

**UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET**



Maja R. Slavkovi Jovanovi

**EFEKAT PASIVNOG PUŠENJA NA
OKSIDATIVNI STRES KOD DECE
OBOLELE OD
BRONHIJALNE ASTME**

DOKTORSKA DISERTACIJA

NIŠ, 2014.

**UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET**

Maja R. Slavkovi Jovanovi

**EFEKAT PASIVNOG PUŠENJA NA
OKSIDATIVNI STRES KOD DECE
OBOLELE OD
BRONHIJALNE ASTME**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof.dr Ivana Stankovi

Niš, 2014.

**UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE**

MAJA R. SLAVKOVI JOVANOVI

**PASSIVE SMOKING EFFECT ON THE
OXIDATIVE STRESS AT CHILDREN
SUFFERING FROM BRONCHIAL
ASTHMA**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor: Prof.dr Ivana Stankovi

Niš, 2014.

I Autor	
Ime i prezime:	Maja Slavkovi Jovanovi
Datum i mesto ro enja:	30.05.1967. Niš
Sadašnje zaposlenje:	Klinika za De je interne bolesti, KC Niš
II Doktorska disertacija	
Naslov	Efekat pasivnog pušenja na oksidativni stres kod dece obolele od bronhijalne astme
Broj stranica:	103
Broj šema/slika:	10
Broj tabela:	22
Broj grafikona:	12
Broj bibliografskih podataka:	211
Ustanova i mesto gde je rad izra en:	Klinika za De je interne bolesti, KC Niš Centar za medicinsku biohemiju, KC Niš Medicinski fakultet, Niš
Nau na oblast:	Medicina Pneumoftizijologija
Mentor:	Prof. dr Ivana Stankovi
III Ocena i odbrana	
Datum prijave teme:	28.04.2010.
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije:	04-770/10, 08.12.2010.
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:	Doc. dr Predrag Mini , predsednik, MF Beograd Prof. dr Ivana Stankovi , mentor i lan, MF Niš Doc. dr Hristina Stamenkovi , lan MF Niš
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:	Prof.dr Tatjana Pej i , predsednik, MF Niš Prof. dr Ivana Stankovi , mentor i lan, MF Niš Prof. dr Predrag Mini , lan, MF Beograd Prof. dr Tatjana Jevtovi Stoimenov, lan, MF Niš Doc. dr Hristina Stamenkovi , lan, MF Niš
Datum odbrane doktorske disertacije:	

Nau ni doprinos disertacije:

1. **Slavkovic Jovanovic M** et al. Relationship between anti-oxidants status, passive smoking and inhaled glucocorticotherapy in children with persistent asthma. Allergy 2013; 68 (s97):368
2. **Slavkovic Jovanovic M** et al. Effect of passive smoking on exhaled nitric oxide fraction in asthmatic children. 5th congress of pediatric association of Macedonia with international participation. Abstract book 2011: 320.

Želim da se zahvalim svima koji su mi pomogli u realizaciji ovog rada a posebno:

Prof. dr Ivani Stankovi , svojoj velikoj prijateljici i mentorki na ukazanom poverenju, nesebičnoj stručnoj pomoći, podsticaju, uloženom trudu i ogromnoj podršci.

Prof. dr Predragu Miniću , na velikom ličnom profesionalnom primeru i nesebičnom darovanom znanju iz oblasti dečije pulmologije, ukazanom poverenju, interesovanju i stručnim savetima.

Prof. dr Tatjani Pejić , za razumevanje, saradnju i iskrenu želju da ova doktorska teza bude što uspešnija.

Prof. dr Tatjani Jevtović Stoimenov , na kolegijalnoj pomoći i oko izvođenja dela istraživanja ove doktorske disertacije.

Doc. dr Hristini Stamenković na profesionalnom podsticaju tokom izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Darinki Koracević , na nesebičnom prijateljskom i profesionalnom angažovanju tokom izrade doktorata.

Dr sc. med. Dr Vladanu Čosiću , na kolegijalnoj pomoći i oko izvođenja dela istraživanja ove doktorske disertacije.

Prof. dr Vidosavi Djordjević na ljubaznoj pomoći i oko izvođenja dela istraživanja.

Prof. dr Aleksandru Bojiću, dip. hem., na sugestijama sa aspekta hemije i tehnika kojim pomoći u ovom naučno istraživačkom izazovu.

Medicinskim sestrama **Violeti Miladinović, Snežani Golubović i Ireni Vasiljević** koje su učestvovala u istraživanju koje je iznedrilo ovaj doktorat.

Veliku zahvalnost dugujem i **malim pacijentima sa astmom** koji su me naučili mnogim znanjima koja se u knjigama teško nalaze i od kojih i dalje učim.

Svojoj porodici za bezgraničnu ljubavi, strpljenje i razumevanje.

*Ovaj rad posve ujem sinu **Lazaru**,
zbog koga vredi živeti i stvarati.*

EFEKAT PASIVNOG PUŠENJA NA OKSIDATIVNI STRES KOD DECE OBOLELE OD BRONHIJALNE ASTME

Sažetak

Pretpostavlja se da je visoka prevalencija astme posledica delovanja faktora u spoljašnjoj sredini, koja ustvari otkriva preegzistuju u osetljivost, aktivacijom lokalnih tkivno specifi nih operativnih gena sa pokretanjem inflamacije u disajnim putevima uz u eš e oksidativnog stresa. Na taj na in se objašnjava uticaj blisko povezanih spoljašnjih faktora poput izlaganja duvanskom dimu sa razvojem astme.

Cilj ove studije je bio da ispita efekat pasivnog pušenja na oksidativni stres u okviru hroni ne inflamacije disajnih puteva, kod lake i srednje teške perzistetne astme kod dece uzrasta 7-18 godina. Studija je uklju ila 110 ispitanika (80 dece sa astmom i 30 zdrave dece), gde su astmatari bili podeljeni u grupe u zavisnosti od izloženosti duvanskom dimu i statusa primenjene kortikoterapije mesec dana pre uklju ivanja u studiju. U uzorcima venske krvi kod svih ispitanika su odre ivani: prisustvo kotinina, nivo karboksihemoglobina i supstanci koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS), aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx), vrednost C reaktivnog proteina, broj leukocita i procenat eozinofila u perifernoj krvi. U izdahnutom vazduhu je odre ivan azot monoksid a nakon toga je u injeno funkcionalno ispitivanje plu a spirometrijom i alergološko testiranje na naj eš e inhalatorne alergene kožni prik testom.

Na osnovu dobijenih rezultata, zaklju eno je da kod ispitanika sa astmom postoji povišen oksidativni stres (TBARS) i eozinofilna inflamacija u plu ima (FeNO), a da pasivno pušenje i kortikostreoidna terapija nemaju efekat na nivo supstanci koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom ali imaju na antioksidativni kapacitet SOD i GPx. Astmatari pasivni puša i bez kortikosteroidne terapije, imaju zna ajnu nižu aktivnost SOD a astmatari pasivnih puša a na terapiji imaju zna ajno nižu aktivnost GPx.

Ovo istraživanje potvr uje zna ajno mesto redukcije pasivnog pušenja za razvoj i astme kod dece.

Ključne reči: oksidativni stres, pasivno pušenje, de ija astma

EFFECT OF PASSIVE SMOKING ON OXIDATIVE STRESS IN CHILDREN WITH ASTHMA

Abstract

It is assumed that high prevalence of asthma is consequently affected by the environmental factors, uncovering preexisting susceptibility, by the activation of local tissue specific operative genes with activation of inflammation in airways, involving the participation of oxidative stress. In that way can be explained the influence of close connected environmental factors, such as tobacco smoke exposure, which contributes to the development of asthma.

The aim of our study is to examine the effects of passive smoking on oxidative stress in chronic inflammation of air ways, in mild and moderate persistent asthma, children aged 7-18. The study includes 110 children (80 of these with asthma and 30 healthy children). The asthmatics were divided into groups depending on tobacco smoke exposure and also taking into account the status of applied corticosteroid therapy one month before including them into the study. In vein blood samples in all participants were determined the presence of cotinine, carboxyhaemoglobin levels, thiobarbuturate acid reactive substances, the activity of super oxide dismutase and glutathione peroxidase, levels of C reactive protein, the number of leucocytes and the percent of eosinophiles in peripheral blood. In exhaled air, nitric oxide level was determined, followed by the functional lung examination by spirometry, and the allergologic tests were done to most frequent inhalatory allergens using prick test.

According to obtained results, it is concluded that in asthmatics persists elevated oxidative stress and eosinophile inflammation in lungs, while passive smoking and corticosteroid therapy have no effects on the level of thiobarbuturate acid reactive substances, but they have effect on antioxidative capacity of examined enzymes. In passive smoking asthmatics without corticosteroid therapy, the super oxide dismutase activity was significantly lower. In passive smoking asthmatics with corticosteroid therapy, the glutathione peroxidase was a significantly lower activity .

This study confirms a significant role of passive smoking reduction as a prevention from the asthma development in children.

Key words: oxidative stress, passive smoking, children asthma.

SADRŽAJ

I PREGLED LITERATURE

1. DEFINICIJA ASTME

1.1. Prevalencija astme	1
1.2. Faktori rizika za razvoj i ekspresiju astme	1
1.3. Patogeneza astme	2
1.4. Heterogenost astme	4

2. OKSIDATIVNI STRES

2.1. Oksidativni stres i pluća	6
2.2. Reaktivne vrste i pluća	8
2.2.1. Reaktivne vrste kiseonika	8
2.2.2. Reaktivne vrste azota	10
2.3. Antioksidansi u plućima	11
2.3.1. Neenzimski antioksidanti	12
2.3.2. Enzimski antioksidanti	13
2.3.3. Drugi detoksikacioni putevi	14
2.4. Patofiziološki efekat oksidativnog stresa u plućima	14

3. ASTMA I OKSIDATIVNI STRES

3.1. Patofiziološki efekat oksidativnog stresa u astmi	17
3.2. Uticaj antiastmatskih lekova na oksidativni stres	22
3.2.1. Terapijska antioksidantna strategija za astmu	24

4. PASIVNO PUŠENJE, OKSIDATIVNI STRES, PLUĆA I ASTMA

4.1. Duvan i duvanski dim	25
4.2. Pasivno pušenje	27
4.3. Procena izloženosti duvanskom dimu	27
4.4. Duvanski dim i slobodni radikali	29
4.5. Pušenje i oksidativni stres pluća	30

II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

III NAUČNO-RADNE HIPOTEZE

32

33

IV MATERIJAL I METODI RADA	34
1. GRUPE ISPITANIKA	34
2. METODI ISPITIVANJA	35
2.1. Klinička obrada ispitanika	35
2.2. Statistička obrada podataka	38
V REZULTATI RADA	39
1. DEMOGRAFSKI PODACI ISPITANIKA I PROCENA PASIVNOG PUŠENJA	
2. PROCENA EFEKATA ASTME I PASIVNOG PUŠENJA NA OKSIDATIVNI STRES	41
3. PROCENA EFEKATA PASIVNOG PUŠENJA NA OKSIDATIVNI STRES	48
4. PROCENA POVEZANOSTI I UTICAJA DOPUNSKIH FAKTORA RIZIKA NA RAZVOJ ASTME ZAVISNO OD PASIVNOG PUŠENJA I TERAPIJSKOG REŽIMA	53
VI DISKUSIJA	59
1. PROCENA PASIVNOG PUŠENJA	59
2. ASTMA OKSIDATIVNI STRES I PASIVNO PUŠENJE	61
2.1. Astma i oksidativni stres	61
2.2. Astma oksidativni stres i pasivno pušenje	66
3. EFEKAT PASIVNOG PUŠENJA NA OKSIDATIVNI STRES KOD ASTME ZAVISNO OD TERAPIJSKOG REŽIMA	68
4. NIVO LOKALNE I SISTEMSKE INFLAMACIJE I PROCENA PLUČNE FUNKCIJE U ASTMI ZAVISNO OD PASIVNOG PUŠENJA I TERAPIJSKOG REŽIMA	71
5. POVEZANOST DOPUNSKIH FAKTORA RIZIKA SA ASTMOM I NJIHOV UTICAJ NA NJEN RAZVOJ	77
VII ZAKLJUČAK	84
VIII LITERATURA	87

