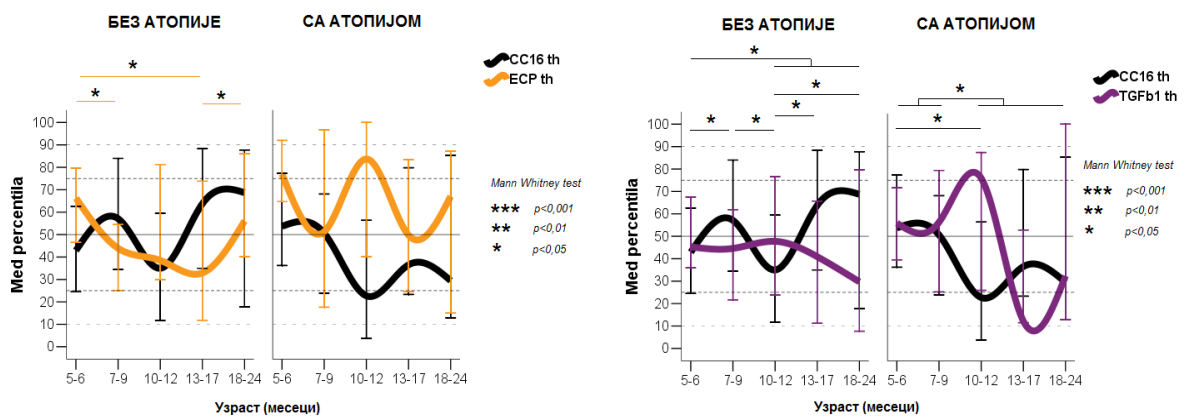
Женска деца са атопијом и TGF $\beta$ 1 $\leq$ 17,0 ng/ml у односу на женску децу са атопијом која имају више концентрације TGF $\beta$ 1 чешће имају CC16  $\leq$  3,4ng/ml, (100%, n=5/5 vs 41,2%, n=7/17, Fisher p=0,030), дијагнозу J04 (Laryngitis) (40%, n=2/5 vs n=0/17, Fisher p=0,043) и упалу плућа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

**У групи женске деце** са TGF $\beta$ 1 $>$ 17,0ng/ml девојчице са атопијом у односу на женску децу без атопије имале су више концентрације укупних IgE (15,4kU/l, range 484,7, IQR 72,5, n=17 vs 2,0kU/l, range 12,3, IQR 2,6, n=21, p=0,001) и ECP (21,2ug/l, range 50,0, IQR 34,4, n=11 vs 5,8ug/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). **У групи мушке деце** са TGF $\beta$ 1 $>$ 17,0ng/ml, дечаци са атопијом у односу на дечаке без атопије имају веће концентрације укупних IgE (72,5kU/l, range 364,1, IQR 224,8, n=16 vs 4,0kU/l, range 23,9, IQR 3,3, n=39, p $<$ 0,001), већи CC16 (4,7ng/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 (7,5U/ml, range 98,0, IQR 31,6, n=11 vs 0,8U/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 TGFβ1 у серуму применили смо тест корелације. Код деце са атопијом TGFβ1 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 TGFβ1 у серуму за  $0,37\text{ng/ml}$  при повећању ЕСР-а у серуму за  $1\mu\text{g/L}$  ( $B\ 0,37$ ,  $SE\ 0,09$ ,  $beta\ 0,581$ ,  $t\ 4,2$ ,  $p<0,001$ ,  $CI95\%\ 0,19 - 0,55$ ).

#### 4.3.2.1.2. CC16 и цитокини урођене имуности (ЕСР и TNFα)

Однос перцентилних вредности TGFβ1, ЕСР и CC16 у односу на узраст код деце без атопије и деце са атопијом приказан је на графикаону 18.



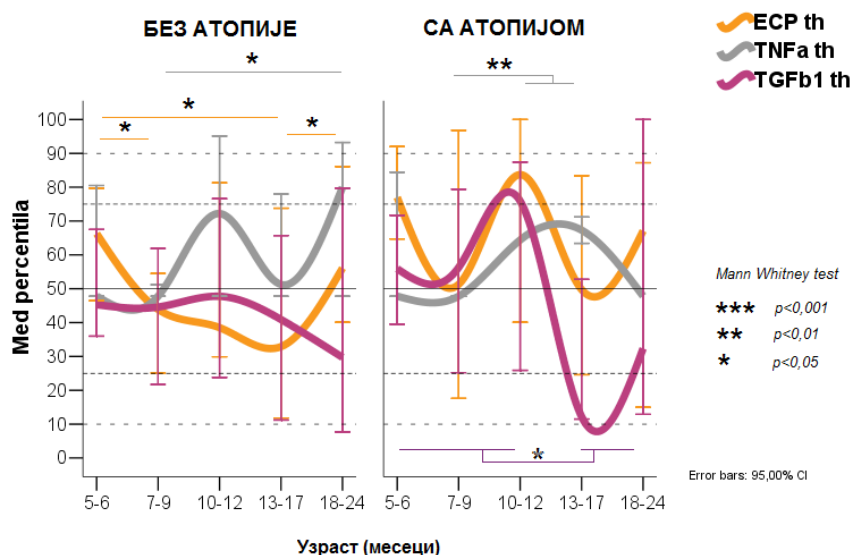
**Графикон 18.** Узрастне промене ЕСР-а и однос са CC16 и TGFβ1 код деце са атопијом и без атопије. Пораст концентрације ЕСР-а и TGFβ1 у узрасту 10-12 месеци праћен је статистички значајним падом CC16, код деце са атопијом, при чему су мале концентрације TGFβ1 у другој години живота удружене са малим концентрацијама CC16.

С обзиром да су статистички значајан пад концентрације TGFβ1 у другој години живота и удруженост малих концентрације TGFβ1 и CC16 утврђени само код деце са атопијом, парцијалном корелацијом смо испитивали повезаност биомаркера TN2 одговора са CC16 независно од концентрације TGFβ1 (табела 10). Код деце са атопијом утврђена је негативна корелација ЕСР-а и CC16 у групи која не сиса у узрасту 8-24 месеца ( $r= - 0,624$ ,  $p=0,054$ ,  $n=10$ ).

Control Variables		БЕЗ АТОПИЈЕ				СА АТОПИЈОМ			
TGFβ1 (ng/ml)		tIgE	ECP	TSLP	IL10	tIgE	ECP	TSLP	IL10
CC16	r	0,000	<b>-0,204</b>	-0,137	-0,018	-0,306	-0,299	-0,274	<b>-0,351</b>
	p	0,500	<b>0,043</b>	0,125	0,439	0,068	0,073	0,093	<b>0,043</b>
	n	70	<b>70</b>	70	70	23	23	23	<b>23</b>
tIgE	r		0,097	<b>0,229</b>	<b>0,357</b>		-0,077	<b>0,330</b>	<b>0,343</b>
	p		0,209	<b>0,026</b>	<b>0,001</b>		0,357	<b>0,054</b>	<b>0,047</b>
	n		70	<b>70</b>	<b>70</b>		23	<b>23</b>	<b>23</b>
ECP	r			<b>0,190</b>	0,096			0,175	<b>0,478</b>
	p			<b>0,055</b>	0,211			0,201	<b>0,008</b>
	n			<b>70</b>	70			23	<b>23</b>
TSLP	r				<b>0,436</b>				<b>0,619</b>
	p				<b>0,000</b>				<b>0,000</b>
	n				<b>70</b>				<b>23</b>

**Табела 10.** Парцијална корелација CC16 и биомаркера TH2 одговора по елиминацији утицаја TGFβ1 у групи деце са и без атопије. Статистичко искључење ефекта TGFβ1, удружено је са негативном корелацијом ECP-а са CC16 у групи деце без атопије (али само у подгрупи са CC16 ≥4,8ng/ml (r= -0,277, p=0,044)), док је код деце са атопијом постојала тенденција смањења CC16 са повећањем свих TH2 биомаркера, од којих је повезаност са IL-10 била значајна и са највећом јачином повезаности.

Затим смо испитивали повезаност биомаркера урођене имуности и то ECP-а (TH2 одговор) и TNFα (TH1/TH17 одговор). Односи ECP-а, TNFα и TGFβ1 у односу на узраст код деце без атопије и деце са атопијом приказани су на графикону 19.



**Графикон 19.** ECP-а, TNFα и TGFβ1 у односу на узраст код деце без атопије и деце са атопијом. 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: 0,0pg/ml, n=6 vs 10-17 месеци: 3,4pg/ml, range 1,8, n=3; p=0,009, без атопије 7-9 месеци: 0,0pg/ml, range 8,7, IQR 0,5, n=15 vs 13-17 месеци: 6,7pg/ml, range 10,2, IQR 4,9, n=5, p=0,050), али је код деце са атопијом то праћено и статистички значајним падом TGFβ1 у другој години живота.

Смањење ЕСР-а са порастом  $TNF\alpha$  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  $TNF\alpha$  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 ( $r=-0,315$ ,  $p=0,017$ ,  $n=45$ ).

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  $\mu\text{g/ml}$ , range 25,1, IQR 13,6,  $n=13$ ) у односу на узраст 13-17 месеци (4,4  $\mu\text{g/ml}$ , range 10,9, IQR 6,7,  $n=14$ ,  $p=0,038$ ).

#### 4.3.2.1.2.1 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).

ДЕЦА БЕЗ АТОПИЈЕ										
Упала плућа	Визинг	CC16	tIgE	ЕСР	$TNF\alpha$	TSLP	IL-10	TGFb1	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)
<i>Mann Whiney</i>		<i>0,083</i>	<i>0,606</i>	<b><i>0,029</i></b>	<i>0,548</i>	<i>0,503</i>	<i>0,364</i>	<i>0,364</i>	<i>0,606</i>	<i>0,364</i>
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)
<i>Mann Whiney</i>		<i>0,350</i>	<i>0,735</i>	<i>0,552</i>	<i>0,305</i>	<i>0,526</i>	<i>0,611</i>	<i>0,610</i>	<i>0,201</i>	<i>0,371</i>
Акутни визинг		<i>0,475</i>	<i>0,542</i>	<i>0,079</i>	<i>0,213</i>	<i>0,536</i>	<i>0,494</i>	<b><i>0,052</i></b>	<i>0,507</i>	<i>0,711</i>
Хронични визинг		<i>0,538</i>	<i>0,857</i>	<b><i>0,050</i></b>	<i>0,776</i>	<i>0,959</i>	<b><i>0,048</i></b>	<i>0,745</i>	<i>0,842</i>	<i>0,218</i>

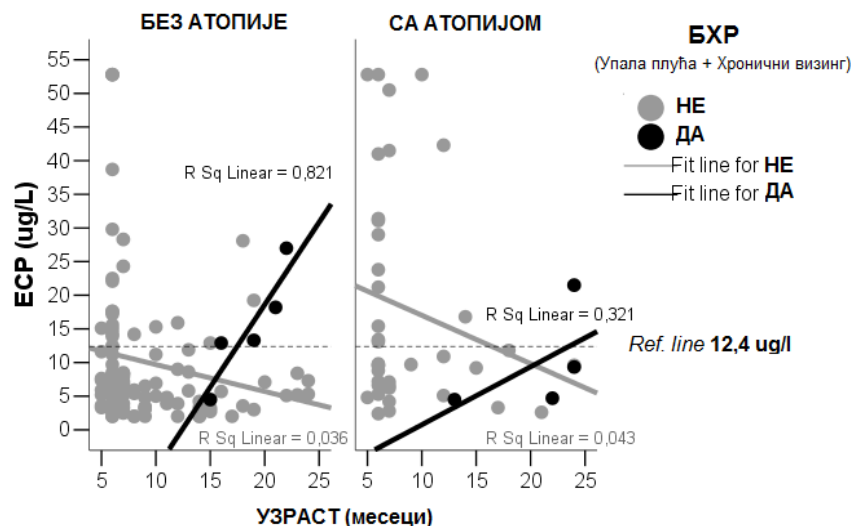
**Табела 11.** Концентрације испитиваних биомаркера у односу на коморбидитет болести доњих дисајних путева код деце без атопије.



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 дечаци са хроничним визингом и упалом плућа имали већи СС16 (10,2ng/ml,  $n=4$ ) у односу на дечаке са акутним визингом и упалом плућа СС16 (2,7ng/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 TGF $\beta$ 1 ( $p=0,052$ ).

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 која су имала упалу плућа и хронични визинг чешће су имала рецидивантне упале грла (60%,  $n=3/5$ ) у односу на осталу децу без атопије (12,4%,  $n=13/105$ , Fisher  $p=0,021$ ).

Промена ЕСР-а са узрастом код деце са атопијом и без атопије у односу на коморбидитет упале плућа и хроничног визинга приказана је на графикаону 20.



**Графикон 20.** Корелација концентрација ЕСР у серуму и узраста, код деце са и без атопије. Код деце без атопије која нису имала БХР постојала је негативна корелација ЕСР-а и узраста ( $r= -0,251$ ,  $p=0,013$ ,  $n=98$ ), а 80% деце без атопије са БХР имало је ЕСР  $\geq 12,4\mu\text{g/l}$ . У групи деце са атопијом без БХР-а постојала је тенденција смањења ЕСР-а са узрастом, али без статистичке значајности ( $r= -0,187$ ,  $p=0,260$ ,  $n=38$ ), док је ЕСР код деце са БХР била у  $75\% \leq 12,4\mu\text{g/l}$ , уз тенденцију пораста ( $r=0,949$ ).

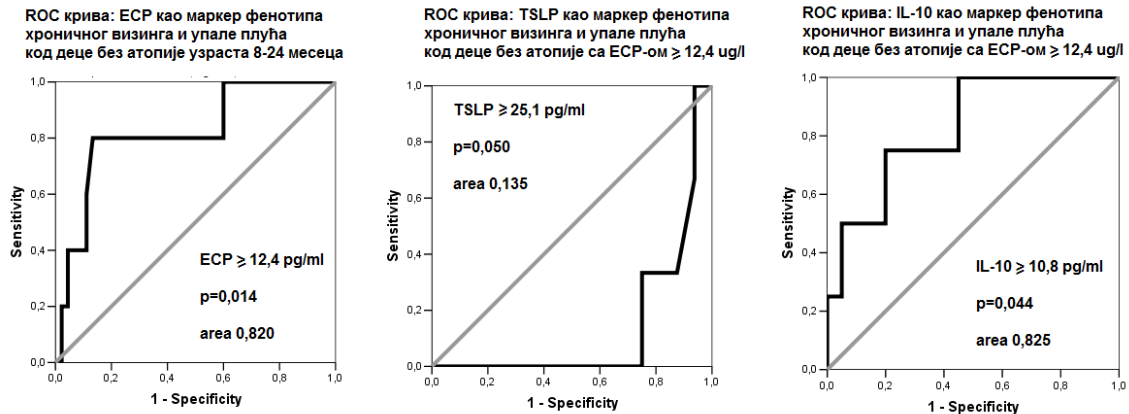
У групи деце без атопије која нису испољила БХР фенотип (упала плућа + хронични визинг), ЕСР у узрасту 5-7 месеци позитивно корелише са TSLP ( $r=0,443$ ,  $p=0,004$ ,  $n=41$ ), док у узрасту 8-24 месеца TNF $\alpha$  позитивно корелише са TSLP ( $r=0,395$ ,  $p=0,046$ ,  $n=26$ ). Код деце са атопијом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

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 малим концентрацијама СС16, предходно смо дефинисали као ендотип „БХР са малим концентрацијама СС16 у серуму“, док је у групи деце без атопије узраста 8-24 месеца, исти клинички фенотип повезан са већим концентрацијама ЕСР-а (13,3 $\mu$ g/l, range 22,5, IQR 13,9,  $n=5$ ) у односу на осталу децу без атопије (5, $\mu$ g/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 типове болести доњих дисајних путева (13,3 $\mu$ g/l,  $n=5$  vs 4,8  $\mu$ g/ml, range 26,1, IQR 4,0,  $n=32$ ,  $p=0,014$ ).

У узрасту 8-24 месеца ЕСР  $\geq 12,4\mu$ g/l може указивати на постојање еозинофилне активације код деце без атопије са упалом плућа и хроничним визингом (сензитивност 80%, специфичност 87%, *area* 0,820) графикон 21, односно у односу на осталу децу без атопије са болестима доњих дисајних путева (сензитивност 80%, специфичност 88%, *area* 0,834). Овај фенотип смо дефинисали као ендотип „БХР са еозинофилном инфламацијом“ код деце без атопије.

У групи деце без атопије са ЕСР  $\geq 12,4\mu$ 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 (15,5pg/ml, range 25,5, IQR 21,1 vs 3,2pg/ml, range 27,0, IQR 8,2,  $p=0,045$ ) и већом концентрацијом укупних IgE (5,1 vs 2,9 kU/l,  $p=0,110$ ) али без

статистичке значајности, а са мањом концентрацијом TSLP (16,4pg/ml, range 10,9, vs 32,0pg/ml range 167,1, IQR 35,6,,  $p=0,047$ ), графикон 21.



**Графикон 21.** Маркери „БХР са еозинофилном инфламацијом“ код деце без атопије. Код деце без атопије у узрасту 8-24 месеца  $ECP \geq 12,4 \mu\text{g/l}$  је маркер БХР-а који се манифестује упалом плућа и хроничним визингом. Деца са концентрацијама ECP-а  $\geq 12,4 \mu\text{g/l}$  која су испољила овај тип БХР-а у односу на децу са великим концентрацијама ECP-а али без БХР-а имала су IL-10  $\geq 10,8 \text{pg/ml}$  (сензитивност 75%, специфичност 80%) и TSLP  $\leq 25,1 \text{pg/ml}$  (сензитивност 100%, специфичност 75%).

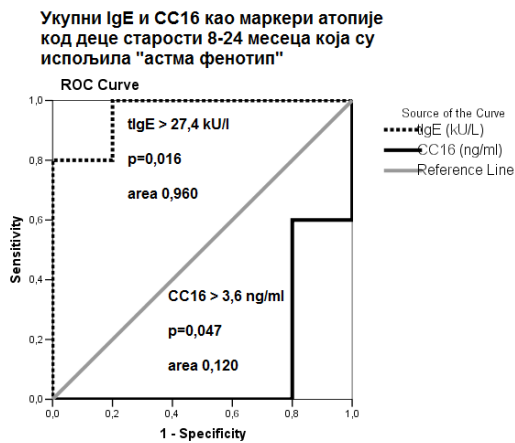
Деца без атопије која су имала „БХР са еозинофилном инфламацијом“ ( $n=5$ ) у односу на децу без атопије са другим болестима доњих дисајних путева ( $n=56$ ) су:

- 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%)
- имала прву упалу плућа у старијем узрасту (13 vs 7 месеци  $p=0,028$ ; ROC крива: area 0,850, за *cut off*  $\geq 12$  месеци сензитивност 80%, специфичност 90%)
- имала први хронични визинг у старијем узрасту (14 vs 8 месеци  $p=0,030$ ; ROC крива: area 0,822, за *cut off*  $\geq 12,5$  месеци сензитивност 80%, специфичност 78%)
- имала већи број болести доњих дисајних путева (4 vs 1x,  $p=0,002$ ; ROC крива: area 0,896, за *cut off*  $\geq 2,5$ x сензитивност 100%, специфичност 71%)

Временски редослед испољавања болести доњих дисајних путева код деце без атопије са „БХР 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 алергијком 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 9,9pg/ml, range 15,1, IQR 10,9,  $p=0,056$ ) и укупним IgE (179kU/l, range 196,3, IQR 186,2 vs 4,2kU/l, range 23,9, IQR 13,6,  $p=0,016$ ) (графикон 22).



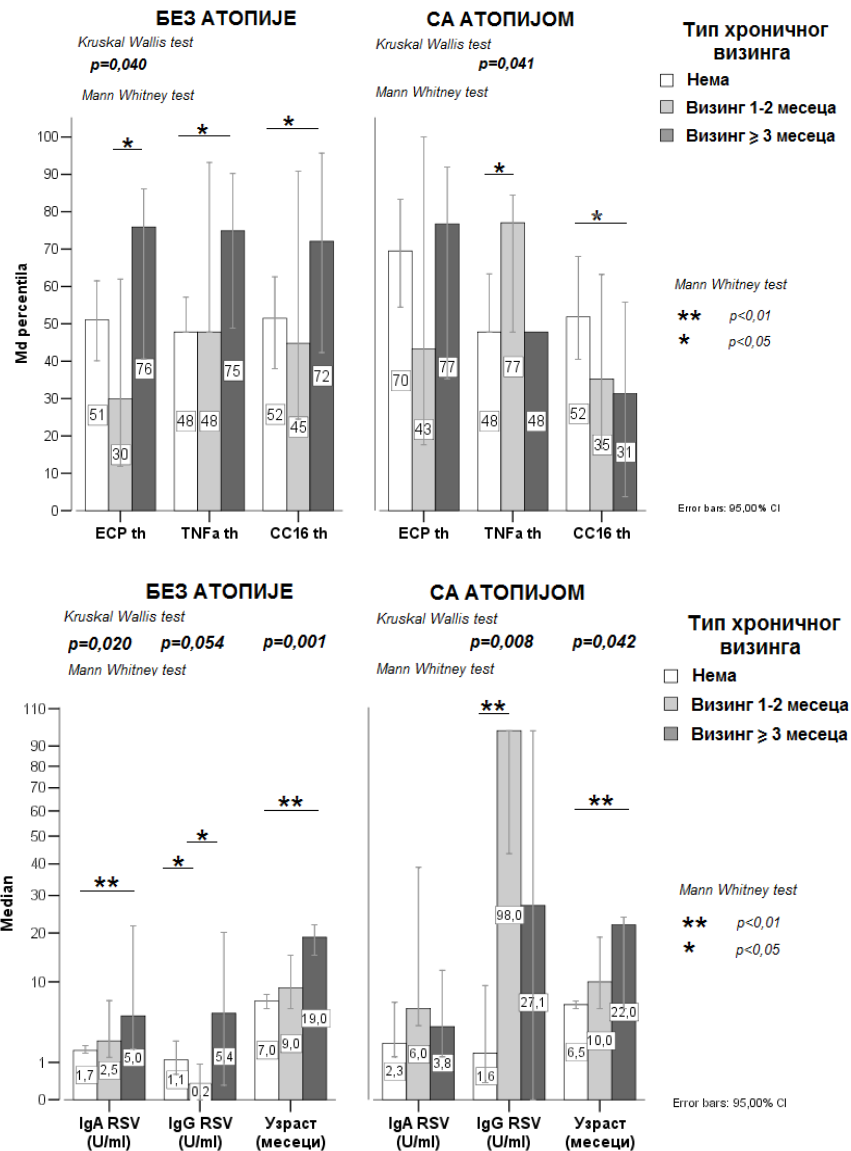
**Графикон 22.** Маркери атопије код деце са БХР-ом. На постојање атопије код деце која су испољила БХР који се манифестује са упалом плућа и хроничним визингом указују концентрација СС16  $\leq 3,6$  ng/ml са сензитивношћу 83% и специфичношћу 80% (ареа 0,833) и укупни IgE  $\geq 27,4$ kU/l са сензитивношћу 80% и специфичношћу 100% (ареа 0,880).

#### 4.3.2.1.2.2 Континуирани визинг у току три месеца

Деца са атопијом и „БХР 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 са еозинofilном инфламацијом“ имала континуирани визинг у 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 (6,7ng/ml vs 4,3ng/ml,  $p=0,050$ ); ROC крива: за *cut off*  $\geq 6,0$ ng/ml, сензитивност 70%, специфичност 65%, ареа 0,689), већи TNF $\alpha$  (5,5 vs 0,0pg/ml,  $p=0,039$ ) и IgA према RSV (5,0 vs 1,9U/ml,  $p=0,010$ ), као и већи ЕСР (12,9 vs 6,2ug/ml,  $p=0,072$ ), при чему је разлика у ЕСР-у била статистички значајна у узрасту  $\geq 11$  месеци (12,9 vs 4,7ug/l,  $p=0,003$ ), а у ком узрасту је утврђена и разлика у СС16 (7,2 vs 4,1ng/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 у серуму, цитокина урођене имуности и хуморалног одговора према RSV у односу на категорије трајања

визинга (0=нема, 1= визинг у току 1-2 месеца, 2=визинг у току  $\geq 3$  месеца) приказане су на графикону 23.



**Графикон 23.** Разлике у концентрацијама CC16, цитокина урођене имуности и хуморалног одговора према RSV у односу на трајање хроничног визинга.

У групи деца 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 CC16 (6,7 vs 4,5ng/ml,  $p=0,046$ ), TNF $\alpha$  (5,5 vs 0,0pg/ml,  $p=0,031$ ) и IgA према RSV (5,0 vs 2,5U/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 $\mu$ g/l,  $p=0,016$ ) и IgG према RSV (5,4 vs 0,2U/ml,  $p=0,050$ ).

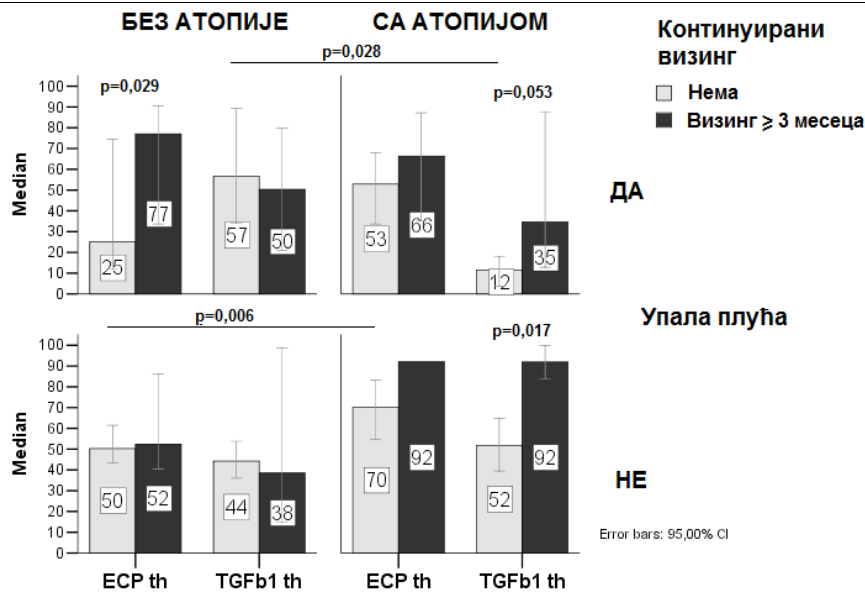
У групи деца са атопијом, деца са хроничним визингом у трајању од 1-2 месеца у односу на децу без хроничног визинга имају веће концентрације TNF $\alpha$  (6,2 vs 0,0pg/ml,  $p=0,040$ ) и IgG према RSV (98,0 vs 1,6U/ml,  $p=0,002$ ), док деца са континуираним визингом у трајању од три и више месеци у односу на децу без хроничног визинга су старија (22 vs 6,5 месеци,  $p=0,026$ ) и имају мањи CC16 (3,3 vs 4,5ng/ml,  $p=0,057$ ).

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  $CC16 \geq 6,0\text{ng/ml}$ , су и IgA према RSV  $\geq 4,3\text{U/ml}$  (сензитивност 70%, специфичност 81,5%, ареа 0,753) и  $TNF\alpha \geq 0,75\text{pg/ml}$  (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  $\geq 10,7 \mu\text{g/l}$  (сензитивност 60%, специфичност 91%, ареа 0,805) и IgG према RSV  $\geq 5,9\text{U/ml}$  (сензитивност 50%, специфичност 92%, ареа 0,746).

Како би смо одредили међусобни однос  $CC16 \geq 6,0\text{ng/ml}$ , ECP  $\geq 10,7\mu\text{g/l}$  и IgG према RSV  $\geq 5,9\text{U/ml}$ , 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 ( $CC16 \geq 6,0\text{ng/ml}$ : B 1,9, SE 0,9, Wald 4,7,  $p=0,031$ , Exp(B) 6,4, CI95% 1,2-34,1; ECP $\geq 10,7\mu\text{g/l}$ : B 1,9, SE 0,8, Wald 5,8,  $p=0,016$ , Exp(B) 7,0, CI95% 1,4-33,8; IgG према RSV  $\geq 5,9\text{U/ml}$ : 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  $CC16 \geq 6,0\text{ng/ml}$ , док је у групи деце са атопијом и  $CC16 \geq 6,0\text{ng/ml}$  утврђена мања концентрације IL-10 у односу на децу са атопијом и мањим концентрацијама  $CC16$  (IL-10: 3,7pg/ml,  $n=13$  vs 10,1pg/ml,  $n=30$ ,  $p=0,048$ ), при чему је ова разлика у IL-10 постојала у узрасту 8-18 месеци (1,2 vs 10,1pg/ml,  $p=0,053$ ). Ни једно дете са атопијом и  $CC16 \geq 6,0 \text{ ng/ml}$  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  $p=0,055$ .

Маркери дијагнозе хроничног визинга код деце са атопијом у односу на децу са атопијом без ове дијагнозе су  $TNF\alpha \geq 4,0\text{pg/ml}$  (сензитивност 75%, специфичност 100%, ареа 0,852) и IgG према RSV  $\geq 35,9\text{U/ml}$  (сензитивност 100%, специфичност 95%, ареа 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%, ареа 0,753) и  $CC16 \leq 3,4 \text{ ng/ml}$  (сензитивност 71%, специфичност 70%, ареа 0,711). 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.



**Графикон 24.** ЕЦР и ТГФβ1 у односу на испољавање континуираног визинга у току 3 месеца и упале плућа у групи деце са и без атопије. Деца са атопијом и континуираним визингом у току три и више месеци имају већи ТГФβ1 у односу на децу без овог типа визинга и у групи са упалом плућа и у групи без упале плућа. Деца без атопије са континуираним визингом у току три и више месеци у односу на децу без овог податка имају већи ЕЦР само уколико су испољила и упалу плућа. У групи деце која нису имала упалу плућа ни континуирани визинг у току три и више месеци деца са атопијом су имала веће концентрације ЕЦР-а у односу на децу без атопије, док је у групи деце која су имала упалу плућа, али без хроничног визинга утврђена мања концентрација ТГФβ1 код деце са атопијом у односу на децу без атопије.

Деца са атопијом, упалом плућа и континуираним визингом у трајању три и више месеци, имала су већи ТГФβ1 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 ТГФβ1 ( $p=0,017$ ; 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).

У групи деце са атопијом  $TGF\beta 1 \geq 32,5$  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  $TGF\beta 1 \geq 32,5$  ng/ml у узрасту 8-18 месеци имала су и мањи CC16 (1,7ng/ml,  $n=2$ ) у односу на децу са атопијом и мањим концентрацијама  $TGF\beta 1$  (4,4ng/ml,  $n=8$ ),  $p=0,044$ .

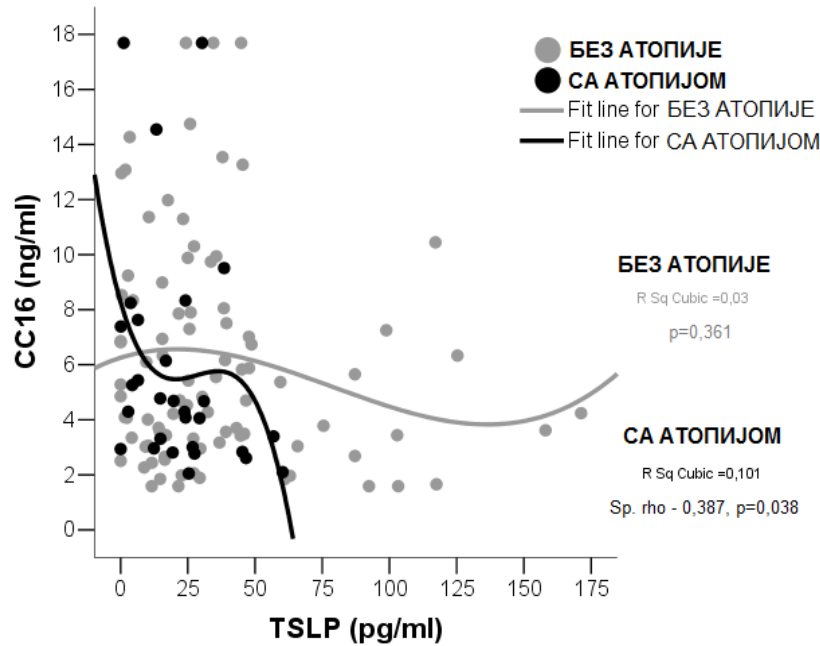
Како би смо утврдили физиолошки однос између испитиваних биомаркера код деце са атопијом и без атопије анализирали смо њихову повезаност у групи деце без болести доњих дисајних путева. Код деце са атопијом која нису имала болести доњих дисајних путева утврдили смо негативну корелацију CC16 са  $TGF\beta 1$  ( $r=-0,422$ ,  $p=0,057$ ,  $n=21$ ), 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 концентрација CC16 има пораст 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  $TGF\beta 1$  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 корелација IL-10 са укупним IgE ( $r=0,435$ ,  $p=0,043$ ,  $n=22$ ), гранично са 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  $TGF\beta 1$  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 ( $r=0,557$ ,  $p<0,001$ ,  $n=48$ ).

#### 4.3.2.2. 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 9 – 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.



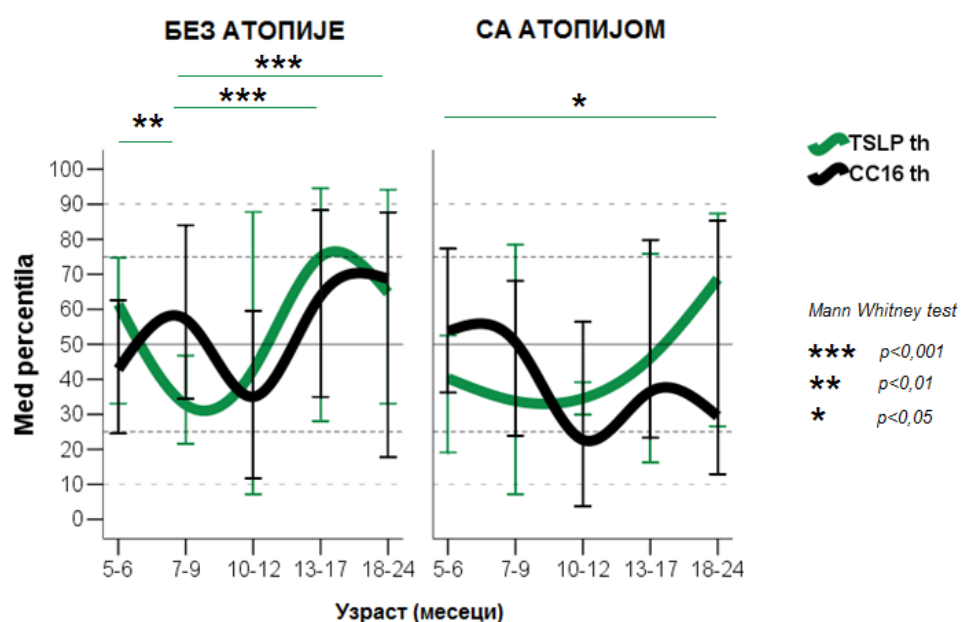


**Графикон 25.** Корелација CC16 и TSLP код деце са атопијом и деце без атопије

Деца са атопијом и ендотипом „БХР фенотип са ниским CC16“ (који смо предходно дефинисали) имају осим мањих концентрација CC16 и веће концентрације TSLP (51,1pg/ml, range 47,9, IQR 38,8 vs 19,4pg/ml, range 46,7, IQR 21,7,  $p=0,043$ ), па 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 4,7ng/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  $\geq 13$  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  $\geq 13$  месеци (F 0,634) и мајку са алергијом (F 0,581).

## 4.3.2.2.1. Детерминанте концентрација TSLP у серуму

Анализа разлика у концентрацији CC16 и TSLP у серуму у односу на узраст, показала је да код деце без атопије, после транзиторног 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 CC16 код деце са атопијом и без атопије

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 (табела 12А).

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)	18,05	2,98		6,06	0,001	11,95	24,16
СА АТОПИЈОМ	<b>Број хроничних визинга</b>	<b>9,31</b>	<b>3,20</b>	<b>0,488</b>	<b>2,91</b>	<b>0,007</b>	<b>2,74</b>	<b>15,90</b>
	(Constant)	48,93	6,80		7,12	0,000	35,42	62,45
БЕЗ АТОПИЈЕ	<b>Дужина дојења</b>	<b>-3,14</b>	<b>0,95</b>	<b>-0,329</b>	<b>-3,30</b>	<b>0,001</b>	<b>-5,04</b>	<b>-1,25</b>
	<b>Број фарингитиса</b>	<b>5,62</b>	<b>2,22</b>	<b>0,253</b>	<b>2,5</b>	<b>0,013</b>	<b>1,21</b>	<b>10,03</b>

Dependent Variable: TSLP(pg/ml)

**Табела 12 А.** Предиктори промене концентрација TSLP у серуму.

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 9,3pg/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 концентрација TSLP и то дужина дојења, при чему је концентрација TSLP мања за 3,1pg/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 5,6pg/ml у односу на децу која нису мала ову дијагнозу.

У другом моделу линеарне регресије укључени су укупни IgE, ECP, IL-10, CC16, TGFβ1 и IgG према RSV, табела 12,В. Код деце са атопијом појединачни 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 ( $F(1,14)=10,4$ ,  $p=0,007$ ,  $adj\ r^2\ 0,401$ ;  $B\ 0,4$ ,  $SE\ 0,11$ ,  $beta\ 0,666$ ,  $t\ 3,2$ ,  $p=0,007$ ,  $CI95\%\ for\ B\ 0,1-0,6$ ).