PREGLED SKRA ENICA

AP-1	aktivator proteina 1
BAL	bronhoalveolarni lavat
BHR	bronhijalna hiperreaktivnost
β_2 AR	beta 2 adrenoreceptor
CBP	creab binding protein
CD14	cluster of differentiation 14
COX	ciklooksigenaza
CO	ugljen monoksid
COHb	karboksihemoglobin
CRP	C reaktivni protein
DNA	dezoksiribonukleinska kiselina
DNMT	DNA metil transferaze
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
EPO	peroksidaza eozinofila
EPGF	epidermalni rastu i faktor
ERK	akstracelularno signalno regulisana kinaza
FAD	flavin adenin dinukleotid
FEV1	forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi
FEF _{25,50,75%}	srednji ekspirijumski protoci pri volumenima od 25, 50 i 75%
FLG	filagrin
FMN	flavin mononukleotid
FVC	forsirani vitalni kapacitet
GATA	transkripcioni faktor
GINA	globalna inicijativa za astmu
GPx	glutation peoksidaza
GM-CSF	rastu i faktor stimulacije granulocita
GST	glutation S transferaza
GSH	redukovani glutacion
GSSH	oksidisani glutacion

GSNO	S-nitroglutation
GRX	glutaredoksin sistem
HAT	histon acetiltransferaza
HDAC	histon acetil deacetilaza
HMT	histon metiltrasferaza
HOBP	hroni na opstruktivna bolest
HO	hem oksigenaza
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HSP	heat shock protein
IgE	imunoglobulin E
IFN	interferon
IL	interleukin
ICAM	intercelularni adhezioni molekul
JNK	c-Jun N terminalna kinaza
MAPK	mitogen aktivišu e protein kinaze
MDA	malonilaldehid
MAPK	mitogen aktivišu a fosfokinaza
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina
MPO	mijeloperoksidaza
MDRP	multidrag rezistetni proteini
NADPH	nikotin amid-adenindinukleotid fosfat oksidaza
NF-kB	nuklearni faktor-kB
NO	azot monoksid
NOS	azot monoksid sintetaza
NOO ⁻	peroksinitrit radikal
Nrf2	transkripcioni faktor
NQO	kvinon oksidoreduktaza
OH ⁻	hidroksii radikal
ONOO ⁻	peroksinitrit radikal
O ₂ ⁻	superoksid radikal
PAF	platelet activating factors

PEF	vršni ekspiratoni protok
PM	poro ajna masa
PM10	estice aerozaga enja veli ine do 10 mikrometara
PRX	peroredoksini
RVA	reaktivne vrste azota
RVK	reaktivne vrste kiseonika
SOD	superoksid dizmutaza
SNO	S-nirosotiol
SPT	kožni (skin) prik test
STAT	signalno-transdukcionni-aktiviraju i transkripcioni faktor
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substace
TGF-	transforming growth factor
TH ₁	T helper 1
TH ₂	T helper 2
TLR	tool-like receptor
TNF-	tumor necrosis factor alfa
TRX	tioedoksin sistem

I PREGLED LITERATURE

1. DEFINICIJA ASTME

Astma je jedna od najčešćih hroničnih inflamatornih respiratornih bolesti detinjstva, sa još uvek potpuno nerazjašnjenom patogenezom. Iz tog razloga je veći deo njene definicije baziran na funkcionalnim posledicama inflamacije disajnih puteva i uključuje tri najbitnije karakteristike: hroničnu inflamaciju, hiperreaktivnost disajnih puteva na različite stimulanse i reverzibilnu bronhoostrukciju.

Najaktuelnija definicija astme (GINA 2011.) glasi:

«Astma je hronična inflamatorna bolest disajnih puteva u kojoj u estvuju mnoge epizode. Hronična inflamacija je povezana sa hiperreaktivnošću u disajnih puteva koja dovodi do rekurentnih epizoda vizinga, otežanog disanja, stezanja u grudima i kašlja i to posebno u i/ili u ranim jutarnjim satima. Ove epizode su povezane sa opsežnom ali varijabilnom opstrukcijom disajnih puteva, koja je reverzibilna spontano ili na terapiju» (1).

1.1. PREVALENCIJA ASTME

Globalna prevalencija astme se u različitim populacijama kreće od 1-18% (oko 5% za odrasle i 10% za decu). Međutim, prevalencija bolesti astme koja se bazira na hiperreaktivnosti disajnih puteva ili postojanje vizinga u poslednjih 12 meseci, iznosi čak 30% (1,2). U našoj zemlji je kod dece uestalost astme 6% (3).

1.2. FAKTORI RIZIKA ZA RAZVOJ I EKSPRESIJU ASTME

Faktori rizika za razvoj i ekspresiju astme pored toga što uzrokuju razvoj bolesti, oni mogu da pogoršavaju njen status ali i da istovremeno deluju na oba načina. Oni su grupisani zavisno od povezanosti sa individuum koja će razviti bolest ili uticajima iz spoljašnje sredine (tabela 1.) (1).

Tabela 1. Faktori koji uti u na razvoj i ekspresiju astme (GINA 2011.)

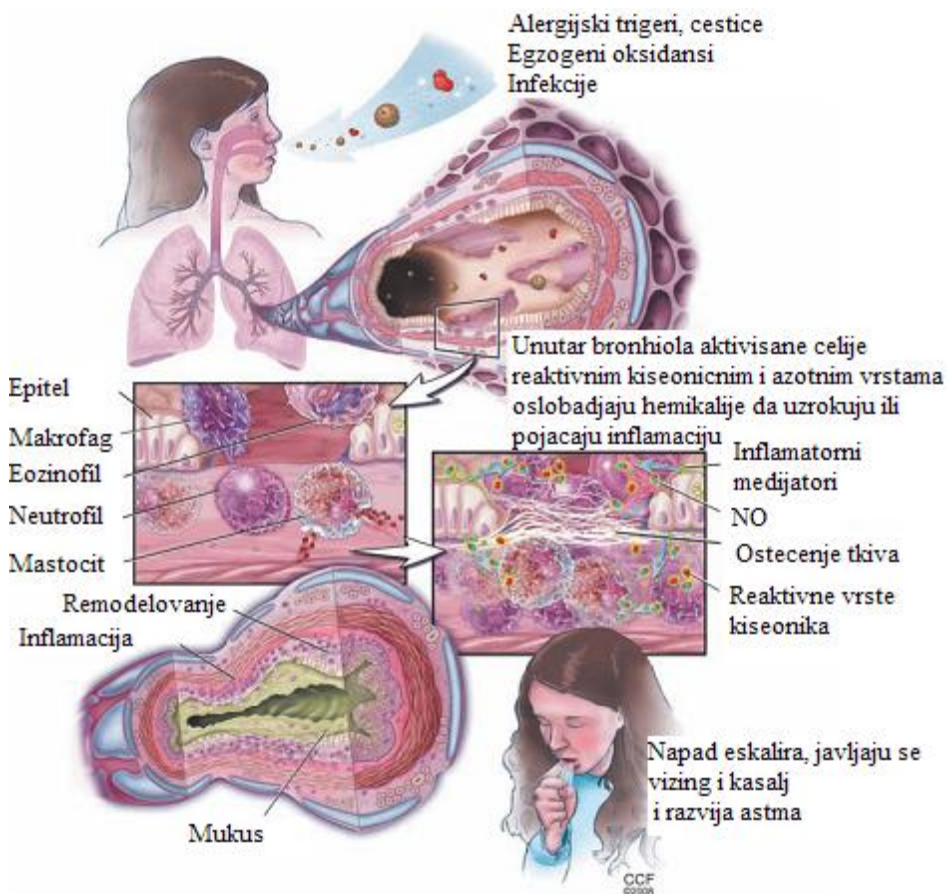
Faktori od strane doma ina <i>Genetika</i> Geni koji predisponiraju atopiju i hiperreaktivnost disajnih puteva <i>Gojaznost</i> <i>Pol</i>
Faktori spoljašnje sredine <i>Alergeni</i> Zatvorenog prostora: ku ne grinje, životinje (psi, ma ke, miševi), alergeni bubašvabe, gljivice, plesni, kvasnice Otvorenog prostora: poleni, gljivice, plesni, kvasnice <i>Infekcije (uglavnom virusne)</i> <i>Profesionalni senziteri</i> <i>Duvanski dim</i> Pasivno pušenje Aktivno pušenje <i>Aerozaga enje otvorenog/zatvorenog prostora</i> <i>Ishrana</i>

1.3. PATOGENEZA ASTME

Inflamacija disajnih puteva u astmi je multi elijski proces, koji uklju uje epitelne elije, eozinofile, neutrofile, CD4+ T limfocite i mast elije, sa eozinofilnom infiltracijom kao glavnom odlikom bolesti u alergijskoj astmi. Inflamacijski proces je uglavnom ograni en na sprovodne disajne puteve, ali u težoj bolesti zahvata i male disajne puteve i alveoluse (4). Od nedavno, mnoga istraživanja sve više podržavaju klju nu ulogu oksidativnog stresa u razvoju astme, uprkos neusaglašenog stava o tome da li je poja an oksidativni stres kod asmata ara uzrokovan inflamacijom ili je njen uzro ni faktor (slika 1.)(5, 6).

Intracelularne reaktivne vrste kiseonika (RVK) obezbe uju ne samo aktiviranje intracelularnih signala koji mogu imati štetan efekat, ve i esencijalnih signala za opstanak i adekvatno funkcionisanje elija. Nedavno je pokazano da u elijama postoji hijerarhijski odgovor na RVK tj. oksidativni stres. Niži stepen oksidativnog stresa,

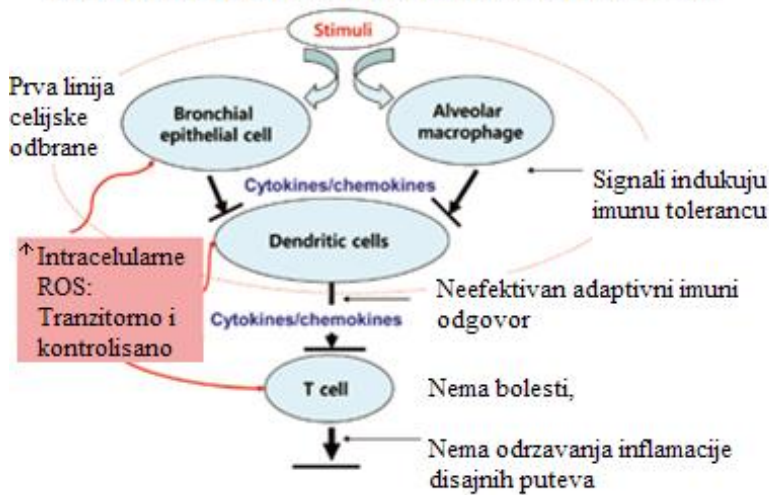
uzrokuje da adekvatan antioksidatni odbrambeni sistem preko aktivacije Nrf2 (ključni transkripcijski faktor) indukuje više od 200 intracelularnih antioksidatnih molekula koji mogu da anuliraju oksidativni stres. Kada je nivo oksidativnog stresa viši, aktivacijom AP-1 i NF- κ B, dolazi do sekrecije različitih tipova proinflamatornih citokina i hemokina, koji pokreću inflamacijski proces da ga savlada. Najveći nivo oksidativnog stresa, intenzivira inflamaciju i uzrokuje ozbiljne citotoksične efekte uključujući i apoptozu i nekrozu (5, 7).