Б) Биомаркери		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)	2,12	3,78		0,56	0,585	-6,11	-10,35
СА АТОПИЈОМ	<b>IL-10 (pg/ml)</b>	1,53	0,35	0,588	4,43	0,001	0,78	2,29
	<b>IgG RSV (U/ml)</b>	0,04	0,07	0,637	4,79	0,000	0,19	0,51
	(Constant)	13,89	6,70		2,07	0,042	0,50	27,29
БЕЗ АТОПИЈЕ	<b>IL-10 (pg/ml)</b>	1,79	0,52	0,384	3,43	0,001	0,75	2,84
	<b>ECP (ug/l)</b>	0,80	0,39	0,231	2,07	0,043	0,03	1,57

Dependent Variable: TSLP(pg/ml)

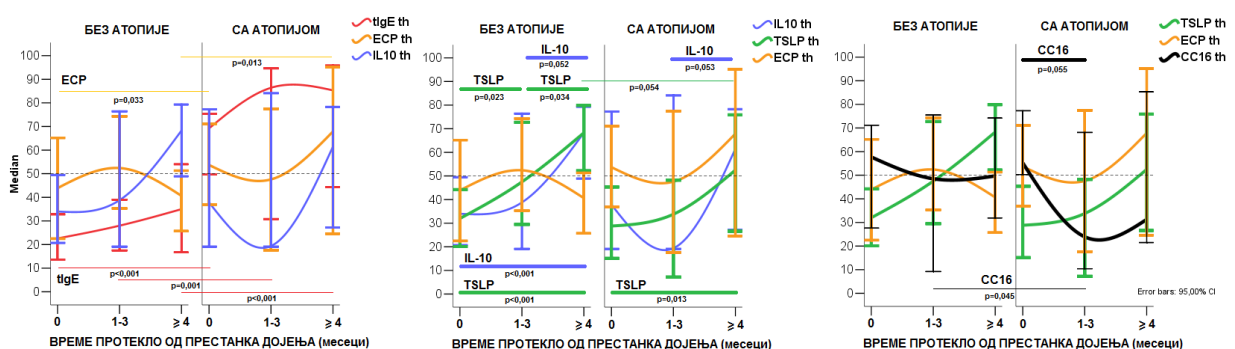
**Табела 12.** Предиктори примене концентрација TSLP у серуму. У групи деце са атопијом добијен је модел ( $F(2,14)=22,4$ ,  $p<0,001$ ,  $adj\ r^2\ 0,753$ ) који је издвојио IL-10 ( $p=0,001$ ) и IgG према RSV ( $p<0,001$ ) као независне предикторе повећања TSLP, док је у групи деце без атопије ( $F(2,65)=8,5$ ,  $p<0,001$ ,  $adj\ r^2\ 0,192$ ) то био случај са IL-10 ( $p=0,001$ ) и ECP ( $p=0,043$ ).

## 4.3.2.2.1.1. Начин исхране и TSLP у серуму

Деца са атопијом у односу на децу без атопије имају веће концентрације укупних IgE без обзира на време које је протекло од престанка сисања (сиса: 19,8 vs 3,4kU/l,  $p \leq 0,001$ ; 1-3 месеца од престанка сисања: 11,7 vs 3,3kU/l,  $p=0,001$ ;  $\geq 4$  месеца од престанка сисања: 48,9 vs 4,2 kU/l  $p \leq 0,001$ ), као и веће концентрације ECP-a у групи која сиса (9,7 vs 7,0 $\mu$ g/l,  $p=0,033$ ). У групи деце која су престала са сисањем 1-3 месеца пре студије код деце са атопијом у односу на децу без атопије утврђена је мања концентрација CC16 (2,9 vs 6,1ng/ml,  $p=0,045$ ), а у групи која је престала да сиса пре  $\geq 4$  месеца веће концентрације ECP-a (9,7 vs 5,2 $\mu$ g/l,  $p=0,013$ ) и IgG према RSV (19,2 vs 1,5U/ml,  $p=0,049$ ), а мање концентрације TSLP (27,5 vs 38,2pg/ml,  $p=0,054$ ).

Код деце са атопијом статистички значајно мање концентрације IL-10 измерене су код деце која су у периоду 1-3 месеца од престанка сисања у односу на децу која још увек сисају у узрасту 7-12 месеци (престала пре 1-3 месеца: 1,0pg/ml,  $n=4$  vs сисају: 3,5pg/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: 21,8pg/ml, range 61,0, IQR 28,7,  $n=10$  vs сисају: 9,9pg/ml, range 27,3, IQR 15,7,  $n=16$ ,  $p=0,047$ ), без разлике у IL-10 (3,1 vs 3,7pg/ml,  $p=1,000$ ).

Перцентилне вредности TH2 биомаркера у односу на време протекло од престанка сисања, код деце са и без атопије приказана је на графикаону 27.



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

У групи деце без атопије веће концентрације TSLP уочавају се за 1-3 месеца од престанка сисања (25,3pg/ml, range 125,3, IQR 30,0,  $n=22$ ) у односу на децу која сисају (13,5pg/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: 10,1pg/ml, range 28,9, IQR 10,4,  $n=39$  vs сиса: 3,0pg/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 (13,3pg/ml, range 46,6, IQR 18,2, n=13, p=0,012), а у периоду 1-3 месеца од престанка сисања уочавају се ниже концентрације IL-10 (1,9pg/ml, range 16,0, IQR 9,42, n=5) у односу на концентрације IL-10 које су измерене у периоду  $\geq 4$  месеца од престанка сисања (11,1pg/ml, range 19,9, IQR 5,3, n=19, p=0,053). Код деце са атопијом ниже концентрације CC16 у серуму имала су деца која су у периоду 1-3 месеца од престанка сисања (2,9ng/ml, n=5) у односу на децу са атопијом која још увек сисају (4,7ng/ml, n=26, p=0,055), и у том периоду деца са атопијом имају и мање концентрације CC16 у односу на децу без атопије у истој категорији времена које је протекло од престанка сисања (6,1ng/ml, n=28, p=0,045).

#### 4.3.2.2.1.2. 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 линеарну регресију, која је показала да код деце са атопијом постоји позитивна повезаност TSLP и IL-10 без обзира на узраст, док код деце без атопије присутна позитивна корелација у узрасту 8-24 месеца, табела 14. 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).

Атопија	Узраст	Варијабле	Нестандард. коефицијент		Стандард. коефицијент	t	Sig.	95% CI for B	
			B	Std. Err.				Од	До
СА АТОПИЈОМ	<b>5-7 месеци</b> (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
		<b>TSLP(pg/ml)</b>	<b>0,36</b>	<b>0,10</b>	<b>0,668</b>	<b>3,59</b>	<b>0,002</b>	<b>0,15</b>	<b>0,57</b>
	<b>8-24 месеци</b> (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
		<b>TSLP(pg/ml)</b>	<b>0,18</b>	<b>0,07</b>	<b>0,692</b>	<b>2,54</b>	<b>0,039</b>	<b>0,01</b>	<b>0,35</b>
БЕЗ АТОПИЈЕ	<b>5-7 месеци</b> (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
	<b>8-24 месеци</b> (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
		<b>TSLP(pg/ml)</b>	<b>0,15</b>	<b>0,03</b>	<b>0,602</b>	<b>4,82</b>	<b>0,000</b>	<b>0,09</b>	<b>0,22</b>

*Dependent Variable: IL-10(pg/ml)*

**Табела 14.** Повезаност концентрација TSLP и IL-10. Код деце са атопијом повећање TSLP за 1 pg/ml прећено је повећањем IL-10 за 0,36pg/ml у узрасту 5-7 месеци и за 0,18pg/ml у узрасту 8-24 месеца, док је код деце без атопије пораст TSLP праћен повећањем IL-10 за 0,15 pg/ml само у узрасту 8-24 месеца.

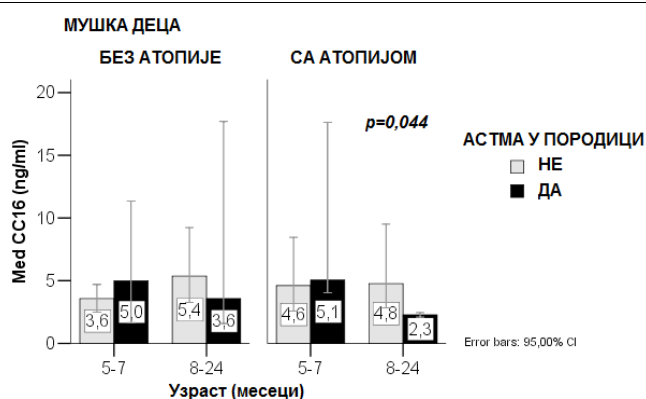
Повезаност испитиваних биомаркера у случају изостанка индукције IL-10, испитана је парцијалном корелацијом са IL-10 као контролном варијаблом, (табела 15).

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

**Табела 15.** Парцијална корелација испитиваних биомаркера по елиминацији утицаја IL-10 у групи деце са и без атопије. У групи деце без атопије постоји статистички значајна негативна корелација CC16 и TSLP, при чему са повећањем TSLP расте и ECP, док је у групи деце са атопијом ECP растао са TGF $\beta$ 1, а смањење TGF $\beta$ 1 праћено је повећањем TNF $\alpha$ . 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 $\alpha$  удружене са већом концентрацијом IgG према RSV.

#### 4.3.2.2.2. Алергија у породици

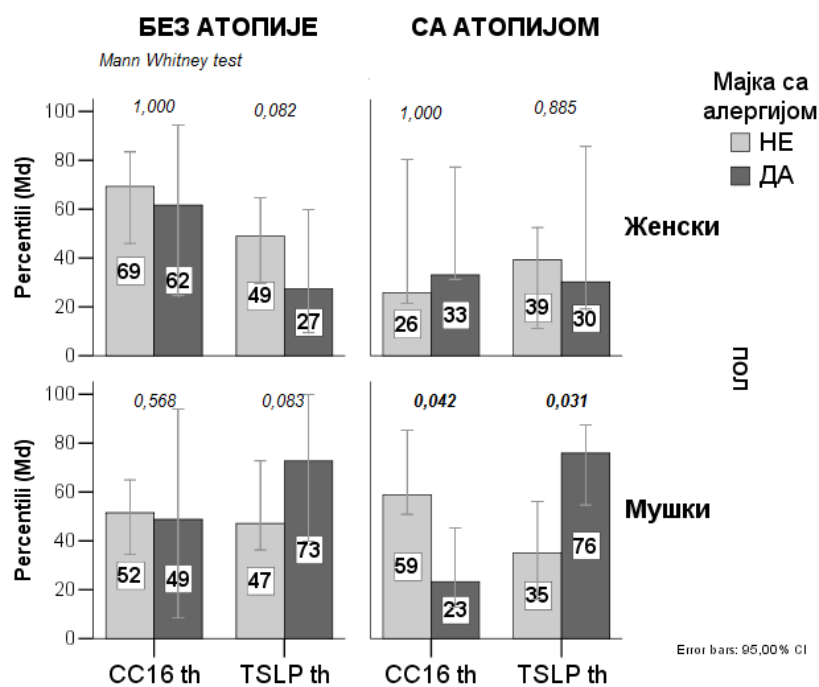
У групи деце са атопијом, податак о постојању астме у породици удружен је са већим концентрацијама TSLP ( $p=0,037$ ; и то у узрасту 8-24 месеца,  $p=0,044$ , код деце која су престала са сисањем  $p=0,025$ ). У групи мушке деце са атопијом, која су имала податак о астми у породици, у узрасту 8-24 месеца утврђене су мање концентрације CC16 у односу на децу без овог податка ( $p=0,044$ ), графикон 28.



**Графикон 28.** Концентрације CC16 код мушке деце у односу на постојање астме у породици. Мушка деца са атопијом и податком о астми у породици у узрасту 8-24 месеца имала су мање концентрације CC16 у односу на дечаке са атопијом у истом узрасту без овог податка. У групи мушке деце без атопије није утврђена разлика у односу на постојање астме у породици.

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 СС16 (3,4 vs 4,3ng/ml,  $p=0,049$ ), а већи укупни IgE (40,3 vs 3,0kU/l,  $p\leq 0,001$ ) и већи ЕСР (21,2 vs 5,8 $\mu$ g/l,  $p=0,008$ ).

У групи деце чија мајка има алергију, деца са атопијом у односу на децу без атопије у узрасту 5-7 месеци имала су већи укупни IgE (15,4 vs 2,0kU/l,  $p=0,001$ ), док је мањи СС16 утврђен је само у узрастој групи 8-24 месеца (3,1 vs 5,7ng/ml,  $p=0,005$ ), у ком узрасту је постојала разлика у укупним IgE (193,5 vs 3,6kU/l,  $p=0,000$ ), али и у TSLP (56,9 vs 25,6pg/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,  $p=0,042$ ). Разлике у СС16 и TSLP код мушке и женске деце са и без атопије у односу на алергију мајке приказане су на графикону 29.



**Графикон 29.** Перцентилне вредности СС16 и TSLP по атопији 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 4,8ng/ml,  $p=0,042$ ), а веће концентрације TSLP (45,3 vs 17,2pg/ml,  $p=0,031$ ), као и IgA према RSV (6,8 vs 2,3U/ml,  $p=0,048$ ), 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%,  $n=7/21$ ,  $p=0,043$ ). У групи женске деце није утврђена разлика у концентрацијама СС16 и TSLP у односу на алергију мајке.

#### 4.3.2.3. 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:  $area\ 0,674$ ,  $CI_{95\%}\ 0,521-0,828$ , за  $cut\ off\ \geq 4,0\text{ng/ml}$ , сензитивност 80%, специфичност 61,5%), већим укупним IgE ( $18,1\ vs\ 3,9\text{kU/l}$ ,  $p\leq 0,001$ , ROC крива:  $area\ 0,926$ ,  $CI_{95\%}\ 0,860-0,993$ , за  $cut\ off\ \geq 5,7\text{kU/l}$  сензитивност 100%, специфичност 82%), са мањом концентрацијом TSLP ( $14,7\ vs\ 25,0\text{pg/ml}$ ,  $p=0,047$ , ROC крива:  $area\ 0,720$ ,  $CI_{95\%}\ 0,543-0,898$ , за  $cut\ off\ \leq 20,6\text{pg/ml}$ , сензитивност 67%, специфичност 71%) и већом концентрацијом IgG према RSV ( $4,5\ vs\ 0,8\text{U/ml}$ ,  $p=0,037$ , ROC крива:  $area\ 0,718$ ,  $CI_{95\%}\ 0,543-0,893$ , за  $cut\ off\ \geq 1,2\text{U/ml}$ , сензитивност 82%, специфичност 64%, а за  $cut\ off\ \geq 4,3\text{U/ml}$ , сензитивност 56%, специфичност 86%), уз податак да су у млађем узрасту имали упалу плућа (2 vs 8 месеци,  $p=0,056$ , ROC крива:  $area\ 1,000$ ,  $CI_{95\%}\ 1,000-1,000$ , 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%,  $n=9/15\ vs\ 28,2\%$ ,  $n=11/39$ ,  $p=0,030$ ). 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:  $4,7\text{ng/ml}$ ,  $n=11\ vs\ без\ атопије:\ 3,2\ \text{ng/ml}$ ,  $n=24$ ,  $p=0,052$ ), (узраст 8-24 месеца  $p=0,596$ ) и IgG према RSV (5-7 месеци: са атопијом-  $1,9\text{U/ml}$ ,  $n=9\ vs\ без\ атопије-\ 0,3\text{U/ml}$ ,  $n=17$ ,  $p=0,045$ ; 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 СС16 (ROC крива:  $area\ 0,700$ ,  $CI_{95\%}\ 0,505-0,894$ , за  $cut\ off\ \leq 4,8\ \text{ng/ml}$ , сензитивност 75%, специфичност 71%), имала су већи укупни IgE ( $76,3\ vs\ 2,3\text{kU/l}$ ,  $p\leq 0,001$ , ROC крива:  $area\ 0,983$ ,  $CI_{95\%}\ 0,950-1,015$ , за  $cut\ off\ \geq 6,3\text{kU/l}$ , сензитивност 100%, специфичност 92%), ЕСР ( $13,8\ vs\ 5,9\ \mu\text{g/l}$ ,  $p=0,016$ , ROC крива:  $area$



0,788, CI95% 0,609-0,967, за *cut off*  $\geq 9,0\mu\text{g}/\text{l}$ , 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 ( $n=42/161$ ), и то 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 без: 13,4%,  $n=16/119$ ,  $p=0,219$ ).

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

Учесталост болести доњих дисајних путева у 7. години живота у односу на испољени БХР у прве две година живота приказана је у табели 16.

Варијабла	Категорија	Укупно (N, %)	БХР фенотип у 5-24 месеца(N)		Fisherтест (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	<b>0,036</b>
	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	

**Табела 16.** Учесталост болести доњих дисајних путева у 7. години у односу на БХР испољен у прве две године живота. Деца која су имала БХР 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.

Статистички значајна већа учесталост болести доњих дисајних путева у седмој години живота у односу на БХР у другој години дијагностикована је само код деце без атопије (са БХР: 80%,  $n=4/5$  vs без БХР: 24%,  $n=25/104$ , Fisher  $p=0,017$ ), док у групи деце са атопијом није било ове разлике (са БХР: 33,3%,  $n=2/6$  vs 23,9%,  $n=11/35$ , Fisher  $p=0,472$ ).

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. години 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 ( $p=0,987$ ).

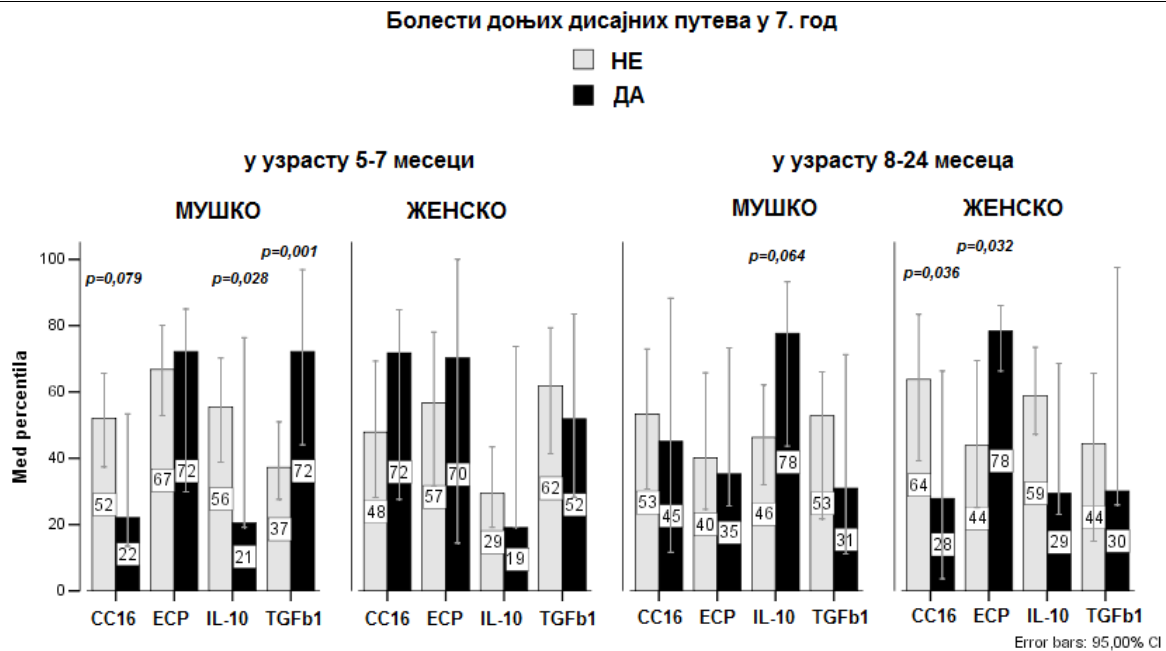
Анализа биомаркера у групи деце са БХР у прве две године по полу показала је да у групи мушке деце која су испољила БХР у узрасту до две године, деца која су имала болести доњих дисајних путева у 7 години имала су веће концентрације СС16 (10,4 ng/ml,  $n=3$ ) у односу на децу без ових болести у 7 години (3,7ng/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 (3,4ng/ml,  $n=24$  vs 4,7ng/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).

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. Разлика у IL-10 који је измерен у узрасту 5-7 месеци код мушке деце између деце са и без болести у 7. години живота била је статистички значајна у подгрупи деце која су испољила болести доњих дисајних путева пре тестирања

(0,5pg/ml, n=4 vs 9,1pg/ml, n=17, p=0,009), док је статистички значајна разлика у TGF $\beta$ 1 утврђена у групи деце без болести доњих дисајних путева пре тестирања (29,9ng/ml, n=8 vs 20,6ng/ml, n=15, p=0,013). Иако разлика у CC16 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  $\leq$ 3,4ng/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.



**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 старостним категоријама у коме је мерен CC16. У групи мушке деце која су тестирана у узрасту 5-7 месеци, деца са болестима у 7. години у односу на децу без болести имала су статистички значајно мање концентрације IL-10 (0,5pg/ml, n=12 vs 8,9pg/ml, n=36, p=0,028) а веће TGF $\beta$ 1 (28,3ng/ml, n=12 vs 18,1ng/ml, n=32, p=0,001) уз мање концентрације CC16 (2,8ng/ml, n=13 vs 4,6ng/ml, n=39), али та разлика није достигла статистичку значајност (p=0,079). У групи женске деце која су тестирана у узрасту 8-24 месеци, деца која су испољила болести у 7. години у односу на децу без ових болести имала су мање концентрације CC16 (3,1ng/ml, n=6 vs 5,8ng/ml, n=23, p=0,036) и веће концентрације ECP-а (14,6 $\mu$ g/l, n=4 vs 5,5 $\mu$ g/l, n=22, p=0,032).

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 39,2pg/ml,  $p=0,036$ ) и IL-10 (0,0 vs 9,2pg/ml,  $p=0,003$ ), а већи TGF $\beta$ 1 (25,8 vs 18,3pg/ml,  $p=0,047$ ), док је у групи мушке деце са атопијом утврђена статистички значајна разлика само у TGF $\beta$ 1 (28,3 vs 17,9ng/ml,  $p=0,006$ ).

Предиктори испољавања болести доњих дисајних путева у 7. години живота код женске деце су ECP  $\geq 9,0\mu\text{g/l}$  (area 0,841, сензитивност 100%, специфичност 68%) и CC16  $\leq 3,5\text{ng/ml}$  (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 (3,4ng/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*  $\leq 4,3\text{ng/ml}$ , сензитивност 100%, специфичност 79%), али су мушка деца са атопијом у узрасту од 5-7 месеци имала и веће концентрације TGF $\beta$ 1 (28,5 vs 18,1ng/ml,  $p=0,004$ ; ROC крива: area 1,000, *cut off*  $\geq 27,5\text{ng/ml}$ , сензитивност 100%, специфичност 100%). У групи мушке деце која су у узрасту 5-7 месеци имала CC16  $\leq 4,0\text{ng/ml}$ , њих 36% је имало акутни бронхитис у узрасту од 7 година ( $n=9/25$ ), док је то био случај у 11,1% мушке деце са већим концентрацијама CC16 у узрасту 5-7 месеци ( $n=3/27$ ), Fisher  $p=0,035$  (OR 4,5, CI95% 1,05-19,2). Паралелно томе, ни једно мушко дете коме је у узрасту од 5-7 месеци измерен TGF $\beta$ 1  $\leq 17,8\text{ng/ml}$  ( $n=0/14$ ) није имало акутни бронхитис у узрасту од 7 година, док је то био случај у 36,7% мушке деце којима је у узрасту 5-7 месеци измерен већи TGF $\beta$ 1 ( $n=11/30$ ), Fisher  $p=0,007$ , и ова разлика је била статистички значајна у групи деце мушке без атопије која су укључена у студију у узрасту 5-7 месеци ( $n=0/9$  vs 40%,  $n=8/20$ , Fisher  $p=0,029$ ), а без статистичке значајности

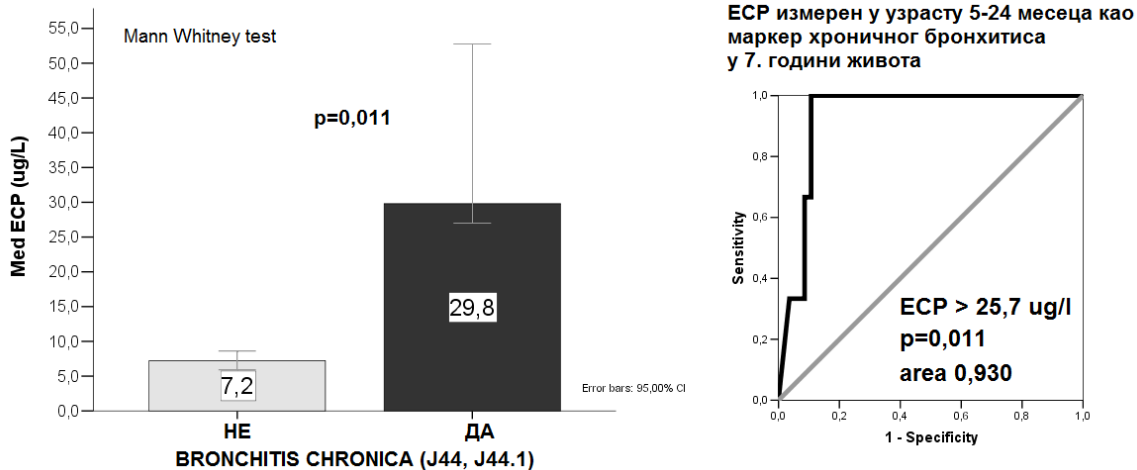
због малог броја испитаника у групи мушке деце са атопијом која су укључена у студију у узрасту 5-7 месеци ( $n=0/5$  vs 30%,  $n=3/10$ , Fisher  $p=0,264$ ).

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). 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 (3,2ng/ml,  $n=16$  vs 5,4ng/ml,  $n=78$ ,  $p=0,033$ ) и мањи IL-10 (0,7pg/ml,  $n=14$  vs 6,4pg/ml,  $n=73$ ,  $p=0,050$ ).

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). Модел линеарне регресије у групи деце која су имала кашаљ у 7. години, са IL-10 као зависном и TSLP као независном варијаблом (који су измерени у узрасту до две године) није био статистички значајан ( $F(1,12)=0,7$ ,  $p=0,429$ ), док је у групи деце која нису имала кашаљ у 7. години ( $F(1,96)=25,9$ ,  $p<0,001$ , adj  $r^2$  0,206) повећање концентрације TSLP за 1 pg/ml праћено повећањем концентрације IL-10 за 0,12pg/ml ( $B$  0,12, SE 0,02, beta 0,463,  $t$  5,1,  $p<0,001$ , CI95% for  $B$  0,07-0,16).

#### 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 ЕСР у односу на децу без ове дијагнозе (29,8 $\mu$ g/ml vs 7,2 $\mu$ g/ml,  $p=0,011$ ), графикон 33.



**Графикон 33.** ЕСП као маркер испољавања хроничног бронхитиса у 7. години живота. ЕСП  $\geq 25,7 \mu\text{g/l}$  измерен у узрасту до две године може бити маркер испољавања хроничног бронхитиса у узрасту од 7 година (ROC крива: *cut off* ЕСП  $\geq 25,7 \mu\text{g/l}$  сензитивност 100%, специфичност 89%, area 0,930).

У групи деце која су имала концентрације ЕСП  $\geq 25,7 \mu\text{g/l}$  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). Деца без атопије са ЕСП-ом  $\geq 25,7 \mu\text{g/l}$  у узрасту до две године имала су већи TSLP (46,7pg/ml, n=5 vs 25,2pg/ml, n=81, p=0,037; ROC крива: *cut off*  $\geq 46,3 \text{pg/ml}$ , сензитивност 60%, специфичност 80%, area 0,779), док деца са атопијом и ЕСП-ом  $\geq 25,7 \mu\text{g/l}$  у узрасту до две године имају већи TGF $\beta$ 1 (32,5ng/ml, n=7 vs 18,0ng/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).

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 10,0pg/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 3,8pg/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).

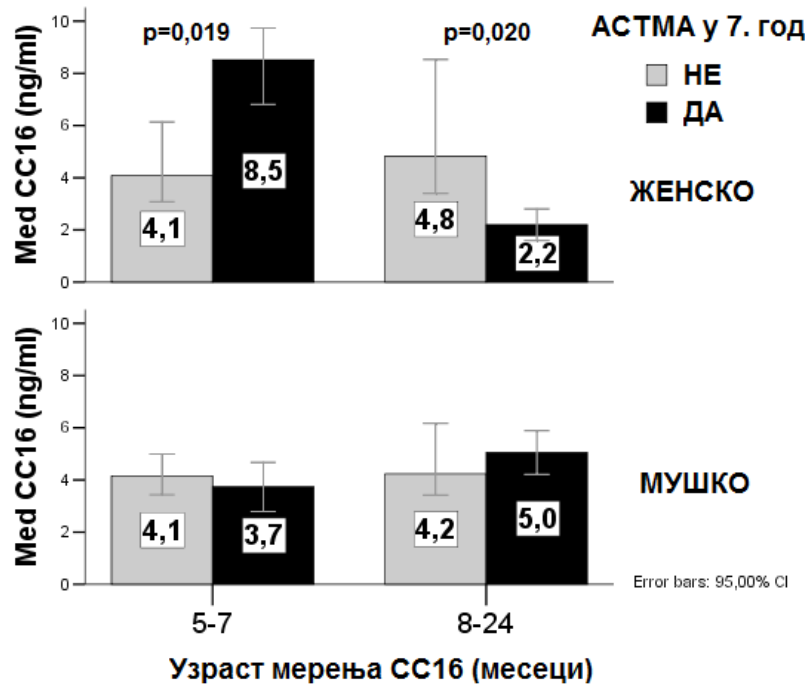
Концентрације CC16 у серуму и испитиване карактеристике у прве две године живота код деце која су имала астму у седмој години приказане су у табели 17.

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

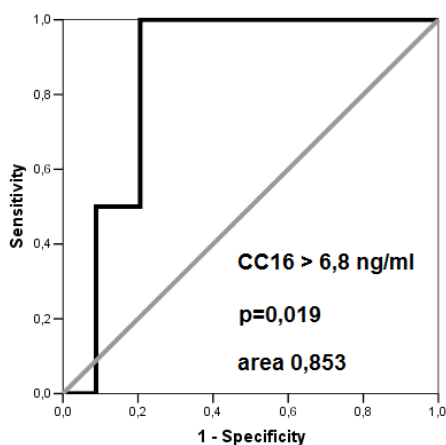
**Табела 17.** Деца са дијагнозом астме у 7 години живота. Половина деце која су испољила астму у 7. год. имала су и болест доњих дисајних путева у узрасту до две године, и њих 80% тестирано је у узрасту 8-24 месеци. Другу половину деце са астмом у 7. години, која нису имала болести доњих дисајних путева чинила су деца тестирана у узрасту 5-7 месеци, и у овој групи деце било је 80% девојчица са CC16  $\geq 6,8$ ng/ml.

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 4,1ng/ml, n=34, p=0,019; ROC крива: за *cut off*  $\geq 6,8$ ng/ml сензитивност 100%,

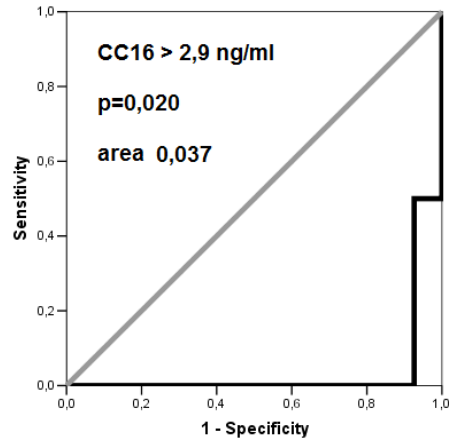
специфичност 79,4%, area 0,853), а у узрасту 8-24 месеца мањи CC16 (2,2ng/ml, n=2 vs 4,8ng/ml, p=0,020; ROC крива: за  $cut\ off \leq 2,9$  ng/ml сензитивност 100%, специфичност 92,6%, area 0,963), без разлике у осталим испитиваним маркерима, графикон 34.



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



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

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; а ова разлика је



била значајна у подгрупи женске деце која су тестирана у узрасту 5-7 месеци у којој су девојчице са  $CC16 \geq 6,8 \text{ ng/ml}$  имала дијагнозу астме у 7 години у 36,4% ( $n=4/11$ ) а код девојчица са мањим концентрацијама  $CC16$  то није био случај ни код једног детета ( $n=0/27$ ), Fisher  $p=0,004$ . И у групи женске деце са атопијом у узрасту 5-7 месеци ( $n=23$ ), девојчице са измереним концентрацијама  $CC16 \geq 6,8 \text{ ng/ml}$  су чешће имале астму у 7. години у односу на девојчице са атопијом и мањим концентрацијама  $CC16$  у узрасту 5-7 месеци (50%,  $n=2/4$  vs  $n=0/11$ , Fisher  $p=0,057$ ), а сличан налаз је утврђен и у групи девојчица без атопије које су тестиране у узрасту 5-7 месеци (28,6%,  $n=2/7$  vs  $n=0/16$ , Fisher  $p=0,083$ ). Девојчице које су тестиране у узрасту 8-24 месеца са  $CC16 \leq 2,9 \text{ ng/ml}$  у 50% су имале астму у 7. години ( $n=2/4$ ) док то није био случај ни са једном девојчицом која је у узрасту 8-24 месеци имала више концентрације  $CC16$  ( $n=0/25$ ), Fisher  $p=0,015$ . Код једног мушког детета са атопијом и дијагнозом астме у 7 години, у узрасту до две године измерен је укупни  $IgE$   $5,9 \text{ kU/l}$ , што је мање од остале мушке деце са атопијом код којих је укупни  $IgE$  био  $36,7 \text{ kU/l}$ ,  $p=0,074$ , односно у односу на дечаке са атопијом у узрасту 5-7 месеци ( $17,5 \text{ kU/l}$ ,  $p=0,118$ ). Код три дечака без атопије који су испољила астму у седмој години измерене су веће концентрација  $IgA$  према RSV у односу на дечаке без атопије у узрасту до две године ( $9,3 \text{ U/ml}$  vs  $1,9 \text{ U/ml}$ ,  $p=0,074$ ).

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). У групи деце са анемијом у узрасту до две године, деца која ће развити астму у седмој години живота у односу на децу са анемијом без астме, имала су веће концентрације  $TGF\beta 1$ , али та разлика није достигла статистичку значајност (22,2  $\text{ ng/ml}$ ,  $n=4$  vs 12,7  $\text{ ng/ml}$ ,  $n=13$ ,  $p=0,079$ ), при чему су двоје деце која су имала и болести доњих дисајних путева и анемију у узрасту до две године и астму у седмој години имала и мање концентрације  $CC16$  (2,2  $\text{ ng/ml}$ ) у односу на децу која су имала болести доњих дисајних путева у узрасту до две године и анемију, али нису имала астму у узрасту од седам година (6,7  $\text{ ng/ml}$ ,  $n=12$ ,  $p=0,044$ ).

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 50% деце, која су у 7 години имала астму, нису имала податак о болести доњих дисајних путева у узрасту у коме су тестирана, анализирали смо концентрације СС16 у серуму у групи деце без болести до тренутка тестирања.