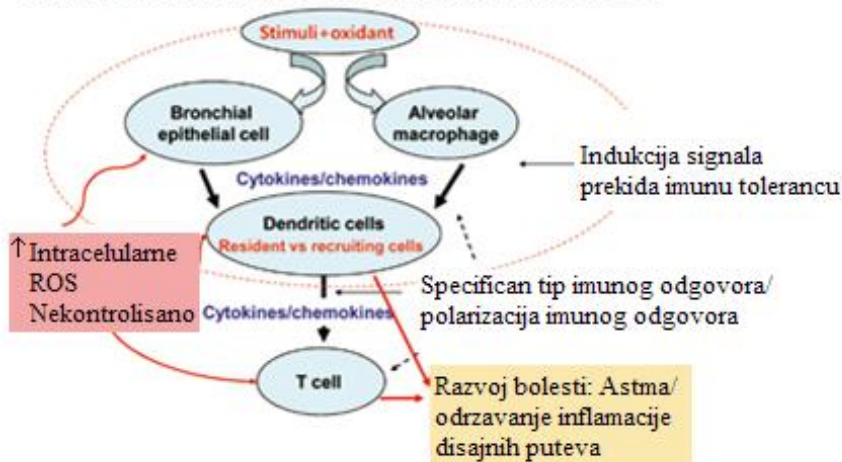
Slika 1. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi astme (Comhair SAA et al. 2010.)

U inicijalnoj fazi razvoja alergijske inflamacije disajnih puteva gubitak kontrole dejstva oksidansa može dovesti do inicijacije Th2 dominantnog imuniteta, umesto indukcije imunske tolerancije (8), i doprinese progresiji ili perpetuaciji već postojeće inflamacije (pojačanje hiperreaktivnosti disajnih puteva, stimulacija sekrecije mucina) indukcijom različitih proinflamatornih hemijskih medijatora (shema 1.) (5, 9, 10).

KONTROLISANI INTRACELULARNI OKSIDATIVNI STRES



GUBITAK KONTROLE INTRACELULARNE OKSIDACIJE



Shema 1. Poreme aj u kontroli oksidativnog stresa kod astme (CYS et al. 2010.)

1.4. HETEROGENOST ASTME

Astma je heterogena bolest sobzirom na postojanje više njenih fenotipova i endotipova. Fenotipovi se odlikuju razli itim klini kim, fiziološkim, morfološkim i biohemijskim karakteristikama i odgovorom na primenjenu terapiju (11, 12). Endotipovi predstavljaju razli ite entitete bolesti sa specifi nim mehanizmima u osnovi. Za sada je definisano nekoliko endotipova me u kojima su i oni kod kojih je u osnovi mehanizma oksidativni stres (tabela 2.) (12,13).

Tabela 2. Endotipovi astme (Lotval J et al. 2011.)

Fenotipovi astme i odgovaraju i endotipovi	Alergijska astma	Eozinofilna
		Th2 vo ena inflamacija
		Steroid senzitivna
		Senzitivna na allergen specifi nu imunoterapiju
		Anti IgE senzitivna
		Anti IL-5 senzitivna
		Anti IL-4/IL-13 senzitivna
	Intrinsik astma	Eozinofilna
		Neutrofilna
		Udružena sa autoantitelima/superantigenima
		Steroid senzitivna
		Steroid rezistetna
	Neutrofilna astma	Aktivacija uro enih imunih odgovora
		HDAC2 poreme eno regrutovanje
		Pove an neutrofilni opstanak
		Steroid rezistetna
		Senzitivna na antioksidanse/antibiotike
		Anti TNF- senzitivna
		Senzitivna na HDAC regulatore (teofilin)
	Aspirin intolerantna astma	Eozinofilna
		Izmenе u metabolizmu eikosanoida/senzitivnost na leukotrijene C4, D4 i E4
		Steroid senzitivna
		Senzitivna na antileukotrijene
	Astma sa obimnim remodelovanjem	Manja inflamacija/ekstezivno remodelovanje
		Abnormalna aktivacija epitelno mezenhimalne trofi ne jedinice
		Abnormalnosti glatkih miši a disajnih puteva
		Poreme eni reparacioni mehanizmi
		Steroid rezistetna
Terapijski senzitivna za glatke miši e disajnih puteva		
Trepijski senzitivna za metaloproteinaze		
Antiangiogeno senzitivna		

2. OKSIDATIVNI STRES

Aerobni uslovi života imaju mnoge prednosti, ali zbog sposobnosti kiseonika da se transformiše u toksi ne intermedijere (nespareni elektroni/slobodni radikali) koji reaguju sa skoro svim biomolekulima, zahtevaju postojanje adaptacione antioksidativne zaštite. Kada se ravnoteža izme u prooksidanata i antioksidanata naruši zbog pove anog

stvaranja slobodnih radikala, ili smanjene aktivnosti antioksidatne odbrane dolazi do oksidativnog stresa (14).

Slobodni radikali mogu biti atomi, molekuli ili joni sa jednim ili više nesparenih elektrona što ih čini vrlo reaktivnim. Mogu biti uzročnici bolesti, posledice pojedinih poremećaja ili samo delovi kompleksnog patogenetskog mehanizma. Razlikujemo više vrsta slobodnih radikala koji su svrstani u reaktivne vrste (RV) (tabela 3.) (15).

Tabela 3. Reaktivne vrste (Korovi V 2006.)

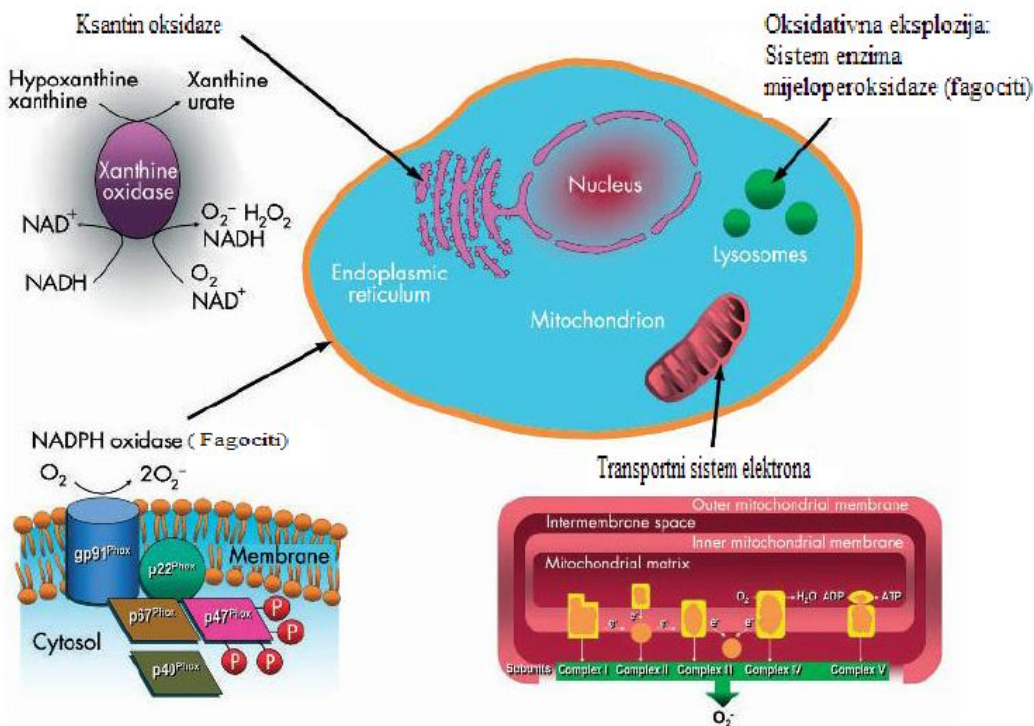
<u>Reaktivne vrste sa kiseonikom (RVK)</u>		
<i>Radikali</i>	<i>Neradikali</i>	
O ₂ [·] superoksid	H ₂ O ₂ vodonik peroksid	
HO [·] hidroksil	HOCl hipohlorna kiselina	
RO ₂ [·] peroksil	O ₃ ozon	
RO [·] alkosil	¹ O ₂ singletni kiseonik	
HO ₂ [·] hidroperoksil		
<u>Reaktivne vrste sa azotom (RVA)</u>		
<i>Radikali</i>	<i>Neradikali</i>	
NO [·] azot monoksid	NO ₂ ⁻ azot-dioksid anjon	NO ⁻ (singlet) nitroksil anjon
NO ₂ [·] azot-dioksid	N ₂ O ₃ azot-trioksid	NO ⁻ (triplet) nitroksil anjon
ONOO [·] peroksinitrit	NO ₂ ⁺ nitronijum jon	NO ⁺ nitrozil katjon
	ONOO ⁻ peroksinitrit anjon	NO ₂ Cl nitril hlorid
	ROONO alkil peroksinitrit	
<u>Reaktivne vrste sa ugljenikom</u>		<u>Reaktivne vrste sa sumporom</u>
R [·] (L [·]) alkil radikal	RS [·] tiil radikal	
RO [·] (LO [·]) alkosil radikal	GS [·] glutatiil radikal	
ROO [·] (LOO [·]) peroksil radikal	GSSG [·] diglutatiol anjon radikal	

2.1. OKSIDATIVNI STRES I PLU A

Redoks stanje zdravih pluća je primarno redukovano, zbog prisutnog obilja antioksidativnih sistema naročito u ekstracelularnom prostoru (16) i predstavlja važan faktor za normalan razvoj urođenog i stečenog imuniteta (17).

Pluća su posebno osetljiva za oštećenja posredovana RVK. Zbog velike površine mukoznih epitelnih ćelija koja je direktno izložena inhaliranom kiseoniku koji se brzo rastvara na njenoj površini, ali i zbog izloženosti mikroorganizmima, aerozaga i virusa ima i

terapijskim procedurama (kiseoni na, radijaciona, citostatska), u plu ima dolazi do dodatnog stvaranja velike koli ine reaktivnih vrsta da bi se u njima održala sterilnost i homeostaza. RVK se stvaraju endogeno od strane neutrofila, eozinofila, alveolarnih makrofaga, epitelnih i endotelnih elija (17). Primarni generišu i enzim za RVK je NADPH oksidaza (kompleks enzimskog sistema) a dominantne RVK koje proizvode inflamatorne elije i makrofagi su superoksid i vodonik peroksid (O_2^- i H_2O_2) (slika 2.) (18, 19, 20).



Slika 2. Generisanje RVK u eliji (Cramori G et al. 2004.)

Prekomerna produkcija RVK povezana je sa oksidacijom proteina, DNA i lipida koje dovodi do direktnog ošte enja elija ili indirektno preko stvaranja sekundarnih metaboli kih reaktivnih vrsta koje dodatno indukuju razli ite elije. Ogromna produkcija reaktivnih RVK inicira inflamatorni odgovor aktivacijom transkripcionih faktora kao što su NF- κ B i AP-1 i hromatinskim remodelovanjem (histon acetilacija/deacetilacija), koje dovode do genske ekspresije proinflamatornih medijatora, regrutovanja i aktivacije novih inflamatornih elija koje stvaraju RVK, inteziviranja inflamacije, ve eg ošte enja tkiva i drugih patoloških efekata. RVK u plu ima remodeluju ekstrascelularni matriks,

apoptozu, mitohondrijalnu respiraciju, elijsku proliferaciju, održavanje surfaktanta i antiproteaza, efikasan alveolarni odgovor i imunsku modulaciju (18, 19).

2.2. REAKTIVNE VRSTE I PLU A

2.2.1. REAKTIVNE VRSTE KISEONIKA

Superoksid (O_2^-)

Od svih RVK naj eš e se u organizmu pa i u plu ima produkuje O_2^- . On u fiziološkim procesima nastaje jednoelektronskom redukcijom kiseonika u mitohodrijama, peroksizomima ili endoplazmatskom retikulumu kao i jednoelektronskom oksidacijom H_2O_2 . Uglavnom se uklanja pomo u superoksid dizmutaze (SOD) (15).