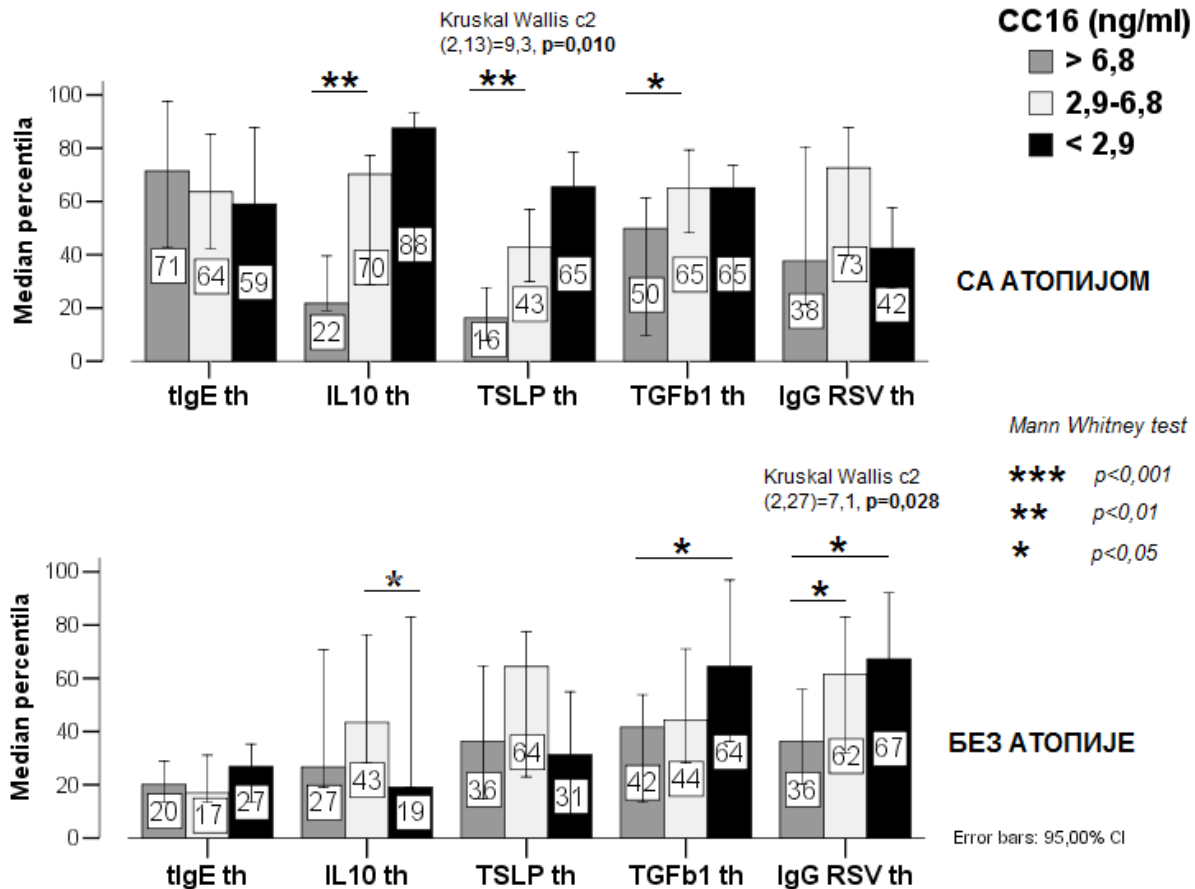
У групи деце са атопијом која нису имала болести доњих дисајних путева у узрасту до две године живота, деца са СС16  $\geq 6,8$  ng/ml у односу на децу са мањим концентрацијама СС16 у серуму, без разлике у узрасту (6 vs 6 месеци,  $p=0,669$ ) имала су мање концентрације TSLP (3,7 vs 25,6pg/ml,  $p=0,002$ ), IL-10 (1,0 vs 11,9pg/ml,  $p=0,008$ ), TGF $\beta$ 1 (21,1 vs 25,6ng/ml,  $p=0,020$ ) и то у подгрупи деце која сисају (TSLP  $p=0,016$ , IL-10  $p=0,013$ , TGF $\beta$ 1  $p=0,081$ ), односно мушке деце са атопијом без болести доњих дисајних путева (TSLP  $p=0,036$ , IL-10  $p=0,016$ , без постигнуте статистички значајне разлике у TGF $\beta$ 1  $p=0,177$ ). У групи деце без атопије која нису имала болести доњих дисајних путева у узрасту до две године живота, деца са СС16  $\geq 6,8$  ng/ml у односу на децу са мањим СС16 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 ( $p=0,024$ , ара 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 СС16  $\leq 2,9$  ng/ml у односу на децу са атопијом и већим СС16 имала су веће концентрације TSLP (36,4 vs 14,8pg/ml,  $p=0,011$ ). У групи деце без атопије која нису имала болести доњих дисајних путева и нису сисала, деца са СС16  $\leq 2,9$  ng/ml у односу на децу са већим концентрацијама СС16 у серуму имала су већи IgG према RSV (20,2 vs 1,4U/ml,  $p=0,053$ ), док је у групи деце без болести која су сисала утврђен и веће концентрације укупних IgE (4,2 vs 2,9kU/l,  $p=0,055$ ), уз гранично веће концентрације TGF $\beta$ 1 (26,3 vs 18,9ng/ml,  $p=0,066$ ), а статистички значајно мање концентрације IL-10 (0,0 vs 3,2pg/ml,  $p=0,021$ ), без разлике према полу.

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 СС16 (од високих на средње вредности) смањивале су се са повећањем TSLP (од 3,7 до 21,7pg/ml,  $p=0,004$ ), IL-10 (од 1,0 до 11,9pg/ml,  $p=0,007$ ), и TGF $\beta$ 1 (од 21,1 до 25,6ng/ml,  $p=0,021$ ), док је у групи деце без атопије то био случај са IgG према RSV (од 0,5 до 2,6U/ml,  $p=0,049$ ) при чему је концентрација СС16 испод

2,9ng/ml удружена са немерљивим концентрацијама IL-10 (0,0pg/ml), а великим концентрацијама TGF $\beta$ 1 (25,4 ng/ml).

### Деца без болести дисајних путева у узрасту до две године



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

#### 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 < 2,0U/ml, IgG <6,6U/ml, 1=IgA  $\geq$ 2,0 U/ml, IgG <6,6 U/ml, IgA <2,0U/ml, IgG  $\geq$ 6,6 U/ml, IgA  $\geq$ 2,0U/ml, IgG  $\geq$ 6,6U/ml. Иако су код деце са атопијом чешће измерени IgA  $\geq$ 2,0 U/ml, IgG према RSV  $\geq$ 6,6U/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 (c2(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  $IgA \geq 2,0U/ml$ ,  $IgG \geq 6,6U/ml$  у односу на мушку децу без атопије (58,3% vs 18,4%), док је ређе утврђен налаз  $IgA \geq 2,0U/ml$ ,  $IgG < 6,6U/ml$  (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 ( $IgA \geq 2,0 U/ml$  и/или  $IgG \geq 6,6U/ml$ ) у односу на децу без инфекције (без атопије: болести са инфекцијом RSV- 89,2%,  $n=33/37$  vs болести без инфекције RSV- 52,6%,  $n=20/38$ , Fisher  $p=0,001$ ; са атопијом: болести са инфекцијом RSV- 100% ,  $n=15/15$  vs болести без инфекције RSV- 66,7%,  $n=4/6$ , Fisher  $p=0,071$ ) али та разлика није постојала у односу на испољавање болести доњих дисајних путева узрасту од 7 година (без атопије: болести у 7. год. са инфекцијом RSV у прве две године – 33,3%,  $n=12/36$  vs болести у 7. год. без инфекције RSV у прве две године - 26,3%,  $n=10/38$ ,  $p=0,509$ ; са атопијом: болести у 7. год. са инфекцијом RSV у прве две године - 33,3% ,  $n=5/15$  vs болести у 7. год. без инфекције RSV у прве две године - 33,3%,  $n=2/6$ ,  $p=1,000$ ).

Код деце која нису имала RSV инфекцију у прве две године живота ( $IgA < 2,0 U/ml$  и  $IgG < 6,6U/ml$ ), деца женског пола која су имала астму у 7. години имала су веће концентрације СС16 у узрасту до 2 године у односу на женску децу која нису имала астму у 7 години (8,2ng/ml,  $n=2$  vs 3,5ng/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 ( $IgA < 2,0U/ml$ ,  $IgG < 6,6U/ml$ ), деца женског пола која су имала хронични бронхитис у 7. години имала су веће концентрације ЕСР у узрасту до 2 године у односу на женску децу која нису имала хронични бронхитис у 7 години (41,3 $\mu g/l$ ,  $n=2$  vs 4,8  $\mu g/l$ ,  $n=13$ ;  $p=0,038$ ).

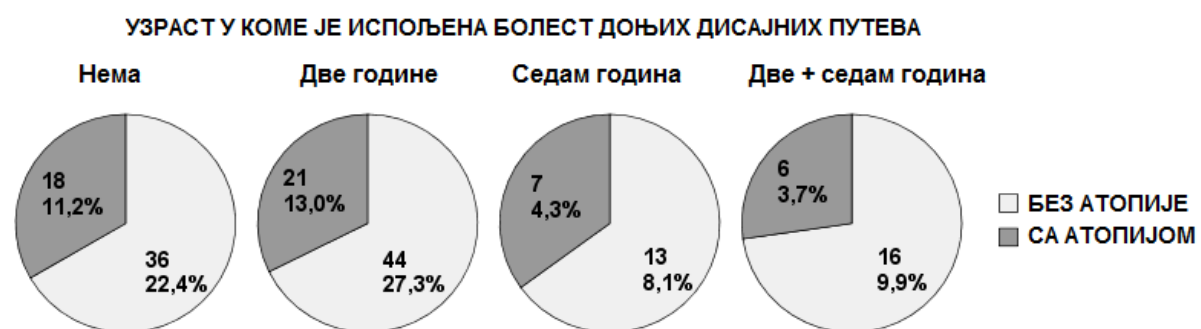
Код деце која су имала RSV инфекцију са повећањем  $IgA$  ( $IgA \geq 2,0U/ml$ ,  $IgG < 6,6U/ml$ ), деца мушког пола која су имала акутни бронхитис у 7. години имала су мање концентрације СС16 у узрасту до 2 године у односу на мушку децу која нису имала акутни бронхитис у 7 години (1,8ng/ml,  $n=5$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

Код деце која су имала RSV инфекцију са повећањем  $IgA$  и  $IgG$  ( $IgA \geq 2,0 U/ml$ ,  $IgG \geq 6,6U/ml$ ), 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 ( $18,2\mu\text{g/l}$ ,  $n=3$  vs  $5,1\mu\text{g/l}$ ,  $n=5$ ;  $p=0,036$ ; ROC крива:  $\text{area } 1,000$ ,  $\text{cut off } \geq 7,3\mu\text{g/l}$ , сензитивност 67%, 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:  $\text{area } 0,879$ ,  $\text{cut off } \leq 4,4\text{kU/l}$ , сензитивност 67%, 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 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  $13,0\text{kU/l}$ ,  $p=0,089$ ), али та разлика није достигла статистичку значајност.

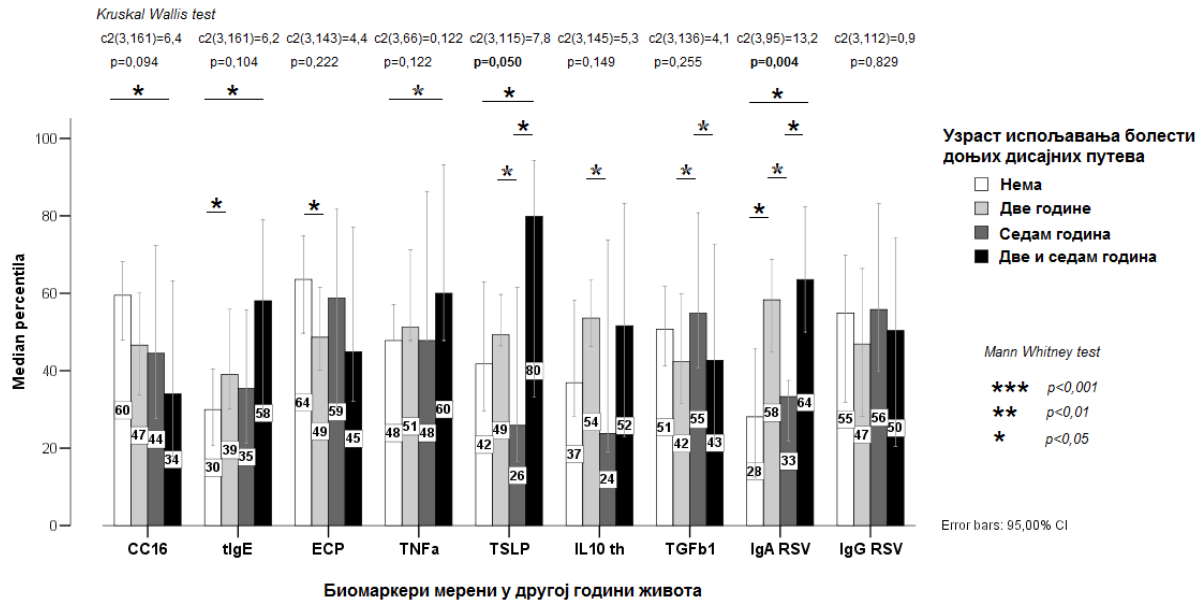
#### 4.4.8. Разлике у испитиваним биомаркерима у односу на испољавање болести доњих дисајних путева у другој и у седмој години живота

Како би смо утврдили разлике у испитиваним биомарекрима 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 (33,1%,  $n=54$ ), 1=болест у прве две године (39,9%,  $n=65$ ), 2= болест у 7. години живота (12,3%,  $n=20$ ), 3=болест и у прве две и у 7. години живота (13,5%,  $n=22$ ), графикон 36.



**Графикон 36.** Учесталост атопије у односу на узраст испољавања болести доњих дисајних путева Није утврђена разлика у учесталости атопије у односу на узраст испољавања болести доњих дисајних путева (Таблица контингенције  $\chi^2(3,161)=0,35$ ,  $p=0,951$ ).

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 узраст испољавања болести доњих дисајних путева

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 4,0kU/l, p=0,049) и IgA према RSV (2,6 vs 1,6U/ml, p=0,013), али ниже концентрације ECP-a (6,3 vs 8,6 $\mu$ g/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, имала су ниже концентрација CC16 (3,4 vs 5,2ng/ml, p=0,013), али веће концентрације укупних IgE (10,0 vs 4,0kU/l, p=0,035), TSLP (47,8 vs 20,9pg/ml, p=0,032), TNF $\alpha$  (2,3 vs 0,0pg/ml, p=0,053), и IgA према RSV (3,1 vs 1,6pg/ml, p=0,001), без утврђене разлике у имунорегулаторним цитокинима (IL-10 p=0,478; TGF $\beta$ 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 8,7pg/ml, p=0,060), TSLP (11,6 vs 26,8 pg/ml, p=0,073) и IgA према RSV (1,7 vs 2,6U/ml, p=0,092), а веће концентрације TGF $\beta$ 1 (22,8 vs 19,2 g/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 47,8pg/ml, p=0,019) и IgA RSV (1,7 vs 3,1U/ml, p=0,002), а веће TGF $\beta$ 1 иако та разлика није достигла статистички значајни ниво (22,8 vs 19,4ng/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.

## Болести доњих дисајних путева

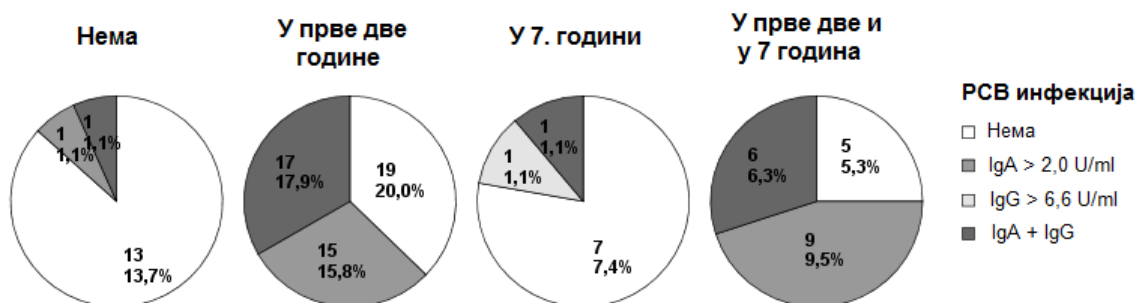


Таблица контингенције 4x4:  $c_2(9,95)=31,1$ , Cramer V 0,330,  $p=0,001$

**Табела 37.** Учесталост болести доњих дисајних путева у узрасту од две и седам година у односу на инфекцију RSV. Инфекција RSV удружена је са испољавањем болести доњих дисајних путева у другој години (62,7%,  $n=32/51$ ), као и испољавањем болести у другој и седмој години живота (75%,  $n=15/20$ ). Деца која нису испољила болести доњих дисајних путева у 86,7% нису имала инфекцију RSV ( $n=13/15$ ). Деца која су испољила болести само у седмој години живота такође су у великом броју била без инфекције (77,8%,  $n=7/9$ ).

У групи деце која нису имала инфекцију RSV, 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 TGFb1 у узрасту до две године (28,0ng/ml vs 19,0 ng/ml  $p=0,035$ , ROC крива: area 0,857, за  $cut\ off \geq 19,8ng/ml$ , 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 и болестима доњих дисајних путева, деца са атопијом и болестима у другој и 7 години имала су мање 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 170kU/l,  $n=10$ ,  $p=0,040$ ; ROC крива: area 0,840, за  $cut\ off \leq 112,5kU/l$  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 години живота.

## 5. ДИСКУСИЈА

### 5.1 СС16 и индивидуалне карактеристике

#### 5.1.1 СС16 као маркер раста плућа

Клара ћелије на бронхо-алвеоларним прелазима (BADJ) су бронхо-алвеоларне стем ћелије (65,175), које имају значајну улогу у развоју плућа (29,64). У току развоја плућа, грањање 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 (64).

Анализа броја изолованих ССSP<sup>poz</sup> ћелија из плућа овце која су по морфологи и постојању пре и постнаталне фазе алвеоларизације током развоја плућа слична хуманим плућима (130,176), показала је да се ССSP<sup>poz</sup> ћелије не могу изоловати пренатално, а постнатално су изоловане у мањем броју у односу на одрасле јединке (177). Код људи концентрација СС16 у серуму пропорционална је броју СС16-позитивних ћелија који је утврђен у биоптатима респираторног епитела (36,168). Наши резултати су показали да код деце без атопије, са узрастом постоји континуирани пораст концентрације СС16 у серуму, па сматрамо да се СС16 може разматрати и као индикатор постнаталне фазе развоја плућа код здраве деце без атопије.

У мишијим моделима експериментално индуковане астме показано је да СС16 смањује стварање ТН2 цитокина, као и еозинофилну инфилтрацију и активацију, односно лимитира алергијски одговор у плућима (74), односно да је дефицијенција СС16 праћена повећањем ТН2 цитокина (IL-4, IL-5, IL-13) и појавом еозинофине инфламације након инхалационе сензибилизације (70). Код људи понављана оштећења респираторног епитела у току детињства удружена су са смањењем СС16 у серуму и појачањем ТН2 одговора у плућима (70,124,172,178,179). Међутим, у нашем испитивању деца са атопијом имала су веће концентрације СС16 у узрасту од 5-7 месеци, па смо мишљења да примарна дефицијенција СС16 није у основи последичног развоја јаког ТН2 одговора, јер су та деца већ сензибилисана и развила ТН2 одговор пре смањења СС16 у серуму, па се велике концентрације СС16 код деце са атопијом у узрасту 5-7 месеци могу разматрати и као повратни механизам смањења ТН2 одговора у плућима, који је после осмог месеца живота компромитован.



Утврђено је да респираторни епител код пацијената са астмом функционише абнормално и сензитиван је на оксидативни стрес (136,180), а хронично оштећење и продужена активација просеца репарације, може да резултује у смањењу репараторног потенцијала исцрпљеног пула прогенитора (62). Хронично оштећење респираторне слузокоже редукује и пролиферативни потенцијал Клара ћелија (64). Мале концентрације СС16 у серуму повезане су са смањеном плућном функцијом код деце (36), а успорени и/или смањени раст плућа за последицу има касније испољавање БХР-а и астме (181). Смањење СС16 код деце са атопијом (182) вероватно је последица нежељених ефеката јачања ТН2 одговора који није током времена компензован развојем ТН1 одговора. Наиме,  $TNF\alpha$  и  $INF\gamma$  повећавају секрецију СС16 из респираторног епитела (72,73), па постојање ТН2 одговора који настаје у условима изостанка активације урођене имуности (183) односно постојања примарно слабог ТН1 одговора код одојчади (услед мање продукције  $IL-12$  и метилације гена за  $INF\gamma$  (87), који је додатно инхибиран јачањем ТН2 одговора (183) код деце са атопијом, могу бити у основи смањења СС16 у серуму у узрасту  $\geq 8$  месеци на ниво  $\leq 4,8$  ng/ml, које смо измерили у нашој студији. Осим тога,  $IL-4$  је потентни инхибитор раста хематопоетских прогенитора, па уколико се ефекат цитокина урођене имуности ( $TNF\alpha$ ,  $IL-6$ ) разматра из аспекта њиховог ефекта на хематопоетске стем ћелије, при чему је дефицит  $IL-6$  удружен са смањеним бројем прогенитора (184), а  $TNF\alpha$  и  $IL-6$  потенцирају ефекат  $IL-3$  на повећање пролиферације прогенитора (185), онда би се смањење активације урођене имуности уз повећање  $IL-4$  код деце са атопијом могло повезати и са смањењем стем ћелијског пула на нивоу костне сржи, односно смањењем репопулације прогенитора плућног епитела током оштећења са *epitel-like* ћелијама из костне сржи које садрже Клара протеин и маркере алвеоларних ћелија типа 1 и 2 (47, 48).

### 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  $\geq 8$  месеци девојчице без атопије имају већу концентрацију СС16 у серуму 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. Интраутерино сазревање плућа женске деце је брже у периоду између 16-26 ГН када се раније појаљују дисајни покрети, као у периоду 26-36. ГН када се уочава раније стварање сурфактанта (186). Разлике у развоју и плућа међу половима одржавају се и током детињства, а морфолошке разлике присутне су и одраслом добу. Код женске деце постоји пропорционали раст дисајних путева и паренхима, али код мушке деце раст дисајних путева заостаје за развојем паренхима (186), па мушка деца имају мањи калибар дисајних путева (којим се тумачила већа учесталост транзиторног визинга код дечака током раног детињства (125), док је код женске деце измерен и већи проток ваздуха, односно мањи отпор протицању ваздуха у односу на дечаке (186,187). Разлике у морфогенези могу објаснити разликама у експресији FGF10, који има улогу у одржавању неопредељених прогенитора епитела плућа у недиферентованом стању током грађања дисајних путева (2). Конститутивно редукована експресија FGF10 повезује се са варијантом морфогенезе плућа која се огледа у великим и широким дисајним путевима, смањеном алвеоларизацијом (23). Утврђено је да девојчице имају мању величину и тежину плућа, као и мањи број, али шире респираторне бронхиоле на рођењу у односу на дечаке (188), а укупни број алвеола и укупна алвеоларна површина је већа код дечака (189). 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 СС16 чије су количине у серуму веће код девојчица у односу на дечаке.

После рођења долази до транзиторног повећања гонадотропина и полних хормона у серуму деце оба пола, али су током детињства нивои гонадотропина већи код девојчица у односу на дечаке. Код дечака доминантан је пораст LH (лутеинизирајући хормон) и тестостерона са пиком у другом месецу живота (на препубертетском нивоу у 4-6 месеци), док концентрације FSH (фоликуло-стимулирајући хормон) расту до 3. месеца (на предпубертетском нивоу у узрасту 9-15

месеци). Код девојчица доминантан је пораст FSH до узраста 3-6 месеци (са смањењем до 12-24 месеца), а пораст LH и естрогена утврђен је од 2 до 6 месеца живота (190). Утицај хормона на развој плућа у односу на пол детета још увек није разјашњен (186). Ткивно специфична експресија *CC16* регулисана је стероидним хормонима укључујући и естроген и прогестерон у плућима (10).  $17\beta$ - естрадиол је митоген и може утицати на процесе миграције и пролиферације прогенитора током раста плућног ткива или крвних судова у плућима (191). Формирање алвеола код девојчица зависно је од естрогена који модулише алвеологенезу преко естрогенских рецептора (192,193), и доводи до продукције сурфактанта (194) што је у основи бржег сазревања плућа женске деце (191). У експреиментима на мишевима показано је да андрогени инхибишу продукцију сурфактанта зависну од  $TGF\beta$  и EGF (195), као и  $IL-12$ -Stat4 сигнализација (196) што може бити удружено са редукцијом TNF $\alpha$  и INF $\gamma$ , односно изостанком њиховог ефекта на повећање секреције *CC16* из респираторног епитела (72,73).

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* (164), тако да ткивна дистрибуција *CC16* не утиче на разлике између полова које су утврђене нашим испитивањем. Ипак, мање концентрације *CC16* у серуму код мушкараца у односу на жене тумаче се и већом гломеруланом филтрацијом код мушкараца (197).

### 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, а Сведске здравствене организације да се дојење треба наставити до краја друге године (198). Мајчино млеко смањује осетљивост одојчади на инфекције (94,199) и садржи значајне количине анти-инфламацијских компоненти као што су  $TGF\beta 1$ ,  $IL-10$ , еритропоетин и лактоферин који редујују прејак проинфламацијски одговор (98). 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 инхалираних хемијских агенаса на интегритет

респираторног епитела и евентуалну активацију имунског одговора. У групи деце која не сисају, мања концентрација СС16 у серуму код деце са атопијом у односу на децу без атопије измерена је у узрасту 8-24 месеца. Овакав налаз указује да у условима изостанка протективних и имунорегулатрних компоненти из мајчиног млека, фактори спољашње средине који утичу на респираторни епител и имунски систем доводе до смањења СС16, како код дечака без атопије који не сисају у узрасту од 5-7 месеци, тако и код девојчица са атопијом које не сисају у узрасту 8-24 месеца.

#### 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 концентрације СС16 у серуму код деце са атопијом у односу на децу без атопије утврђено у групи деце без генског оптерећена алергијом односно без податка о алергији у породици.

##### 5.1.4.1 Инфекција RSV и СС16 код мушке деце са атопијом

Код мушке деце без генске 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  $\leq 3$  месеца и већим IgG хуморалним одговором према RSV уз веће концентрације укупних IgE у серуму. Респираторне вирусне инфекције могу да измене баланс цитокина у плућима одојчади (100). RSV блокира индукцију сазревања плазмоцитних DC, сигнализирање преко TLR7 и TLR9, а неструктурни NS протеини RSV, инхибирају индукцију  $IFN\alpha/\beta$  блокирањем IRF-3 (интерферон регулаторног фактора 3) и JAK/STAT сигнализације, док RSV инфицирана мијелоидна DC прави веома мало  $IFN\gamma$  због мање индукције IL-12 (неопходног за индукцију  $IFN\gamma$ ), са последично слабим антивирусним и TH1 одговором (129,200). Повећана концентрација СС16 код мушке деце са атопијом, без податка о алергији у породици може бити и последица инфекције Клара ћелија и континуираног анти-апоптотског ефеката RSV на инфициране ћелије било преко активације NF- $\kappa$ B и PI3K (*fosfatidilinozitol 3 kinaza*) NS протеинима (што је повезано са дужим преживљавањем

инфицираних ћелија) или преко блокаде апоптотских TNF $\alpha$  сигнала у присуству SH протеина RSV (129), 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 генског ризика због TH2 индуковане инфламације у плућима у току ране и тешке RSV инфекције, није удружена са поремећајем 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), па је генски X-везани механизам повезан са малим концентрацијама CC16 у атопији ком мушке деце, која чине подгрупу мушке деце са атопијом и повећаним ризиком од болести доњих дисајних путева у каснијем животу.

Женска деца са атопијом у узрасту 8-24 месеца имају мање концентрације CC16 и у групи са и у групи без генске 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. У анималним моделима алергијске сензибилизације показано је да женске јединке имају већу инфилтрацију плућа еозинофилима, и већу продукцију укупних IgE и TH2 цитокина, што је удружена са БХР-ом и ремоделовањем дисајних путева (201,202). Такође, женске јединке у плућима имају два пута више нуоцита типа 2 у односу на мушке јединке, са већим бројем IL-13R (ST2), а нуоцити типа 2 женских јединки продукују више IL-5 и IL-13 после индукције IL-33 у односу на мушке јединке (203,204), а оваријектомија код женских јединки праћена је смањењем еозинофилне инфилтрације и смањењем продукције IL-5 (205). Естроген повећава и експресију MUC5B у епителу дисајних путева (206), па диференцијација Клара у пехарасте ћелије може бити у основи смањења CC16 код женске деце, али да ли би мале концентрације естрогена у плућима могле имати значаја на развој у плућима у узрасту до две године није познато (191).

#### 5.1.4.2 Разлике у СС16 између полова код деце без атопије и оксидативни стрес

У групи деце која не сисају у узрасту 5-7 месеци, без атопије и без алергије у породици, мушка деца у односу на женску децу имала су мање концентрације СС16 у серуму, што указује да су примарне полне разлике у концентрацији СС16 повезане са ефектом фактора спољашње средине код деце без атопије. Клинички и експериментални подаци указују да жене имају већи антиоксидантни потенцијал од мушкараца који није зависан 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 (207). Осим тога супероксид дизмутаза конвертује слободне кисеоничне радикале у водоник пероксид, а на анималним моделима је показана већа експресија овог ензима у плућима женских јединки, без утврђених разлика у нивоу каталазе која разграђује H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на воду и кисеоник (208). 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 СС16 у серуму. Осим тога, слободни радикали повећавају експресију SNAIL1, док фактор индукован хипоксијом (енг. *Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$* , HIF1 $\alpha$ ) повећава експресију TWIST1, транскрипторних фактора који су од значаја за развој епително-мезенхимне транзиције (160), па ниска концентрација СС16 може указивати на овај процес у узрасту 5-7 месеци код мушке деце без атопије. Већа продукција СС16 код женске деце без атопије, са антиинфламацијским ефектом који остварује преко инхибиције фосфолипазе А2, чиме смањује ослобађање липидних медијатора и спречава деградацију сурфактанта, доприноси смањеној осетљивости епитела у дисајним путевима што се манифестује и мањом учесталашћу болести доњих дисајних путева у код деце женског пола.

Анализа испитиваних индивидуалних карактеристика и концентрације СС16 показала је неопходност разматрања два фактора као предиктора СС16  $\leq 4,8\text{ng/ml}$  и то: 1) атопије (снажан ТН2 одговор) као предиктора малих концентрација СС16 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 СС16 за 2,5x (повећан оксидативни стрес и морфолошке полне разлике плућа код деце без атопије).

## 5.2 СС16 и болести доњих дисајних путева

Наши резултати су показали да деца са атопијом која имају  $CC16 \geq 4,8$  ng/ml у узрасту 8-24 месеца нису испољила болести доњих дисајних путева. Иако су деца са атопијом осетљивија на вирусне инфекције (127), повећана концентрација СС16 у серуму, која је измерена код здраве деце, може се разматрати као показатељ оптималног анти-инфламацијског потенцијала на респираторном епителу који поништава повећану осетљивост деце са атопијом на инфекције, па се атопијски фенотип без болести доњих дисајних путева у узрасту 8-24 месеца може дефинисати и концентрацијом  $CC16 \geq 4,8$  ng/ml (182). Ипак концентрацију СС16  $\geq 4,8$  ng/ml утврдили смо само код 20% деце са атопијом у узрасту 8-24 месеца.

Подаци у литератури показују да деца са предходно манифестованим визингом имају мање концентрације СС16 у серуму независно од атопије (209,210), док смо у нашој студији измерили мање концентрације СС16 код мушке деце без атопије у узрасту 5-7 месеци као и код женске деце са атопијом у узрасту 8-24 месеца. Тенденција повећања СС16 у серуму са већим узрастом у групама деце без атопије са визингом и са упалом плућа, односно смањења СС16 код деце са атопијом која су испољила исте респираторне болести (182) може указати да исти фенотипови (визинг, упала плућа) и исти ендотип (мале концентрације СС16 у серуму), у различитом узрасту (5-7 месеци код мушке деце без атопије и у 8-24 месеца код женске деце са атопијом) могу 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 живота код мушке деце без атопије, али не и касније у животу (125), може бити повезан и са малим концентрацијама СС16 у раном узрасту, који касније расте па уравнотежење анти-инфламацијског потенцијала на респираторном епителу може бити у основи изостанка болести касније у животу (182). Транзиција ћелија из епителног у мезенхимни фенотип је реверзибилан процес (160), 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 СС16 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. Студије на културама моноцита из крви деце са атопијом показале су конститутивно већу експресију  $Fc\epsilon RI\alpha$  која се снажно повећава под дејством  $TH2$  цитокина, као и  $CCR2$  (одговоран за одлазак ћелија у плућа), док је експресија  $Fc\epsilon RI\gamma$  (која је потребна за формирање високо-афинитетних рецептора за  $IgE$ ) на мијелоидним ћелијама индукована са  $INF$  тип I (211). Мијелоидне DC из коштане сржи које експримују  $Fc\epsilon RI$  и долазе врло брзо у ткиво плућа у току вирусне инфекције код деце са атопијом (која стварају специфичне  $IgE$  према алергену, али и према вирусу), препознају антигене са 10-100x већим капацитетом и индукују додатну  $TH2$  диференцијацију лимфоцита, односно повећавање пула меморијских  $TH2$  ћелија (91). Плазмоцитоидне DC које експримују  $Fc\epsilon RI$ , после премошћавања  $IgE$  антигеном, смањују експресију  $INF$  тип I, чиме се смањује капацитет антивирусног одговора, чему додатно доприноси инхибиција  $TH1$  у условима доминантног  $TH2$  одговора код деце са атопијом, па се продужава се трајање инфекције (212). Смањена продукција  $INF$  тип I удружена је са смањењем његовог антагонистичког ефекта на  $IL4$  и  $IL13$  индуковану експресију  $Fc\epsilon RI\alpha$  на мијелоидним DC, па долази додатно по повећања  $TH2$  одговора услед изостанка негативне повратне спреге која регулише алергијски фенотип DC на нивоу коштане сржи (211). Хронично оштећење респираторне слузокоже редукује пролиферативни потенцијал Клара ћелија и удружено је са њиховом трансдиференцијацијом у ћелије које продукују мукус (64). С обзиром да је код деце са атопијом утврђена удруженост клиничке манифестације упале плућа и хроничног визинга, са  $CC16 \leq 3,4ng/ml$  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 СС16 у серуму“ код деце са атопијом. Ова деца су имала прву акутну болест доњих дисајних путева у узрасту од 9 месеци, а после просечно четири месеца испољавали су се удружено упалу плућа и хронични визинг.



У присуству IL-13 долази до диференцијације базалних ћелија у пехарасте ћелије, а на Клара ћелијама је детектован рецептор за IL-4 чија активација је неопходна за диференцијацију Клара ћелија у ћелије које продукују мукус (213). Концентрације CC16 у серуму  $\leq 3,4\text{ng/ml}$  које смо измерили код деце са атопијом крајем прве године живота могу указивати на развој мукозне метаплазије респираторног епитела услед претежне диференцијације прогенитора епитела у пехарасте ћелије под утицајем TN2 цитокина, као и на развој епително-мезенхимне транзиције, с обзиром да су у узрасту 10-12 месеци измерене и велике концентрације TGF $\beta$ 1 код деце са атопијом. Због изостанка биолошких ефеката CC16 у плућима као што су: инхибиција фосфолипазе A2, редукција стварања еоикозаноида и продужење полу-живота сурфактанта услед смањења његове хидролизе фосфолипазом A2 (214), чишћење полутаната и антипротеазна активност (69), као и смањења броја цилијарних ћелија у бронхиоларном епителу услед усмеравање диференцијације прогенитора у пехарасте ћелије, потпуно је компромитована неспецифична имуност респираторне баријере, који је подложен понављаним оштећењима. Наши резултати су показали да се код деце са атопијом концентрација CC16 смањује на ниво  $\leq 3,4\text{ng/ml}$  просечно у 11. месецу живота (примарни догађај), а да су упала плућа и хронични визинг удружени са малим концентрацијама CC16 у серуму дијагностиковани у просечном узрасту 22 месеца (секундарни догађаји).

### 5.2.2 Акутни визинг и вирусне респираторне инфекције

Мали калибар дисајних путева и већа осетљивост на оксидативни стрес мушке деце, могу бити у основи чешћег испољавања акутног визинга у односу на девојчице, неvezано од постојања атопије. 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. Аустралијска студија је показала да је код деце која развијају бронхиолитис, плућна функција смањена пре испољавања вирусне инфекције (215). Удружено испољавање акутног ринитиса и бронхитиса у групи деце без атопије праћено је мањим концентрацијама CC16 код дечака у односу на девојчице и то у групи која не сиса и деце без алергије у породици, а што указује и на значај утицаја спољашњих фактора на смањење концентрација CC16. Управо у овој групи мушке деце узраста 5-7 месеци утврђено је да са повећањем броја ринитиса долази до пада CC16 у

серуму (што није био случај са девојчицама), док испољавање акутног визинга позитивно корелисало са концентрацијама СС16 у серуму.

Смањење концентрације СС16 у носној слузокожи постоји код људи који конзумирају мање од једне пакле цигарета дневно у току једне године (216). 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 (71). Токсичне компоненте из ваздуха као што су (фуран, ароматични угљени хидрати, нафтален, бензопирен, озон, азот оксид, компоненте дуванског дима итд) које подлежу биотрансформацији у Клара ћелијама могу довести и до хиперметилације гена за СС16 у бронхиолама (217,218), па епигенетске промене (услед редукованог антиоксидантног потенцијала) могу бити у основи утврђене мање концентрације СС16 код дечака без атопије. На смањену осетљивост девојчица на овакву врсту оштећења може утицати и анти-оксидантни ефекат малих доза естрогена (који су присутни у узрасту 2-6 месеци (190), с обзиром да фенолни прстен естрогена преузима слободне радикале, чиме их отклања из окружења, за разлику од великих концентрација естрогена код одраслих жена код којих катехол-естрогени представљају супстрат за цитохром Р450 и у већим дозама изазивају оксидативни стрес у ХОБП-у код жена пушача (191).

Као други значајан фактор спољашње средине удружен са визингом у дечијем узрасту су респираторне вирусне инфекције, од којих су највише проучавани RSV и hRV. Условима оштећења епитела hRV инфицира базалне ћелије (219), а ширење вирусне инфекције из носне слузокоже ка бронхијалном епителу може довести до потпуне деплеције базалних ћелија (220) са последичном транс-диференцијацијом Клара у базалне ћелије (2), па сматрамо да овај процес може бити у основи смањења концентрације СС16 и његовог антиинфламаторног дејства код мушке деце без атопије. Деца која су испољила визинг у току hRV инфекције у узрасту до три године имала су лошије параметре осцилометрије у односу на децу са инфекцијом без визинга, при чему не постоји побољшање после примене бронходилататорне терапије, што указује на постојање абнормалности малих дисајних путева (221), а што је у складу са нашим

налазом малих концентрација CC16 код мушке деце без атопије која не сисају у узрасту 5-7 месеци и имају испољени акутни ринитис и акутни визинг.

Примарна RSV инфекција се такође најчешће 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 (78). 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 стварња синцицијума у HBEC културама (енг. *Human Bronchial Epithelial Cells*, HBEC) (220), а што је утврђено и у биоптатима деце умрле због тешке респираторне болести (222). 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 (220). Индукција INF тип 3 (IL-28A/B и IL-29, односно INF $\lambda$ ) инфекцијом RSV утврђена је само у назалном респираторном епителу (223), при чему присуство ових цитокина има значаја у измени фенотипа из доминантно цилијарног у доминантно мукус-секреторни (пехарасте) епител у доњим дисајним путевима (220).