Najvažnija fiziološka uloga O_2^- u organizmu je u procesu aktivne fagocitoze polimorfonuklearnih elija i makrofaga tokom koje dolazi do “respiratorne eksplozije”, pri emu se potrošnja kiseonika pove ava i do 20 puta a 90% kiseonika troši za stvaranje O_2^- . Nastali O_2^- dizmutacijom prelazi u H_2O_2 koji u prisustvu jona Cl^- i u eš e MPO prelazi u hipohlornu kiselinu koja je jak baktericidni agens. U tim uslovima nastaju i hidroksilni radikal, singlet kiseonik i azot oksid radikal. Hipohlorna kiselina ve pri koncentraciji od 10-20 μ M oksidiše SH grupe proteina elijske plazma membrane i remeti njenu funkciju, a ve e koncentracije dovode do lize elije. elije tkiva doma ina, mikroorganizmi i polimorfonukleari istovremeno podležu oksidativnom ataku (15, 21).

O_2^- je jako reaktivan, ima kratak životni vek i omogu ava stvaranje drugih toksi nih radikala, a pokazuje i visoku specifi nost za selektivna ciljna mesta. Mada je manje aktivan od HO^- , postencijalno je toksi niji jer može duže da difunduje. U estvuje i u reakcijama redukcionog razlaganja H_2O_2 i lipidnih hidroperoksida (ROOH) u reakcijama tipa Haber-Wess (shema 2.) (16):



Ovaj tip reakcija je zajedno sa reakcijama dizmutacije zna ajan za po etak lipidne peroksidacije. U stanju je i da redukuje jone metala Fe^{3+} i Cu^{2+} , ime katalizuje reakciju formiranja drugih slobodnih radikala (21).

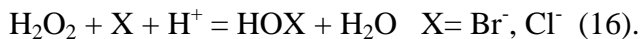
Vodonik peroksid (H₂O₂)

H₂O₂ je snažan oksidans koji u velikoj koncentraciji može ubiti bilo koju ćeliju, ali se u tako velikoj količini ne produkuje in vivo. U prisustvu slobodnog gvožđa njegova toksičnost H₂O₂ može da se poveća 10-1000 puta. U niskim koncentracijama stimuliše ćelijski rast i deobu, indukuje apoptozu u inficiranim ćelijama i njihovoj okolini i povećava aktivnost pentoznog puta. On prenosi i stimuliše signale kao ključni intracelularni sekundarni mesenđer i može da moduliše imunski odgovor. Fiziološka intracelularna koncentracija H₂O₂ u stabilnom stanju ćelije je 0.002-0.2μM a dostiže vrednost do 0.5-0.7μM tokom intracelularnog prenosa signala (10, 22).

U biološkim stanjima glavna reakcija O₂⁻ je da reaguje sa samim sobom i vodonikom kada se produkuje H₂O₂ i kiseonik - reakcija poznata kao superoksid dizmutacija (shema 2.) (16).

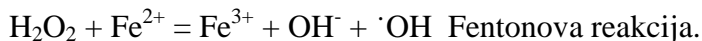
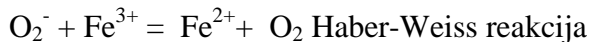


Ova dizmutacija može biti spontana ali i katalizovana enzimom SOD. H₂O₂ može takođe biti stvoren i od strane oksidaznih enzima poput ksantin oksidaze, monoamina, aminokiselinske oksidaze. Njegov oksidni potencijal može biti pojačan i od strane eozinofilne peroksidaze (EPO) i mijeloperoksidaze (MPO) u sledećoj reakciji:

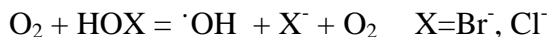


Hidroksil radikal (HO[•])

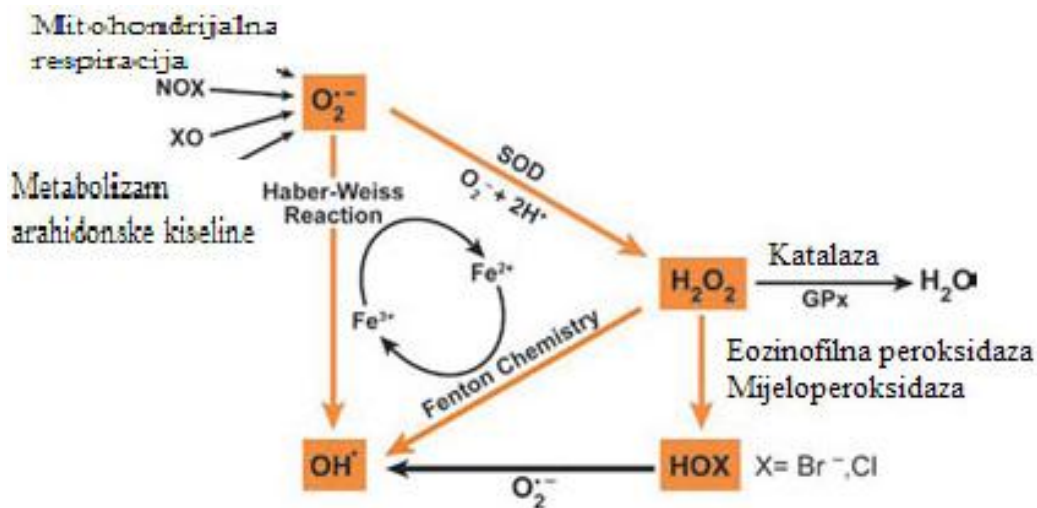
OH[•] je ekstremno reaktivan oksidni radikal koji reaguje sa većinom biomolekula. Reaktivniji je prema ćelijskim konstituentima nego O₂⁻ i H₂O₂. Većina in vivo oštećenja uzrokovanih O₂⁻ i H₂O₂ su odraz produkcije HO[•] u serijama reakcija katalizovanim tranzicionim metalnim jonima. Klasičan primer je Haber-Weiss reakcija, u kojoj se Fe³⁺ redukuje u Fe²⁺, što je praćeno Fentonovom reakcijom u kojoj Fe²⁺ katalizuje transformaciju H₂O₂ u HO[•].



HO[•] može nastati i u reakciji O₂⁻ sa H₂O₂ i produktima lipidne peroksidacije. Alternativni put za formiranje [•]OH in vivo uključuje MPO i EPO.



Nekontrolisana produkcija HO^\cdot karakteristika je brojnih elijskih poremećaja kao što su inflamacija, teratogeneza, elijska smrt i fagocitoza (shema 2.) (15, 16).



Shema 2. Osnovni mehanizmi redoksa (Combhair SAA et al. 2010.)

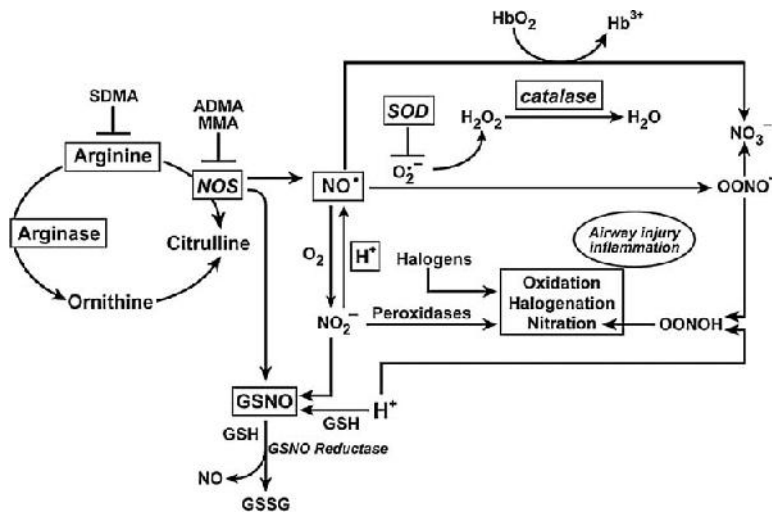
2.2.2. REAKTIVNE VRSTE AZOTA

U plu ima se sintetišu i reaktivne azotne vrste (RVA) po ev od azot monoksida (NO). NO nastaje pod dejstvom enzima azot monoksid sintetaze (NOS) koja konvertuje L-arginin do NO i L-citrulina, u reakciji koja zahteva dimerne enzime, kiseonik, NADPH i kofaktore: flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mononukleotid (FMN), tetrahidrobiopterin, kalmodulin i gvožđe i protoporfirin IX. NOS postoji u tri izoforme: inducibilna (iNOS, NOS_2), neuronalna (nNOS, NOS_1) i endotelna (eNOS NOS_3) (16).

Kako NO ima nespareni elektron to ga čini jako reaktivnim. Slobodno je difuzibilan, troši se na različitim mestima unutar elije, u ekstracelularnoj tečnosti i intravaskularnom kompartmentu. Hemijski je vrlo nestabilan, poluživot mu je veoma kratak (6-60 sekundi) a može se produžiti u prisustvu SOD i dvovalentnog bakra i gvožđea. Kada se metaboliše, nastaju druge RVA sa posebnim karakteristikama. Njegova autooksidacija sa O_2 dovodi do formiranja nitrita (NO_2^-) koji je substrat za hemiperoksidaze (EPO i MPO) i dovodi do formiranja azot dioksid radikala (NO_2^\cdot) ili sličnih molekula. Nitriti su prevashodno krajnji produkti NO ali oni mogu biti recikrirani putem brojnih mehanizama (kao što su ksantin oksidaze ili reakcije sa vodonikovim jonima), kada dolazi do ponovnog stvaranja bioaktivnog NO u krvi i tkivima. Na taj

na in oni služe kao skladišteni pul za produkciju NO u vreme kada NO sintetaze nisu sposobne za tu funkciju (16).

Brza reakcija NO sa drugim slobodnim radikalima (radikal-radikal reakcija) je još jedan od velikih izvora RVA. Kada NO reaguje sa O_2^- formira se peroksinitrit ($ONOO^-$) koji može da nitrira tirozin rezidue i menja nivoe ili funkcije enzima ali i strukturalnih i signalnih proteina. On se u kiseloj sredini može protonovati do peroksinitratne kiseline ($ONOOH$) koja se brzo prevodi u NO_3^- preko me uproizvoda OH^- i NO_2 sli njih vrsta. Tako e može da reaguje sa tiol reziduama i formira S-nitrosotiol (SNO) koji predstavlja jedinstveni signalni mehanizam indukovano azotnim stresom (shema 3.) (16, 23).



Shema 3. Metabolizam RVA i njihova uloga u astmi (Andreadis A et al. 2003.)

2.3. ANTIOKSIDANSI U PLU IMA

Antioksidansi su supstance koje prisutne u malim koncentracijama u pore enju sa supstratom koji se oksidiše, zna ajno odlažu ili spre avaju njegovu oksidaciju. Funkciju ostvaruju na tri nivoa: spre avaju stvaranja radikala, neutrališu i umanjuju efekte slobodnih radikala i repariraju oksidativno izmenjene molekule (24).

U plu ima postoje endogeni antioksidatni sistemi za borbu protiv slobodnih radikala koji mogu biti neenzimski i enzimski. Neenzimski sistem ine vitamin E, vitamin A i karotenoidi, vitamin C i glutation. Enzimski sistem ine superoksid

dizmutaza (SOD), glutation sistem sa glutation peroksidazom (GPx), katalaza, hem oksigenaza (HO), glutaredoksin, tioredoksin i peroksiredoksin. Ovi antioksidatni enzimi za funkcionisanje obično zahtevaju metalne kofaktore (16, 25).

2.3.1. NEENZIMSKI PLU NI ANTIOKSIDANSI

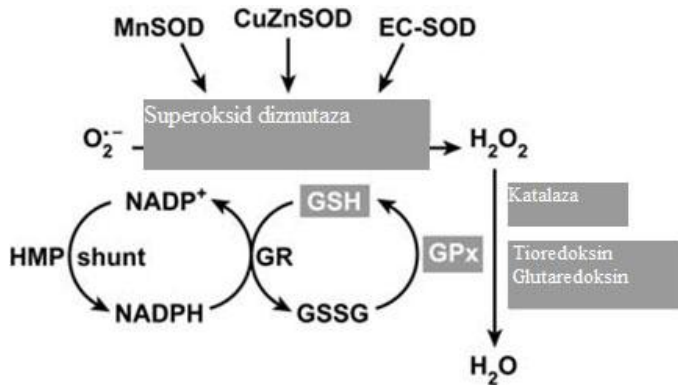
Neenzimski antioksidansi reaguju direktno sa oksidansima i klasifikuju se zavisno od toga da li su hidrofilni ili hidrofobni. Hidrofilni antioksidanti reaguju sa oksidantima u elijskom citozolu i/ili elijama krvi, dok hidrofobni štite elijsku membranu od lipidne peroksidacije. Vitamin C je hidrofilni vitamin koji može direktno da ukloni O_2^- i OH^- formiranjem semidehidroaskorbat slobodnog radikala, koji se dalje redukuje do GSH. Za Vitamin E je pokazano da štiti elijsku membranu od oksidacije reakcijom sa lipidnim radikalima kao što su lipidni peroksil radikali (LOO^\cdot) koji se produkuju tokom lipidne peroksidacije. Drugi neenzimski antioksidanti su karoten (uklanja O_2^- i peroksil radikale), mokra na kiselina (uklanja OH^- , O_2^- , peroksi radikal), bilirubin (sakuplja lipidnih peroksil radikala), taurin (neutrališe hipohlornu kiselinu), albumin (glutation prekursor i ista H_2O_2) i cistein i cistamin (donatori sulfuril grupa) (16).

Glutationski sistem

Glutationski sistem sadrži redukovani GSH, oksidisani GSSH, GPx i GR (glutation peroksidaza i glutation reduktaza). Smatra se velikim tiol-disulfidnim redoks puferom elije. GSH se stvara intracelularno iz aminokiselina cistein, glicin i glutamata i sposoban je da ukloni slobodne radikale ili direktno ili enzimski preko GPx. Široko je rasprostranjen u elijskim odeljcima kao što su citoplazma (1-10 mM) i mitohondrije (5-10 mM) kao i ekstracelularnim odeljcima kao što je površina epitelnih elija plu a (100 mM). Njegova centralna uloga je u redukciji H_2O_2 a ključni enzim odgovoran za ovu redukciju je GPx. Glutation disulfid koji se formira tokom dalje reakcije redukuje se nazad do GSH preko GR, intracelularnog enzima koji koristi NADPH. Kapacitet recikliranja GSH u plućima ovaj sistem ključni u antioksidatnom odbrambenom mehanizmu elija i prevenira depleciju elijskih tiola (shema 4.) (16).

Drugi važan put za dopunu GSH u plućima ima je njegova sinteza preko glutamat cistein ligaze i glutation sintetaze. Pokazano je da ograničavaju i nivo glutamat cistein

ligaze ima fundamentalnu ulogu u regulaciji plućne GSH homeostaze. Regulacija ovog enzima je još uvek kontradiktorna ali izgleda da može biti indukovana oksidativnim i citokinima i nishodno regulisana od strane TGF- β in vitro (26).



Shema 4. Glutationski sistem i oksidativni stres (Combhair SAA et al. 2010.)

2.3.2. ENZIMSKI PLUĆNI ANTIOKSIDANSI

Superoksid dizmutaze (SOD)

SOD su ubikvotarni enzimi koji su neophodni za zaštitu aerobnih ćelija protiv oksidativnog stresa i prisutni su u svakoj ćeliji humanog organizma. Oni katalizuju reakciju $O_2^{\cdot-}$ radikala do H_2O_2 (shema 4.). SOD enzimi sadrže metalni jonski kofaktor (bakar, cink, mangan, gvožđ e). Postoje tri izoforme ovog enzima: Bakar Cink SOD (CuZnSOD), Mangan-SOD (MnSOD) i Ekstracelularna SOD (ECSOD). Aktivna CuZnSOD je homodimeričan protein koji ubrzava spontanu dizmutaciju $O_2^{\cdot-}$ do 40 puta, preko ciklusa oksidacije-redukcije njegovog Cu^{2+} metala. Pored ovoga CuZnSOD ima i peroksidaznu aktivnost. U prisustvu velike količine H_2O_2 , dolazi do redukcije Cu^{2+} kada se stvaraju Cu^+-O ili $Cu^{2+} + ^-OH$, koji mogu da oksidišu histidin reziduu proteina ali i samog monomera SOD kada on sam sebe inaktivira. Pored toga CuZnSOD može i da nitrira tirozinske proteine, reakcijom koja uključuje peroksinitrit i da katalizuje stvaranje NO iz nitrosotiola. U plućima uvek su prisutne sve tri forme SOD (16).

Katalaza

Katalaza je metaloprotein oksidoreduktaza enzim i u principu uklanja H_2O_2 kada je prisutan u veoma velikoj koncentraciji. Kod produženog oksidativnog stresa i oksidacije NADPH koji je vezan za enzim, stabilizuje njegovu strukturu i štiti ga od

inaktivacije, pri čemu njena aktivnost tada opada. Oksidacija tirozinske rezidue u katalazi (posebno tirozina 358), povezana je sa gubitkom aktivnosti što se beleži u astmi (slika 6.) (16).

U disajnim putevima i alveolarnim makrofagima mogu se naći i tzv. neklasični antioksidativni enzimi kao što su: glutaredoksin, tioredoksin peroksidaza, tioredoksin-tioredoksin reduktaza sistem (shema 4.) (16, 27).

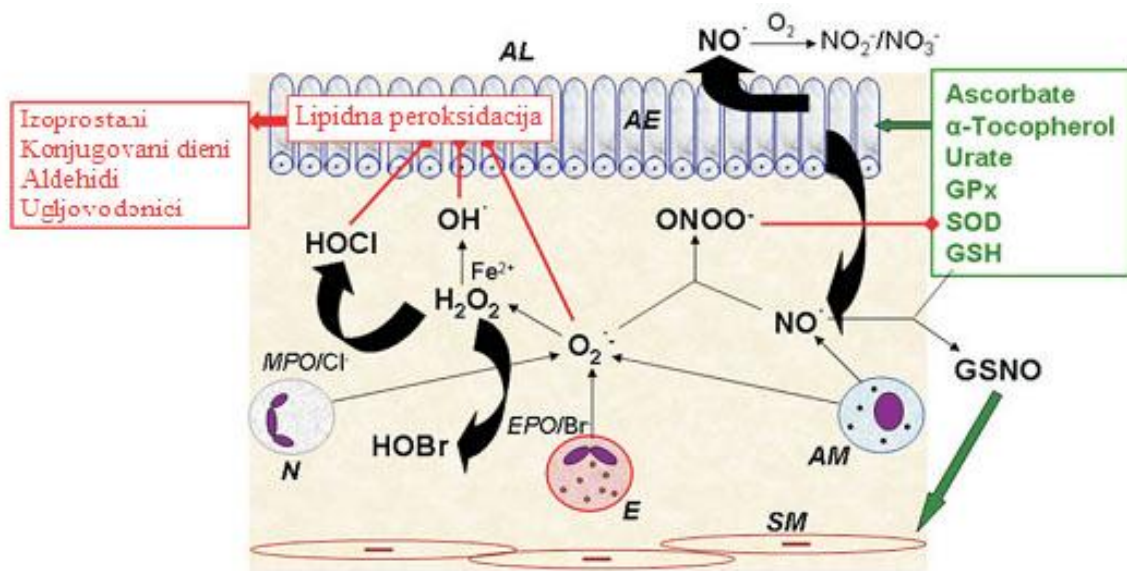
2.3.3. DRUGI DETOKSIKACIONI PUTEVI

Glutation S transferaze (GST) i multidrag rezistentni proteini (MRP) pripadaju grupi detoksikacionih enzima kojima je neophodna intracelularna GSH za katalitičku aktivnost. Pored ovih, i GG (GGT) koji je plazma membranski enzim a i eksprimovan u epitelnim ćelijama pluća može biti indukovana oksidativnim stresom a njegova deficijencija može dovesti do povećanog oksidativnog stresa i u normooksiji (26). Hemoksigenaze koje su članovi hit šok familije proteina, takođe imaju zaštitnu ulogu u inflamaciji i oksidativnom stresu. Ovi enzimi katalizuju degradaciju hem molekula u pigmente žute, Fe i CO uz biliverdin koji imaju antioksidativna svojstva (16, 26).

2.4. PATOFIZIOLOŠKI EFEKAT OKSIDATIVNOG STRESA U PLUĆIMA

Primarna posledica oksidativnog stresa je lipidna peroksidacija ili oksidativna degeneracija lipida, uzrokovana lančanom reakcijom slobodnih radikala i polinezasićenih masnih kiselina membrana ćelija (slika 3.) (28). Ova reakcija permanentno oštećuje ćelijske membrane i dovodi do smrti ćelija. Pored toga i krajnji produkti lipidne peroksidacije: malonilaldehid, 4-hidroksi 2-nonenal (4-HNE), F₂ izoprostan i akroleini mogu uzrokovati dalje patološke efekte. Pokazano je da su aldehidi koji se generišu endogeno tokom procesa lipidne peroksidacije uključeni u mnoge patofiziološke efekte povezane sa oksidativnim stresom u ćelijama i tkivima jer su u poređenju sa slobodnim radikalima generalno stabilniji a mogu da difunduju u i van ćelija, i atakuju ciljeve daleko od mesta svog porekla. Krajnji produkt 4-HNE takođe ima brojne štetne efekte. On je jako reaktivan, difuzibilan i indukuje/reguliše različite ćelijske događaje posebno proliferaciju, apoptozu i aktivaciju signalnih puteva. Ima jak afinitet za cistein, histidin i

lizin rezidue pa može direktno da formira proteinske dodatke i menja njihovu funkciju (19). In vitro, on uzrokuje lipidnu peroksidaciju i potencira oksidativni stres preko smanjenja intracelularnog glutationa i indukcijom produkcije peroksida. Ima ulogu i u remodelovanju disajnih puteva preko aktivacije receptora epidermalnog rastu eg faktora i indukuju produkciju fibronektina. Za izoprostane je kao krajnje elijske produkte neenzimske lipidne peroksidacije arahidonske kiseline, pokazano da su potentni glatko miši ni konstriktori i mitogeni i da modulišu elijske funkcije in vitro preko membranskih receptora za prostaglandine (18).



Slika 3. Patofiziološki efekat oksidativnog stresa (Misso N et al. 2005.).

Drugi mehanizmi gde oksidansi pokazuju patofiziološki efekat u plu ima su modifikacija proteina i DNA. RVK deluju direktno ili indirektno na proteine i uzrokuju oksidaciju polipeptida, peptidnih veza, protein-protein unakrsnih veza ili uzrokuju modifikaciju lanaca aminokiselina. Proteini sastavljeni od aminokiselina koje poseduju cistein i metionin rezidue, su posebno osetljivi na oksidanse. Primer je oksidativna modifikacija proteina surfaktanta koja povecava osetljivost plu a za lipidnu peroksidaciju, inflamaciju i dalje oksidativno oštećenje. Oksidativno oštećenje DNA može da menja gen, ekspresiju proteina i uzrokuje elijsku smrt. U epitelnim elijama plu a utvrđeno je da ozon oštećuje DNA a pretretman C i E vitaminima taj efekat redukuje (18).