Механизам смањења CC16 код мушке деце без атопије која су имала ринитисе може бити осидативно оштећење слузокоже са откривањем базалних ћелија за RSV и hRV (док женску децу, од аерозагађењем изазваних промена на епителу штите конститутивно висок антиоксидантни потенцијал и високе концентрације CC16), након чега под дејством INF $\lambda$  долази до измене фенотипа респираторног епитела у доминантно мукус-продукујући, а диференцијација Клара ћелија у пехарасте и/или базалне ћелије за последицу има мање измерене концентрације CC16 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) (220). Међутим, смањење CC16 које прати акутне ринитисе код мушке деце за последицу има и смањење антиинфламацијског 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, односно бронхиолитиса,

током вирусне инфекције (220). Код деце са акутним респираторним болестима у одојачком периоду, утврђена удруженост присуства RSV и индивидуалних бактеријских профила са *Haemophilus*-ом, *Streptococcus*-ом, и/или *Moraxella*-ом у назофарингеалном лавату, а што је повезано и са ширењем инфекције из слузокоже носа на доње дисајне путеве паралелно са развојем појачаног инфламацијског одговора, као и са каснијим испољавањем перзистентног визинга, али механизам ове повезаности није познат (91). Наши резултати указују да би појачан инфламацијски одговор на бактерије које су колонизовале респираторну слузокожу у току вирусних инфекција, управо могли бити последица лошег локалног антиинфламаторног потенцијала на слузокожи услед малих концентрација CC16.

Међутим, појава акутног визинга код мушке деце без атопије, у нашем истраживању је повезана са последичним повећањем CC16, при чему је ово повећање праћено порастом концентрације IgA према RSV без обзира на атопију. Позитивну повезаност концентрација CC16 и IgA према RSV у серуму утврдили смо после престанка сисања код деце без атопије са хроничним визингом, односно код деце са атопијом која су испољила акутни визинг, што може указати на повратни механизам повећања CC16 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 (7), током ког процеса Клара ћелије пролиферишу и диференцирају у цилијарне ћелије у бронхиолама, као и у пнеумоците типа 2 у алвеолама, што одржава интегритет респираторног епитела после оштећења и не искључује могућност реактивације физиолошке мезенхимно-епителне транзиције која обезбеђује довољан пул Клара ћелија (29).

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 концентрација CC16 у серуму, што указује на одређене генске детерминантама (невезане за атопију у раном узрасту), које могу бити у основи исцрпљивања пула Клара ћелија током рецидивантне или тешке RSV инфекције, а у чијем механизму учествује и активација TNF $\alpha$  одговора, односно повећање концентрација TNF $\alpha$  до нивоа који је удружен са апоптозом локалних мезенхимних ћелија (191,224). Деца мајки са алергијом имају мањи број бактерија из групе *Lactobacillus* у меконијуму (225). Број *Lactobacillus*-а у амнионској течности повезан је са експресијом TLR у дигестивном тракту фетуса (226), а деца са алергијом родитеља и са мањим процентом *Lactobacillus*-

*a* у нормалној цревној флори у узрасту до две године чешће развијају атопију (227, 228). *Bacteroidaceae* стварају пропионат који има антиинфламаторна својства и протективни је фактор за настанак алергијске астме у мишијим моделима (229). Астма мајке удружена је са већом применом антибиотика и порођај царским резом (230, 231), што за последицу може имати и мањи прелаз мајчине нормалне флоре преко плаценте, црева или вагиналног тракта, што утиче на нормалну колонизацију новорођенчета и развој имунског система после рођења (232). Нема података о директној повезаности нормалне цревне флоре са концентрацијама СС16 у серуму.

### 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 IgE на уобичајене алергене очекивано је удружено са повишеним концентрацијама укупних IgE, као и присуством еозинофилне активације, али и повишеним концентрацијама IgG према RSV ( $\geq 6,6U/ml$ ) у серуму. 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 (224,233-236). TH2 одговор је физиолошки присутан у одојачком периоду, јер Т лимфоцити примарно диференцирају у TH2 лимфоците који продукују IL-4 и IL-13 (88), па концентрације укупних IgE расту току инфекција патогеним микроорганизмима неvezано за алергију (235), али је ниво њихове продукције различит између деце са атопијом и без атопије (237). У овом истраживању, у групи деце која нису имала болести доњих дисајних путева, једина разлика између деце са атопијом и без атопије је укупни IgE  $\geq 5,7 kU/l$  (генски детерминисана разлика у продукцији IgE), док је у групи деце са болестима доњих дисајних путева, код деце са атопијом измерен укупни IgE  $\geq 27,4kU/l$ , ECP  $\geq 9,1\mu g/l$  и IgG према RSV  $\geq 16,1U/ml$ , у односу на децу без атопије, што указује да је имунски TH2 одговор код деце са атопијом удружен са рецидивантним респираторним вирусним инфекцијама (238). У инфекцији RSV очекивана је доминација TH2 одговора, с обзиром да је ова инфекција удружена са смањеном продукцијом IFN $\gamma$ , смањењем активације NK ћелија, и смањењем TH1 и CTL имунског одговора уз фаворизовање TH2 имунског одговора (129), 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 поремећај алармирања на епителу, односно смањења неспецифичног антимикробног ефекта код деце са атопијом у овом узрасту. Овакав налаз, такође указује да код деце са атопијом у узрасту од 5-7 месеци, болест доњих дисајних путева није последица TSLP индукованог TH2 одговора. Наиме, секреција IL-4 из TH2 ћелија доводи до продукције IgE, а изоловано IL-4 или IL-33, као ни комбинација IL-33 и IL-25 не индукују активацију нуоцита типа 2 у плућима, већ се то догађа само у присуству TSLP, IL-2 или IL-7 (239). TSLP у нуоцитима типа 2 индукује експресију рецептора за IL-4 и тек након тога IL-33 и IL-4 изазивају пролиферацију нуоцита типа 2 у плућима (240), који су главни произвођачи IL-5 и IL-13, и одговорни за еозинофилну инфламацију, секрецију мукуса и БХР, али не и продукцију IgE (204,239).

Наши резултати указују да деца са атопијом и болестима доњих дисајних путева имају повишене вредности ЕСР-а само у узрасту  $\geq 8$  месеци, када су болести доњих дисајних путева удружене су са редукцијом СС16, па изостаје његово антиинфламаторно дејство преко инхибиције фосфолипазе А2, смањења стварања еокозаноида и продужења полуживота сурфактанта (69). Мала концентрација СС16 код деце са атопијом може бити последица постојања директног ефекта IL-4 на Клара ћелије које диферентују у пехарасте ћелије (213) или мукусног фенотипа респираторног епитела који је настао индукцијом IL-13 након инфекције RSV (241,242). Код СС16 дефицијентних мишева је утврђено веће перзистирање RSV и продужена експресија гена вируса (246). Кокултура еозинофила и епителних ћелија које су инфициране са RSV доводи до лизе еозинофила преко активације интегрин  $\beta 2$  и ослобађања ЕСР-а (247), рибонуклеазе која разграђује једноланчане RNK и има цитостатску активност преко дестабилизације липида у мембрани ћелија (248). Осим тога, вируси могу да инхибишу апоптозу ћелија Fas-FasL механизмом преко инхибиције каспазе 8 на који начин индукују некроптозу инфициране ћелије (249), а управо еозинофилне грануле доприносе процесу одклањања оштећених ћелија епитела што омогућава процес попуњавања простора издуженим околним ћелијама епитела на базалној мембрани, на који начин се не губи функција епитела као баријере, па се ЕСР сматра и показатељем

повећаног процеса репарације код пацијената са астмом (220). Међутим, садржај еозинофилних гранула је токсичан за нормалне епителне ћелије (250) и дозно зависно повезан са степеном оштећења (251,252), односно са појавом Креол-телашаца у спутуму код оболелих од астме (220,253). Инкубација ћелијских линија K562 (енг. *Human Erythroleukemic Cells*) и HL-60 (енг. *Cell Line Human Promyelocytic Leukemia*) са великим дозама ЕСР-а после четири дана доводи до инхибиције пролиферације ћелија за 50% (254), и ћелијска смрт индукована ЕСР-ом је посредована стварањем интрацелуларних слободних радикала и активацијом каспазе 3 (255). Нема података да ли ЕСР има цитотоксични ефекат и на хематолошке прогениторе Клара ћелија из костне сржи.

Код деце без атопије, болести доњих дисајних путева удружене су са такође порастом укупних IgE, али и са смањењем ЕСР-а, без промене у концентрацијама СС16 у серуму. Разлика у доминантном присуству еозинофилне активације код деце са атопијом у односу на повећање укупних IgE код деце без атопије може лежати у разликама у примарним ћелијама које су активирани у болестима доњих дисајних путева. Нуоцити типа 2 секретују IL-5 и IL-13 и њихова активација аларминима из епитела узрокује доминантно еозинофилну инфламацију, секрецију мукуса и хиперактивност, док секреција IL-4 из TH2 ћелија доводи до продукције IgE (239,256), па не искључујемо могућност да је доминација IL-4<sup>High</sup>IL-5<sup>Low</sup> TH2 одговора или изостанак активације нуоцита типа 2, код деце без атопије удружена са изостанком нежељеног ефекта еозинофилне инфламације у TH2 одговору на развој плућа. Код деце без атопије болести доњих дисајних путева удружене су и са порастом TSLP и IL-10 (што указује на повезаност између алармирања на епителу и развоја IL-10-везане толеранције) и то паралелно са порастом IgA према RSV, односно јачањем механизма хуморалног имунског одговора према вирусима на респираторној слузокожи. IL-10 смањује експресију TH1 цитокина, молекула II класе HLA и костимулацијских молекула на макрофагима, а појачава преживљавање и пролиферацију В ћелија као и продукцију антитела (235), класе IgA и IgG4 (257). У нашем истраживању утврђена је позитивна корелација између IL-10 и IgA према RSV само у групи деце без атопије. Изостанак пораста IL-10 код деце са атопијом у инфекцији RSV, може бити и у основи смањења концентрација СС16 које смо утврдили у узрасту  $\geq 8$  месеци. Наиме, на анималним моделима је показано да интраназална примена IL-10 повећава СС16 mRNA у ћелијама епитела плућа ембриона миша (258), као и да IL-10 повећава експресију гена

за CC16 до умереног (*steady state*) нивоа, а овај ефекат је завистан од сигнализације преко IL-10R које активира T/EBP транскрипторни фактор експресије CC16 (258). Плазмоцитоидне DC (pDC) генеришу IL-10 продукујуће Treg (259) у изолованим лимфним фоликулама унутар БАЛТ-а, али није утврђена разлика у броју ових ћелија у биоптату бронхија деце са атопијом и без атопије у узрасту до две године (84), иако је код деце са алергијом утврђена је смањена експресија IL-10 (260). Због тога не искључујемо могућност да код деце са атопијом изостаје индукција толеранције на нивоу интраепителних имунских ћелија.

### 5.3.1.2 Маркери различитих типова болести доњих дисајних путева

Нашим ранијим истраживањем је показано да у Шумадијском региону, 41% деце има бар једну болест доњих дисајних путева у узрасту до две године, али је 74% деце са визингом у овом узрасту без атопије (233). Анализа испитиваних биомаркера у овом истраживању која је урађена по типу болести доњих дисајних путева, показала је потпуно другачији образац и разлику у величини промене испитиваних биомаркера у односу на број и врсту респираторних болести у групи деце са и без атопије. Предходно испољена **акутна бронхијална болест** праћена је повећањем концентрације укупних IgE у серуму, али је код деце са атопијом на ову болест указивала концентрација укупних IgE  $\geq 63,5 \text{ kU/l}$ , док је код деце без атопије то био случај са укупним IgE  $\geq 3,7 \text{ kU/l}$ . Овај налаз је у складу са подацима из литературе да вирусна респираторна инфекција, иако повећава TH2 одговор код деце, није довољна за индукцију ризичног TH2<sup>high</sup> имунотипа који се повезује са алергијом и са каснијим испољавањем астме (91). Деца без атопије са **хроничним визингом** у односу на децу без болести доњих дисајних путева имала су IgA према RSV  $\geq 2,1 \text{ U/ml}$ , док су деца са атопијом и хроничним визингом имала IgG према RSV  $\geq 4,0 \text{ U/ml}$  у односу на децу са атопијом без болести. Маркери предходно испољене **упале плућа** код деце без атопије у односу на децу без атопије и без болести доњих дисајних путева су: IL-10  $\geq 3,9 \text{ pg/ml}$ , TSLP  $\geq 41,2 \text{ pg/ml}$ , TNF $\alpha$   $\geq 0,15 \text{ pg/ml}$  и IgA према RSV  $\geq 2,0 \text{ U/ml}$ , док је IL-10  $\geq 10,8 \text{ pg/ml}$  маркер испољавања упале плућа у односу на хронични визинг код деце без атопије. TSLP стимулише дендритске ћелије на продукцију APRIL, што доводи до повећања синтезе IgA, доприноси развоју TH2 имунског одговора, а IL-4 и IL-13 доводе до алтернативне активације макрофага који почињу да продукују IL-10 (54,101). Велика



концентрација IL-10 у серуму разматра као предиктивни фактор ризика за рецидивантни визинг код деце (261). IL-10 инхибише експресију костимулатора и молекула II класе HLA на DC и макрофагима, као и продукцију IL-12 у активисаним DC и макрофагима, чиме се супримира индукција INF $\gamma$  који је неопходан за TH1, и цитотоксични NK и CD8+T ћелијски одговор (262). 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 TH1 и CD8+T ћелијског одговора прејаким IL-10 регулацијом, која повећава осетљивост деце на вирусне инфекције (263). Експресивна секреција IL-10, такође, супримира фагоцитозу и презентацију антигена Т лимфоцитима, па може бити удружена и са дужим током и тежом клиничком сликом респираторне инфекције hRV или RSV (264), а што је у складу да нашим налазом високих концентрација IL-10 код деце са упалом плућа без атопије. Већу учесталост акутног визинга код деце са упалом плућа без атопије, са једне стране тумачимо управо великим концентрацијама IL-10, а са друге стране акутни ток је вероватно детерминисан концентрацијама CC16 које расту код деце без атопије, за разлику од деце са атопијом код којих је упала плућа и хронични ток визинга удружен са малим концентрацијама CC16 у серуму.

Осим типа болести доњих дисајних путева анализирали смо и повезаност броја различитих респираторних болести са испитиваним биомаркерима. Већи број акутних ринитиса и акутног визинга у групи деце без атопије повезан је са већим укупним IgE (за 0,8kU/l са сваки ринитисом и за 1,2kU/l са сваки 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 1,2kU/l, односно са сваки акутним визингом за 2,3kU/l). Осим укупних IgE, код деце без атопије са већим бројем респираторних болести растао је и IL-10 у серуму и то са сваки акутним ринитисом за 1,2pg/ml, са сваки акутним визингом за 2,0pg/ml (са акутним визингом у групи деце са хроничним визингом за 3,4 pg/ml) и са сваком упалом плућа за 6,2pg/ml (и са сваки акутним визингом у групи деце са упалом плућа за 4,8pg/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 (265, 266), балансирана продукција IL-10 редукује прекомерни имунски одговор у току вирусних инфекција (267). Мали и умерен пораст IL-10 који смо утврдили код деце без атопије са акутним респираторним болестима може се разматрати и из аспекта

индукције толерогеног меморијског пула на периферији који обезбеђује заустављање неадекватног имунског одговора на вирусне инфекције (91), као и на широк спектар агенаса (и микроорганизама) које се налазе у окружењу (268). Код људи је идентификована  $CD4^+CD25^-IL-7R\alpha^-$  популација ћелија (Tr1) које не експримују FoxP3 ни рецептор за IL-2, али оставрују имунорегулаторне ефекте преко продукције IL-10 (262). Ове ћелије се у *in vitro* условима генеришу из наивних Т лимфоцита у присуству толерогених сигнала (269), као што су незреле DC, у контакту са природним  $CD4^+CD25^+$  Treg порекла из тимуса, у присуству IL-10 и TGF $\beta$ 1 (270). Познато је да одржавање обнављања FoxP3+Treg од значаја је у одржавању толеранције на сопствене антигене, као и на егзогене антигене који су продуковани од стране мукозних DC (270), али стабилност индукованих Treg на периферији, као и врста и ниво толерогених сигнала који су потребни за генерисање меморијског пула *in vivo* код деце није позната.

У групи деце са атопијом већи број респираторних болести повезан је са повећањем TSLP (са сваким акутним ринитисом за 3,1pg/ml, са сваким акутним визингом за 6,4pg/ml, а са сваким хроничним визингом утврђен је пораст TSLP за 9,3 pg/ml, као и TNF $\alpha$  за 2,6pg/ml). TSLP је високо експримован у кертиноцитима и у епителу дисајних путева у току алергијске инфламације, па се сматра да је TSLP кључни регулатор алергијских болести (271,272). Пошто је просечна концентрација TSLP у серуму код деце са атопијом без болести доњих дисајних путева 16,8pg/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. Мијелоидне DC активирани у присуству TSLP, поред TH2 цитокина и еотаксина, могу да продукују и IL-8, (273, 274), а наши резултати указују да је пораст TNF $\alpha$  са порастом TSLP удружен само са хроничним визингом код деце са атопијом, односно великим концентрацијама TSLP.

У ћелијама епитела оболелих од астме у односу на здраве особе утврђена је слична базална експресија TSLPR, а TNF $\alpha$  и инфекција RSV 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 (275). У нашем истраживању деца са атопијом и хроничним визингом су поред пораста концентрација TNF $\alpha$  имала и велике концентрације IgG према RSV. Током TSLP зависног одговора у проинфламацијском окружењу (IL-1, TNF $\alpha$ ), мастоцити почињу да

продукују IL-5, IL-13, као и IL-6, TNF $\alpha$ , GM-CSF и хемокине (CCL1 и CXCL8) (108) што узрокује, поред јачања TH2 одговора, и инфилтрацију неутрофила, а ефекат TSLP на CD8<sup>+</sup> се састоји у индукцији цитотоксичних Т лимфоцита које продукују велике количине INF $\gamma$  уз повећавање њиховог преживљавања преко појачане експресије анти-апоптотског протеина Bcl-2 (109,276). INF $\gamma$  индукује повећање синтезе и ефекта TNF $\alpha$ , односно активацију неутрофила и класичну активацију макрофага (184). Неутрофили и класично активирани макрофаги одговорни су за убијање фагоцитованих микроорганизама преко продукције протеаза (еластаза и катепсина Г) и активацијом NADPH оксидазе која доводи до стварања слободних кисеоничних радикала (енг. *Reactive Oxygen Intermediates*, ROI). Активацијом макрофага преко TLR (инфекција RSV) у присуству INF $\gamma$  долази до синтезе индуцибилне синтазе азот-оксида (енг. *Inducible Nitric Oxid Synthetase*, iNOS) која катализује стварање NO. Ефекат ROI и NO није специфичан, па осим убијања микроорганизама, током пролонгиране и снажне активације неутрофила и макрофага, неселективно могу довести до оштећења ткива домаћина (277). Због тога не искључујемо могућност да код деце са атопијом утврђена већа продукција TSLP која прати већи број респираторних болести (са локалном индукцијом IL-6, TNF $\alpha$ , CXCL8 из мастоцита и индукцијом INF $\gamma$  из CTL), као и повећање концентрација TNF $\alpha$  са већим бројем хроничних визинга, могу бити разлог локалне индукције TH1 ћелија које експресијом FASL могу довести до апоптозе епителних ћелија и компромитовања функције респираторне баријере (278), односно смањења Клара ћелија и последично концентрација CC16 у серуму. Услед смањења CC16 изостаје инхибиција синтезе липидних медијатора (LTB<sub>4</sub> и PAF) који, заједно са TLR4 сигнализирањем у инфекцији RSV, активирају додатно комплекс NADPH оксидазе у неутрофилима и макрофагима (277), односно стварања слободних радикала који у *circulus vitiosus*-у узрокују даље оштећење ткива, па је смањење CC16  $\leq 3,4\text{ng/ml}$  удружено са каснијом манифестацијом упале плућа код деце са атопијом.

У групи деце са атопијом и упалом плућа у односу на децу са атопијом без болести доњих дисајних путева, измерили смо такође и веће концентрације укупних IgE  $\geq 67,0\text{kU/l}$  а јачање TH2 одговора код ове деце може бити последица паралелне TSLP индуковане продукције CCL17 (хемоатрактанта за TH2 лимфоците (279) из ћелија хуманог епитела дисајних путева које експримују TSLPR и IL-7R $\alpha$  (275) у оквиру физиолошког процеса зарастања ране. Ипак, измерене концентрације TGF $\beta$ 1  $\leq 17,8\text{ng/ml}$  код ове деце указују на могући изостанак алтернативне активације

макрофага, због чега је процес зарастања рана компромитован или на неактивирану толеранцију изазвану неадекватним ефекатом TSLP на CD4<sup>+</sup> у тимусу у коме изостаје њихова диференцијација у Treg (109), или због мањег прилива тимоцита из коштане сржи услед потентног инхибиторног ефекта IL-4 на раст хематопоетских прогенитора (185), што за последицу има мале концентрације и TGFβ1 и CC16 измерене код деце са атопијом која су имала упалу плућа.

### 5.3.2 Фактор атопија

#### 5.3.2.1 CC16 и TGFβ1 код деце са атопијом

У нашем истраживању смо током прве године код деце са атопијом утврдили високе концентрације TGFβ1 у серуму, највеће у узрасту од 10-12 месеци, када долази до статистички значајног пада концентрација CC16. TGFβ1 драстично супримира развој дисајних путева и алвеола (239), а овакав однос TGFβ1 и CC16 у узрасту 10-12 месеци код деце са атопијом указује на могућност постојања епително-мезенхимне транзиције (EMT) типа 2. TGFβ1 доводи до метилације хистона на промотору за E кадери, са дестабилизацијом међућелијских веза и смањује експресију инхибитора диференцијације – ID што реактивира TWIST, па долази до EMT (160). Такође, је показано да после оштећења, преживеле Клара ћелије продукују Wnt7b који утиче на повећану пролиферацију парабронхијалних глатких мишића који почињу да секретују FGF10. У току репулације оштећеног епитела ектопична експресија FGF10 индукује експресију *Snail1* у Клара ћелијама и активацију EMT програма са редукцијом експресије E- кадери и индукцијом αSMA (енг. *α-Smooth Muscle Actin*) и виметина који чине адекватну нишу за размножавање и миграцију прогенитора и повратну мезенхимно-епителну транзицију (161). Продукција CC16 из опорављених прогенитора CC16 редукује депозицију екстрацелуларног матрикса редукцијом активног облика TGFβ1 (280). Због тога се реверзибилна EMT сматра уобичајеном појавом после оштећења епитела на који се надовезује процес мезенхимно-епителне транзиције који доприноси нормалној регенерацији епителне баријере (161), а што може бити разлог амплитудиналног кретања концентрација CC16 код деце без атопије. TGFβ1 је главни индуктор измене μ у α тешки ланац током развоја хуморалног одговора (220), а продукција IgA зависна је и од IL-10 (54,220), па поремећаји регулације имунског

одговора могу бити у основи изостанка ефективног IgA одговора на слузокожама, односно доминантног IgG одговора према RSV који смо утврдили код деце са атопијом.

TGF $\beta$ 1 стимулише експресију FoxP3, па је диференцијација FoxP3+ Treg на периферији зависна од овог цитокина. Елиминација TGF $\beta$ 1 или блокирање TGF $\beta$ 1 сигнала удружено је са системским инфламацијским болестима услед дисфункције функционалних Treg (183). Оди и сарадници су такође утврдили повећан ризик за испољавање визинга код одојчади са малим концентрацијама TGF $\beta$ 1 (281), а у CAS студији није утврђена удруженост изолованих болести доњих дисајних путева ни са једним микроорганизмом или њиховом комбинацијом (282), па према нашим резултатима TGF $\beta$   $\leq$  17,0ng/ml у серуму може бити и узрок спонтане инфламације у плућима неvezано за инфекцију, коју смо утврдили код женске деце са упалом плућа и ларингитисом, мушке деце са атопијом која су испољила клиничку манифестацију упале плућа без визинга, као и изоловане манифестације акутног визинга код деце без атопије (у просечном узрасту од 6 месеци). Смањење TGF $\beta$ 1 уз редукцију Treg ћелија један је од механизма развоја и алергије (283), а испитивање деце са алергијом на млеко показало је да је експресија FOXP3 mRNA најмања код деце која имају клиничку манифестацију алергије после пробе млеком, већа код деце која имају алергију без клиничке манифестације, а највећа код деце која су развила толеранцију на млеко, па је индукција специфичних Treg у основи развоја толеранције у алергији (260). Treg смањују продукцију IgE и директно и индиректно смањују активност ефекторских ћелија алергијске инфламације као што су еозинофили, базофили и маст ћелије. (284). Адоптивни трансфер CD4+CD25+Treg ћелија резултује у супресији главних карактеристика алергијског одговора као што су продукција TH2 цитокина, еозинилна инфламација и БХР, као и до спречавања процеса ремоделовања дисајних путева у случају постојања хроничног алергијског запаљења (285). Концентрација укупних IgE негативно корелише са експресијом FOXP3 mRNA (260,286), а велике концентрације укупних IgE разматрају се и као маркер имунске дисрегулације настале као последица смањеног броја Т лимфоцита услед дефекта тимуса (*Di George Sy*) или постојања олигоклоналности Т лимфоцита (*RAG1, RAG2, Artemis* дефицити), а који се манифестују првенствено оштећењем органа који се континуирано обнављају (287). Моно- или олигоклонална експанзија TH2 лимфоцита удружена је са великим концентрацијама IgE и испољавањем алергијских болести, као и одсуством Хасалових телашаца у тимусу која доприноси смањеном броју Treg (288). Најтежи примери

дисрегулације су *IPEX* синдромом (енг. *Immune Disregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X Linked Syndrome*) који представља дефект у стварању Foxp3, главног транскрипторног фактора природних Treg, и манифестује се ентеропатијом, лезијама коже, цитопенијама, као и Оменов синдром (олигоклоналност Т лимфоцита) који се манифестује екцемом, ентеропатијом и лимфопрлиферативним синдромом и удружен је са алергијама (287,288).

TGF $\beta$  индукује експресију интегрина  $\alpha\beta 6$  преко кога алвеоларни макрофаги чврсто пријањају за ћелије епитела у стању мировања (289). У случају губитка ове адхезије (нарушавања интегритета баријере), алвеоларни макрофаги развијају функцију фагоцитозе и секреције проинфламацијских цитокина са развојем стања инфламације у плућима (289). TGF $\beta 1$  такође повећава својства епитела као баријере повећавајући (на SMAD независан начин) деградацију RhoA што је потребно за очување интегритета чврстих међућелијских веза (290), а чиме онемогућава и ефекат проинфламаторних цитокина на епител, па услед смањења TGF $\beta 1$  може доћи до развоја БХР-а код деце са атопијом. Међутим, утврђено је да TGF $\beta 1$  има улогу и у деградацији међућелијских веза у току епително-мезенхимне транзиције (са смањењем CC16 у узрасту 10-12 месеци код деце са атопијом), али да се са падом TGF $\beta 1$  услед повећања TNF $\alpha$  који индукује апоптозу фибробласта (191,224) долази до смањења протективног ефекта TGF $\beta 1$  у антагонизовању ефекта проинфламацијских цитокина на епител, што је додатно потенцирано малим концентрацијама CC16 током друге године код деце са атопијом, односно смањењем CC16 индукованог антиинфламаторног потенцијала на епителу. У нашем истраживању пад концентрације TGF $\beta 1$  у серуму ( $\leq 17,0\text{ng/ml}$ ) измерен је код деце са атопијом у другој години живота и то код женске деце, а што је удружено са малим концентрацијама CC16 ( $\leq 3,4\text{ng/ml}$ ) у серуму, као и чешћим предходним дијагнозама ларингитиса и упале плућа у односу на женску децу са атопијом и већим концентрацијама TGF $\beta 1$ . Аутоимунска дисрегулација је чешће присутна код жена (291), али се узроци овог налаза још увек истражују, првенствено код деце, код које је утицај хормона на имунски систем дискутабилан.

#### 5.3.2.2 CC16 и цитокини урођене имуности

У нашем истраживању смо утврдили позитивну корелацију ECP-а и TGF $\beta 1$  код деце са атопијом, са максимумом концентрација оба цитокина у узрасту од 10-12

месеци. Овај пораст оба биомаркера код деце са атопијом може бити последица ефекта TGF $\beta$ 1 из епитела дисајних путева који индукује акумулацију нуоцита у епителу и последичну еозинофилну инфламацију у плућима (59), као и повећања експресије еотаксина у фибробластима под дејством IL-4 и IL-13, инфилтрације еозинофилима који такође продукују TGF $\beta$ 1, као и пораста TGF $\beta$ 1 порекла из M2 активисаних макрофага који стимулише продукцију екстрацелуларног матрикса (29,292). Некроза еозинофила која је удружена са порастом ЕСР-а, дешава се пре активације неутрофила и може бити индукована стафилококним ентеротоксином (293), имуноглобулинима (IgG, sIgA) (294), фактором активације тромбоцита, FMPL (295), Siglec-8 (296), паразитима и гљивицама (220). На анималним моделима је показано да управо токсични протеини из еозинофила, као што је ЕСР доводе до оштећења епитела у клинички значајним концентрацијама (220,250). CC16 инхибише стварање липидних медијатора преко инхибиције фосфолипазе A2 (69), док се липидна телашца у еозинофилима дефинишу као места синтезе еикозаноида (297). LTB<sub>4</sub> и PAF (који се појачано стварају у одсуству CC16) су снажни хемоатрактанти за еозинофиле, који стимулишу дегранулацију еозинофила и њихову оксидативну активност (297), па смањење концентрација CC16 може бити у основи одржавања еозинофилне инфламације код атопичара индуковану липидним медијаторима, што објашњава негативну корелацију ЕСР-а и CC16.

Не може се искључити ни директни цитотоксични ефекат ЕСР-а на бронхиоларни епител и/или његове прогениторе у условима малих концентрација TGF $\beta$ 1, с обзиром да је код деце без атопије утврђено смањење концентрација CC16 услед повећања ЕСР-а, али само када се статистички искључи ефекат TGF $\beta$ 1, који је главни инхибитор активације еозинофила (23,297). 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, већ и на нормално ткиво, а еозинофилне пероксидазе и каталазе учествују у настанку токсичне хипохромне и хипохлорне киселине које доприносе оштећењу (101). Негативни ефекат ЕСР-а на Клара ћелије може бити везан за цитотоксични ефекат на прогениторе, као и за деградацију miRNA неопходних за индукцију мезенхимно-епителне транзиције током развоја плућа. Међутим, код деце без атопије негативна корелација између CC16 и ЕСР-а утврђена је, осим код TGF $\beta$  дисрегулације, и код деце која су имала високе

концентрације CC16 ( $\geq 4,8 \text{ ng/ml}$ ) (могућа интензивна MET), па сматрамо да је продукција еотаксина из Клара ћелија и инфилтрација еозинофилима која је зависна од интактних Клара ћелија у респираторном епителу (71) уствари један од повратних механизма контроле прекомерног раста плућа.

Астма се разматра и као болест губитка толеранције на агенсе из ваздуха који нису штетни (59), а системска неутрализација TGF $\beta$ 1 удружена је са ремоделовањем у плућима, инфламацијом и БХР-ом независно од места излагања алергену (298). Код деце са атопијом у условима изостанка утицаја TGF $\beta$ 1 највећа јачина везе утврђена је између смањења CC16 и повећања IL-10, при чему је повећање IL-10, са највећом јачином везе, удружено са повећањем TSLP. 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. TH2 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 $\gamma$  са инхибицијом диференцијације TH1 и TH17 лимфоцита и са IL-13 учествује у алтернативној активацији макрофага уз стимулацију TGF $\beta$ 1 и фибробластних фактора раста и продукцију колагена током репарације ткива, индукује пролиферацију, диференцијацију и секреторну функцију пехарстих ћелија бронхијалног епитела са стварањем заштитиног слоја мукуса и продукцијом IgA (54,220). Могуће је да је управо TH2 индукција трансдиференцијације Клара ћелија у пехарасте ћелије у основи смањења CC16 код деце са атопијом, али се према нашим резултатима то дешава само у условима изостанка ефекта TGF $\beta$ 1, односно недостатка адекватних сигнала у стем-ћелијској ниши за пролиферацију, односно обнављање ових прогенитора, тј у условима дисрегулације и одсуства интраепителних регулаторних сигнала који су од значаја у очувању интегритета епитела (93). Трансгена експресија Smad7 (инхибитора ефекта TGF $\beta$ 1) у Клара ћелијама, смањује број нуоцита типа 2 и редукује еозинофилну инфламацију (59) са смањењем продукције мукуса и мање депозиције матрикса у субепителним регионима, уз значајно повећање IL-10 у хомогенизату плућа (299). Могуће је да интраепителни пад TGF $\beta$ 1 удружен са редукцијом броја Клара ћелија, уз пораст IL-10 има физиолошку улогу у остваривању ефеката IL-10 на појачану експресију CC16 mRNA (258,300) што би омогућавало даљи раст плућа, али да је овај механизам код деце са атопијом компромитован, можда услед SNP за IL-10R, преко



кога се остварује ефекат IL-10 на активацију T/EBP транскрипторни фактор који повећава експресију *CC16* (258). 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, а да је развој TH1 одговора, тј повећање INF $\gamma$  и TNF $\alpha$  потребно за стимулацију продукције *CC16* (72,73), односно да се ради о повратном механизму омогућавања раста плућа код деце са доминантним TH2 одговором.

Пад ECP-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 ECP-а и TNF $\alpha$  код мушке деце са атопијом и женске деце без атопије. Код деце са атопијом током друге године живота долази до израженог пада TGF $\beta$ 1 уз умерени пад ECP-а, па је смањење концентрације TGF $\beta$ 1 у серуму код деце са атопијом у првој половини друге године живота бар делом повезан са падом активности еозинофила. Мања концентрација IL-2 (неопходног за одржавање пула Treg, а у чијем одсуству постоји трансдиференцијација Treg у TH17) могла би имати улогу и у редукцији активности нуоцита типа 2 приликом излагања аларминима а што за последицу има депресију TH2 одговора, односно активацију неутрофилног запаљења у TH17 одговору (239). У узрасту 13-17 месеци код деце са атопијом, мале концентрације TGF $\beta$ 1 удружене су са већим концентрацијама TNF $\alpha$ , што указује на развој TH17 одговора у овом узрасту код деце са атопијом. TNF $\alpha$  преко активације NF- $\kappa$ B директно утиче на протеине чврстих међућелијских веза у епителу плућа, повећавајући његову пропустљивост, а што има улогу у повећању чишћења ексудата из малих дисајних путева и алвеола и одржању гасне размене, али степен инфламаторног оштећења епитела, који је повезан са испољавањем болести и механизми његовог настанка нису до краја познати (301). Повећање TNF $\alpha$  у серуму утврђено је у исто време када је утврђен пад концентрација TGF $\beta$ 1 (13-17 месеци), а после пада концентрација *CC16* (10-12 месеци) код деце са атопијом. *CC16* модулише функцију DC преко смањења експресије OX40 лиганда, IL-23, IL-6, (77), на дозно-завистан начин инхибише хемотаксу хуманих полиморфонуклеара зависну од формил-метионил-леуцил-фенилаланина (енг. formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine, fMLP) (10), редукује експресију TLR4 на алвеоларним макрофагима, смањује и експресију TNF $\alpha$  из алвеоларних макрофага (302) и инхибира LPS-ом индуковану експресију TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 у макрофагима преко инхибиције NK- $\kappa$ B и p38 MARK сигнализација (303). Због

тога сматрамо да мале концентрације  $CC16$  у серуму током прве половине друге године живота удружене са развојем неутрофилног запаљења код деце са атопијом које је праћено и малим концентрацијама  $TGF\beta 1$ . У групи деце која су на природној исхрани, а која су имала телесну масу на рођењу  $\geq 3750g$  (необјављени резултати) измерили смо најмање концентрације  $TGF\beta 1$  (код деце без атопије) и највеће концентрације  $TNF\alpha$  (код деце са атопијом), па не искључујемо могућност да механизми контроле соматског раста леже у активацији неутрофилне инфламације удружене са поремећајима развоја плућа. У прилог овој хипотези иде и чињеница да се тешка неутрофилна астма са касним почетком повезује са гојазношћу код девојчица, али је неутрофилни тип инфламације редак код мале деце (140). Експресија  $TNF\alpha$ ,  $IL-1$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $GM-CSF$  у ћелијама респираторног епитела у току инфекције или услед изложености загађивачима у ваздуху, може директно активирати неутрофиле или индуковати  $TH17$  лимфоците (304).

У одсуству интраепителног  $TGF\beta 1$  постоји смањење  $IL-4+$  ћелија и  $IL-13+$  ћелија у плућима (при чему смањење  $TGF\beta 1$  у епителу инхибише и експресију  $GATA-3$  у нуоцитима типа 2), али се одржава број  $IL-17+$  ћелија (59). Хумане  $FoxP3+$   $Treg$  у проинфламацијском окружењу могу конвертовати у  $TH1$  или  $TH17$  лимфоците, мада је утврђена и стабилност регулаторне активности  $FoxP3+$   $Treg$  чак и ако оне стичу капацитет продукције  $IFN-\gamma$  и  $IL-17$  (262). На смањење експресије  $FoxP3$  може утицати неутрализација  $IL-2$ , без конверзије „бивших“  $FoxP3+$  ћелија у конвенционалне  $T$  лимфоците (262). У нашем истраживању, код деце са атопијом велика јачина везе између  $ECP$ -а и  $TGF\beta 1$  утврђена је по искључењу ефекта  $IL-10$ , док је пад  $TGF\beta 1$  праћен порастом  $TNF\alpha$  који је повезан и са високим концентрацијама  $IgG$  према  $RSV$ . С обзиром да је  $PCV$  инфекција повезана са неутрофилном инфламацијом (129), а код деце са атопијом смо утврдили негативну повезаност  $TGF\beta 1$  и  $TNF\alpha$  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. Испитивања ефекта неутрализације  $IL-10$  у културама  $CD4+CD25+$   $Treg$  и  $CD4+CD25-$  ефекторских  $T$  лимфоцита, изолованих из периферне крви особа са алергијом и без алергије, показала је пораст продукције  $INF\gamma$  у културама ефекторских  $T$  лимфоцита, као и шестоструко повећање  $TNF\alpha$  и код особа са алергијом и код особа без алергије (305).  $TNF\alpha$  директно смањује експресију  $Foxp3$  и поништава супресивну функцију  $Treg$ , а примена третмана са анти-  $TNF\alpha R$  (*etanercept*) доводи до повећања експресије

Foxp3 у CD4+CD25+ Treg и обнављања њихове функционалне активности код особа са алергијском астмом (306). Због тога сматрамо да повећање концентрације TNF $\alpha$  може бити у основи одржавања малих концентрација TGF $\beta$ 1 код деце са атопијом током друге године и последичног проинфламаторног стања, односно да је неадекватна индукција IL-10 (која у периоду 1-3 месеца после прекида сисања не прати пораст TSLP код деце са атопијом, као и изостанак повећања IL-10 са порастом IgA према RSV код деце са атопијом) може бити у основи патолошког ефекта TNF $\alpha$  (стварање ROS, липидна пероксидација, потрошња антиоксидативних ензима и промене потенцијала на мембрани митохондрија, чиме индукује апоптозу ћелија (191). Апоптоза фибробласта може да представља механизам превенције ремоделовања у дисајним путевима деце са атопијом, а присуство TNF $\alpha$  активира урођени имунски одговор и продукцију IL-6, IL-1 из епителних, ендотелних и ћелија имунског система што ствара услове за развој TH1 одговора и позитиван повратни ефекат на секрецију CC16 (72).

#### *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 $\mu$ g/l са већим бројем болести доњих дисајних путева ( $\geq$ 3х) 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 TH2 одговора може бити у основи испољавања БХР-а односно IL-4<sup>Low</sup>IL-5<sup>High</sup> TH2 имунски одговор удружен је са одржавањем, односно амплификацијом еозинофилне инфламације (307), на коју значајан ефекат може имати активација нуоцита типа 2 у плућима (308), а коју смо утврдили код деце без атопије са БХР-ом. Нуоцити типа 2 могу да процесирају антигене и да их презентују Т ћелијама преко молекула HLA класе II, при чему интерреакција HLAII-TCR не доводи до пролиферације Т ћелија већ до повећане продукције IL-2 који повратно може индуковати пролиферацију нуоцита типа 2 и продукцију IL-13. Само у присуству TSLP се преко активисаних DC стимулише TH2 одговор и продукција IL-4, односно специфичних IgE (239). Управо код деце са

атопијом и БХР-ом уз велике концентрације TSLP у серуму, измерене су и велике концентрације укупних IgE које указују на IL-4<sup>High</sup>IL-5<sup>Low</sup> TH2 одговор, односно постојање DC индукције TH2 ћелија које продукују IL-4 и IL-13, са повећањем рецептора за IL-4 на Клара ћелијама, чија активација индукује мукусну метаплазију (213), а што може бити удружено са смањењем CC16 у серуму.

Код деце без атопије која имају еозинофилну активацију ( $ECP \geq 12,4 \mu g/l$ ) и развијају БХР, измерен је  $IL-10 \geq 10,8 \text{ pg/ml}$  и  $TSLP \leq 25,1 \text{ pg/ml}$  у односу на децу која имају еозинофилну инфламацију, али немају БХР. Мале концентрације TSLP које су измерен код ове деце могу указивати на изостанак TSLP-индуковане стимулације DC које усмеравају TH2 диференцијацију лимфоцита, па изостаје повећана TH2 лимфоцитна продукција IL-4, неопходног за продукцију IgE (239). Велике концентрације IL-10, које су измерене код деце без атопије са БХР-ом, због инхибиције класично активираних макрофага и супресије продукције IL-12 смањују TH1 и цитотокични антивирусни одговор, што може бити у основи испољавања већег броја, односно тежих облика вирусних инфекција код деце (261,266). У студијама испитивања бактеријске ДНК у бронхоалвеоларним лаватима је показано да пацијенти са астмом и еозинофилном инфламацијом у односу на пацијенте са астмом без еозинофилне инфламације имају веће присуство *Sphingomonas*, *Halomonas* и *Aeribacillus sp.* а мање *Neisseria* и *Bacteroides sp.* (309), док су инфекције *Mycoplasma pneumonia* такође удружене са повећаним концентрацијама ECP-а неvezано за атопију (310), па не искључујемо могућност хроничне инфекције праћене еозинофилном инфламацијом код деце која немају атопију, али имају еозинофилну инфламацију. Код деце без атопије која нису развила БХР са порастом TSLP расте и ECP-а само у узрасту 5-7 месеци, док у узрасту 8-24 месеца са порастом TSLP долази до пораста TNF $\alpha$  у серуму, а што није био случај код деце без атопије која су развила БХР. Изостанак пораста TSLP може бити у основи смањене продукције TNF $\alpha$  из CD4+ ћелија односно изостанка развоја TH1/TH17 одговора у узрасту 8-24 месеца код деце без атопије са БХР, што за последицу има одржавање еозинофилне инфламације.

За настанак атопије и астме утврђен је значај експресије молекула II класе HLA на мијелоидним ћелијама, као и број и функција циркулишућих Treg и DC (91). Активација меморијских Т ћелија у ткивима одвија се преко презентације антигена молекулима HLA класе II на Б ћелијама и макрофагима, а нуоцити типа 2 могу да процесирају антигене и да их презентују Т ћелијама преко молекула HLA класе II, када

изазивају индукцију IL-2 (239), од значаја у преживљавању Treg (54). Студије скрининга генома идентификовале су повезаност астме и гена на хромозому бр21 где се налазе гени за молекуле HLA (енг. *Human Leukocyte Antigen*, HLA) (311), као и разлике у алелима који су удружени са различитим типовима астме. Астма са великим концентрацијама укупних IgE удружена је са HLA-DRB1\*11 (у 40%) у Ирану (312), са B\*08, DRB1\*01 и \*03 у Хрватској (313) и DRB1\*07 у Немачкој (314), док је астма са малим концентрацијама укупних IgE удружена је са HLA-DRB1\*0301 (у 17,5%), \*07 (у 20%) у Ирану (312), и са DRB1\*16 у Хрватској (313), па се не искључује могућност да су разнолики резултати последица разлика у учесталости одређених халотипова карактеристичних за етничке групе.

У основи различитог механизма TH2 одговора у астми могу утицати и карактеристике алергена (239). Алергени са протеазном активношћу (папаин који повећава мокраћну киселину у ћелијама епитела или активира PAR-2; а у којој групи су и алергени гриње, амброзије, буђи и буба-шваба) индукује TH2 инфламацију у плућима у условима изостанка продукције IL-12, а присуство непротеазних алергена (хитина и полисахарида из инсеката, паразита и гљивица) индукују активацију нуоцита типа 2 преко TSLP, IL-25 и IL-33 (315, 316). Полиморфизам молекула HLA који је повезан са карактеристичним процесом обраде антигена може бити разлог појаве сензибилизације на различите алергене који детерминишу и клиничку манифестацију алергијске болести. У популацији народа Ирана није утврђена повезаност молекула II класе HLA са специфичним IgE утврђеним *skin prick* тестом (312), али је сензибилизација на грињу чешће била удружена са DRB1\*11 у Венецуели (317), са DRB1\*07 у Кореји, са DRB1\*04 у Грчкој (318), B\*08 у Хрватској (313). Полиморфизам HLA, њихова различита експресија на имунским или ћелијама ткива, као и различити алели цитокина, значајно утичу на репертоар индукованих Treg у тимусу, као и на потенцијал антиген презентујућих ћелија да презентују антигене и узрокују доминацију ефекторских или регулаторних Т лимфоцита у односу на алерген.

#### 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. Наши резултати указују да 80% деце са атопијом и БХР-ом са малим концентрацијама CC16 и 100% деце без атопије са БХР-ом

и великим концентрацијама ЕСР-а, имају континуирани визинг у трајању од три и више месеца. 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 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 (71), па постоји могућност да је велики број Клара ћелија у плућима одговоран за еозинофилну инфламацију са пролонгираним визингом код деце без атопије. У културама хуманог епитела бронхија показано је да СС16 инхибира IL-13 индуковану експресију MUC5AC и LPS-ом индуковану експресију IL-8 и GM-SCF преко инхибиције NF- $\kappa$ B и ERK фосфорилације (319), али смо у нашем истраживању 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 $\alpha$ , као и инфекцију RSV (129). Анализа цитокина у БАЛ-у оболелих од астме показао је присуство TH2/TH17 одговора (320), који може бити у основи мешане инфламације у дисајним путевима. *In vitro* експерименти показали су ефекат ЕСР у деактивацији инфективности RSV ефектом рибонуклеазе, а инкубација ЕСР-а са RSV смањује инфективност вируса у хуманом плућном епителу (248). ЕСР такође инхибира пролиферацију незрелих лимфоцита и смањује продукцију антитела у В ћелијама (248). Међутим, RSV може да инфицира еозинофиле и да се репликује унутар еозинофила и индукује експресију IL-6 (321). Бразилски аутори су код деце са РСВ инфекцијом узраста 9-12 месеци утврдили велики титар IgG1 према RSV, што указује на развој TH1 одговора односно повећане продукције INF $\gamma$  (322), који су индуковани активацијом урођене имуности (183). TNF $\alpha$  повећава секрецију СС16 у ћелијским културама хуманих ћелија епитела плућа (72), и потенцира ефекте IL-3 на пролиферацију прогенитроа (185), али са друге стране нарушава интегритет баријере (323). Зато би његово присуство могло бити од значаја у повећању прогениторског пула Клара ћелија са великом концентрацијом СС16 која је измерена код деце без атопије са пролонгираним током визинга. Наиме, стање терминално диферентованих ћелија повратно уравнотежује степен пролиферације прогенитора (2), па би проинфламацијски ефекат TNF $\alpha$  на цилијарне ћелије могао онемогућавати ову повратну спрегу у контактної инхибицији пролиферације прогенитора локално у плућима, првенствено због нарушавања интегритета међућелијских веза (323). У мишијим моделима астме

утврђена је активација Wnt сигнализација у ћелијама глатких мишића, док су FGF10 и Notch сигнализација удружени са хиперплазијом пехарстих ћелија, при чему су оба пута удружена са одржавањем Клара ћелија онемогућавајући њихову терминалну диференцијацију у цилијарне ћелије (282), што може бити у основи дисфункције епитела код деце без атопије која је праћена БХР-ом (услед малог броја цилијарних ћелија) са једне стране и великим концентрацијама СС16 (услед нагомилавања Клара ћелија) са друге стране. Локално повећање броја Клара ћелија и њихова повећана продукција еотаксина могу бити у основи еозинофилне инфилтрације (71) код деце без атопије са БХР-ом удруженим са еозинофилном инфламацијом. У нашем испитивању концентрације СС16  $\geq 6,0$  ng/ml код деце без атопије повећавању ризик од хроничног визинга у току три и више месеци за 6,4х.

За разлику од деце без атопије, код које је пораст TNF $\alpha$  и IgG према RSV утврђен код деце са хроничним визингом који траје  $\geq 3$  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 узрастно утврђен и пад СС16, а визинг  $\geq 3$  месеца праћен је малим концентрацијама СС16  $\leq 3,4$  ng/ml у серуму у просечном узрасту од 22 месеца. Пораст TNF $\alpha$  код деце са атопијом и визингом у трајању 1-2 месеца могао би имати позитиван ефекат на продукцију СС16 (72), који се исцрпљује, па су код деце са трајањем визинга  $\geq 3$  месеца детектоване мале концентрације СС16 услед исцрпљивања прогенитроског пула. Код пацијената са астмом идентификоване су и TH2 ћелије које продукују IL-17 (ангажовање неутрофила и последични пораст TNF $\alpha$ ), а IL-4, IL-13 и IL-17 синергистично промовишу пролиферацију фиброцита и експресију колагена (324), па не искључујемо могућност почетног ремоделовања у продуженој реакцији зарастања рана код деце са атопијом и пролонгираним током визинга.

Иако смо код деце са атопијом утврдили позитивну корелацију ЕСР-а и TGF $\beta$ 1, са статистички значајним падом концентрација TGF $\beta$ 1 у серуму у другој години живота, у подгрупи деце са атопијом испољавање пролонгираног тока визинга било удружено са великим концентрацијама TGF $\beta$ 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. 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 (158). Велике концентрације  $TGF\beta 1 \geq 32,5$  ng/ml (које 6,6x повећавају ризик од пролонгираног тока визинга код деце са атопијом) уз мале концентрације CC16 у узрасту 8-18 месеци утврдили смо код 20% деце са атопијом. У астми код деце и одраслих утврђене су повишене концентрације серумског TGF- $\beta 1$  у односу на здраве особе (325). SNP промотора гена за TGF $\beta 1$  који су удружени са његовом повећаном експресијом, удружени су са развојем астме (326). TGF- $\beta 1$  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 (327). Могуће је да код деце са атопијом и пролонгираним током визинга уствари постоји рано ремоделовање дисајних путева у коме прекомерна експресија TGF $\beta 1$  активира епително-мезенхимну трофичну јединицу што промовише стварање микроокружења у ткиву плућа са развојем ремоделовања ткива дисајних путева и условљава губитак реверзибилности са редукцијом плућне функције и развојем астме (136). TGF $\beta 1$  доводи до промена у мезенхиму са активацијом фибробласта, ексцесивном депозицијом екстрацелуларног матрикса, фиброзирања и хиперплазије глатких мишићних ћелија (2), услед чега је пропусност баријере мања и за CC16, па ниске концентрације CC16 у серуму могу указивати и на развој ремоделовања дисајних путева (164).

#### *5.3.2.2.3 CC16 и имунорегулацијски цитокини*

У нашем испитивању смо 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 $\beta 1$  и CC16 што би могло да указује на индукцију терминалне диференцијације Клара ћелија под дејством TGF $\beta 1$  у одсуству оштећења плућа, односно мезенхимно-епителну транзицију. Током развоја плућа TGF $\beta$  инхибира експресију FGF10 у мезенхималним стромалним ћелијама плућа услед чега долази до повећане експресије Sox2 и индукције диференцијације прогенитора респираторног епитела (2), па овакав налаз указује да се код деце са атопијом промене у концентрацији CC16 дешавају пре испољавања болести доњих дисајних путева. Са испољавањем болести доњих дисајних путева јача TH2



одговор, при чему је пораст концентрације CC16 повезан је са IgA хуморалним одговором према RSV, па се не може искључити позитиван ефекат вирусне инфекције на развој плућа у условима доминантног TH2 одговора код деце са атопијом, при чему повећање ECP-а повратно контролише пролиферацију прогенитора.

Раст детета и истезање коже могли би бити у основи активације NFκB у ћелијама епитела које нису у стресу са последичном продукујом TSLP који у том случају првенствено индукује Т регулаторни одговор (57). 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. Утврђено је да је већи пораст у телесној маси током одојачког периода удружен са већом учесталашћу респираторних болести у току детињства и да представља фактор ризика за испољавање астме у предшколском узрасту независно од брзине феталног раста (328,329). 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 (330), 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. На анималним мишијим моделима конститутивно појачане селективне експресије TSLP у плућима после излагања антигену утврђена је инфилтрација плућа еозинофилима, TH2 лимфоцитима, ремоделовање, пехараста метаплазија са прекомерном експресијом мукуса и хиперреактивношћу бронхијалног стабла (331), због чега се сматра да је улога TSLP нарочито значајна у процесима сензибилизације на инхалационе алергене (332). Експресија TSLP пропорционална је

TH2 одговору, а негативно корелише са плућном функцијом (332,333), па пацијенти са астмом и ХОБП-ом имају већи број TSLP продукујућих ћелија у односу на здраву контролу (332). То је у сагласности са нашим резултатима да је у групи деце са атопијом TSLP  $\geq 41,9$  pg/ml у серуму повезан са 72x већим ризиком од БХР-а при чему су у истом фактору груписани CC16  $\leq 3,4$  ng/ml, узраст  $\geq 13$  месеци и алергија мајке. На анималним моделима је показано да системска прекомерна експресија TSLP из кератиноцита може бити окидач бронхијалне хиперреактивности код мишева (334), при чему су поремећаји диференцијације епидерма који резултују у дефекту коже као баријере узрок повећане експресије TSLP и TH2 инфламације у кожи (332). 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 нуоцитима типа 2 са развојем атопијског дерматитиса и индукцијом TH2 одговора уз системски пораст циркулишућих IgE, метаплазију респираторног епитела у пехараста тип, продукцију мукуса и развој инфламације у бронхиолама (335). Да ли је повећана концентрација TSLP повезана и са поремећајим диференцијације у респираторном епителу, што би имало ефекта на мање концентрације CC16, није познато.

#### 5.3.3.1 Детерминанте концентрација TSLP у серуму

Мање концентрације TSLP утврђене су код деце са атопијом у односу на децу без атопије у групи деце која не сисају, а пораст TSLP-а код деце са атопијом дешава се у старијем узрасту (18-24 месеца) у односу на децу без атопије (13-17 месеци), односно после дужег периода који је протеко од престанка сисања (пораст TSLP код деце са атопијом дешава се  $\geq 4$  месеца, а код деце без атопије за 1-3 месеца од престанка дојења). TSLP-ом индуковане DC у одсуству антигена индукују само пролиферацију CD4+ без диференцијације што указује на улогу ових ћелија у хомеостазу Т лимфоцита (336), док се индукција TH2 одговора дешава тек након излагања алергену (332). Ниске концентрације TSLP удружене са поремећајем хомеостазе Т лимфоцита, због изостанка индукције TH2 ћелија које продукују, осим TH2 цитокина и TNF $\alpha$  доводе и до супресије TH1/TH17 одговора на баријери (337). С обзиром да смо код деце са атопијом утврдили мање концентрације TSLP у серуму до краја друге половине друге године живота, изостанак адекватне пролиферације недиферентованих CD4+ ћелија могло би

условити релативно смањење пула из ког ће настати индуковани IL-10 продукујући Tr1 лимфоцити на периферији. На анималним моделима је утврђено да код TSLPR<sup>-/-</sup> мишева постоји дефекти миграције DC и редукован капацитет пролиферације CD4<sup>+</sup> ћелија (332). Уколико услед недостатка TSLP није дошло до адекватне ткивне дистрибуције DC, могуће је да током вирусних инфекција долази до инфилтрације ткива плућа незрелим дендритским ћелијама из костне сржи са повећаном експресијом FcεR1 рецептора а што представља основу за ангажовање TH2 имунског одговора на аероалергене (83).

На анималним моделима је показано да су нивои TSLP mRNA значајно снижени услед специфичне делеције ензима који су укључени у синтезу microRNA (Disher) (338). Не-кодирајуће miRNA се селективно везују за информациону RNA и инхибишу транслацију или промовишу њену деградацију, па могу смањивати експресију SNAIL1 и ZEB транскрипторних фактора од значаја у епително-мезенхимној транзицији (160). Смањење експресије miRNA, као што су miR-29b, miR-30 повећава експресију SNAIL1-a (339), док је смањење miR-200 удружено са повећањем ZEB-a и последичном прогресијом епително-мезенхимне транзиције (340). Смањење концентрације CC16 у серуму код деце са атопијом у периоду од 1-3 месеца од престанка сисања, а која је удружена са изостанком пораста TSLP у овом периоду, могло би бити последица паралелне смањене активности ензима који су укључени у синтезу microRNA које блокирају експресију транскрипторних фактора у EMT (као паралелном а не узрочном налазу). Није познато да ли су повишени нивои ECP-a због рибонуклеазне активности повезани са снижењем наведених miRNA.

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 ћелијама епитела дисајних путева оболелих од астме, па се сматра да велика осетљивост епитела астматичара на инфективне агенсе може бити последица снажног TSLP одговора (341). Код деце са атопијом смо предходно описали пораст TNFα и IgG према RSV код деце која су испољила хронични визинг. Испитивања на култури хуманих ћелија епитела дисајних путева (A549) показала су да RSV инфекција и TNFα повећавају експресију TSLPR и IL-7Rα (275). Испитивања индукције хуманих DC са TSLP и TLR3 лигандима показала су постојање диференцијације централних

меморијских TH17 лимфоцита у условима TH2 имунског одговора (342), па с обзиром да код деце са атопијом у условима изостанка IL-10 имунорегулације постоји смањење TGFb1 са повећањем TNF $\alpha$ , могуће је да је развој TH17 одговора механизам смањења високе концентрације TGF $\beta$ 1 код деце са атопијом, а што је праћено и смањењем ECP-a. Слабија индукција TSLP код деце са атопијом може бити удружена и са мањом продукцијом IL-2 током активације и диференцијације Т лимфоцита (због мањег броја DC и CD4+ ћелија услед нижег TSLP-a у млађем узрасту), па је мања концентрација IL-2 у основи снажније трансдиференцијације Foxp3+ Treg у TH17 лимфоците, 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 (235). Код деце са астмом, осим повећане концентрације IL-4 и IL-13 у серуму, утврђена је и већа концентрација IL-17, као и TNF $\alpha$  и IL-6 (343).

TSLP посредована индукција TH2 одговора има значаја у зарастању рана преко алтернативне активације макрофага и продукције IL-10 са инхибицијом класично активираних макрофага преко смањења експресије молекула II класе HLA, костимулатора и адхезионих молекула (184). Наши резултати указују да у узрасту од 5-7 месеци са порастом TSLP расте и ECP у серуму, што је случај и у условима изостанка ефекта IL-10 код деце без атопије, па је могуће да је TSLP индукована алергијска инфламација и у старијем узрасту последица неадекватне IL-10 имунорегулације. Код деце са манифестном IgE-везаном алергијом на кравље млеко (карактеристична алергија на храну за испитивани узраст) постоји већа метилација промотора гена за IL-10 и INF $\gamma$ , а мања за IL-4 и IL-5 у односу на здраву децу, као и у односу на децу која су развила толеранцију на млеко (344). Због тога не искључујемо могућност да је метилација гена за IL-10 у основи TSLP индукције TH2 одговора у узрасту 5-7 месеци, односно код деце са IL-10 дисрегулацијом. Деpleција Treg је довољна за пролиферацију нуоцита типа 2 који продукују IL-5 и IL-13, што је повезано и са блокадом секреције IL-22 из нуоцита типа 3 и може бити удружено са додатним нарушавањем интегритета респираторне баријере (345). Управо је код деце без атопије утврђена и негативна корелација TSLP и CC16 у условима изостанка ефекта IL-10, па би поремећај имунорегулације могао имати улогу у неадекватној репарацији бронхиоларног епитела која је повезана са порастом TSLP код деце без атопије.

У старијем узрасту утврдили смо позитивну корелацију TSLP и TNF $\alpha$  код деце без атопије. TSLP посредована индукција TNF $\alpha$  доводи до повећавања пермеабности ендотела, експресије селектина, продукције IL-1, IL-6 и појачавања фагоцитне активности макрофага (184), што може бити у основи индукције TH1/TH17 диференцијације лимфоцита. Директни ефекат TSLP на CD8 $^{+}$  састоји се у индукцији цитотоксичних Т лимфоцита који продукују велике количине INF $\gamma$  и повећању њиховог преживљавања кроз појачану експресију Bcl-2 анти-апоптотског протеина (109,276). Могуће је да код деце без атопије пораст INF $\gamma$  из CD8 $^{+}$  додатно потенцира развој TH1 одговора на нивоу интраепителних ћелија, јер је описана трансдиференцијација једног облика нуоцита у други првенствено смањењем експресије ROR $\gamma$ t у подтипу 3, када прелазе у подтип 1 (111).

### 5.3.3.2 TSLP и имунорегулација

И код деце са атопијом и без атопије постоји независна позитивна корелација TSLP и IL-10, која је утврђена и у групи деце без болести доњих дисајних путева, па активирање ћелија епитела 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 код деце са атопијом утврђена је ова повезаност и у узрасту 5-7 месеци и у узрасту 8-24 месеци (и код деце која су на природној исхрани, и без болести доњих дисајних путева и без обзира на алергију у породици), док је код деце без атопије то био случај само у старијем узрасту (само код деце која су престала са сисањем и имала болести доњих дисајних путева). Утврђено је да TSLP прво индукује продукцију IL-9 из нуоцита типа 2 (112), а TH9 лимфоцити продукују поред IL-9 и IL-10 и паралелно врше инхибицију TH1 одговора (184). Могуће да код деце са атопијом TSLP преко продукције IL-9 из нуоцита типа 2 повећава и инфилтрацију ткива мастоцитима, а да се паралелна експресија IL-10 огледа у повећаној TSLP-индукцији овог цитокина у узрасту 5-7 месеци код деце са атопијом удружен са TH9 и доминантним TH2 одговором, што није био случај код деце без атопије. Постојање TSLP зависне индукције IL-10 може указивати на рано присутно оштећење ткива код деце са атопијом које узрокује цитотоксични ефекат ЕСР-а (из примарно јаког TH2 одговора) или појачана пролиферација прогенитора (висок СС16 у узрасту од 5-7 месеци),

односно повећане осетљивости епитела на оксидативни стрес који је утврђен код алергијских болести (83).

Подаци из литературе о утицају TSLP на имунорегулацију су контрадикторни. Са једне стране је показано да TSLP инхибише IL-10-посредовану имунорегулацију и формирање индукованих Treg на спољашње стимулусе (346), али са друге стране постоје резултати да у *in vitro* условима TSLP промовише развој Treg у тимусу (347), као и Treg на периферији и да је индукција толерогених DC код људи зависна од присуства TSLP, што није био случај код мишева (348). У медули тимуса око 50% CD4<sup>+</sup> ћелија које имају високо-афинитетни TCR према сопственом ткиву у присуству TSLP порекла из ћелија епитела Хасалових телашаца диференцирају у Treg (109). Овај механизам вероватно подразумева постојање сопствених антигена епитела (или читавих ћелија епитела која праве Хасалова телашца) у медули тимуса, где се врши диференцијација CD4<sup>+</sup> реактивних ћелија на сопствене антигене у CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцита (336,349). Број CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> у периферној крви је сличан код пацијената са алергијским ринитисом и здравих особа, али је број Tr1 лимфоцита (CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>IL-4<sup>-</sup>) мањи код особа са алергијом (350). Могуће је да је реорганизација толеранције од „толеранције на сопствено“ са великим бројем природних Treg према сопственим антигенима (код деце без болести која су на природној исхрани), ка индукованој толеранцији на периферији у одговору на спољашње агенсе (у узрасту  $\geq$  8 месеци, код деце која су престала са сисањем) („толеранција на страно“) код деце са атопијом поремећена. Наиме велика индукција и/или изостанак апоптозе природних CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> из тимуса и фибробласта у условима изостанка активације урођеног имунитета и касног развоја TH1/TH17 одговора, може бити у основи повећане толеранције на сопствено (велика повезаност TSLP и IL-10 у узрасту 5-7 месеци и велике концентрације TGF $\beta$ 1 у првој години живота, са пиком у узрасту 10-12 месеци), уз смањени потенцијал индукције специфичних Tr1 на спољашње антигене или њихова појачана апоптоза (услед смањења TGF $\beta$ 1 у другој години код деце са атопијом које је неопходан за њихово одржавање).

Значајан извор IL-10 код деце са атопијом могу бити и CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> мијелоидне супресорне ћелије (енг. *Myeloid-derived Suppressor Cell*, MDSC), које после активације преко TLR-4 продукују велике количине IL-10 уз редукцију стварања IL-12 у макрофагима у току инфламације (351). Код деце са дијагнозом астме у узрасту до 5 година утврђен је већи проценат мијелоидних супресорних ћелија (енг. *Myeloid-derived*

*Suppressor Cell*, MDSC) у периферној крви у односу на здраву контролу, при чему се код деце са астмом концентрације IL-10 у серуму повећавају са порастом броја CD11b+CD33+ мијелоидних ћелија, а што је праћено и већим концентрацијама NO у серуму, ROS у ћелијама и смањењем продукције IL-12 у макрофагима плућа (343). Да ли овај налаз постоји и током прве године живота, односно да ли повезан са повећањем TSLP није познато. Анализа инвазивности трофобласта у присуству имунорегулаторних цитокина, индукованих са TSLP, показала је да Treg које секретују IL-10 изазивају већу инвазивност трофобласта, док Treg које секретују TGF $\beta$ 1 превенирају ексцесивну инвазију трофобласта (352). Да ли је физиолошки раст деце која су на природној исхрани и без болести повезан са великим концентрацијама TGF $\beta$ 1 који превенира ексцесивну инвазију прогенитора у ткива регулисан и потенцијалом продукције TNF $\alpha$  из мастоцита или TH17 одговора супротстављен IL-10-зависном повећању инвазивности прогенитора у процесу регенерације после оштећења ткива спољашњим агенсима или инфламацијом код деце која су престала са сисају и испољила болести, остаје да буде детерминисано.

### 5.3.3.3 Генима детерминисано повећање TSLP

Иако се развој астме повезује са утицајем спољашњих фактора на плућа генетски предиспонираних особа за ову болест, није познато да ли један или комбинација спољашњих фактора у специфичном тренутку развоја имунског одговора код генетски передиспонираних деце детерминишу да ли ће се астма развити или не (141). Експресија TSLP у биоптатима асматицара корелише са степеном бронхоопструкције, односно тежином астме (353), а пораст концентрација TSLP повезује се са раним јачањем TH2 одговора и нуоцита типа 2 (354). TSLP индукована OX40L експресија на DC индукује TH2 поларизацију одговора приликом презентације антигена наивним Т лимфоцитима, док IL-4 стабилизује и појачава TH2 одговор (274) у условима одсуства индукције TH1 одговора (273). Изостанак ефекта INF $\gamma$  на повећану продукцију CC16 (73), може бити у основи смањења CC16 у току детињства, које се повезује са појачањем TH2 одговора у плућима (70,172,178,179).

Код деце са атопијом која су имала податак о астми у породици, у узрасту 8-24 месеци и после престанка сисања утврдили смо већу концентрацију TSLP, а мушка деца са астмом у породици имала и мање концентрације CC16 у серуму. Код мушке

деце са атопијом и податком о алергији мајке, поред великих концентрација TSLP и малих концентрација CC16 у серуму измерена је и већа концентрација IgA према RSV, као и чешће постојање акутног ринитиса и визинга. Разлике између полова у одговору на инфекцију RSV могу бити повезане са полиморфизмом TSLP рецептора (TSLPR) кодиран геном на хромозому Xp22.3 и Yp11.3 (109), који условљава већу експресију ових рецептора при инфекцији RSV у респираторном епителу, а што је налаз карактеристичан за астматски епител (275). Генски детерминисана појачана индукција TSLP у респираторном епителу, удружена са појачањем TH2 одговора, може бити у основи смањења CC16, односно изостанка његовог повећања у инфекцији RSV.

#### 5.4 CC16 и болести доњих дисајних путева у седмој годни живота

Визинг у току одојачког периода је хетерогени симптом са различитим исходом, од потпуног опоравка (у више од 50% деце) до испољавања перзистентне астме (221). У CAS студији је утврђено да деца са бар једном болешћу доњих дисајних путева у узрасту до годину дана имају већу учесталост хроничног визинга у предшколском узрасту живота у односу на децу без болести доњих дисајних путева, без обзира на атопију (355). У нашој студији такође није утврђена разлика у учесталости испољавања болести доњих дисајних путева у седмој години живота између деце са атопијом и без атопије у узрасту до две године.

БХР, који је у нашој студији дефинисан као клиничка манифестација  $\geq 3$  болести доњих дисајних путева 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). Деца са БХР у узрасту до две године имају 3,8х 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 (356). Разлог за овај налаз није нађен у антропометријским разликама, стању ухрањености или утицају фактора спољашње средине, утицајем полних хормона



који детерминишу пубертет, због чега се разлози у учесталости респираторних болести између полова траже у физичким разликама у развоју плућа (357).

У нашем истраживању концентрација  $CC16 \geq 7,25 \text{ ng/ml}$  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  $CC16 \leq 3,6 \text{ ng/ml}$ . 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 (2). Активација анти-апоптотских сигнала у Клара ћелијама у RSV инфекцији (129), при чему је доминантни TN2 одговор удружен са смањеним антивирусним одговором па је присутна перзистентна инфекција (127), као и поремећај у диференцијацији Клара ћелија у цилијарне ћелије услед појачаног FGF10 и Notch сигнализирања (282) могу бити удружени са порастом њиховог броја и последичном експресијом еотаксина из Клара ћелијама, који је одговоран за развој еозинофилне инфламације у плућима (71).

Са друге стране, мале концентрације  $CC16$  код деце без БХР-а које су повезане са испољавањем болести у седмој години, може бити повезана са појачаном индукцијом диференцијације Клара ћелија у ћелије које продукују мукус (3,213,241,242) или њихова трансдиференцијација у базалне ћелије или алвеоларне ћелије типа 2 (172). 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 транзиторног визинга код мушке деце, тако и испољавања хроничних респираторних болести као што су астма и ХОБП касније у животу (243-245), али је њихово мерење компликовано и технички тешко изводљиво код деце. У нашем истраживању смо показали да концентрација  $CC16$  у серуму 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 СС16 испољавање болести доњих дисајних путева код мушке деце у 7 години живота утврдили смо и постојање малих концентрација IL-10  $\leq 2,7\text{pg/ml}$  и великих концентрација TGF $\beta$ 1  $\geq 27,4\text{ng/ml}$ , 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 $\beta$ 1. Осим, индукције SMAD3-SMAD4 комплекса који инхибира експресију инхибитора диференцијације (Id) и повећава експресију TWIST-а (358), TGF $\beta$  такође повећава експресију убиквитина који разграђују протеине међућелијских веза, активира PI3K-AKT и mTORC 1 и 2 (mammalian TOR complex 1 и 2) што је удружено са повећањем величине ћелије, синтезе протеина, мобилности и транзиције епителног у мезенхимни фенотип (160). TGF $\beta$ 1 који је главни индуктор и фактор одржавања ЕМТ, па његово присуство, као и смањене концентрације miR200 (индукују диференцијацију ћелија и инхибиране су присуством TGF $\beta$ 1), континуирано присуство ROS, вирусна инфекција у хипоксији ткива (вирусом индукована експресија *Sox9* и *Snail1*) могу допринети ЕМТ. Активирани TGF $\beta$ 1 на епителним ћелијама у присуству интегринa  $\alpha$ V делује паракрино на резидентне мезенхимне ћелије и кључан је у одржавању ЕМТ. Овом процесу доприносе и PDGF порекла из макрофага који активише фибробласте и промовише њихову пролиферацију. Није познато да ли матичне ћелије плућа могу у оваквом окружењу постати транзиторно или трајно колаген1 продукујуће ћелије и учествовати у развоју фиброзе (161). Поремећај хомеостазе преласка мезенхимног у епителни фенотип услед повећане концентрације TGF $\beta$ 1 и појачања његовог сигнализирања током развоја плућа може бити у основи смањења и концентрације СС16 у узрасту до две године, а рано настало ремоделовање екстрацелуларног матрикса са измењеним саставом и својствима под дејством металопротеиназа индукованих са TGF $\beta$ 1 (160) могло би бити у основи перзистирања болести доњих дисајних путева и у 7 година.

Могуће је и да високе концентрације TGF $\beta$ 1 у овом узрасту онемогућавају активацију имунског система и последичног повећања IL-10 у проинфламацијском одговору, уз изостанак проинфламацијских цитокина (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ ) на појачање секреције СС16 (72,73). Такође, повећана осетљивост мушке деце на оксидативни стрес са пропадањем Клара ћелија у условима високе концентрације TGF $\beta$ 1 не би изазвала проинфламацијску активацију ћелија епитела и/или активацију интраепителних и ћелија урођене имуности, па самим тим би овакво оштећење остало непрепознато и без

продукције проинфламацијских цитокина и IL-10. Уколико би смо ефекте имунорегулаторних цитокина посматрали из аспекта ефекта на трофобласте као матичних ћелија (352), онда би велике концентрације TGF $\beta$ 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.

Задебљање базалне мембране као први знак ремоделовања утврђено је после прве године живота код деце са атопијом која имају рекурентни визинг (121), а смањење концентрације CC16 у серуму могу указивати и на смањени излазак овог протеина у циркулацију услед развоја фиброзе (359). Овај тип ремоделовања можемо повезати са децом женског пола, која су испољила болести доњих дисајних путева у 7. години, а у узрасту од 8-24 месеца су имала 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 ирверзибилним 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 седам година утврђен је код 19,9% деце без разлике у учесталости атопије. Перзистентни визинг у предшколском узрасту повезан је са међутипом између раног алергијског и неалергијског-вирусом индукованог визинга у прве три године и са неконтролисаним неалергијским визингом са раним почетком који се до пете године живота одржава у 59% (140). У нашем испитивању смо само за мушку децу са испољеним акутним визингом у седмој години утврдили разлике у испитиваним биомаркерима у узрасту до две године. Мање концентрације CC16 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 $\beta$ 1 ( $\geq 27,5$  ng/ml) у овом узрасту. Мале концентрације TGF $\beta$ 1 измерене у овом узрасту биле су протективне за испољавање акутног визинга у 7

години живота код мушке деце, а проинфламацијско стање услед смањења TGF $\beta$ 1, иако удружено са већим бројем болести доњих дисајних путева у узрасту до две године, могло би условити правовремени развој TH1/TH17 имунског одговора, изостанак ремоделовања, односно имати протективни значај за испољавање болести доњих дисајних путева касније у животу у складу са „хипотезом хигијене“. Међутим, у подгрупи 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 $\beta$ 1 и мале концентрације CC16 у серуму, у 40% је утврђено испољавање болести доњих дисајних путева у седмој годни живота, што указује на рану иреверзибилну епително-мезенхимну транзицију и рано ремоделовање дисајних путева у узрасту до две године. Мале концентрације CC16 код мушке деце која имају смањени оксидативни потенцијал у односу на женску децу (207), живот у граду који је повезан са већом изложеношћу аерозагађењу, као и чешће RSV инфекције код градске деце (360) могу допринети активацији епително-мезенхимне јединице и остваривања нежељеног ефекта TGF $\beta$ 1 са раним развојем ремоделовања дисајних путева.