Utvrđeno je da RVK imaju ulogu i u prenosu signala u ćelijama mada egzaktni intracelularni molekularni mehanizam u osnovi ovog procesa još uvek nije kompletno razjašnjen. Pretpostavlja se da je važan element u ovom procesu prenos signala na senzitivne molekularne ciljeve koji sadrže jako zatvorene cistenske rezidue, pa njihova oksidacija, S-nitrozacija i formiranje disulfidnih veza predstavljaju ključni događaji jer uzrokuju strukturne modifikacije koje dovode do izlaganja aktivnih mesta i aktivacije proteina (19).

U odgovoru na RVK i TNF- α dolazi do indukcije inflamatornih medijatora putem aktivacije redoks senzitivnih transkripcionih faktora AP-1 i NF- κ B. Dokumentovano je da i egzogeno i endogeno dobijene RVK mogu dovesti do aktivacije i fosforilacije familije MAPK, uključujući i ekstracelularnu signal regulisanu kinazu (ERK), c-Jun N-terminal kinazu (JNK), p38 kinazu i PI-3k/Akt, što sve dovodi do hromatinskog remodelovanja i ekspresije gena koji regulišu bateriju različitih proinflamatornih i antioksidativnih gena uključujući one u apoptozu, proliferaciju, transformaciju i diferencijaciju ćelija. Pored RVK i sam ćelijski redoks status (posebno tiol status), može direktno biti uključen u aktivaciju AP-1 i NF- κ B, prenosu signala i genskoj ekspresiji tokom patofizioloških procesa u ćeliji (19).

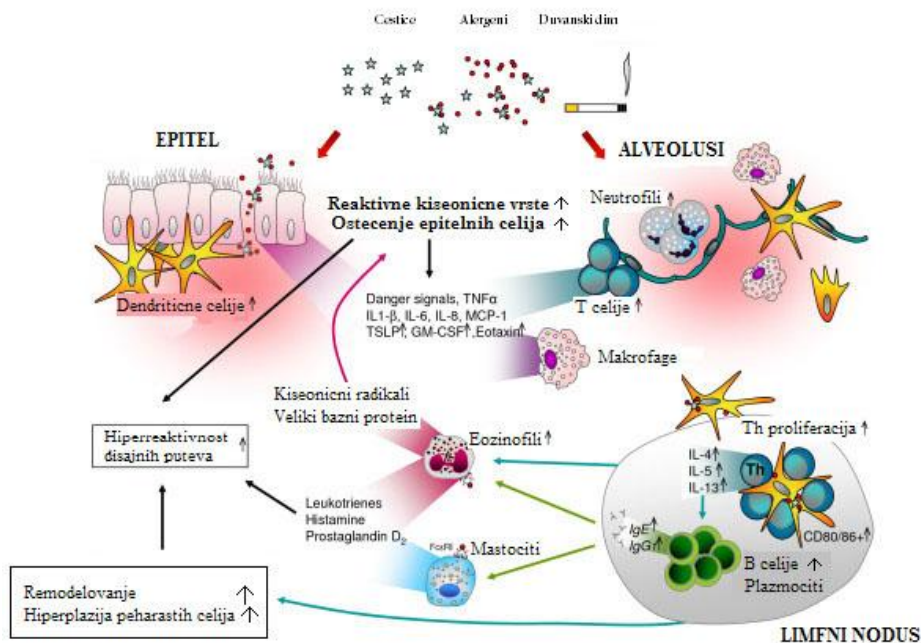
Medijumi u kojima se određuju biomarkeri za procenu oksidativnog stresa u bolestima pluća su puna krv, plazma, eritrociti, trombociti, bronhoalveolarni lavaz, indukovani sputum, izdahnuti vazduh, kondenzat izdahnutog vazduha (29). U pomenutim medijumima najčešće se određuju sledeći sistemski biomarkeri: izoprostan (8-izoprostano-PGF₂), malonilaldehid (MDA), supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS), GSH (totalni, redukovani, oksidisani), GPx (aktivnost), SOD (aktivnost), katalaza (aktivnost), oligoelementi (Se, Zn), vitamini (C, E, A). Nasuprot sistemskim parametrima oksidativnog stresa, velika uloga se pridaje i proceni lokalnih markera oksidativnog stresa u izdahnutom vazduhu, pa se vrši određivanje HO-1, ugljovodonika, CO, H₂O₂ i NO zavisnih produkata. U poslednje vreme se insistira i na određivanju transkripcionih faktora (JNK, ERK, MAPK kinaza, STAT, p53, AP-1, NF- κ B) s obzirom da oni kontrolišu produkciju slobodnih radikala i antioksidativnih enzima (27).

3. ASTMA I OKSIDATIVNI STRES

3.1. PATOFIZIOLOŠKI EFEKAT OKSIDATIVNOG STRESA U ASTMI

U ve ini patoloških stanja vezanih za disajne puteve konstatuje se pove an oksidativni stres. Astma se tako e karakteriše izraženim oksidativnim stresom, sobzirom da je izražena inflamacija u njenoj osnovi posledica pove ane produkcije elija sposobnih za generisanje enormne koli ine slobodnih radikala sa jedne strane a oksidisana biohemijska sredina sa druge strane sama za sebe povoljna za reakcije posredovane slobodnim radikalima (30, 31).

Kao i u mnogim drugim patološkim stanjima oksidativni stres je u astmi samopropagiraju i nespecifi an proces iniciran konkuretnim dejstvom brojnih inflamatornih puteva. Istraživanja su pokazala da su kompleksne intereakcije elija (epitelne elije, mastociti, eozinofili, limfociti, monociti, makrofagi i neutrofilni) i brojnih biološki aktivnih proinflamatornih medijatora (lipidni medijatori, hemokini, adhezioni molekuli i proteini eozinofilnih granula) odgovorni za patogenezu astme i da odre uju njenu težinu (16). Pored toga svi oni su i potencijalni stimulusi ili promoteri produkcije oksidanata (slika 4.)(30, 32).



Slika 4. Stimulusi i promoteri oksidanata u plu ima (Maes T et al. 2010.)

Epitel disajnih puteva, pored toga što ima bitnu ulogu fizičke barijere, ima i fundamentalnu ulogu u oksidativnom stresu i patogenezi astme (4). Direktni ili indirektni oksidativni stres epitela disajnih puteva i alveolarnih makrofaga, generiše citokine koji aktiviraju epitelne ćelije da indukuju proinflamatorne gene (TNF- α , IL-8, IL-1, iNOS, COX-2, ICAM-1, IL-6, MIP-1, GM-CSF), stres odgovorne gene (HSP-27, 70, 90, HO-1) i antioksidativne enzime (α -glutamilcistein sintetaze, MnSOD, tioredoksin). Geni za ove inflamatorne medijatore regulisani su redoks senzitivnim transkripcionim faktorima (NF- κ B i AP-1). Balans ekspresije pro i antiinflamatornih gena i nivoa antioksidativnih gena tokom inflamacije u odgovoru na RVK, ključan je za oštećenje ili zaštitu ćelije od štetnih efekata inflamacije (19). Pored toga, važna karakteristika epitela u astmi je i njegov slab kapacitet za odbranu od endogenog oksidativnog oštećenja, s obzirom da pokazuje redukciju aktivnosti dva antioksidativna enzima: superoksid dizmutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx). Zbog toga astmatičari pokazuju posebnu osetljivost na oksidativne aerozagaivače kao što su ozon, duvanski dim i čestice aerozagaenja (4).

Eozinofili su veoma važne ćelije u inflamaciji alergijske astme jer stvaraju razne citokine, hemokine, proteine (veliki bazni protein, eozinofilna peroksidaza i eozinofilni katjonski protein) i eikosanoide (prostaciklin i cistenil leukotrijeni), ali i zato što mogu uzrokovati oštećenje tkiva superoksidom (O_2^-) (4). Oksidativno oštećenje uzrokovano eozinofilima je osnova u astmi s obzirom da ove ćelije poseduju nekoliko puta veći kapacitet za stvaranje O_2^- i H_2O_2 u odnosu na neutrofile i sadrži EPO 2-4 puta više u odnosu na MPO u neutrofilima (33). Međutim, kod astmatičara u perifernoj krvi i neutrofile mogu da stvaraju veći količinu O_2^- i H_2O_2 koja koreliše sa stepenom BHR na inhalirani metaholin (34).

Pored toga, i monociti i makrofagi u mukoznoj disajnih puteva astmatičara imaju važnu ulogu u patogenezi astme s obzirom da su važan izvor cistenil leukotrijena, različitih lipozomalnih enzima i RVK (4). Dokazano je i da IgE može indukovati stvaranje O_2^- u monocitima preko niskoafinitetnog receptora. Ova IgE-posredovana O_2^- produkcija zabeležena je čak i kod zdravih, ali je veća kod bolesnih (35).

U astmi se oksidansi proizvode endogeno u većoj količini, međutim i egzogeni oksidansi (duvanski dim, ozon, čestice dizela) mogu direktno da uzrokuju egzacerbaciju i

tako dopunski utiče na patogenezu bolesti (25). Alergenom-indukovana egzacerbacija astme (spontano i eksperimentalno) dovodi do regrutovanja i aktiviranja eozinofila i neutrofila. Tada se aktivira NADPH oksidaza i brzo formiraju RVK kao što su O_2^- i njegov dismutacijski produkt H_2O_2 . Deset minuta od instilacije alergena u disajne puteve dolazi do dvostrukog porasta O_2^- (u opsegu od 4×10^6 nmol/ 5×10^5 elija/h) koje je najveće na mestu provokacije a perzistira i tokom kasnog astmatskog odgovora (36). Oksidativni stres tokom egzacerbacija je pojačan i sistemski (16, 33).

Mehanizmi, kojima RVK uzrokuju astmu su oksidacija ili nitracija lipida, proteina ili DNA koje dovode do disfunkcije ovih molekula (7, 25) i uzrokuju mnoge patofiziološke promene (povećanu vaskularnu permeabilnost, sintezu hemoatraktanata, stvaranje arahidonske kiseline, kontrakciju glatkih mišića i reaktivnost disajnih puteva) (18, 19).

Povećanu produkciju RVK astmatičari imaju u alveolarnim makrofagima, eozinofilima i neutrofilima uz povećanje oksidacionih produkata i lokalno u plućima i sistemski u serumu i urinu. Više vrednosti MDA i produkata tiobarbiturne kiseline tzv. reaktivni produkti (TBARS) detektovani su u urinu, plazmi, sputumu, izdahnutom vazduhu i BAL, i to u korelaciji sa težinom bolesti (37). U kondenzatu izdahnutog vazduha astmatičari izmereni su veći nivoi 8-izoprostana (glavna F2-izoprostana klase i produkta peroksidacije arahidonske kiseline), ugljovodonika (etan i pentan) i TBARS. Nivo 8-izoprostana povišen je u BAL i u plazmi astmatičara (19, 28). U perifernoj krvi, indukovanom sputumu i BAL u odnosu na zdrave pacijente su veći nivoi EPO i MPO (18). Da kod astmatičara postoji i oštećenje proteina oksidativnim stresom potvrđuje nalaz povišenih nivoa tirozina i hlorotirozina u BAL (16).

Pretpostavlja se da je produkcija NO u uslovima oksidativnog stresa u astmi rezultat stvaranja RVA koji modulišu i/ili pojačavaju inflamaciju disajnih puteva i može doprineti edemu ali i redukciji potencijala β_2 adrenergičkog signalnog puta (28). Nivo izdahnutog NO kod astmatičara raste posle alergenske provokacije u kasnom astmatskom odgovoru i ukazuje da sinteza NO odražava i/ili doprinosi inflamaciji disajnih puteva koja definiše astmu. Individui sa atopijskom astmom u prvom redu bez steroidne terapije imaju trostruko veći nivo NO u izdahnutom vazduhu i povećanje NOS₂mRNA i proteina u epitelnim ćelijama disajnih puteva. Međutim, porast nivoa NO nije samo posledica

povećane transkripcione aktivacije NOS₂ gena veći i povećanog katabolizma skladištenog pule SNO u plućima tokom izmena u redoks stanju (16).