Већа учесталост симптома астме у узрасту 6-7 месеци код дечака утврђена је у ISAAC студији (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) (357,361), а дечаци са раним визингом имају већи ризик за перзистентни визинг који се одржава и током пубертета у односу на девојчице (357). Због тога се испољавање акутног бронхитиса у предшколском узрасту може се посматрати и као фенотип дечије астме код мушке деце, због присутног обрасца великих концентрација TGF $\beta$ 1 и малих концентрација CC16 и код деце без атопије која нису имала упалу плућа у прве две године живота, а код којих су утврђене и мање концентрације IL-10 а веће концентрације IgG према RSV, које смо утврдили и нашој студији.

#### 5.4.2. Предиктори хроничног бронхитиса у седмој години

Хронични бронхитис у узрасту од седам година имало је 1,9% деце и сва су била без атопије у узрасту до две године. У нашем истраживању ECP  $\geq$  12,4  $\mu$ g/l је маркер БХР код деце без атопије у узрасту до две године, а ECP  $\geq$  25,7  $\mu$ 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  $\mu$ g/l у старијем узрасту утврдили 2,3x већи ризик од постојања астме у односу на здраву децу (362). 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 ЕСР корелише са инфламацијом у дисајним путевима, али не и са БХР-ом, као и да велика концентрација ЕСР-а у серуму није предиктор алергијске астме (363). У нашем истраживању у групи деце без атопије са еозинофилном инфламацијом предиктори испољавања БХР-а у узрасту до две године, 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 инфекције у одсуству адекватног алармирања у епителу, што се манифестовало БХР-ом. У узрасту до годину дана, продукција великих концентрација IL-10 из моноцита у иницијалној инфекцији RSV повезано је са чешћим визингом у току годину дана после бронхиолитиса, при чему се велика продукција IL-10 наставља и при следећим инфекцијама (267). Велике концентрације IL-10 утврђене су код вирусима индуковане – инфективне, неалергијске астме (364), што је у складу са нашим налазом да еозинофилна инфламација није била карактеристика атопије ни код деце са БХР-ом у прве две године, ни код деце која су испољила хронични визинг у седмој години живота. Развој Tr1 IL-10-продукујућих ћелија на периферији може допринети ублажавању клиничког фенотипа од БХР у прве две године, до акутног визинга у седмој години живота, и поред конститутивно повећане еозинофилне активације код ове деце.

У основи испољавања хроничног визинга у седмој години код деце која су имала  $ESR \geq 25,7 \text{ ug/l}$  у узрасту до две године могло би стојати и преживљавање гликокортикоид резистентних нуоцита типа 2 услед широке примене гликокортикоидне терапије у раном узрасту која супримира еозинофилну инфламацију и развој Treg, али не утиче на нуоцита типа 2. Код деце са атопијом и ЕСР-ом  $\geq 25,7 \text{ ug/l}$  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 искључити могућност да је код ове деце цитотоксична активност еозинофила усмерена управо на TGFb1 продукујуће ћелије, што онемогућава каснији развој ремоделовања. Убијање ћелија по типу некрозе

у присуству ЕСР-а, могао би бити механизам стимулације урођене имуности и индукције неутрофилне инфламације што за последицу има развој ТН1 одговора, након чега се регулација раста плућа одвија са  $TNF\alpha$  индукованом апоптозом миофибробластних ћелија уз индукцију мезенхимно-епителне транзиције и стимулације продукције СС16 из Клара ћелија у присуству  $TNF\alpha$  и  $INF\gamma$ .

#### 5.4.3. Предиктори астме у седмој години

У седмој 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% (365). Астма се дефинише као комплексни и хетерогени синдром који обухвата неколико различитих фенотипова (111). Иако се уназад две деценије астма разматра као имунска болест дисајних путева за коју је одговоран ТН2 имунски одговор, са тачно дефинисаним епидемиолошким, генским и имунским факторима ризика, утврђивање каузалних фактора и њихова међусобна интерреакција која доприноси настанку астме је непозната (123). Дечија астма је у школском узрасту алергијска у 80% случајева (139), али је у нашем испитивању, само половина деце са астмом у седмој години живота је имало атопију у узрасту до две године, па не искључујемо могућност накнадне сензибилизације, нарочито у групи деце без атопије са еозинофилном инфламацијом, односно мањим концентрацијама СС16.

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 (123). У узрасту до две године није утврђена разлика у параметрима осцилометрије између деце која ће развити астму у узрасту од 6-8 година и здраве деце (221). 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 (55). Ова чињеница је упоредива са нашим налазима да је код деце која су имала астму у седмој години живота измерена концентрација  $CC16 \geq 6,8ng/ml$  у узрасту од 5-7 месеци и  $CC16 \leq 2,9ng/ml$  у узрасту 8-24 месеца, али се у нашем истраживању овај налаз односи првенствено на женску децу. 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 (2). У нашем

истраживању је у узрасту од седам година дијагнозу астме имало 36,4% девојчица са  $CC16 \geq 6,8 \text{ ng/ml}$  у узрасту 5-7 месеци, као и 50% девојчица које су имале  $CC16 \leq 2,9 \text{ ng/ml}$  у узрасту 8-24 месеца. Код деце са астмом утврђен је абнормалан, незрели фенотип респираторног епитела са већом продукцијом антиинфламацијских медијатора и у одсуству инфламације (55), што је потврђено и нашим истраживањем у коме смо утврдили да  $CC16 \geq 6,8 \text{ ng/ml}$  у узрасту 5-7 месеци 7,3x повећава ризик од постојања астме у 7. години живота. Хронично оштећење респираторног епитела доводи до исцрпљивања пула прогенитроских ћелија, а смањење плућне функције утврђено је у другој години код деце са атопијом која касније развијају астму, што је у сагласности са смањењем концентрација  $CC16 \leq 2,9 \text{ ng/ml}$  које смо измерили у нашем истраживању  $\geq 8$  месеца, код деце која ће имати дијагнозу астме у седмој години. Лонгитудиналне студије су такође показале да код деце са почетком астме пре треће године живота поремећај плућне функције се одржава до 6. године (141).

Контрадикторни резултати између студија које су указале на смањење броја и функције Treg у атопији (366-368) и студија у којима није утврђена ова повезаност (369,370) повезују се са потешкоћама у идентификацији типова Treg, као и разлика у клиничком испољавању алергије, узраста, различитих утицаја спољашње средине и метода дијагностиковања алергије (260). У литератури се 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 да ниједно дете са  $TGF\beta 1 \leq 17,8 \text{ ng/ml}$  у узрасту до две године није имало болести доњих дисајних путева у 7 години што указује на протективни значај оваквог налаза.

Са друге стране, сва деца са атопијом у узрасту до две године и астмом у узрасту у седам година имала су  $IL-10 \leq 3,5 \text{ pg/ml}$  у узрасту до две године. Деца са атопијом имају мање концентрације  $IL-10$  у односу на децу без атопије (260,371), код пацијената са астмом утврђена је смањена продукција  $IL-10$  из алвеоларних макрофага и полиморфонуклеара, а смањење концентрације  $IL-10$  корелише са тежином астме (372), као и редукција FOXP3 експресије и смањена функција CD25+ ћелија (373), које не успевају да инхибирају пролиферацију TH2 лимфоцита и њихову продукцију цитокина (374). Студије асоцијације гена показале су да код особа са тешким облицима астме

чешће постоје халотипови са мањом продукцијом IL-10 (375). IL-10 инхибише алергијску инфламацију преко смањења матурације DC у присуству IL-4, односно смањења индукције диференцијације TH2 лимфоцита (376). IL-10 из DC кључан је за индукцију толеранције на антиген преко индукције природних IL-10- секретујућих CD4+ T лимфоцита које доводе до супресије TH2 одговора у алергији (377), а наши резултати указују да би закасна индукција TSLP експресије на епителима коју смо утврдили код деце са атопијом могла бити повезана са дефектима миграције DC и редукованим капацитетом пролиферације CD4+ ћелија (332). Испитивања на животињама су показала са IL-10 +/- мишеви, сензибилисани са овалбумином, развијају БХР само после инфекције RSV (378), док је код деце са астмом утврђен изостанак пораста IL-10 током инфекције *Mycoplasma pneumoniae* (379), па не искључујемо значај метилације промотора гена за IL-10 код деце са атопијом (344) која омогућава развој TH2 одговора и рану сензибилизацију на инхалаторне алергене, што је повезано са каснијим настанком астме (91). Код деце са блажим облицима алергије на храну, утврђена је негативна повезаност узраста и експресије TGFβ1 као и позитивна корелација узраста и експресије IL-10 код деце која развијају толеранцију (260). У спонтаном развоју толеранције на храну код деце са алергијом утврђена је улога Tr1 ћелије које продукују IL-10 (380). Изостанак развоја индуковане толеранције на периферији са малим концентрацијама IL-10 могла би бити у основи генезе астме код деце са атопијом.

Повећана биосинтеза леукотријена у дисајним путевима повезује се са патогенезом астме. Цистенил леукотиријени настају из арахидонске киселине преко 5-липооксигеназе и изазивају бронхоконстрикцију и вазодилатацију у акутној фази непосредне преосетљивости, потенцирају активацију и миграцију DC ка лимфном чвору, модулишу цитокински профил DC, учествују у иницијацији и амплификацији антиген-специфичног TH2 инфламацијског одговора, па имају улогу у патогенези хроничне алергијске инфламације у астми (381). CC16 инхибише метаболизам арахидонске киселине и синтезу леукотријена (69), а наши резултати су показали да су мале концентрације CC16 у серуму у узрасту  $\geq 8$  месеца живота код деце са атопијом повезане са испољавањем астме у седмој години живота, што може указати на значај CC16 на инхибицију синтезе леукотријена код деце са атопијом. 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 (172,209,210). Мале концентрације СС16 удружене са малим концентрацијама ИЛ-10 као предиктори астме у седмој години живота код деце са атопијом управо указују на значај леукотирјена у њеној патогенези. Испитивања на хуманим моноцитима и на *in vitro* индукованом њиховом диференцијацијом у незреле DC показала су да ИЛ-10, дозно-зависно, смањује експресију рецептора типа I и II и леукотријенима индуковану хемотаксу и активацију моноцита и незрелих DC (381). ИЛ-4 и ИЛ-13 повећавају експресију рецептора за леукотријене, а овај ефекат може поништити ихибиторни ефекат ИЛ-10 на њихову експресију (381).

Постојање анемије повећава ризик од постојања астме у седмој години живота за 34x у групи деце са атопијом и може указати на поремећај обнављања прогенитора плућа порекла из костне сржи. У неколико студија је показано присуство ССSP+ ћелија у коштаном сржи (382), које експримују CD45 (леукоцитини антиген) и маркере мезенхимних ћелија (CD73, CD90, CD105), од значаја у развоју дисајних путева и алвеола (10). У одговору на оштећење плућа, у периферној крви се повећава број ССSP+ ћелија из коштане сржи које одлазе у плућа (47,382). Трансфузија ССSP+ ћелија из коштане сржи после оштећења изазваног нафталеном код трансгених СС $\alpha$ к мишева довела је до повећања маркера Клара ћелија, алвеоларних ћелија типа 2 и цилијарних ћелија у респираторном епителу, смањења неутрофилне инфламације и повећавања концентрације кисеоника у артеријској крви (382). У нашем истраживању анемија је утврђена као предиктор астме само код деце са атопијом, што указује да ТН2 одговор има улогу у овом налазу. Код деце са астмом у току вирусних инфекција утврђено је да у коштану срж пристужу како цитокини из ткива плућа које је у инфламацији, тако и активирани ТН2 ћелије неопредно после излагања алергену код деце са атопијом (383). Цитокини ТН2 одговора као што су ИЛ-4 и TGF $\beta$ 1 (из алтернативно активираних макрофага у ТН2 одговору) су потентни инхибитори раста хематопоеетских прогенитора (184), што може бити у основи раног испољавања анемије али и смањења ССSP+ ћелија у коштаном сржи. Ефекат TGF $\beta$  на смањење индукције плурипотентних стем ћелија, може бити у основи смањене транзиције мезенхима у ћелије епитела (384).

#### 5.4.4 Хомеостаза СС16

У нашем истраживању 50% деце која су имала астму у 7 години живота није имало болест доњих дисајних путева у прве две године, али се тај проценат односио

уствари на децу која су тестирана у узрасту 5-7 месеци. 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  $Treg$  у кожи (57), 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) са исцрпљивањем пула Клара ћелија и каснијим испољавањем болести доњих дисајних путева у узрасту  $\geq 8$  месеци. Одсуство проинфламацијских 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 мастоцита (385). 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 костној сржи што за последицу има повећане концентрације  $TNF\alpha$  (185) или је  $TNF\alpha$  порекла из активисаних мастоцита у условима прекомерне експресије  $CC16$  (385) 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 неутрофилима у плућима (129) са последичним повећањем TN1 одговора и IgG према RSV и смањењем CC16 као последице тежих, рецидивантних и хроничних оштећења респираторног епитела код деце са атопијом и апоптотског ефекта прекомерно створеног TNF $\alpha$  на респираторни епител. У хроничним оштећењима у којима је број Клара ћелија редукован, или је експресија CC протеина смањена изостаје антиинфламацијски ефекат на епителу, макрофаги су класично активирани и понављано секретују проинфламацијске цитокине, па долази до развоја хроничне инфламације у плућима (386).

#### 5.4.5 Инфекција RSV и болести доњих дисајних путева у седмој години

RSV је најзначајнији узрочник респираторних болести код деце (129) са инциденцом у општој популацији деце у Шумадијском округу од 12,9% у првој години и у 47% деце у другој години живота, при чему су сва деца са БХР-ом у (дефинисан као  $\geq 3$ х акутни визинг и/или хронични визинг) узрасту 5-6 месеци била без атопије, (у њих 30% БХР је био удружен са RSV инфекцијом), док је тек 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 (360). Подаци у литератури о повезаности вирусног бронхиолитиса и настанка алергијске астме су контрадикторни. Шведска кохортна студија показала је да деца са тешким RSV бронхиолитисом имају већу преваленцу астме/рекурентног визинга и алергијске сензибилизације у узрасту од три, седам, 13. година, као и у раном одраслом добу у односу на контролну кохортну групу (387), док *Poorisrisak* и сар. не подржавају теорију да RSV бронхиолитис изазива астму, јер у току периода праћења од 6-7 година, нису пронашли разлику између монозиготних близанаца хоспитализованих услед RSV бронхиолитиса у следећим параметрима: плућној функцији, нивоу издахнутог азот оксида, преваленци астме и коришћењу медикамената за астму (388). Ова неусаглашеност података у литератури може бити последица различитих приступа у дијагностици RSV инфекције (серолошка потврда у серуму, изолација антигена или ДНК вируса из бриса носа или лавата), разлика у дефинисању испитиваних група деце на основу индивидуалних карактеристика (пол, узраст, исхрана) и тежине респираторних болести (бронхиолитис, бронхиолитис који захтева хоспитализацију, акутни бронхитис, упала плућа, рекурентни визинг, БХР итд), методама дијагностике алергије (*skin prick* или *in vitro*

утврђивање специфичних IgE) или ризика за алергију (постојање алергије родитеља, првенствено мајке, еозинофилије, екцема/атопијског дерматитиса и др), односно дефинисања дијагнозе хроничне респираторне болести у старијем узрасту (перзистентни визинг, рекурентни визинг, астма, хронична опструктивна болест плућа) и др. Због тога су у нашој студији болести доњих дисајних путева дефинисане на основу шифара МКБ и у узрасту до две године груписане по току (акутне и хроничне болести) и тежини (визинг и упала плућа), уз утврђивање атопије на основу детектованих специфичних IgE у крви и инфекције на основу хуморалног IgA и IgG одговора према RSV.

Да ли вирусне инфекције могу да изазову развој астме код деце која не би развила ову болест без инфекције, или су маркер повећане осетљивости деце са астмом на вирусне инфекције није познато. Преовладава мишљење да је алергијска сензибилизација узрок повећане осетљивости на вирусне инфекције код деце која ће развити астму (181). У нашем истраживању иако је RSV инфекција била чешће удружена са болестима доњих дисајних путева у узрасту до две године и код деце без атопије и код деце са атопијом, у узрасту од седам година није утврђена разлика у учесталости болести доњих дисајних путева у односу на инфекцију RSV, као ни у односу на атопију. У студијама у Аустралији (RAINE (389) и CAS-Childhood Asthma Study (355) и САД (COAST - the Childhood Origins of Asthma Study, (390) показано је да вирусна инфекција и сензибилизација на инхалацијски алерген представљају независне факторе настанка перзистентног визинга и каснијем узрасту, али да је синергистично испољавање оба фактора у одојачком периоду при чему доминантни TH2 одговор и сензибилизација специфичним IgE први догађај, који условљава смањење TH1 одговора и повећану осетљивост на вирусне инфекције, има најјачи предиктивни значај за каснији перзистентни визинг (91). У нашем истраживању смо показали да су мале концентрације CC16 код мушке деце ( $\leq 3,7\text{ng/ml}$  у групи без атопије и  $\leq 4,3\text{ng/ml}$  у узрасту 5-7 месеци у групи са атопијом), односно изостанак повећања концентрација CC16 са порастом IgA према RSV код мушке деце у узрасту  $\geq 8$  месеца ( $\leq 2,9\text{ng/ml}$ ) без обзира на атопију, удружене са испољавањем акутног визинга у 7. години живота. Овакав налаз указује да је дисфункција епитела примарни догађај који дефинише ризик за акутни визинг код мушке деце. Као други имунопатолошки механизам за ризик од испољавања акутног визинга код мушке деце у седмој години утврдили смо слабији TH2 одговор (укупни IgE  $\leq 4,4\text{kU/l}$  у узрасту 8-24 месеца) и поред RSV инфекције

(одређене повећањем IgA и IgG према RSV) што указује да слабост TH2 одговора односно процеса репарације ране током резолуције инфламацијског одговора може чинити основ овог механизма или прејак TH17 одговор који инхибира TH2 лимфоците (77). Утврђено је да одојчад и школска деца са алергијском астмом имају измењени хуморални имунски одговор са смањењем и специфичних IgE у односу на децу без атопије или асимптоматске деце са атопијом. (91). Слабост TH2 одговора и мала концентрација IL-10 и поред RSV инфекције утврђени су код женске деце која су испољила кашаљ у седмој години живота (R05), чија је карактеристика мала концентрација TSLP односно изостанак пораста IL-10 са порастом TSLP у узрасту до две године, са дијагнозом кашља у седмој години живота. Код женске деце са RSV инфекцијом концентрације ECP-a  $\geq 7,3\mu\text{g/l}$  у серуму у узрасту 8-24 месеца удружене су са ризиком од испољавања акутног визинга у седмој години живота, па овај имунотип можемо повезати са изостанком развоја TH1 одговора, односно доминацију еозинофилне инфламације током RSV инфекције.

У студији *Thomsen* и сарадника је на основу узрочног модела генске варијансе на 8280 парова близанаца утврђено да тешки RSV бронхиолитис највероватније представља генску предиспозицију за астму (391). 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 ( $< 2,9 \text{ ng/ml}$  као маркером астме у узрасту од 7 година) у условима ниских концентрација IL-10 што може бити у основи генске предиспозиције за астму. Мала цитопатогеност овог вируса у условима велике концентрације TGFb1 може бити удружена са перзистентном асимптоматском инфекцијом. Да ли је перзистентна инфекција RSV удружена са континуираним смањењем броја инфицираних Клара ћелија, при чему је имунски систем инхибиран високим концентрацијама TGFb1 или је полиморфизам HLA молекула одговоран за немогућност препознавања вирусних протеина у склопу HLA 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 групи деце која нису имала РСВ инфекцију у узрасту до две године испољавање астме (J45) код женске деце у 7. години било је удружено са великим концентрацијама СС16 у узрасту од 5-7 месеци, а испољавање хроничног бронхитиса (J44) у 7 години код женске деце било је удружено са већим концентрацијама ЕСП-а у серуму, што указује да ови механизми развоја хроничних респираторних болести у седмој години нису повезани са RSV инфекцијом.

#### 5.4.6 Транзиторни, перзистентни и визинг са касним почетком

Постнатална алвеоларизација плућа је интензивна у току прве две године, али се продужава споријим темпом до 8. године живота (181). Лонгитудиналне студије од рођења до одраслог доба показале су да и код деце рођене пре термина, као и код деце која су имала упалу плућа у одојачком периоду, постоји *catch-up* раст и успостављање нормаланог раста и развоја дисајних путева и алвеола, без каснијих симптома хроничних болести (181).

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 ТН2 одговор уз повећање укупних IgE, али уз смањење ЕСП-а у серуму које је било протективно за испољавање болести у седмој години. Ови резултати указују да би вирусне инфекције и развој ТН2 IL-4<sup>High</sup> IL-5<sup>Low</sup> одговора могли бити удружени са превазилажењем болести доњих дисајних путева.

Смањена плућна функција која предходи бронхиолитису у одојачком периоду одржава се до 11. године живота (215), а наши резултати указују да је одржавање болести и у другој и у 7. години живота удружено са малим концентрацијама СС16 и у RSV инфекцији, као и са већим концентрацијама укупних IgE, TSLP и TNF $\alpha$ . Овака налаз указује да дефицијенција СС16 узрокује дисфункцију респираторног епитела са прекомерном TSLP- индукованом стимулацијом имунског одговора, уз изостанак адекватне репарације услед смањеног броја Клара ћелија.

Задебљање базалне мембране као први знак ремоделовања утврђено и код деце која немају визинг у првој години живота (121), као и у одсуству неутрофилне или еозинофилне инфламације код деце која имају визинг (151,392). Деца која су испољила

болести доњих дисајних путева само у седмој години нису имала РСВ инфекцију, а имунорегулаторни образац подразумевао је велике концентрације 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 DC и периферне толеранције код деце без болести доњих дисајних путева током прве две године живота.

## 5.5 Могућности примарне превенције

Адекватна превенција хроничних респираторних болести подразумева дефинисање нормалног обрасца развоја плућа интраутерино и у току детињства (181). Утврђено је да инфламација која је удружена са поремећајима алвеоларизације плућа услед смањења развоја микроваскулатуре и смањене сепарације алвеола, може бити изазвана интраутериним хориоамнионитисом (*Ureaplasma*, *Mycoplasma*) (393), па је здравље жена и скрининг ових инфекција неопходан у оквиру примарне превенције хроничних респираторних болести код деце. С обзиром да стања хипоксије стимулишу алвеоларизацију, али немају ефекат на раст и функцију дисајних путева, поставља се питање некритичне примене оксигено-терапије код деце рођене пре термина (181). Велика телесна маса на рођењу и прекомерно добијање у тежини током прве године живота повезују се такође са смањењем плућне функције (16,329), па превенција ране гојазности може имати значаја у превенцији и хроничних респираторних путева код људи. Од фактора који су штетни по развој плућа током детињства у литератури се наводе никотин, аерозагађење и производи сагоревања горива који повећавају величину алвеола и смањују њихов број, а законске регулативе у развијеним земљама које су довеле до побољшања квалитета ваздуха, као и мере смањење учесталости грејања на чврста горива, и смањена изложеност деце органофосфатним пестицидима утичу на побољшање функције и раста плућа код деце. Ипак, новија испитивања су показала да су БХР и астма јачи предиктори успореног раста плућа у односу на спољашње факторе као што је дувански дим (181).

Догађаји који детерминишу ризик за развој хроничних алергијских болести настају много година пре манифестације перзистентних симптома (91). Деца са алергијском астмом која се манифестује у прве три године живота имају редуковану плућну функцију у школском узрасту (395), па су промене у дисајним путевима које се

дешавају током раног детињства у основи тешких облика астме касније (119, 395). Алергијске болести су неизлечиве, а актуелна фармакотерапија астме подразумева примену симптоматских лекова само у циљу контроле болести (396). Атопијска сензибилизација и перзистентни визинг повезани су са редукцијом раста плућа што за последицу има настанак астме (397) а САМР (*Childhood Asthma Management Program*) студија је показала да једна трећина деце има смањење плућне функције без обзира на примењену терапију (398). Даља истраживања астме усмерене су на: генезу астме и примарну превенцију; дефинисање фенотипова и ендотипова; могућности модификације тока болести; као и персонализовани приступ терапији астме (123), јер је превенција и терапијска стратегија у лечењу хроничних респираторних болести једино успешна уколико се поклапа са патофизиологијом болести (307).

Актуелне стратегије примарне превенције алергија заснивају на искључивом дојењу у току 4-6 месеци, раном излагању детета бактеријским продуктима (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 (396).

Гликокортикоиди повећавају експресију СС16 гена (399). Студија ефекта гликокортикоида на концентрације ЕСР-а и СС16 у назалном лавату код особа са алергијским перинеалним ринитисом и хроничним риносинузитисом са назалним полипима, показала је да су смањење еозинофилне инфламације и редукција ЕСР-а праћени мањим оштећењем Клара ћелија и повећањем концентрације СС16, односно смањењем симптома болести (15,400). Инхалациони гликокортикоиди повећавају проценат CD4+CD25+ Т лимфоцита у периферној крви и БАЛ-у код деце са астмом. (374) и повећавају ослобађање IL-10 из алвеоларних макрофага оболелих од астме (401). Према нашим резултатима, подгрупа деце код којих би интермитентна примена гликокортикоида у фармакопрофилактици болести доњих дисајних путева у седмој години имала ефекта су: женска деца са атопијом и ЕСР-ом  $\geq 9,0 \mu\text{g/l}$  и СС16  $\leq 3,5\text{ng/ml}$  у циљу превенције било које болести доњих дисајних путева у седмој години; женска деца са СС16  $\leq 2,9\text{ng/ml}$  у узрасту  $\geq 8$  месеци у циљу превенције астме; деца без атопије са ЕСР-ом  $\geq 12,7\mu\text{g/l}$  која су испољила БХР, односно деца са ЕСР-ом  $\geq 25,7 \mu\text{g/l}$  у узрасту до две године без обзира на испољавање болести у циљу превенције хроничног бронхитиса у седмој години. Иако су гликокортикоиди ефикасни у редукцији експресије еотаксина и еозинофилне инфламације, они нису ефикасни у смањењу IL-13



индуковане хиперплазије пехарстих ћелија у мишијем (402) и хуманом епителу (403), а утврђено је да инхибишу алвеоларну сепарацију, повећавају активацију фибробласта и ремоделовање, и доприносе и повећаној осетљивости на вирусне инфекције (393).

Еозинофилна TH2 инфламација у плућима је осетљива на примену инхалаторних гликокортикоида, али ова терапија може усмерити инфламацијски процес у правцу неутрофилне TH17 инфламације која је резистентна на примену инхалаторних гликокортикоида (404, 405). Због ефекта гликокортикоида на повећавање преживљавања неутрофила (15), ова терапија у сваком случају није индикована у групи деце са атопијом и хроничним визингом код које је утврђен пораст концентрација TNF $\alpha$ , односно код деце са податаком о астми у породици који је повезан са великим концентрацијама TNF $\alpha$  и малим концентрацијама TGF $\beta$ . TNF $\alpha$  директно смањује експресију Foxp3 и поништава супресивну функцију Treg, због чега се код одраслих са астмом разматра третман са анти- TNF $\alpha$ R (etanercept) који доводи до повећања експресије Foxp3 у CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg и обнављања њихове функционалне активности (306). Интратрахеална примена рекомбинантног CC16 у дози од 5mg/kg доводи до редукције неутрофилне инфламације (406). Интратрахеална примена протеина Клара ћелија код превремене деце или деце у ризику за развој респираторног дистреса доводила је до смањења неутрофила у БАЛ-у и смањења протеина у плућима (406), а на анималним моделима је показано да је трансфузија CCSP<sup>+</sup> ћелија из коштане сржи доводила је до репарације бронхијалног епитела, смањења инфламације и повећаног преживљавања животиња трансгених CCtk мишева (382).

Ефекат антагониста леукотријенских рецептора у терапији астме огледа се у блокади ефекта леукотријена и смањењу активације и миграције моноцита и DC (слично ефектима IL-10), па би могао би бити од значаја у регулацији иницијалног имунског одговора код деце (381). На анималним моделима је показано да примена антагониста леукотријенских рецептора може да опорави изглед и функцију Клара ћелија које су подлегле метаплазији у мукус-продукујуће ћелије током алергијске инфламације, уз повећање експресије CC16, SP-D и CYP2E1 (15). Наше истраживање је показало да би циљна група за промену ових лекова у циљу прекида генезе астме, била деца са малим концентрацијама IL-10 ( $\leq 3,6$  pg/ml) и (CC16  $\leq 2,9$ ng/ml) у узрасту 8-24 месеца.

После идентификације Fc $\epsilon$ RI-зависног механизма осетљивости деце са астмом на вирусне инфекције, примењен је континуирани третман са анти-IgE код деце са

астмом, што је довело до смањења вирусних егзарцербација (407), али није познато да ли би овај приступ имао значаја у превенцији генезе астме. Иако је значај еозинофилне инфламације потврђен у генези астме, примена анти IL-5 моноклонских антитела довела је до смањења броја егзарцерација астме, али не и до побољшања плућне функције (408, 409). Наши резултати указују да би примена анти IL-5 моноклонских антитела могла бити од значаја у подгрупама деце узраста 10-12 месеци са атопијом, односно деце код којих је утврђена негативна корелација ECP-a и CC16, као што су деца са атопијом која су престала да сисају и у узрасту су 8-24 месеца и деце без атопије која имају мале концентрације TGF $\beta$ 1, а код којих је такође утврђено смањење CC16 праћено повећањем ECP-a.

Специфична имунотерапија је једини третман који је заснован на патофизиолошком механизму и може мењати природни ток алергијске болести (102). Преумеравање алергијског ка регулаторном одговору је кључни механизам развоја здравог имунског одговора, односно повољног исхода алерген-специфичне имунотерапије у смислу превенције и излечења од алергијске болести. Природни CD4+CD25+FOXP3+ и индуковани Tr1 лимфоцити контролишу алергијски имунски одговор на неколико начина: инхибишу ефекторске T лимфоците и њихову миграцију у ткива, инхибишу IgE а индукују IgG4 имунски одговор, супримују мастоците, базофиле и еозинофиле, интерреагују са резидентним ткивним ћелијама и учествују у ремоделовању (380). NKT ћелије секретују веће количине IL-4 и мање количине IL-10 после стимулације са  $\alpha$ -GalCer код деце са алергијом узраста 5-16 година у односу на здраву контролу, али специфична имунотерапија после годину дана редукује продукцију IL-4 а повећава IL-10 у NKT ћелијама на ниво здраве контроле (410). Утврђено је да код деце са алергијом на кравље млеко после елиминације из исхране ове намирнице долази до пада броја специфичних Treg, а да њихов број расте током развоја стечене толеранције на алерген (411), па би контролисано давање намирница на које су деца развија сензибилизацију омогућило и адекватни развој толеранције, односно превазилажење симптома алергијских болести код деце са атопијом.

Витамин Д3 такође индукује настанак Tr1 IL-10-продукујућих ћелија (412), па његова примена у току зимских месеци у току неколико година код деце са атопијом може имати ефекат на одржавање адекватне имунорегулације. Поређењама са смањеним стварањем секундарних септи током алвеологенезе услед редуковане експресије FGF10 током инфламације (413), који могу бити и у основи развоја хроничне опструктивне

болести плућа (414), могу се кориговати применом ретиноичне киселине коју током развоја плућа продукују липофибробласти задужени за очување алвеоларних ћелија типа 2 (24).

Терапија матичним ћелијама представља нову терапијску стратегију (1), с обзиром да матичне ћелије нису имуногене због мале експресије молекула класе I и одсуства молекула II класе HLA, као и непостојања костимуолатора (30). 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 кличина листа. Мезенхимне (адултне) матичне ћелије могу се изоловати из костне 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 (1). 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 и абнормални раст крвних судова. Као каузални фактори бронхопулмоналне дисплазије наводе се инфекције, хипероксија или траума волуменом при вештачкој вентилацији (30). На анималним моделима хипероксије показано је да интратрахеална трансплантација мезенхимних матичних ћелија порекла из костне сржи може превенирати застој у алвеоларном развоју и спречити фиброзне промене (415). 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 (415). 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 (416). Да ли би примена матичних ћелија путем трансфузије 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. У неколико студија су анализирани узорци крви из пупчаника, који су узети за чување матичних ћелија у банкама, при чему се са каснијим развојем алергија повезује слабији

TH1 одговор са мањим концентрацијама INF, IL-12 и IL-15, као и јачи TH2 одговор са повећањем CCL-17, CCL-22 и ECP-а који су детерминисани интраутерино (417, 324), а показано је и да TH2 цитокини индукују TH2 DC фенотип на нивоу коштане сржи (91). Због тога би даља истраживања примерне матичних ћелија у примарној превенцији астме подразумевала и ефекте *in vitro* индукованих плурипотентних прогенитора цитокинима који индукују TH1 одговор и/или инхибишу TH2 одговор, код деце у ризику за развој алергијских болести детерминисан на основу генетских испитивања и података о алергији родитеља, првенствено алергије мајке.

## 5.6 Лимитираност студије и даље препоруке

Дизајн студије у којој смо у популацији здраве деце узраста до две године утврдили концентрације CC16 и биомаркера TH2 одговора, дефекта баријере и имунорегулације, 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 типовима болести у узрасту до две године. Анализа карактеристика репрезентативног узорка популације здраве деце у узрасту до две године омогућава и дефинисање поузданог предикторног значаја одређених биомаркера за испољавање болести доњих дисајних путева у узрасту од седам година.

Будућа истраживања *ендотипова астме*, које смо на основу овог истраживања утврдили, могу се поделити у следеће категорије ризика утврђеног у узрасту 5-24 месеца:

### 1) Алергијске астме:

- Невезано за пол:
  - БХР у току три и више месеци у другој години са  $CC16 \leq 3,4 \text{ ng/ml}$  у серуму као и  $TGF\beta 1 \geq 32,5 \text{ ng/ml}$  у 14. месецу (без упале плућа) и  $TGF\beta 1 \geq 14,3 \text{ ng/ml}$  у 22. месецу (са упалом плућа)
  - $IL-10 \leq 3,5 \text{ pg/ml}$  у узрасту до две године
- Женска деца са атопијом:
  - Анемија у узрасту до две године ;  $CC16 \geq 6,8 \text{ ng/ml}$  у серуму у узрасту 5-7 месеци (без инфекције RSV) и  $CC16 \leq 2,9 \text{ ng/ml}$  у серуму у узрасту 8-24 месеца

- Мушка деца са атопијом
  - Слаб TH2 одговор – низак укупни IgE (5,9 kU/l) и поред атопије
  - Рана ЕМТ (TGFβ1 ≥ 27,5 ng/ml и CC16 ≤ 4,3 ng/ml у узрасту 5-7 месеци)
- 2) **Неалергијске еозинофилне астме/хроничног визинга:**
  - Рани БХР са еозинофилном инфламацијом у другој години живота са ECP ≥ 12,7 μg/l, нарочито код женске деце без инфекције RSV, односно ECP ≥ 25,7 μg/l у узрасту до две године без обзира на пол
- 3) **Акутног визинга** у предшколском узрасту, могући ризик од ХОБП-а:
  - Мушка деца
    - Перзистентни визинг у предшколском узрасту мушке деце са раним БХР-ом и CC16 ≥ 7,25 ng/ml у узрасту до две године
    - Мушка деца без атопије са CC16 ≤ 3,7 ng/ml у узрасту до две године (застој у расту плућа), односно мушка деца са CC16 ≤ 2,9 ng/ml у узрасту 8-24 месеца са изостанком пораста у инфекцији RSV
    - Мушка деца са укупним IgE у узрасту 8-24 месеца ≤ 4,4 kU/l - слаб TH2 у инфекцији RSV
  - Женска деца
    - Женска деца са ECP ≥ 7,3 μg/l у узрасту 8-24 месеца – изостанак смањења ECP-а у инфекцији RSV
- 4) **Асматског кашља:**
  - Деца са атопијом и TSLP ≤ 9,4 pg/ml – изостанак TSLP индукованог TH2 одговора у инфекцији RSV

**Ток визинга** дефинисали смо у односу на децу без болести доњих дисајних путева:

- 1) **Рани-транзиторни визинг** (присутан визинг у прве две године без визинга у седмој години) удружен је са порастом укупних IgE и падом ECP-а у инфекцији RSV у прве две године живота (а што тумачимо адекватним развојем TH1 и TH2 одговора у инфекцији, али је потребно додатно испитивање цитокина TH1/TH17 одговора)
- 2) **Перзистентни визинг** (присутан визинг и у прве две и у седмој години живота) удружен је у узрасту до две године са малим концентрацијама CC16 у серуму, великим концентрацијама IgE, TSLP, TNFα у инфекцији RSV, а код деце са атопијом и са слабијим TH2 одговором (што тумачимо TSLP индукованом

доминантном неутрофилном инфламацијом са смањењем пула прогенитора и присутни снажан, али недовољно ефикасни TH2 одговор и неочекивани изостанак промене у концентрацијама инуморегулаторних цитокина)

- 3) **Визинг са касним почетком** (није присутан у прве две године, али јесте у узрасту од 7 година) удружен је са малим концентрацијам IL-10 и TSLP, а великим концентрацијама TGF $\beta$ 1 у одсуству инфекције RSV (потврђује хипотезу хигијене, а може се тумачити као изостанак правовремене измене типа системске имунорегулације због одсуства инфекције).