Dinamika metabolizma NO u plućima astmatičara tokom eksperimentalno provociranog odgovora antigenom, se odvija u više postepenih reakcija i ukazuje na multifunkcionalnu ulogu NO u disajnim putevima. Unutar par minuta od alergenom indukovano astmatskog odgovora nivo NO₃⁻ značajno raste kod svih astmatičara, nivoi NO₂⁻ ili SNO se ne menjaju a nivo NO ima trend pada. Smanjenje NO i porast NO₃⁻ ukazuje da on reaguje sa O₂⁻ do stvaranja ONOO⁻ koji se dalje raspada do NO₃⁻ ili dovodi do formiranja nitrotirozina (16). ONOO⁻ indukuje na animalnom modelu hiperreaktivnost disajnih puteva, oštećuje respiratorni epitel, inhibira plućni surfaktant i indukuje lipidnu peroksidaciju membrane i tirozina i aktivnost MAPK (38). U kasnom astmatskom odgovoru odvija se i nitracija tiola (ONOOCO₂) i formiraju tiol radikali (16). U poređenju sa zdravima, dobro kontrolisani astmatičari sa blagom formom bolesti imaju u plazmi i kondenzatu izdahnutog vazduha povećane nivoe NO, NO₃⁻ i nitrotirozina a nedetektibilan SNO. Ukupne koncentracije NO₂⁻/NO₃⁻ su veće u klinički stabilnih astmatičara u odnosu na zdrave a vrednosti su im niže ukoliko su tretirani inhalatornim kortikosteroidom ali i dalje više nego kod zdravih (28, 38).

NO je i regulatorni medijator jer pokazuje efekat na hemokine, a ima uticaj i na Th1/ Th2 balans. U visokim koncentracijama može da ima supresivne efekte i na Th1 i Th2 odgovor. U manjim koncentracijama pokazuje supresivni efekat na Th1 ćelije objašnjava posrednim uticajem na IL-2 (na transkripcionom nivou) i na INF- γ (u manjoj meri) a sa druge strane i dejstvom na regulaciju IL-4 što vodi favorizovanju Th2 odgovora što se nalazi u bronhijalnoj astmi (39). Pored toga može da interferira i sa pojedinim adhezionim molekulima i na taj način smanji akumulaciju Th1 ćelija na mestu inflamacije (40).

U teškoj astmi produkcija RVK u neutrofilima koreliše sa težinom reaktivnosti disajnih puteva (16). Nedavne studije koje su ispitivale hromatinsko remodelovanje povezano sa težom formom astme, u inflamiranim disajnim putevima dokumentovale su učestalo ključnih mehanizama oksidativnog stresa. Povećana ekspresija mnogih inflamatornih gena uključeni u remodelovanje hromatinske strukture i razvoja teže

forme bolesti, ide preko pojačane aktivnosti HAT i smanjene aktivnosti HDAC a pod uticajem H_2O_2 i peroksinitrita (25).

RVK i RVA reaguju sa proteinima tako što formiraju aminokiselinske završetke kao što su bromotirozin, nitrotirozin ili hlorotirozin, a sa DNA formiraju bazno parne nastavke kao što je 8-oxo-2-dehidroguanozin. Povišen nivo ovih molekula tako ukazuje na oksidativni stres. Aktivacija eozinofilna in vivo može dovesti do oksidativnog oštećenja proteina preko bromizacije tirozinskih nastavaka formiranjem 3-bromotirozina, dok neutrofili i monociti hlorinacijom proizvode 3-hlorotirozin (20). Povećan nivo 3-bromotirozina nađen je kod astmatičara u BAL i u urinu kod egzacerbacija, u poređenju sa zdravima. Kod blage i teške astme njegov nivo je povišen i u izdahnutom vazduhu. Njegova vrednost je stotruko veća kod hospitalizovanih astmatičara u intenzivnoj nezi sa respiratornom insuficijencijom (16, 19).

Oksidativni stres se kod astmatičara javlja kao i posledica izmenjene ekspresije i aktivnosti antioksidativnog sistema i lokalno u plućima i sistemski (6).

Aktivnost SOD značajno je niža na površini i u epitelnim ćelijama kod astmatičara kao posledica inflamacije disajnih puteva, a normalizuje se nakon primene kortikosteroida (41). U akutnom astmatskom napadu kod atopijske astme unutar jednog minuta dolazi do rapidnog gubitka aktivnosti SOD koja je povezana sa dvostrukim stvaranjem O_2^- i ukazuje da postoji korelacija između stepena reaktivnosti disajnih puteva i aktivnosti SOD (42). Pored toga, i sam oksidativni stres može uticati na aktivnost SOD. CuZnSOD može biti inaktivisana tj. oksidativno modifikovana od strane RVK i RVA, delovanjem na histidinske rezidue enzima i formiranjem histidinskih radikala što može doprineti većem oksidativnom stresu i težoj astmi. Utvrđeno je da do 10% MnSOD dobijene iz epitelnih ćelija astmatičara poseduje najmanje jednu oksidativnu modifikaciju koje mogu doprineti remodelovanju disajnih puteva, apoptozi epitelnih ćelija sa ogoljavanjem disajne površine i predispozicije za veću hiperaktivnost disajnih puteva (42). I neke genetske varijabilnosti SOD mogu uticati na njenu aktivnost, pa tako i na razvoj astme. Jedan nukleotidni polimorfizam Ala16Val može da menja sekundarnu strukturu i aktivnost SOD (43, 44).

Aktivnost katalaze je i do 50% niža u BAL astmatičara u odnosu na zdrave (45). U eritrocitima kod dece sa astmom je pokazana niža aktivnost katalaze u odnosu na

zdrave (46). I za ovaj enzim su na ene este oksidativne modifikacije u plu ima astmati ara (hlorinacija tirozina, nitracija tirozina i oksidacija cisteina 377 u cisteinskoj kiselini) koje mogu doprinosti gubitku aktivnosti ovog enzima (45).

Izmene u nivou i odnosu oksidisanog i redukovanog glutaciona zabeležene su u plu ima kod stabilne astme ali i tokom egzacerbacije bolesti. Par minuta nakon alergene provokacije na površini epitelnih elija pada nivo GSH a raste nivo GSSG i dolazi do gubitka redukcionog potencijala u plu ima. Tako se menja intracelularri redoks balans koji doprinosi apoptozi epitelnih elija. Ova GSH deplecija in vivo i/ili in vitro dovodi i do inhibicije produkcije Th1 citokina i/ili favorizuje Th2 odgovor (8). Nivo glutaciona u izdanutom vazduhu kod dece sa astmom i tokom akutne egzacerbacije, je niži nego kod zdravih i raste nakon kortiko terapije (47). Tako e ima nalaza da su kod astmati ara ukupan glutacion u krvi i oksidisani glutacion u eritrocitima ve ih vrednosti nego kod zdravih (28).

U plu ima astmati ara jedna studija nalazi da je (epitelna GPx) eGPx prisutna u ve oj koli ini, nasuprot SOD i katalazi, kao posledica indukcije eGPx mRNA i proteinske ekspresije od strane bronhijalnih epitelnih elija u odgovoru na pove ane intracelurane ili ekstracelularne RVK (48). Me utim, ima i suprotnih nalaza (49). U trombocitima astmati ara je inicijalno zabeležena deficijencija GPx (50). Kasnije je ovaj nalaz potvr en u eritrocitima i leukocitima kod pacijenata sa atopijskom i neatopijskom astmom. Neki autori redukciju ove aktivnosti dovode u mogu u vezu sa smanjenim nivoom selena u organizmu koji je njegova integralna komponenta (28, 51).

Spekuliše se da deficijencija antioksidanasa u formi vitamina C, E i A može biti u vezi sa astmom (28). I za ne dijetalne antioksidanse (poput mokra ne kiseline, bilirubina i albumina) je pokazano da su sniženih vrednosti u plazmi i da mogu biti prediktori teške astme (52), mada po ovom pitanju ima opre nih mišljenja (53).

3. 2. UTICAJ ANTIASMTATSKIH LEKOVA NA OKSIDATIVNI STRES

Za trenutno naj eš e koriš ene lekove u terapiji astme (bronhodilatatori, kortikosteroidi) koji su generalno efikasni, još uvek nije precizirano kakav efekat imaju na oksidativni stres u hroni noj inflamaciji ove bolesti (20).

Bronhodilatatori

In vitro, kratko i dugodeluju i inhalatorni β_2 agonisti imaju antioksidativni efekat na neutrofile i eozinofile. Ipak, in vivo za postizanje ovakvog efekta pokazano je da su potrebne znatno veće doze od terapijskih (54). Za Aminofilin je na animalnom modelu pokazano da redukuje stvaranje oksidantima kod endotoksinom indukovane bronhijalne hiperreaktivnosti. Tako je, utvrđeno da doznano zavisno inhibira oksidativnu pokrenutu produkciju trombocitno aktivirajućeg faktora (PAF) i IL-5, ali samo u visokim koncentracijama (55). Pored toga, teofilin pojačava aktivnost HDAC2 u uslovima oksidativnog stresa i na taj način vraća kortikosteroidnu senzitivnost, čime se objašnjava zašto je dodavanje male doze teofilina efikasnije nego povećanje doze inhalatornih kortikosteroida kod pacijenata sa slabo kontrolisanom astmom tj. zašto redukuje pogoršanje kontrole bolesti kod pacijenata sa teškom astmom (56).

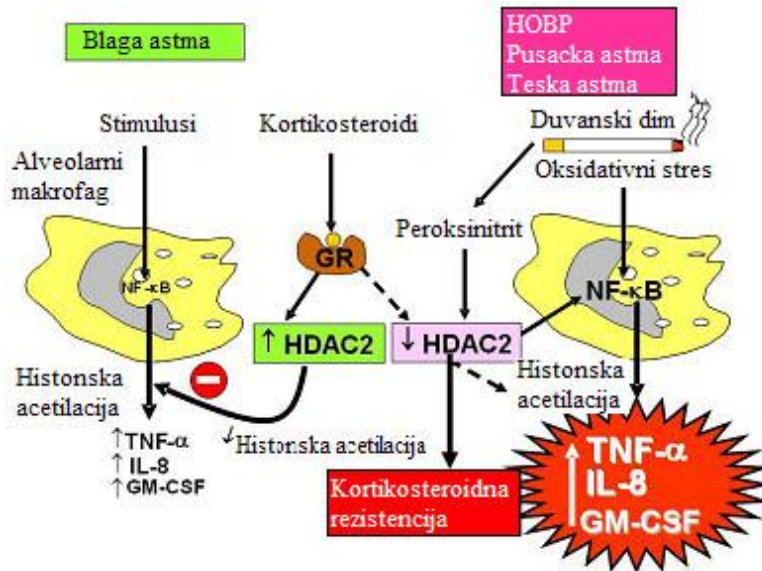
Kortikosteroidi

Još uvek nije potpuno razjašnjeno da li glukokortikosteroidni tretman u astmi svoju efikasnost ostvaruje i preko redukcije oksidativnog stresa. Iako glukokortikoidi ne inhibiraju in vitro produkciju oksidantata u eozinofilima, pokazano je međutim da inhalacioni glikokortikoidi smanjuju nivo H_2O_2 (57) i koncentraciju ukupnih nitrata i nitrita u kondenzatu izdahnutog vazduha i sputumu pacijenata sa stabilnom astmom (58). Pored toga, zabeleženo je da terapija inhalatornim kortikosteroidima može normalizovati redukovanu aktivnost CuZnSOD u bronhijalnom epitelu (41).