Због евидентних промена у испитиваним биомарекрима 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 током развоја имунског система и његовог утицаја на раст плућа.

Учесталост БХР код деце узраста до две године од 6,7% захтева величину узорка од 300 до 500 деце, како би се, за задовољавајућом снагом студије, установиле евентуалне разлике по полу, начину исхране или генском 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 TH2 одговора, генско испитивање HLA и полиморфизма цитокина могло би допринети разјашњењу механизма настанка овог фенотипа код деце узраста до две године.

Даља испитивања на анималним моделима значаја NK, NKT ћелија,  $\gamma\delta$  лимфоцита и нуоцита у развоју плућа, могла би да разјасне однос алармина и процеса диференцијације прогенитора локално у респираторном епителу плућа, али механизми ефекта цитокина и локално индукованих ћелија током инфекције на матичне ћелије у костној сржи. Испитивање ефекта примене матичних ћелија на репопулацију Клара ћелија или супституционе примене рекомбинантног CC16, током раног детињства у случајевима дефицијенције, усмерили би даљи развој новог правовременог примарног 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 са узрастом код деце са атопијом утврђено је код женске деце, која нису на природној исхрани и 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 серуму 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 без обзира на атопију.
- 3) БХР фенотип код деце са атопијом удружен је са малом концентрацијом СС16 у серуму ( $CC16 \leq 3,4 \text{ ng/ml}$ ), док је код деце без атопије удружен са еозинофилном активацијом ( $ECP \geq 12,4 \text{ ug/l}$ ). СС16 у серуму  $\leq 3,4 \text{ ng/ml}$  за 5,7x повећава ризик од континуираног визинга  $\geq 3$  месеца 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 инфекцијом RSV, али је упала плућа код деце са атопијом удружена са малим концентрацијама СС16 и TGF $\beta$ 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. Негативна корелација TSLP и СС16 утврђена је код све деце са атопијом, као и код деце без атопије при статистичкој елиминацији ефекта IL-10. Код деце са атопијом статистичка елиминација IL-10 удружена је са порастом TGF $\beta$ 1 уз пораст ECP-а, као и са смањењем TGF $\beta$ 1 уз пораст TNF $\alpha$ .
- 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 ECP-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  $CC16 \leq 3,7 \text{ ng/ml}$ , 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  $CC16 \leq 4,3\text{ng/ml}$  и  $TGF\beta 1 \geq 27,5\text{ng/ml}$ .

- 7) Рани транзиторни визинг удружен је са порастом укупних IgE и падом ЕСР-а у инфекцији RSV; перзистентни визинг удружен је, у узрасту до две године, са малим концентрацијама CC16 у серуму, великим концентрацијама IgE, TSLP, TNF $\alpha$  у инфекцији RSV; визинг са касним почетком удружен је, у узрасту до две године, са малим концентрацијама IL-10 и TSLP, а великим концентрацијама TGF $\beta$ 1 у одсуству инфекције RSV.



## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. 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;99:155–68.
2. Volckaert T and De Langhe S. Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2014; 7: 8.
3. Barkauskas CE, Chung MI, Fioret B, Gao X, Katsura H, Hogan BL. Lung organoids: current uses and future promise. *Development* 2017; 144(6): 986-997.
4. Watson JK, Rulands S, Wilkinson AC, Wuidart A, Ousset M, Van Keymeulen A, Göttgens B, Blanpain C, Simons BD, and Rawlins EL. Clonal dynamics reveal two distinct populations of basal cells in slowturnover airway epithelium. *Cell Rep* 2015;12:90-101.
5. Clara M. Zur Histobiologie des Bronchalepithels On the histobiology of the bronchial epithelium. *Z mikrosk anat Forsch* 1937;41:321–47.
6. 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: 1585–91.
7. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BL. The role of Scgblal1 Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar epithelium. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 525–34.
8. Archer F, Abi-Rizk A, Desloire S, Dolmazon C, Gineys B, Guiguen F, Cottin V, Mornex JF, Leroux C. Lung progenitors from lambs can differentiate into specialized alveolar or bronchiolar epithelial cells. *BMC Vet Res* 2013; 9: 224.
9. 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: 13295-301.
10. Lacho-Contreras ME, Polverino F, Tesfaiqi, Y Pilon A, Celli BR and Owen CA. Club Cell Protein 16 (CC16) Augmentation: A Potential Disease-modifying Approach for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Expert Opin Ther Targets* 2016; 20(7): 869–83.
11. 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: 1723-30.
12. Broeckaert FB, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16) characteristics and prospectives lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 469-75.
13. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, Miller BE, Coxson HO, Tal-Singer R. Evaluation of Serum CC-16 As a Biomarker for COPD in the ECLIPSE Cohort. *Thorax*. 2008; 63: 1058–63.
14. 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.
15. Roth FD, Quintar AA, Leimgruber C, García L, Uribe Echevarría EM, Torres AI, Maldonado CA. Restoration of the normal Clara cell phenotype after chronic allergic inflammation. *Int J Exp Pathol* 2013; 94: 399–11.
16. Carraro S, Scheltema N, Bont L and Baraldi E. Early-life origins of chronic respiratory diseases: understanding and promoting healthy ageing. *Eur Respir J* 2014; 44: 1682–96.
17. 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; 161(1): 173-82.
18. Jain R, Barkauskas CE, Takeda N, Bowie EJ, Aghajanian H, Wang Q, Padmanabhan A, Manderfield LJ, Gupta M, Li D1, Li L, Trivedi CM, Hogan BL, Epstein JA. Plasticity of Hopx(+) type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. *Nat Commun* 2015; 6: 6727.
19. Shi W, Chen F, Cardoso WV. Mechanisms of lung development: contribution to adult lung disease and relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:558–63.
20. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, Wang YH, Lim H, Reynolds JM, Zhou XH, Fan HM, Liu ZM, Neelapu SS, Dong C. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* 2011; 17: 983–88.
21. Blanco CE. Maturation of fetal breathing activity. *Biol Neonate*. 1994; 65(3-4): 182-8.
22. 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.
23. 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: 237–47.
24. 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.

25. Rosen C, Shezen E, Aronovich A, Klionsky YZ, Yaakov Y, Assayag M, Biton IE, Tal O, Shakhar, G, Ben-Hur, Shneider D, Vaknin Z, Sadan O, Evron S, Freud E, Shoseyov D, Wilschanski M, Berkman N, Fibbe WE, Hagin D, Hillel-Karniel C, Krentsis IM, Bachar-Lustig E, Reisner Y. Preconditioning allows engraftment of mouse and human embryonic lung cells, enabling lung repair in mice. *Nat Med* 2015; 21869-79.
26. Maturana A, Bernard A, Germain AM, Chau VL, Moya FR. Amniotic fluid Clara cell protein concentration in normal pregnancy, a marker of fetal airway growth or fetal lung maturation? *J.Perinatol.* 2001; 21: 516–20.
27. Bernard A, Thielemans N, Lauwerys R, Langhendries JP, Van, Lierde M, Freund MM. Clara cell protein in human amniotic fluid: a potential marker of fetal lung growth. *Pediatr.Res.* 1994; 36: 771–5.
28. Jimenez FR, Belogique ST, Lewis JB, Albright SA, Jones CM, Howell BM, Mika AP, Jergensen TR, Gassman JR, Morris RJ, Arroyo JA, Reynolds PR. Conditional pulmonary over-expression of Claudin 6 during embryogenesis delays lung morphogenesis. *Int J Dev Biol* 2015; 59: 479-85.
29. Atkinson J, Adair-Kirk T, Kelley D, deMello D and Senior R. Clara cell adhesion and migration to extracellular matrix. *Respir Res* 2008; 9: 1-11.
30. 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.
31. 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: 71426.
32. University of Fribourg. Human embryology. Phases of lung development. Online course Swiss Virtual Camus, modul 18; last revision 2008. [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)
33. 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 postpneumectomy in mice. *Stem Cells* 2013; 31: 1330–39.
34. Thomas W, Seidenspinner S, Kawczynska-Leda N, Chmielnicka-Kopaczyk M, Marx A, Wirbelauer J, Szymankiewicz M, Speer CP. Clara cell secretory protein in tracheobronchial aspirates and umbilical cord serum of extremely premature infants with systemic inflammation. *Neonatology* 2010; 97: 228–34.
35. Ramsay PL, DeMayo FJ, Hegemier SE, Wearden ME, Smith CV, Welty SE. Clara cell secretory protein oxidation and expression in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2001;164: 155–61.
36. Guerra S, Halonen M, Vasquez MM, Spangenberg A, Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Lavi I, Tarès L, Carsin AE, Dobaño C, Barreiro E, Zock JP, Martínez-Moratalla J, Urrutia I, Sunyer J, Keidel D, Imboden M, Probst-Hensch N, Hallberg J, Melén E, Wickman M, Bousquet J, Belgrave DC, Simpson A, Custovic A, Antó JM, Martinez FD. 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.
37. 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.
38. Wong PM, Lees AN, Louw J, Lee FY, French N, Gain K, Murray CP, Wilson A, Chambers DC. Emphysema in young adult survivors of moderate-to-severe bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* 2008; 32: 321–8.
39. 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.
40. 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: 17531–536.
41. Tata PR. and Rajagopal J. Plasticity in the lung making and breaking cell identity. *Development* 2017; 144: 755-66.
42. Pardo-Saganta A., Law BM, TataPR, 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: 184-97.
43. 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: 126–31.
44. 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: 48451.

45. 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; 177 (7): 701-11.
46. 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; 293(1): 131-41.
47. 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* 2009; 119: 336–348.
48. Crosby LM and Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298: L715–L731.
49. Persson CG, Erjefalt JS, Erjefalt I, Korsgren MC, Nilsson MC, Sundler F. Epithelial shedding–restitution as a causative process in airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 746–55.
50. 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: 1164-77.
51. Smith MK, Koch PJ, Reynolds SD. Direct and indirect roles for  $\beta$ -catenin in facultative basal progenitor cell differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302: 580-94.
52. Blundell P. The biology of Clara cells – review paper. *Int J Molec Med Adv Sci* 2006; 2: 307-311.
53. Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH and Hogan BLM. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 3641-49.
54. 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.
55. Lloyd CM, Saglani S. Asthma and allergy the emerging epithelium. *Nat Med* 2010; 16: 273–74.
56. Whittsett JA. and Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 2015; 16(1): 27-35.
57. Swamy M, Jamora C, Havran W and Hayday A. Epithelial decision-makers : in search of the “epimmunome”. *Nat Immunol* 2010; 11(8): 656–65.
58. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 583–94.
59. Denney L, Byrne AJ, Shea TJ, Buckley JS, Pease JE, Herledan GMF, Walker SA, Gregory LG and Lloyd CM. Pulmonary Epithelial Cell-Derived Cytokine TGF- $\beta$ 1 Is a Critical Cofactor for Enhanced Innate Lymphoid Cell Function. *Immunity* 2015; 43: 945–58.
60. Gibbs JD, Ornoff DM, Igo HA, Zeng JY and Imani F. Cell cycle arrest by transforming growth factor  $\beta$ 1 enhances replication of respiratory syncytial virus in lung epithelial cells. *J Virol* 2009; 83: 12424–31.
61. Kariyawasam HH, Pegorier S, Barkans J, Xanthou G, Aizen M, Ying S, Kay AB, Lloyd CM and Robinson DS. Activin and transforming growth factor- $\beta$  signaling pathways are activated after allergen challenge in mild asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 454–62.
62. Beers MF, Morrissey EE. The three R’s of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *J Clin Invest* 2011; 121: 2065–73.
63. 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: 237–41.
64. 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.
65. Perl AK, Riethmacher D, and Whittsett J. Conditional Depletion of Airway Progenitor Cells Induces Peribronchiolar Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 511–521.
66. Owen CA. Leukocyte cell surface proteinases regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1246–72.
67. Lee YC, Zhang Z, Mukherjee AB. Mice lacking uteroglobin are highly susceptible to developing pulmonary fibrosis. *FEBS Lett* 2006; 580: 4515–20.
68. Antico G, Lingen MW, Sassano A, Melby J, Welch RW, Fiore S, Pilon AL, Miele L. Recombinant human uteroglobin/CC10 inhibits the adhesion and migration of primary human endothelial cells via specific and saturable binding to fibronectin. *J Cell Physiol* 2006; 207: 553–61.
69. Shiyu S, Zhiyu L, Mao Y, Lin B, Lijia W, Tianbao Z, Jie C, Tingyu L. 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.

70. Chen LC, 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; 67(6): 3025-28.
71. 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: 429-38.
72. Yao XL, Levine SJ, Cowan MJ, Logun C and Shelhamer JH. Tumor necrosis factor-alpha stimulates human Clara cell secretory protein production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 629.
73. 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: 864.
74. 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; 114: 664-70.
75. Long XB, Hu S, Wang N, Zhen HT, Cui YH, Liu Z. Clara cell 10-kDa protein gene transfection inhibits NF-kappaB activity in airway epithelial cells. *PLoS One* 2012; 7: 35960.
76. Katavolos P, Ackerley CA, Clark ME, Bienzle D. Clara cell secretory protein increases phagocytic and decreases oxidative activity of neutrophils. *Vet Immunol. Immunopathol* 2011; 139: 1-9.
77. Liu Y, Yu HJ, Wang N, Zhang YN, Huang SK, Cui YH and Liu Z. Clara cell 10-kDa protein inhibits TH17 responses through modulating dendritic cells in the setting of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(2): 387-94.
78. Muenchhoff M and Goulder PJR. Sex Differences in Pediatric Infectious Diseases. *J Infect Dis* 2014; 209 (3): 120-6.
79. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB. Cord blood CD4(1)CD25(1)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 2005; 105(2): 750-58.
80. Levy O, Martin S, Eichenwald E, Ganz T, Valore E, Carroll SF, Lee K, Goldmann D, Thorne GM. Impaired innate immunity in the newborn Newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics* 1999; 104: 1327-33.
81. Ambruso DR, Bentwood B, Henson PM, Johnston RB. Oxidative metabolism of cord blood neutrophils: Relationship to content and degranulation of cytoplasmic granules. *Pediatr Res* 1984; 18: 1148-53.
82. Qing G, Rajaraman K, Bortolussi R. Diminished priming of neonatal polymorphonuclear leukocytes by lipopolysaccharide is associated with reduced CD14 expression. *Infect Immun* 1995; 63: 248-52.
83. Holt PG, Rowe J, Kusel M, Parsons F, Hollams EM, Bosco A, McKenna K, Subrata L, de Klerk N, Serralha M, Holt BJ, Zhang G, Loh R, Ahlstedt S, Sly PD. Toward improved prediction of risk for atopy and asthma among preschoolers a prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(3): 653-9.
84. Heier I, Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Kajosaari M, Turpeinen M, Lindahl H, Brandtzaeg P, Jahnsen FL, Mäkelä MJ. Bronchial response pattern of antigen presenting cells and regulatory T cells in children less than 2 years of age. *Thorax* 2008; 63: 703-9.
85. 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: 1165-71.
86. Rowe J, Kusel M, Holt BJ, Suriyaarachchi D, Serralha M, Hollams E, Yerkovich ST, Subrata LS, Ladyman C, Sadowska A, Gillett J, Fisher E, Loh R, Soderstrom L, Ahlstedt S, Sly PD, Holt PG. Prenatal versus postnatal sensitization to environmental allergens in a high-risk birth cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1164-73.
87. Lewis DB. Maturing of the fetal and neonatal immune system. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT at al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4<sup>th</sup> ed, Elsevier Saunders, 2013; 405-414.
88. 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, ed. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 7th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 80-191.
89. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 379-390.
90. Prendergast AJ, Klenerman P, Goulder PJ. The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 636-48.
91. Holt PG. The mechanism or mechanisms driving atopic asthma initiation. The infant respiratory microbiome moves to center stage. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136: 15-22.
92. Strickland D, Holt P. T-regulatory cells in childhood asthma. *Trends Immunol* 2011; 32: 420-7.

93. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol* 2011; 11(7): 445-56.
94. Hanson LA. Session 1 Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc* 2007; 66(3): 384-96.
95. Kelly D, Coutts AG. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 177-85.
96. 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.
97. 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.
98. Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr.* 2010; 156(2 Suppl): 3-7.
99. 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. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5): 832-6.
100. Macaubas C, de Klerk H, Holt B J, Wee C, Kendall G, Firth M, Sly PD, Holt PG. Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *Lancet* 2003; 362: 1192-97.
101. 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.
102. Frew AJ. Sublingual immunotherapy. *N Engl J Med* 2008; 358: 2259-64.
103. Ree R, Hummelshøj L, Plantinga M, Poulsen LK and Swindle E. Allergic sensitization: host-immune fact. *Clin Transl Allergy* 2014; 4: 12.
104. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54(8): 577-89.
105. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 2012; 106(1): 9-14.
106. Dichlberger A, Kovanen PT, Schneider WJ. Mast cells: from lipid droplets to lipid mediators. *Clin Sci (Lond)* 2013; 125(3): 121-30.
107. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(7): 478-94.
108. 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; 204(2): 253-8.
109. Boita M, Garzaro M, Raimondo L, Riva G, Pecorari G, Landolfo V, Naqe N, Rolla G. Thymic stromal lymphopoietin in respiratory disorders: An update on signalling pathway. *OA Immunology* 2013; 1(1): 3.
110. Lacy P, Moqbel R. Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1(1): 79-84.
111. DeKruyff RH, Yu S, Kim HY, Umetsu DT. Innate immunity in the lung regulates the development of asthma. *Immunol Rev* 2014; 260(1): 235-48.
112. Wilhelm C, Hirota K, Stieglitz B, Van Snick J, Tolaini M, Lahl K, Sparwasser T, Helmby H, Stockinger B. An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat Immunol* 2011; 12: 1071-77.
113. Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB, Thornton EE, Krummel MF, Chawla A, Liang HE, Locksley RM. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 2013; 502: 245-48.
114. Umetsu DT, DeKruyff RH. Natural killer T cells are important in the pathogenesis of asthma the manz pathways of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(5): 975-9.
115. Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie AN, Smith DE, DeKruyff RH, Umetsu DT. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyperreactivity independent of adaptive immunity. *Nat Immunol* 2011; 12: 631-38.
116. Strickland DH, Thomas JA, Mok D, Blank F, McKenna KL, Larcombe AN, Sly PD, Holt PG. Defective aeroallergen surveillance by airway mucosal dendritic cells as a determinant of risk for persistent airways hyperresponsiveness in experimental asthma. *Mucosal Immunol* 2012; 5: 332-41.
117. Hollams EM, Devereil M, Serralha M, Suriyaarachchi D, Parsons F, Zhang G, de Klerk N, Holt BJ, Ladyman C, Sadowska A, Rowe J, Loh R, Sly PD, Holt PG. Elucidation of asthma phenotypes in atopic teenagers through parallel immunophenotypic and clinical profiling. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 463-70.
118. Watts KD and Goodman DM. Wheezing in infants: Bronchiolitis In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Ed 18<sup>th</sup>, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.

119. 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.
120. Liu AH, Covar RA, Spahn JD, Leung DYM. Childhood asthma. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Ed 18<sup>th</sup>, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
121. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, Turpeinen M, Rogers AV, Payne DN, Bush A, Haahtela T, Mäkelä MJ, Jeffery PK. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(7):722-7.
122. Bush A. How Early do Airway Inflammation and Remodeling Occur? *Allergol Int* 2008; 57: 11-9.
123. Levy B, Noel PJ, Freemer MM, Cloutier MM, Georas SN, Jarjour NN, Ober C, Woodruff PG, Barnes KC, Bender BG, Camargo CA Jr, Chupp GL, Denlinger LC, Fahy JV, Fitzpatrick AM, Fuhlbrigge A, Gaston BM, Hartert TV, Kolls JK, Lynch SV, Moore WC, Morgan WJ, Nadeau KC, Ownby DR, Solway J, Szeffler SJ, Wenzel SE, Wright RJ, Smith RA, Erzurum SC. Future Research Directions in Asthma. An NHLBI Working Group Report. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192(11): 1366-72
124. Lagerkvist BJ, Bernard A, Blomberg A, Bergstrom E, Forsberg B, Holmstrom K, Karp K, Lundstrom NG, Segerstedt B, Svensson M, Nordberg G. Pulmonary Epithelial Integrity in Children: Relationship to Ambient Ozone Exposure and Swimming Pool Attendance. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1768-71.
125. 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.
126. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-60.
127. Holt PG, Sly PD. Viral infections and atopy in asthma pathogenesis: new rationales for asthma prevention and treatment. *Nat Med* 2012; 18: 726-35.
128. 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: 108-19.
129. Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol* 2008; 82(5): 2040-55.
130. Derscheid PJ and Ackermann MP. Perinatal Lamb Model of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection. *Viruses* 2012; 4: 2359-78.
131. 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.
132. 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.
133. Akinbami LJ, Moorman JE, Garbe PL, Sondik EJ. Status of childhood asthma in the United States, 1980-2007. *Pediatrics* 2009; 123 (Suppl 3): S131-S145.
134. 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.
135. 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; 6(8): 655-9.
136. Holgate ST, Arshad HS, Roberts GC, Howarth PH, Thurner P, Davies DE. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clinical Science* 2010; 118: 439-50.
137. 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* 2000; 162: 1403-6.
138. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, Bacharier LR, Boehmer SJ, Krawiec M, Larsen G, Lemanske RF, Liu A, Mauger DT, Sorkness C, Szeffler SJ, Strunk RC, Taussig LM, Martinez FD. characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004 ; 114(6): 1282-7.
139. Sly PD, Boner AL, Björkstén B, Bush A, Custovic A, Eigenmann PA, Gern JE, Gerritsen J, Hamelmann E, Helms PJ, Lemanske RF, Martinez F, Pedersen S, Renz H, Sampson H, von Mutius E, Wahn U, Holt PG. Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children. *Lancet* 2008; 372: 1100-6.
140. Just J, Bourgoin-Heck M, Amat F. Clinical phenotypes in asthma during childhood. *Clin Exp Allergy* 2017; 47: 848-55.
141. Szeffler SJ, Chmiel JF, Fitzpatrick AM, Giacomia G, Green TP, Jackson DJ, Nielsen HC, Phipatanakul W, Raissy HH. Asthma across the ages: knowledge gaps in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(1): 3-13.
142. Arshad SH, Karmaus W, Matthews S, Mealy B, Dean T, Frischer T, Tsitoura S, Bojarskas J, Kuehr J, Forster J, 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 Invest Allergol Clin Immunol* 2001; 11(2): 94-102.
143. 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
144. Just J, Gouvis-Echraghi R, Rouve S, Wanin S, Moreau D, Annesi-Maesano I. Two novel, severe asthma phenotypes identified during childhood using a clustering approach. *Eur Respir J* 2012; 40: 55-60.
145. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008; 118(11): 3546-56.
146. Holtzman MJ. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. *J Clin Invest* 2012; 122(8): 2741-8.
147. D'Amato G, Holgate ST, Pawankar R, Ledford DK, Cecchi L, Al-Ahmad M, Al-Enezi F, Al-Muhsen S, Ansotegui I, Baena-Cagnani CE, Baker DJ, Bayram H, Bergmann KC, Boulet LP, Buters JT, D'Amato M, Dorsano S, Douwes J, Finlay SE, Garrasi D, Gómez M, Haahntela T, Halwani R, Hassani Y, Mahboub B, Marks G, Michelozzi P, Montagni M, Nunes C, Oh JJ, Popov TA, Portnoy J, Ridolo E, Rosário N, Rottem M, Sánchez-Borges M, Sibanda E, Sienra-Monge JJ, Vitale C, Annesi-Maesano I. Meteorological conditions, climate change, new emerging factors and asthma and related allergic disorders. *World Allergy Organ J*. 2015; 8(1): 25.
148. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006; 11(1): 54-61.
149. 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* 2013; 7: 199-210.
150. Just J, Fournier L, Momas I, Zambetti C, Sahraoui F, Grimfeld A. Clinical significance of bronchoalveolar eosinophils in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 42-4.
151. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, Tsartsali L, Lloyd CM, Bush A, Saglani S. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 974-982.
152. Hadebe S, Kirstein F, Fierens K, et al. Microbial Ligand Costimulation Drives Neutrophilic Steroid-Refractory Asthma. *PLoS ONE* 2015; 10: 0134219.
153. Cheung TK, Lam B, Lam KF, Ip M, Ng C, Kung R, Wong BCY. Gastroesophageal reflux disease is associated with poor asthma control, quality of life, and psychological status in Chinese asthma patients. *Chest*. 2009; 135: 1181-85.
154. Carraro S, Doherty J, Zaman K, Gainov I, Turner R, Vaughan J, Hunt JF, Márquez J, Gaston B. S-nitrosothiols regulate cell surface pH buffering by airway epithelial cells during the human immune response to rhinovirus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: 827-32.
155. Spycher BD, Silverman M, Pescatore AM, Beardsmore CS, Kuehni CE. Comparison of phenotypes of childhood wheeze and cough in 2 independent cohorts. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132: 1058-67.
156. Piippo-Savolainen E, Korppi M. Wheezy babies—wheezy adults? Review on long-term outcome until adulthood after early childhood wheezing. *Acta Paediatr* 2008; 97: 5-11
157. Wang F, He XY, Baines KJ, Gunawardhana LP, Simpson JL, Li F, Gibson PG. Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. *Eur Respir J* 2011; 38(3): 567-74.
158. 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; 2(12): 303-13.
159. Kalluri R and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-28.
160. Lamouille S, Xu J and Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(3): 178-96.
161. Vaughan AE, Chapman HA. Regenerative activity of the lung after epithelial injury. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(7): 922-30.
162. Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Degryse AL, Li B, Han W, Sherrill TP, Plieth D, Neilson EG, Blackwell TS, Lawson WE. Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 657-65.
163. Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong YY and Hogan BLM. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 8(6): 639-48.
164. 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: 646-78.
165. Bernard A, Hermans C, Van Houte G. Transient increase of serum Clara cell protein (CC16) after exposure to smoke. *Occup Environ Med*. 1997; 54(1): 63-5.

166. Corren J. Small airways disease in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008; 8: 533–39.
167. Contoli M, Bousquet J, Fabbri LM, Magnussen H, Rabe KF, Siafakas NM, Hamid Q, Kraft M. The small airways and distal lung compartment in asthma and COPD: a time for reappraisal. *Allergy* 2010; 65: 141–151.
168. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Imada A, Hirasawa M, Yamada T, Kawai T, Abe S. Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 930-3.
169. Rava M, Tares L, Lavi I, Barreiro E, Zock JP, Ferrer A, Muniozgueren N, Nadif R, Cazzoletti L, Kauffmann F, Anto JM, Guerra S. 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.
170. 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.
171. Johansson S. CC16 in allergy and allergic inflammation. PHD thesis, University of Gothenburg, 2008.
172. Laing IA, de Klerk NH, Turner SW, Judge PK, Hayden CM, Landau LI, Goldblatt J, Le Souëf PN, Perth Infant Asthma Follow-up Cohort. 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.
173. 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.
174. Lakind JS, Holgate ST, Ownby DR, Mansur AH, Helms PJ, Pyatt D, Hays SM. 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.
175. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchoalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823–35.
176. Scheerlinck JP, Snibson K.J, Bowles VM, Sutton P. Biomedical applications of sheep models: From asthma to vaccines. *Trends Biotechnol* 2008; 26: 259–66.
177. 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): 225–67.
178. 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;119:1095–103.
179. 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: 823–30.
180. 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.
181. Bush A. Lung Development and Aging. *Ann Am Thorac Soc* 2016; 13(Supp 5); S438–S446.
182. Ilic N, Mihailovic N. Serum Clara cell protein and atopic phenotype in children up to 2 years of age. *J Clin Lab Anal* 2017; 31(6); doi: 10.1002/jcla.22151.
183. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Activation of T Lymphocytes. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012; 206-209.
184. O’Shea JJ, Gadina M, Siegel R. Cytokines and cytokine receptors. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT at al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4<sup>th</sup> ed, Elsevier Saunders, 2013, 16-34.
185. Lewis DE, Harriman GR, Blutt SE. Regulation of hematopoietic and lymphopoietic cell growth and differentiation. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4<sup>th</sup> ed, Elsevier Saunders, 2013, 17-19.
186. Becklake MR and Kauffmann F. Gender differences in airway behaviour over the human life span. *Thorax* 1999;54(12);1119–38.
187. Doershuk CF, Fisher BJ, Matthews LW. Specific airway resistance from the perinatal period into adulthood. Alterations in childhood pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1974;109:452–57.
188. Thurlbeck WM. Postnatal human lung growth. *Thorax* 1982; 37: 564–71.
189. 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.
190. Rapaport R. Disorders of sex development. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Ed 18<sup>th</sup>, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
191. Assaggaf H and Felty Q. Gender, Estrogen, and Obliterative Lesions in the Lung. *Int J Endocrinol* 2017; 2017: ID 8475701.



192. Massaro D, Clerch LB and Massaro GD. Estrogen receptor-alpha regulates pulmonary alveolar loss and regeneration in female mice: morphometric and gene expression studies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(1): 222–228.
193. Patrone C, Cassel TN, Pettersson K, Piao YS, Cheng G, Ciana P, Maggi A, Warner M, Gustafsson JA, Nord M. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8542–52.
194. Chu AJ and Rooney SA. Estrogen stimulation of surfactant synthesis. *Pediatr Pulmonol* 1985; 1(3): 110–14.
195. Dammann CE, Ramadurai SM, McCants DD, Pham LD, Nielsen HC. Androgen regulation of signaling pathways in late fetal mouse lung development. *Endocrinology* 2000; 141: 2923–29.
196. Kissick HT, Sanda MG, Dunn LK, Pellegrini KL, On ST, Noel JK, Arredouani MS. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(27): 9887–92.
197. Hermans C, Dong P, Robin M, Jadoul M, Bernard A, Bersten AD, Doyle IR. Determinants of serum levels of surfactant proteins A and B and Clara cell protein CC16. *Biomarkers* 2003; 8: 461–71.
198. Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, Eidelman AI, American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2005; 115(2): 496–506.
199. Oddy WH. Breastfeeding and asthma in children: findings from a West Australian study. *Breastfeed Rev* 2000; 8(1): 5–11.
200. Wu P, Dupont WD, Griffin MR, Carroll KN, Mitchel EF, Gebretsadik T, Hartert TV. Evidence of a causal role of winter virus infection during infancy in early childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1123–29.
201. Blacquiere MJ, Hylkema MN, Postma DS, Geerlings M, Timens W, Melgert BN. Airway inflammation and remodeling in two mouse models of asthma: comparison of males and females. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 153(2): 173–81.
202. Takeda M, Tanabe M, Ito W, Ueki S, Konno Y, Chihara M, Itoga M, Kobayashi Y, Moritoki Y, Kayaba H, Chihara J. Gender difference in allergic airway remodelling and immunoglobulin production in mouse model of asthma. *Respirology* 2013; 18(5): 797–06.
203. Warren KJ, Sweeter JM, Pavlik JA, Nelson AJ, Devasure JM, Dickinson JD, Sisson JH, Wyatt TA, Poole JA. Sex differences in activation of lung-related type 2 innate lymphoid cells in experimental asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016; 118(2): 233–4.
204. Laffont S, Blanquart E and Guéry J-C. Sex Differences in Asthma: A Key Role of Androgen-Signaling in Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol* 2017; 8: 1069.
205. Riffo-Vasquez Y, Ligeiro de Oliveira AP, Page CP, Spina D, Tavares-de-Lima W. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(3): 459–70.
206. Choi HJ, Chung YS, Kim HJ, Moon UY, Choi YH, Van Seuning I, Baek SJ, Yoon HG, Yoon JH. Signal pathway of 17beta-estradiol-induced MUC5B expression in human airway epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2009; 40(2): 168–78.
207. 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
208. Chen Y, Ji LL, Liu TY, Wang ZT. Evaluation of gender-related differences in various oxidative stress enzymes in mice. *Chinese J Physiol* 2011; 54: 385–90.
209. Yang KD, Ou CY, Chang JC, Chen RF, Liu CA, Liang HM, Hsu TY, Chen LC, Huang SK. 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.
210. 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.
211. Subrata LS, Bizzantino J, Mamessier E, Bosco A, McKenna KL, Wikstrom ME, Goldblatt J, Sly PD, Hales BJ, Thomas WR, Laing IA, LeSouëf PN, Holt PG. Interactions between innate antiviral and atopic immunoinflammatory pathways precipitate and sustain asthma exacerbations in Children. *J Immunol* 2009; 183: 2793–800.
212. Gill MA, Bajwa G, George TA, Dong CC, Dougherty I, Jiang N, Gan VN, Gruchalla RS. Counter regulation between the Fc epsilon RI pathway and antiviral responses in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2010; 184: 5999–6006.
213. Kuperman DA, Huang X, Nguyen L, Hölscher C, Brombacher F, Erle DJ. IL-4 receptor signaling in Clara cells is required for allergen-induced mucus production. *J Immunol* 2005; 175: 3746–52.
214. 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; 268(27): 20343–51.

215. Turner SW, Young S, Landau LI, Le Souef PN. Reduced lung function both before bronchiolitis and at 11 years. *Arch Dis Child* 2002; 87: 417–20.
216. Van Miert E, Sardella A, Bernard A. Biomarkers of early respiratory effects in smoking adolescents. *Eur Respir J* 2011; 38: 1287–93.
217. Buro-Auriemma LJ, Salit J, Hackett NR, Walters MS, Strulovici-Barel Y, Staudt MR, Fuller J, Mahmoud M, Stevenson CS, Hilton H, Ho MW, Crystal RG. Cigarette smoking induces small airway epithelial epigenetic changes with corresponding modulation of gene expression. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 4726–38.
218. Shaykhiiev R, ZuoWL, Chao I, Fukui T, Witover B, Brekman A. and Crystal RG. EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(29): 12102-7.
219. 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: 517–23.
220. Persson C. Primary lysis of eosinophils in severe desquamative asthma. *Clin Exp Allergy* 2014; 44: 173–83.
221. Guilbert TW, Singh AM, Danov Z, Evans MD, Jackson DJ, Burton R, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, Gangnon R, Gern JE, Lemanske RF. Decreased lung function after preschool wheezing rhinovirus illnesses in children at risk to develop asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 532-8.
222. 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.
223. Okabayashi T, Kojima T, Masaki T, Yokota S, Imaizumi T, Tsutsumi H, Himi T, Fujii N, Sawada N. Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res* 2011; 160:360–66.
224. Mansour AI, Almonaem ERA, Behairy OG and Gouda TM. Predictive value of IL-35 and IL-17 in diagnosis of childhood asthma. *Scand J Clin Lab Invest* 2017; DOI:10.1080/00365513.2017.1328739
225. Gosalbes MJ, Llop S, Valles Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy* 2013; 43: 198–11.
226. Rautava S, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology* 2012; 102: 178–84.
227. Penders J, Thijs C, Mommers M, et al. Intestinal lactobacilli and the DC-SIGN gene for their recognition by dendritic cells play a role in the aetiology of allergic manifestations. *Microbiology* 2010; 156: 3298–05.
228. Johansson MA, Sjogren YM, Persson JO, Nilsson C, Severremark-Ekstrom E. Early colonization with a group of Lactobacilli decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity. *PLoS One* 2011; 6: 23031.
229. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* 2014; 20: 159–66.
230. Rejno G, Lundholm C, Gong T, et al. Asthma during pregnancy in a population-based study—pregnancy complications and adverse perinatal outcomes. *PLoS One* 2014; 9: 104755.
231. Stensballe LG, Simonsen J, Jensen SM, et al. Use of antibiotics during pregnancy increases the risk of asthma in early childhood. *J Pediatr* 2013; 162: 832–8.
232. Koleva PT, Tun HM, Konya T, Guttman DS, Becker AB, Mandhane PJ, Turvey SE, Subbarao P, Sears MR, Scott JA and Kozyrskyj AL, for the CHILD Study Investigators. Sex-specific impact of asthma during pregnancy on infant gut microbiota. *Eur Respir J* 2017; 50: 1700280.
233. Ilic N, Velickovic V, Djokic DI, Rankovic N, Kostic G, Petrovic M, Baskic D. Clinical manifestations of atopy in children up to two years of age. *Vojnosanit Pregl* 2011; 68(8): 690-5.
234. 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.
235. Knipping K, Knippels LMJ, Dupont C, Garssen J. Serum biomarkers for allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2017; 28: 114–23.
236. Chandran CNM, Kiran GS, Babu KR, Buchineni M. Serum IgE levels as a marker of disease activity in childhood asthma: A cross sectional study. *IAIM* 2015; 2: 45–51.
237. Jovanovic D, Ilic N, Miljković-Selimović B, Djokić D, Relić T, Tambur Z, Doder R, Kostić G. *Campylobacter jejuni* infection and IgE sensitization in infant up to two years of age. *Vojnosanit Pregl* 2015; 72 (2): 140-47.
238. Tregoning JS, 2010 Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 74-98.

239. Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation. *Trends Immunol* 2015; 36(3): 189–95.
240. Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA, Kuroki Y, Ohara O, Koyasu S, Kubo M. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity* 2014; 40: 758–71.
241. 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: 8485–95.
242. 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: 2376–84.
243. Aysola RS, Hoffman EA, Gierada D, Wenzel S, Cook-Granroth J, Tarsi J, Zheng J, Schechtman KB, Ramkumar TP, Cochran R, Xueping E, Christie C, Newell J, Fain S, Altes TA, Castro M. Airway remodeling measured by multidetector CT is increased in severe asthma and correlates with pathology. *Chest* 2008; 134(6): 1183–91.
244. Grainge CL, Lau LC, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, Holgate S, Davies DE, Howarth PH. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med* 2011; 364(21): 2006–15.
245. 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.
246. Wang S, Rosenberger C, Bao Y, Stark J, Harrod KS. Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 2003; 171: 1051–60.
247. Olszewska-Pazdrak B, Pazdrak K, Ogra PL, Garofalo R. Respiratory syncytial virus infected pulmonary epithelial cells induce eosinophil degranulation by a CD18-mediated mechanism. *J Immunol* 1998; 160: 4889–95.
248. Bystrom J, Amin K, Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Res Res* 2011; 12: 10.
249. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. Viral modulation of programmed necrosis. *Curr Opin Virol* 2013; 3: 296–06.
250. Gleich GJ, Flavahan NA, Fujisawa T, Vanhoutte PM. The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 776–81.
251. Erjefalt JS, Korsgren M, Nilsson MC, Sundler F, Persson CG. Association between inflammation and epithelial damage-restitution processes in allergic airways in vivo. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1344–55.
252. Woolley KL, Adelroth E, Woolley MJ, Ellis R, Jordana M, O'Byrne PM. Effects of allergen challenge on eosinophils, eosinophil cationic protein, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1915–24.
253. Tateishi K, Motojima S, Kushima A, Fukuda T, Makino S. Comparison between allergen induced and exercise-induced asthma with respect to the late asthmatic response, airway responsiveness, and Creola bodies in sputum. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 229–37.
254. 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): 307–16.
255. 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): 324–37.
256. Halim TY et al. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 2012; 36: 451–63.
257. 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.
258. Srisodsai A, Kurotani R, Chiba Y, Sheikh F, Young HA, Donnelly RP, Kimura S. Interleukin-10 induces uteroglobin-related protein (UGRP) 1 gene expression in lung epithelial cells through homeodomain transcription factor T/EBP/NKX2.1. *J Biol Chem* 2004; 279: 54358–68.
259. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, Qin XF, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 2007; 204: 105–15.
260. Krogulska A, Borowiec M, Polakowska E, Dynowski J, Młynarski W, Wasowska-Królikowska K. FOXP3, IL-10, and TGF- $\beta$  Genes Expression in Children with IgE-Dependent Food Allergy. *J Clin Immunol* 2011; 31: 205–15.
261. Burgess SL, Lu M, Ma JZ, Naylor C, Donowitz JR, Kirkpatrick BD, Haque R, Petri WA. Inflammatory markers predict episodes of wheezing during the first year of life in Bangladesh. *Respir Med* 2016; 110: 53–7.

262. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, Monticelli S, Lanzavecchia A, Sallusto F. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature* 2012; 484(7395): 514-8.
263. 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.
264. Bartz H, Buning-Pfaue F, Turkel O, Schauer U. Respiratory syncytial virus induces prostaglandin E<sub>2</sub>, IL-10 and IL-11 generation in antigen presenting cells. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 438-45.
265. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(5): 331-44.
266. 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; 30(1): 23-32.
267. Schuurhof A, Janssen R, de Groot H, Hodemaekers HM, de Klerk A, Kimpen JL and Bont L. Local interleukin-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with post-bronchiolitis wheeze. *Resp Res* 2011; 12: 121.
268. Rook GA, Raison CL, Lowry CA. Microbial 'old friends', immunoregulation and socioeconomic status. *Clin Exp Immunol* 2014; 177(1): 1-12.
269. 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; 11(9): 854-61.
270. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H and Horwitz DA. Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25+ Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- $\beta$ , and IL-10. *J Immunol* 2004; 172: 5213-21.
271. 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.
272. Siracusa MC, Saenz SA, Hill DA, Kim BS, Headley MB, Doering TA, Wherry EJ, Jessup HK, Siegel LA, Kambayashi T, Dudek EC, Kubo M, Cianferoni A, Spergel JM, Ziegler SF, Comeau MR, Artis D. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature* 2011; 477: 229-33.
273. Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 238-44.
274. Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FX, Yao Z, Cao W, Liu YJ. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005; 202: 1213-23.
275. Miazgowiec MM, Elliott MS, Debley JS, Ziegler SF. Respiratory syncytial virus induces functional thymic stromal lymphopoietin receptor in airway epithelial cells. *J Inflamm Res* 2013; 6: 53-61.
276. Rochman Y, Leonard WJ. The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol* 2008; 181(7): 699-05.
277. McDonald D, Levy O. Innate immunity. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT et al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4<sup>th</sup> ed, Elsevier Saunders, 2013; 35-47.
278. Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(10): 761-71.
279. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology* 2002; 3: 673-80.
280. Laucho-Contreras ME, Polverino F, Gupta G, Taylor KL, Kelly E, Pinto-Plata V, Divo M, Afshaq N, Petersen H, Stripp B, Pilon AL, Tesfaigzi Y, Celli BR and Owen CA. A Protective Role For Club Cell Secretory Protein-16 (CC16) In The Development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Eur Respir J* 2015; 45(6): 1544-56.
281. Oddy WH, Halonen M, Martinez FD, Lohman IC, Stern DA, Kurzius-Spencer M, Guerra S, Wright AL. TGF- $\beta$  in human milk is associated with wheeze in infancy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112: 723-8.
282. 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: 2297-307.
283. 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; 33(8): 2307-15.

284. Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA. T regulatory cells and their counterparts masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy* 2009; 39(5): 626-39.
285. 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; 122(3): 617-24.
286. Hinz D, Simon JC, Maier-Simon C, Milkova L, Röder S, Sack U, Borte M, Lehmann I, Herberth G. Reduced maternal regulatory T cell numbers and increased T helper type 2 cytokine production are associated with elevated levels of immunoglobulin E in cord blood. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 419-26.
287. 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; 33(4): 716-24.
288. Roifman CM, Grunebaum E. Primary T cell immunodeficiencies. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT at al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4<sup>th</sup> ed, Elsevier Saunders, 2013, 437-453.
289. 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; 24(4): 475-87.
290. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005; 307(5715): 1603-9.
291. Libert C, Dejager L, Pinheiro I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 594-04.
292. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 2007; 56(4): 331-40.
293. Prince LR, Graham KJ, Connolly J et al. Staphylococcus aureus induces eosinophil cell death mediated by alpha-hemolysin. *PLoS ONE* 2013; 7: 31506.
294. Weiler CR, Kita H, Hukee M, Gleich GJ. Eosinophil viability during immunoglobulin-induced degranulation. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 493-01.
295. Ueki S, Melo RC, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion competent eosinophil granules in humans. *Blood* 2013; 121: 2074-83.
296. Kano G, Almanan M, Bochner BS, Zimmermann N. Mechanism of Siglec-8-mediated cell death in IL-5-activated eosinophils: role for reactive oxygen species-enhanced MEK/ERK activation. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 437-45.
297. Kovalski A, Sheikh J and Weller PF. Eosinophils and eosinophilia. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT at al. *Clinical Immunology: principles and practice*, 4<sup>th</sup> ed, Elsevier Saunders, 2013. P 289-309.
298. Fattouh R, Midence NG, Arias K, Johnson JR, Walker TD, Goncharova S, Souza KP, Gregory RC, Lonning S, Gaudie J and Jordana M. Transforming growth factor-beta regulates house dust mite-induced allergic airway inflammation but not airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 593-03.
299. Luo X, Ding Q, Wang M, Li Z, Mao K, et al. In Vivo Disruption of TGF- $\beta$  Signaling by Smad7 in Airway Epithelium Alleviates Allergic Asthma but Aggravates Lung Carcinogenesis in Mouse. *PLoS ONE* 2010; 5(4): 10149.
300. Yoon JM, Lee KH, Lee SM, Lim JJ, Yang SC, Yoo CG, Lee CT, Han SK, Shim YS, Kim YW. The immune modulation of Clara cell-10 in human peripheral monocytes and dendritic cells. *Int J Mol Med* 2010; 26: 415-23.
301. Wittekindt OH. Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Eur J Physiol* 2017; 469: 135-47.
302. 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; 42(2): 161-71.
303. Pang M, Yuan Y, Wang D, Li T, Wang D, Shi X, Guo M, Wang C, Zhang X, Zheng G, Yu B and Wang H. Recombinant CC16 protein inhibits the production of pro-inflammatory cytokines via NF- $\kappa$ B and p38 MAPK pathways in LPS-activated RAW264.7 macrophages. *Acta Biochim Biophys Sin* 2017; 49(5): 435-43.
304. Way EE, Chen K, Kolls JK. Dysregulation in lung immunity - the protective and pathologic Th17 response in infection. *Eur J Immunol* 2013; 43: 3116-24.
305. Thunberg S, Akdis M, Akdis CA, Grönneberg R, Malmström V, Trollmo C, van Hage M, Gafvelin G. Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(8): 1127-36.
306. Lin YL, Shieh CC, Wang JY. The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy* 2008; 63(1): 67-74.
307. Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 2012; 18(5): 705-15.

308. Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell R. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013; 14: 536–42.
309. Sverrild A, Kiilerich P, Brejnrod A, Pedersen R, Porsbjerg C, Bergqvist A, Erjefält JS, Kristiansen K, Backer V. Eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients is associated with an altered airway microbiome. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(2): 407-17.
310. 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 pneumonia Pneumonia. *Allergy Asthma Immunol Res* 2014; 6(5): 428-433.
311. Howard T, Meyers D, Bleecker E. Mapping susceptibility genes for asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(2 pt 2): S477-81.
312. Movahedi M, Moin M, Gharagozlou M, Aghamohammadi A, Dianat S, Moradi B, Nicknam MH, Nikbin B, Amirzargar A. Association of HLA class II Alleles with Childhood Asthma and Total IgE Levels. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2008; 7(4): 215-20.
313. Ivković-Jureković I, Zunec R, Balog V, Grubić Z. The distribution of HLA alleles among children with atopic asthma in Croatia. *Coll Antropol* 2011; 35(4): 1243-9.
314. Mansur AH, Williams GA, Bishop DT, Markham AF, Lewis S, Britton J, Morrison JF. Evidence for a role of HLA DRB1 alleles in the control of IgE levels, strengthened by interacting TCR A/D marker alleles. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(10): 1371-8.
315. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Mastumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 18581–6.
316. Van Dyken SJ et al. Chitin activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory responses via innate lymphoid type 2 and gammadelta T cells. *Immunity* 2014; 40: 414–24.
317. Lara-Marquez ML, Yunis JJ, Layrisse Z, Ortega F, Carvallo-Gil E, Montagnani S, Makhatadze NJ, Pocino M, Granja C, Yunis E. Immunogenetics of atopic asthma: association of DRB1\*1101 DQA1\*0501 DQB1\*0301 haplotype with Dermatophagoides spp.-sensitive asthma in a sample of the Venezuelan population. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(1): 60-71.
318. Parapanissiou E, Papastavrou T, Deligiannidis A, Adam K, Kanakoudi F, Daniilidis M. HLA antigens in Greek children with allergic bronchial asthma. *Tissue Antigens* 2005; 65(5): 481-4.
319. Tokita E, Tanabe T, Asano K, Suzuki H and Rubin BK. Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. *Eur Respir J* 2014; 44: 1002–10.
320. Irvin C, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska MM, Martin RJ, Alam R. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 1175–86.
321. Dyer KD, Percopo CM, Fischer ER, Gabryszyewski SJ, Rosenberg HF. Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. *Blood* 2009; 114(13): 2649-56
322. Queiróz DA, Durigon EL, Botosso VF, Ejzemberg B, Vieira SE, Mineo JR, et al. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(10): 1183-93.
323. McKenzie JA, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol* 2007; 213(1): 221-8.
324. Zissler UM, Esser-von Bieren J, Jakwerth CA, Chaker AM, Schmidt-Weber CB. Current and future biomarkers in allergic asthma. *Allergy* 2016; 71: 475–94.
325. 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.
326. Li H, Romieu I, Wu H, Sienra-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, del Rio-Navarro BE, del Lara-Sanchez IC, Kistner EO, Gjessing HK and London SJ. Genetic polymorphisms in transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and childhood asthma and atopy. *Hum Genet* 2007; 121: 529–38.
327. Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol* 2007; 85(5): 348-56.
328. Duijts L, Granell R, Sterne JA, Henderson AJ. Childhood wheezing phenotypes influence asthma, lung function and exhaled nitric oxide fraction in adolescence. *Eur Respir J* 2016; 47: 510-19.
329. Sonnenschein-van der Voort AM, Jaddoe VW, Raat H, Moll HA, Hofman A, de Jongste JC. Fetal and Infant Growth and Asthma Symptoms in Preschool Children. The Generation R Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(7): 731-7.
330. 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): 0134089.

331. 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.
332. Ziegler SF. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(6): 795–9.
333. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Cousins D, Zhang G, Gu S, Gao Z, Shamji B, Edwards MJ, Lee TH, Corrigan CJ. 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.
334. Demehri S, Morimoto M, Holtzman MJ, Kopan R. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol* 2009; 7(5): 1000067.
335. Bergot AS, Monnet N, Le Tran S, Mittal D, Al-Kouba J, Steptoe RJ, Grimbaldston 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; 93(6): 540–7.
336. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, Waal-Malefyt R, Liu YJ. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol* 2004; 5: 426–34.
337. Roan F, 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; 91(6): 877–86.
338. Biton M, Levin A, Slyper M, Alkalay I, Horwitz E, Mor H, Kredon-Russo S, Avnit-Sagi T, Cojocaru G, Zreik F, Bentwich Z, Poy MN, Artis D, Walker MD, Hornstein E, Pikarsky E, Ben-Neriah Y. Epithelial microRNAs regulate gut mucosal immunity via epithelium-T cell crosstalk. *Nat Immunol* 2011; 12(3): 239–46.
339. Zhang J, Zhang H, Liu J, Tu X, Zang Y, Zhu J, Chen J, Dong L, Zhang J. miR-30 inhibits TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2012; 417: 1100–05.
340. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2008; 68: 7846–54.
341. Lee HC, Headley MB, Loo YM, Berlin A, Gale M Jr, Debley JS, Lukacs NW, Ziegler SF. 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: 1187–96.
342. 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; 39(1): 89–100.
343. Zhang Y-L, Luan B, Wang X-F, Qiao J-Y, Song L, Lei RR, Gao WX, Liu Y. Peripheral Blood MDSCs, IL-10 and IL-12 in Children with Asthma and Their Importance in Asthma Development. *PLoS ONE* 2013; 8(5): 63775.
344. Berni Canani R, Paparo L, Nocerino R, Cosenza L, Pezzella V, Di Costanzo M, Capasso M, Del Monaco V, D'Argenio V, Greco L, Salvatore F. Differences in DNA methylation profile of Th1 and Th2 cytokine genes are associated with tolerance acquisition in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Clin Epigenetics* 2015; 7: 38.
345. Klose CS and Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nature Immunology* 2016; 7(17): 765–74.
346. 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.
347. 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-7 $\alpha$  stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 2008; 112(8): 3283–92.
348. Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, Foschi D, Caprioli F, Viale G, Rescigno M. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 2009; 58(11): 1481–9.
349. 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.
350. Han D, Wang C, Lou W, Gu Y, Wang Y, Zhang L. Allergen-specific IL-10-secreting type I T regulatory cells, but not CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells, are decreased in peripheral blood of patients with persistent allergic rhinitis. *Clin Immunol* 2010; 136(2): 292–301.

351. Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *Journal of leukocyte biology* 2009; 85: 996–1004.
352. Du MR, Guo PF, Piao HL, Wang SC, Sun C, Jin LP, Tao Y, Li YH, Zhang D, Zhu R, Fu Q, Li DJ. 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: 1502–11.
353. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, Robinson D, Zhang G, Zhao J, Lee TH, Corrigan C. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 2005; 174: 8183–90.
354. Miljkovic D, Bassiouni A, Cooksley C, Ou J, Hauben E, Wormald PJ, Vreugde S. Association between group 2 innate lymphoid cells enrichment, nasal polyps and allergy in chronic rhinosinusitis. *Allergy* 2014; 69: 1154–61.
355. Kusel MM, de Klerk NH, Keadze T, Vohma V, Holt PG, Johnston SL, Sly PD. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1105–10.
356. Almqvist C, Worm M, Leynaert B. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: GA2LEN review. *Allergy* 2008; 63(1): 47–57.
357. Arathimos R, Granell R, Henderson J, Relton CL, Tilling K. Sex discordance in asthma and wheeze prevalence in two longitudinal cohorts. *PLoS ONE* 2017 ;12(4): 0176293.
358. Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGF $\beta$  response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003; 11: 915–26.
359. 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.
360. 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; 73(1): 59–65.
361. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *The European respiratory journal* 1998; 12(2): 315–35.
362. 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; 25(3): 167–74.
363. 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; 101(4): 696–705.
364. Grissell TV, Powell H, Shafren DR, Boyle MJ, Hensley MJ, Jones PD, Whitehead BF, Gibson PG. Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 433–39.
365. 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; 56(8): 1–54.
366. Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 949–59.
367. Jartti T, Burmeister KA, Seroogy CM, Jennens-Clough ML, Tisler CJ, Salazar LP, Dasilva DF, Evans MD, Vrtis RF, Wallace PK, Ruiz-Perez B, Gangnon RE, Lemanske RF Jr, Gern JE. Association between CD4(+)CD25(high) T cells and atopy in children. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 177–83.
368. Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)CD25(+)CD127(lo/–) regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1460–6.
369. Tiemessen MM, Hoffen EV, Knulst AC, Zee JVD, Knol EF, Taams LS. CD4 CD25 regulatory T cells are not functionally impaired in adult patients with IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 934–36.
370. Taylor AL, Hale J, Hales BJ, Dunstan JA, Thomas WR, Prescott SL. FOXP3 mRNA expression at 6 months of age is higher in infants who develop atopic dermatitis, but is not affected by giving probiotics from birth. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 10–9.
371. Chung HL, Kim WT, Kim JK, Choi EJ, Lee JH, Lee GH, Kim SG. Relationship between atopic status and nasal interleukin 10 and 11 levels in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94: 267–72.
372. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, and Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1288–96.
373. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy* 2009; 39(9): 1314–23.



374. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, Griese M, Krauss-Etschmann S. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1258–66.
375. Lim S, Crawley E, Woo P and Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 1998; 352: 113.
376. Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M and Willems F. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 1997; 27: 756 – 62.
377. Koya T, Matsuda H, Takeda K, Matsubara S, Miyahara N, Balhorn A, Dakhama A, and Gelfand EW. IL-10-treated dendritic cells decrease airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1241–50.
378. Mäkelä MJ, Kanehiro A, Dakhama A, Borish L, Joetham A, Tripp R, Anderson L, Gelfand EW. The failure of interleukin-10-deficient mice to develop airway hyperresponsiveness is overcome by respiratory syncytial virus infection in allergen-sensitized/challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 824–31.
379. Ding S, Wang X, Chen W, Fang Y, Liu B, Liu Y, Fei G, Wang L. Decreased Interleukin-10 Responses in Children with Severe Mycoplasma pneumoniae Pneumonia. *PLoS ONE* 2016; 11(1): e0146397.
380. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 961–8.
381. Woszczek G, Li-Yuan C, Nagineni S, and Shelhamer JH. IL-10 Inhibits Cysteinyl Leukotriene-Induced Activation of Human Monocytes and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 2008; 180: 7597–03.
382. Bustos ML, Mura M, Hwang D, Ludkovski O, Wong AP, Keating A and Waddell TK. Depletion of Bone Marrow CCSP-Expressing Cells Delays Airway Regeneration. *Mol Therapy* 2015; 23(3): 561–69.
383. Wood LJ, Sehmi R, Dorman S, Hamid Q, Tulic MK, Watson RM, Foley R, Wasi P, Denburg JA, Gauvreau G, O'Byrne PM. Allergen-induced increases in bone marrow T lymphocytes and interleukin-5 expression in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 883–9.
384. Maherali N, Hochedlinger K. TGFβ signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 2009; 19: 1718–23.
385. Hayashi T. Molecular Mechanisms of Metaplasia, Differentiation and Hyperplasia of Goblet Cellin Allergic Asthma *J Aller Ther* 2012; 3(3): 121.
386. 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; 42: 161–71.
387. 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.
388. Pooririsak P, Halkjaer LB, Thomsen SF, Stensballe LG, Kyvik KO, Skytthe A, Schioetz PO, Bisgaard H. Causal direction between respiratory syncytial virus bronchiolitis and asthma studied in monozygotic twins. *Chest* 2010; 138: 338–44.
389. Oddy WH, de Klerk NH, Sly PD, Holt PG. The effects of respiratory infections, atopy, and breastfeeding on childhood asthma. *Eur Respir J* 2002; 19: 899–905.
390. Jackson DJ, Evans MD, Gangnon RE, Tisler CJ, Pappas TE, Lee WM, Gern JE, Lemanske RF Jr. Evidence for a causal relationship between allergic sensitization and rhinovirus wheezing in early life. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 281–5.
391. Thomsen SF, van der Sluis S, Stensballe LG, Posthuma D, Skytthe A, Kyvik KO, Duffy DL, Backer V, Bisgaard H. Exploring the association between severe respiratory syncytial virus infection and asthma: a registry-based twin study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 1091–97.
392. Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Sarna S, Lindahl H, Kajosaari M, Saarinen KM, Saglani S, Jahnsen FL, Bush A, Haahtela T, Sarna S, Pelkonen AS, Makela MJ. Lung function, airway remodelling and inflammation in symptomatic infants: outcome at 3 years. *Thorax* 2011; 66(2): 157–62.
393. Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and Development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91: F132–F135.
394. Bisgaard H, Jensen SM, Bonnelykke K. Interaction between Asthma and Lung Function Growth in Early Life. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(11): 1183–9.
395. Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, Guerra S, Holberg CJ, Guilbert TW, Taussig LM, Wright AL, Martinez FD. 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.
396. 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.

397. Belgrave DC, Buchan I, Bishop C, Lowe L, Simpson A, Custovic A. Trajectories of lung function during childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 1101–9.
398. Covar RA, Spahn JD, Murphy JR, Szeffler SJ; Childhood Asthma Management Program Research Group. Progression of asthma measured by lung function in the childhood asthma management program. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 234–41.
399. Hagen G, Wolf M, Katyal SL, Singh G, Beato M, Suske G. Tissue-Specific Expression, Hormonal Regulation and 5'-Flanking Gene Region of the Rat Clara Cell 10 KDa Protein: Comparison to Rabbit Uteroglobin. *Nucleic Acids Res.* 1990;18: 2939–46.
400. Spadijer-Mirkovic C, Peric A, Belic B, Vojvodic D. Clara cell protein 16 and eosinophil cationic protein production in chronically inflamed sinonasal mucosa. *Int Forum Allergy Rhinol* 2016; 6: 529-36.
401. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Robichaud A, O'Connor B, Barnes PJ, and Chung KF. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon- release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 256–62.
402. Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, Machida K, Matsumoto K, Koto H, Ikegami T, Aizawa H, Hara N. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 50–6.
403. Kanoh S, Tanabe T and Rubin BK. IL-13-induced muc5ac production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1747–56.
404. Choy DF, Hart KM, Borthwick LA, Shikotra A, Nagarkar DR, Siddiqui S, TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Science translational medicine.* 2015; 7(301): 301.
405. Brown KR, Krouse RZ, Calatroni A, Visness CM, Sivaprasad U, Kerckmar CM.. Endotypes of difficult-to-control asthma in inner-city African American children. *PLoS ONE* 2017; 12(7): 0180778.
406. Abdel-Latif ME, Osborn DA. Intratracheal Clara cell secretory protein (CCSP) administration in preterm infants with or at risk of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; CD008308.
407. Busse WW, Morgan WJ, Gergen PJ, Mitchell HE, Gern JE, Liu AH, Gruchalla RS, Kattan M, Teach SJ, Pongracic JA, Chmiel JF, Steinbach SF, Calatroni A, Togias A, Thompson KM, Szeffler SJ, Sorkness CA. Randomized trial of omalizumab (anti-IgE) for asthma in inner-city children. *N Engl J Med* 2011; 364: 1005-15.
408. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356: 2144–48.
409. Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, Pizzichini E, Hargreave FE, O'Byrne PM. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med* 2009; 360: 985–93.
410. Yan-ming L, Lan-fang C, Chen L, Ya-qin L, Wei C, Wen-ming Z. The Effect of Specific Immunotherapy on Natural Killer T cells in Peripheral Blood of House Dust Mite-Sensitized Children with Asthma. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; 2012: 1-6.
411. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:43–52.
412. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2010; 105: 99-130.
413. Benjamin JT, Smith RJ, Halloran BA, Day TJ, Kelly DR, Prince LS. FGF-10 is decreased in bronchopulmonary dysplasia and suppressed by Toll-like receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(2): L550–558.
414. Klar J, Blomstrand P, Brunmark C, Badhai J, Hakansson HF, Brange CS, Bergendal B, Dahl N. Fibroblast growth factor 10 haploinsufficiency causes chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Genet* 2011; 48(10): 705–09.
415. Chang YS, Ahn SY, Yoo HS, Sung SI, Choi SJ, Oh WI, Park WS. Mesenchymal stem cells for broncho-pulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial. *J Pediatr* 2014; 164(5): 966–72.
416. Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Tao QM, Zhu JH, Chen JZ. 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.
417. Mete E, Erdemli K, Bavbek N, Erturac M. High levels of cord serum eosinophil cationic protein predict the risk of atopy. *J Asthma* 2004; 41: 679–82.

**8. ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА****A**

AP-1 (енг. *Activating protein-1*) - протеин активације 1

API (енг. *Asthma predictive index*) - индекс којим се предвиђа ризик од развоја астме

Arg(+)/Gly(0)/Asp(-)– трипептид аргинин-глицин-аспартична киселина, смањује миграцију прогенитора

**B**

B лимфоцити – B лимфоцити код човека сазревају у костној сржи, а код птица у *Bursa fabricii*

B – коефицијент вероватноће у логистичкој регресији

BADJ (енг. *Bronchoalveolar duct junction*)- регион између бронхиола и алвеоларних канала

BAFF (енг. *B-cell activating factor*)- фактор активације B-ћелија

BCL-2 (енг. *B-cell lymphoma 2*)– протеин који регулише апоптозу

BEAS-2B (енг. *Cell line human bronchial epithelial cells* )- култура хуманих ћелијаепитела бронхија

beta – стандардизовани коефицијент независне варијабле у линеарној регресији

BXP – бронхијална хиперреактивност

БАЛ – бронхоалвеоларни лават (испирак)

**C**

C5a- компонента комплемента 5a

CC16- протеин кога секретују Клара ћелије величине 16 килодалтона

CCSP (енг. *Club cell secretory protein*)- протеин кога секретују кубичне (Клара) ћелије

CD (енг. *Cluster od differentiation* )- маркер диференцијације ћелије

CI 95% - (енг. *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 аминокиселином

CXCL– хемокини са аминокиселином X између два цистеина на крају протеина са аминокиселином

CCR– рецептор за CC хемокине

CrG– региони ДНК који су стартне секвенце гена

CTL (енг. *cytotoxic T cell*)- цитотоксични Т лимфоцит

**D**

d – коефицијент јачине везе у т тестовима

df (енг. *Degrees of freedom* )– број степени слободе

DNA (енг. *Deoxyribonucleic acid*) - дезоксирибонуклеинска киселина (DNK)

DC (енг. *Dendritic cell*) - дендритична ћелија

**E**

ECP (енг. *Eosinophil cationic protein*) – еозинофилни катјонски протеин

EGF (енг. *Epidermal growth factor*)– епидермални фактор раста

ELISA (енг. *Enzyme linked immunosorbent assay*)- имунски тест обележен ензимом

EMTU (енг. *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

FcεR1– високо афинитетни рецептор за IgE

FGF10 (енг. *Fibroblast growth factor 10* )- фактор раста фибробласта 10

FGFR2b (енг. *Fibroblast growth factor receptor 2* )- рецептор за фибробластни фактор раста 2b

Fn (енг. *Fibronectin*) – фибронектин

FOXP3 (енг. *forkhead box P3*) – транскрипторни фактор регулаторних Т лимфоцита

**G**

GATA3 – транскрипторни фактор који регулише TH2 диференцијацију  
 GM-CSF – фактор стимулације гранулоцитно моноцитних колонија у току хематопоезе  
 GTP- гуанозин-три-фосфат

**H**

HВЕС (енг. *Human bronchial epithelial cells*) – култура хуманих ћелија бронхијалног епитела  
 HCl – хлоро-водонична киселина  
 HLA (енг. *Human Leukocyte Antigen*) – хумани леукоцитни антиген  
 HL-60 (енг. *Cell Line human promyelocytic leukemia*) – ћелијска култура хумане акутне мијелоидне левкемије у којој промијелобласти диференцирају у гранулоцитну и моноцитно-макрофагну линију  
 HIF 1 $\alpha$  (енг. *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) – фактор индукован хипоксијом  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник - пероксид  
 ХОБП – хронична опструктивна болест плућа  
 $\chi^2$ тест – статистички тест значајности разлике у учесталости независних у односу на зависну варијаблу

**I**

ID2 (енг. *Inhibitor of differentiation 2*) – инхибитор диференцијације 2  
 IFN $\gamma$  (енг. *Interferon gamma*) – интерферон гама  
 Ig (енг. *Immunoglobulin*) – имуноглобулин  
 IgE (енг. *Immunoglobulin class E*) – имуноглобулин класе E  
 IgA (енг. *Immunoglobulin class A*) – имуноглобулин класе A  
 IgG (енг. *Immunoglobulin class G*) – имуноглобулин класе G  
 IgM (енг. *Immunoglobulin class M*) – имуноглобулин класе M  
 IL (енг. *Interleukin*) – интерлеукин  
 IL-4<sup>High</sup>IL-5<sup>Low</sup> – велика експресија интерлеукина 4 и мала експресија интерлеукина 5  
 ILC (енг. *innate lymphoid cells, nuocytes*) – лимфоидне ћелије урођене имуности, нуоцити  
 iNKT (енг. *Invariante natural kiler T cell*) – ћелије са неваријабилним T ћелијским и НК рецепторима  
 iNOS (енг. *Inducible Nitric Oxid Synthetase*) – индуцибилне синтазе азот-оксида  
 IQR (енг. *Interquartal range*) – распон концентрација између средњих кварталних концентрација  
 IRF-3 (енг. *Interferon regulatory factor 3*) – регулаторни фактор интерферона 3  
 ИЗЈЗ - Институт за јавно здравље

**J**

JAK (енг. *Janus Kinase*) – интрацелуларни преносилац сигнала

**K**

K562 (енг. *Human erythroleukemic cells*) – култура хроничне мијелоидне левкемије у бластној кризи  
 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

**L**

LPS (енг. *Lipopolysaccharide*) – Липополисахарид  
 LTВ<sub>4</sub> – Леукотријен В 4  
 LTC<sub>4</sub> – Леукотријен С 4

**M**

mTORC (енг. *mammalian TOR complex*) – транскрипторни фактор TOR-комплекс код сиссара  
 MAP (енг. *Mitogen Activated Protein*) – протеин активиран митогеном  
 MBP (енг. *Major Basic Protein*) – главни базични протеин  
 Md – медијана  
 miRNA – микро рибонуклеинске киселине  
 ml – милилитар

$\mu\text{m}$  (енг. *Micrometer*) - микрометар

MMP - металопротеиназе

MUC5 (енг. *Mucin 5*) - маркер пехарстих секреторних, муцин продукујућих ћелија

mRNA (енг. *Messenger ribonucleic acid*) - информациона рибонуклеинска киселина

## N

n - број испитаника

$N^{th}$  - перцентилна вредност концентрација

NADP (енг. *Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat*) - никотин-амид аденин динуклеотид фосфат

NaOH - натријум- хидроксид

NEB - (енг. *Neuroendocrine body*) - неуроендокрино телашце

ng - нанограм

NF $\kappa$ B (енг. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) - нуклеарни фактор измене лаког ланца капа у активисаним В ћелијама

NLR (енг. *Nod Like Receptors*) - рецептори сличанолигомеризућем домену

NK (енг. *Natural killer cell*) - ћелије природне убице

NO (енг. *nitric oxid*) - азот оксид

Nod2 (енг. *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) - интрацелуларни рецептор за препознавање мурамил-ди-пептида из бактерија

NOTCH (енг. *Neurogenic locus notch homolog protein*) - трансмембрански протеин рецептор

NOX (*NADPH oxidase*) - оксидазе које учествују у стварању супероксида и водоник пероксида

NS - неструктурални протеини RSV

## O

OR (енг. *odds ratio*) - показатељ релативног ризика

OX40-OX40L - TNFR суперфамилија костимулатора од значаја у активацији Т лимфоцита

## P

p (енг. *Probability*) - вероватноћа грешке

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

PAF (енг. *Platelets Activation Factor*) - фактор активације тромбоцита

PAR-2 (енг. *Proteinase activated receptor 2*) - протеиназама активисани рецептор 2

PCA (енг. *Principal component analysis*) - анализа главних компонената (факторска анализа)

PDGF (енг. *Platelets derived growth factor*) - фактор раста ослобођен из тромбоцита

Pdgfra (енг. *platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$* ) - рецептор за PDGF од значаја у алвеолизацији плућа

Phadiator infant - Вишеструки тест за детекцију специфичних имуноглобулина класе Е

pg - пико-грам

PI3K - фосфатидил-инозитол 3 киназа

4PL (енг. *Softwarey evaluate*) - софтвер за квантификацију резултата на основу четири тачке

## Q

q - коефицијент јачине везе у тестовима корелације

## R

r - Spearman's rho - Коефицијент непараметријске корелације

$r^2$  - коефицијент удела независне варијабле у промени зависне варијабле

range - распон између најмање и највеће концентрације у испитиваној континуираној категорији

RAG1, RAG (енг. *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

RNA (енг. *Ribonucleic acid*) - рибонуклеинска киселина (RNK)

ROC curve - (енг. *Receiver operating characteristic curve*) - израчунава могућност дискриминације бинарно класификованог система

ROI (енг. *Reactive Oxygen Intermediates*) - реактивни слободни радикали кисеоника

ROR $\gamma$ T (енг. *Retinoid-Acid Receptor-related Orphan Receptor gamma t-*) - рецептор за ретиноичну киселину, сличан орфан рецептору гама т

RSV (енг. *Respiratory syncytial virus*) - респираторни вирус изазива стварање синцицијума у култури ћелија

RXR (енг. *retinoid X receptor*)– рецептор ретиноида X

### S

SE (енг. *Standard Error*)- стандардна грешка

Sig.- вероватноћа грешке вредности  $p$

SFTPC–сурфактант протеин Ц

SCGB (енг. *Secretoglobin*)– синоним за протеин кога секретују Клара ћелије

SMAD (енг. *products of the Drosophila gene 'mothers against decapentaplegic' (Mad) and the C. elegans gene*

*Sma*) – сигнални путеви и транскрипциони модулатори од значаја за TGF $\beta$  сигнализирање

SNAI1 (енг. *Snail Family Transcriptional Repressor 1*)- транскрипторни фактор од значаја у ЕМТ

Sox (енг. *Sex determining region Y box*)– полом детерминисан регион Y

STAT (енг. *Signal Transducer and Activator of Transcription protein family*)– преносилац сигнала и активатор протеина транскрипције

SZO (СЗО) - Светска здравствена организација

SAD (САД) - Сједињене Америчке Државе

### T

TAC1 (енг. *Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*) – молекул који се понаша као трансмембрански активатор, модулатор калцијума и реагује са лигандом за циклофилин

T-BET (енг. *T cell transcription factor*) - T ћелијски транскрипторни фактор

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

TGF $\beta$  (енг. *Transforming growth factor  $\beta$* ) - фактор трансформације раста бета

TH1 (енг. *T-helper 1*)- субпопулација ефекторских помоћничких Т лимфоцита типа 1

TH2 (енг. *T-helper 2*)- субпопулација ефекторских помоћничких Т лимфоцита типа 2

TH17 (енг. *T-helper 17*) - субпопулација ефекторских помоћничких Т лимфоцита типа 17

TRP63 маркер базалних ћелија респираторних епитела

TLR (енг. *Toll-like receptor*) - рецептор сличан протеину кодираном Toll- геном винске мушице

ТМБ – тетра-метил-бензидин

TNF- $\alpha$  (енг. *Tumor Necrosis Factor alpha*) - фактор некрозе тумора алфа

Treg (енг. *Regulatory T cell*) – регулаторни Т лимфоцити

TSLP (енг. *Thymic stromal lymphopoietin*) - лимфопоетин строме тимуса

TSLPR (енг. *Thymic stromal lymphopoietin receptor*) – рецептор за лимфопоетин строме тимуса

TWIST1 - транскрипторни фактор сличан протеину кодираном *Twist1* геном винске мушице

### U

U/ml (енг. *units/ml*)- јединице/ml

### V

VLA-4 (енг. *Very Late Antigen-4*) – антиген касне активације 4 - интегрин  $\alpha 4\beta 1$

### W

$w$  – коефицијент јачине везе у  $\chi^2$  тестовима

W – Wald – коефицијент доприноса независне варијабле промени зависне у логистичкој регресији

WNT– сигнални протеин ембриогенезе сличан протеину кога кодира Wnt ген винске мушица

### Z

ZEB (енг. *zinc-finger E-box-binding*)– транскрипторни фактор од значаја у ембриогенези и ЕМТ