Sa druge strane, produžena terapija visokim dozama glikokortikoida je uopšte esto ograničena pa i u astmi, ne samo zbog pojave neželjenih reakcija povezanih sa prisustvom njihovog viška u organizmu već i zbog izazivanja oksidativnog stresa jer je utvrđeno da mogu direktno da utiču na funkciju mitohondrija i produkciju RVK. Za Deksametazon je pokazano da povećava gensku ekspresiju i aktivnost ksantin-oksidadaze što može da bude jedan od mehanizama indukcije produkcije RVK. Indirektna potvrda za ovu spekulaciju je i nalaz u jednoj studiji da antagonist glukokortikoidnog receptora RU 486 može kompletno da blokira hiperprodukciju RVK indukovanu glikokortikoidima (59).

U teškoj astmi i astmi kod pušača sam oksidativni stres predstavlja vodeću snagu Th2 zavisnog imunskog inflamatornog odgovora koji redukuje aktivnost HDAC koji

smanjuju kortikosenzitivnost i efikasnost terapije (slika 5.)(60). Ovakvu redukovanu funkciju kortikosteroida u odgovoru na duvanski dim ili intezivan oksidativni stres, i u humanim i animalnim elijama smanjenjem oksidativnog stresa mogu da obnove N-acetil cistein i mimetik SOD (AEOL 10150) (61).



Slika 5. Razvoj kortkorezistencije kod astmatičara koji puše (Barnes P 2010.)

3.2.1. TERAPIJSKA ANTIOKSIDATNA STRATEGIJA ZA ASTMU

Sobzirom da oksidativni stres ima jasnu ulogu u patogenezi astme, pojačana antioksidatna odbrana trebalo bi da ima korisne efekte na ovu bolest. Dosadašnji rezultati nisu ohrabrujući, jer nema dokaza da su izabrane doze i kombinacije raspoloživih antioksidanasa efikasne in vivo (30).

Svi modeli sintetičkih mimetika enzimskih antioksidanasa pokazali su veoma dobre rezultate u zaštiti pluća (16) a redukuju i negativne efekte izlaganja duvanskom dimu (26). Na nekoliko animalnih modela, egzogena CuZnSOD ili rekombinantna MnSOD kombinovane sa katalazom, pokazale su dobre rezultate ali na žalost i visoku imunogenost (62). Za mimetik glutation peroksidaze (Ebselen), koji je netoksičan seleno-organski lek pokazano je da efikasno redukuje H_2O_2 i inhibira inflamaciju disajnih puteva, smanjenjem regrutovanja neutrofila i ekspresije hemokina na različitim animalnim modelima inflamacije (63).

Ukoliko se CoQ daje astmatima koji su na kortikoterapiji, on dovodi do poboljšanja kontrole bolesti uz redukciju doze kortikosteroida. Utvrđeno je da on svoj efekat ostvaruje povećanjem aktivnosti SOD (64).

Za Resveratrol koji je nađen u semenkama grožđa, pokazano je da ima antioksidativna, antiinflamatorna i antikancerogena dejstva. On efikasno inhibira oksidativno oštećenje i uklanja slobodne radikale (lipid hidroperoksid, hidroksil i superoksid). Pored toga može da indukuje sintezu GSH i depleciju GSSH u epitelnim ćelijama pluća posebno ako je posredovana duvanskim dimom (65).

Sistematski pregled literature nije našao dovoljno dokaza da vitamin C ima mesto u lečenju astme (66). Zaključeno je i da unos vitamina E nema efekat na kontrolu astme i ukazano da samo kombinacija antioksidanasa u hrani i voću može biti od koristi (67). Spekuliše se da bi suplementacija selena kod astmatičara mogla da poboljša aktivnost GPx u trombocitima i skor težine bolesti jer ima i opretniji mišljenja (68). Treba imati u vidu da i genotip individue može uticati na efikasnost suplementacije antioksidansima u astmi, a primer za to su varijacije u GST superantigen familiji (69).

Bolje razumevanje molekularnih mehanizama antioksidanasa u oksidativnom stresu koji posreduju u ćelijskom prenosu signala i razjašnjenje ekspresije genetike/epigenetike/genomike, trebalo bi da da informacije u budućnosti za razvoj novih antioksidativnih terapijskih ciljeva u prevenciji astme (19). Antioksidansi koji imaju efikasan širok spektar aktivnosti i dobru bioraspoloživost kao što su tioli ili molekuli koji imaju i antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo istovremeno mogli bi biti dobri potencijalni terapijski agensi u budućnosti jer se pored zaštite od efekata oksidanasa, mogu i fundamentalno da menjaju osnovu inflamatornog procesa koji igra važnu ulogu u patogenezi hronične inflamatorne bolesti pluća (19, 30).

4. PASIVNO PUŠENJE, OKSIDATIVNI STRES I ASTMA

4.1. DUVAN I DUVANSKI DIM

Duvan je biljka koja potiče iz tropskih zona Amerike i u zapadnoj kulturi se koristi više od 400 godina. Njen list je komercijalno značajan jer sadrži nikotin, a

medicinski značajan zbog štetnih efekata koje ima na konzumente i okolinu. Složenog je sastava jer se u njemu nalaze ugljeni hidrati, azotne materije, organske kiseline i druga jedinjenja (70).

Usled nekompletnog sagorevanja lista duvana nastaje heterogeni aerosol tj. duvanski dim. On pored osnovnih komponenti duvanskog lista u sebi sadrži i produkte njihovog sagorevanja. U njegovom sastavu se nalazi više od 4700 supstanci, od kojih preko 100 ima štetne efekte na zdravlje oveka jer su farmakološki aktivne, antigene, citotoksične, mutagene i kancerogene (71, 72). Među njima se izdvajaju: alkaloidi (nikotin), materije sa baznim osobinama, organske kiseline, alkoholi, aldehidi i ketoni, ugljovodonici (aromatični, alifatični i policiklični), estri, amini, katran, fenoli, cijanovodonikna kiselina, amonijak, CO, CO₂, arsen, hrom, nikel, polonijum (70).

Duvanski dim je dvokomponentnog sastava. Jednu komponentu čini sekundarni (sporedni) dim koji se emituje iz dela cigarete koji gori. Drugu komponentu čini primarni (glavni) dim koji izdiše puša nakon inhaliranja duvana iz cigarete. Razlike u sastavu između ova dva dima su veoma male i uglavnom posledica temperature sagorevanja duvana. U sporednom dimu, koji se produkuje pri nižoj temperaturi i pod većim redukujim uslovima nego glavni dim, stvaraju se mnogi kancerogeni i toksične supstance (4-aminobifenil, benzeni, nikl i širok dijapazon policikličnih aromatičnih ugljovodonika, nitrozamina kao i nekoliko iritativnih gasova kao što su amonijak, NO, SO₂ i različiti aldehidi) u većoj količini nego u glavnom dimu i manje je kiselosti (73). Ovaj dim sadrži više CO a manje CO₂ i veću koncentraciju sagorelih produkata formiranih nitrozacijom i aminacijom. Nikotin je prisutan u većoj količini u nejonizovanoj formi, koja se mnogo bolje absorbuje u organizmu (74). Ambijentalni duvanski dim je sačinjen od 50-90% sporednog dima i 10-50% glavnog dima (72). Sa povećanjem broja puša a količina duvanskog dima i nivo zagađenja zatvorenog prostora raste (71).

Pored isparljive faze duvanski dim sadrži i estice. Glavni dim sadrži estice u respirabilnom rangu od 0,2-0,5 mikrona a sporedni visoku koncentraciju estica sa aerodinamičnim dijametrom do 10 mikrona (PM₁₀) (71). Polovina ukupne količine estica u vazduhu zatvorenog prostora u kojima je pušenje dozvoljeno, potiče iz duvanskog dima (75). U plućima ima deteta, estice duvanskog dima se talože do 50% više

nego kod odraslog, kao posledica razlike u dijametru i konfiguraciji disajnih puteva, sa proporcionalno većom depozicijom u traheobronhijalnoj oblasti (74).

4. 2. PASIVNO PUŠENJE

Tokom sedamdesetih godina prošlog veka, prvi put se beleži povećan rizik za respiratorne bolesti kod aktivnih pušača, a zatim i kod nepušača i to posebno dečijeg uzrasta koji su izloženi duvanskom dimu (71). Svetska zdravstvena organizacija je 1999. godine iznela podatak da više od 1000 miliona odraslih u svetu aktivno puši a da najmanje polovina dece u svetu pasivno puši sa štetnim posledicama po zdravlje. Pored toga, izneto je i da su deca posebno vulnerabilna na duvanski dim jer imaju veću ventilacioni protok vazduha i inhaliraju veću količinu duvanskog dima u odnosu na odrasle (73).

Pasivno pušenje može da počne još tokom fetalnog razvoja, ukoliko je majka aktivan pušač ali i izlaganjem majki nepušača duvanu od strane drugih pušača i može se nastaviti tokom celog detinjstva. Takvo izlaganje se povezuje sa redukcijom plućnog rasta i razvoja i plućne funkcije, kao i povećanjem uestalosti respiratornih simptoma, akutnih respiratornih infekcija, bronhijalne hiperreaktivnosti i astme (74, 76). Godišnje se oko 8000-26000 novih slučajeva astme registruje kod dece čije majke puše više od deset cigareta dnevno u njihovom prisustvu a izlaganje čak i maloj koncentraciji duvanskog dima pogoršava dečju astmu u više od milion slučajeva godišnje (77).

Kod dece je u Americi pokazano da visok nivo pasivnog pušenja trostruko povećava verovatnoću za umerenu/i tešku astmu i srednju redukciju FEV₁ za 8,1% (78). Cook i Strachan (1999.) nalaze povezanost između u astme kod dece i izlaganja duvanskom dimu OR 1,2 ukoliko jedan od roditelja puši (79). Pasivno pušenje u detinjstvu povezuje se i sa povećanim rizikom za astmu kod odraslih koji nisu nikada pušili (80). Pored toga izlaganje duvanskom dimu povećava broj i težinu egzacerbacija bolesti, upotrebu lekova, hitne posete lekaru i odsustvovanja iz škole. Sve ovo se značajno redukuje kada se izlaganje duvanskom dimu smanji (72).

4.3. PROCENA IZLOŽENOSTI DUVANSKOM DIMU

Nije moguće direktno izmeriti koncentraciju duvanskog dima u zatvorenom prostoru ili proceniti izloženost njegovim konstituentima, jer je kompleksnog i promenljivog sastava. Zbog toga se u ove svrhe koristi upitnik sa podacima o pušačkim navikama ljudi u sredini gde provode vreme mada mu je vrednost limitirana smanjenim razumevanjem postavljenih pitanja, predrasudama, slabim pamćenjem ili nepažljivim odgovorima (81). U te svrhe je bolje određivanje komponenti duvanskog dima ili njegovih metabolita u uzorku izdahnutog vazduha, krvi, serumu, salivi, urinu, dlaci (nikotin, kotinin, CO, karbokishemoglobin i tiocijanat jon) (82, 83).

Nikotin i kotinin

Nikotin je jedan od najjačih štetnih sastojaka duvana koji je izolovan 1828.godine. List duvana sadrži 0,6-11% nikotina zavisno od vrste duvana, prirode zemljišta gde je uzgajan i na ina pripremanja. Duvan za pušenje sadrži 1-3% nikotina (70).

Pri udisanju duvanskog dima, nikotin se vrlo brzo apsorbuje preko plućnih alveola. Njegova koncentracija u plazmi kod teških aktivnih pušača može biti 30-40mg/ml. On se u manjoj količini može detektovati u znoju i majčinom mleku. Nikotin se uglavnom razgrađuje u jetri (80-90%) a nešto manje u plućima i bubrezima (70). Do 70% se metaboliše u kotinin konverzijom na dva načina. Prvi uključuje citohrom p450 sistem a drugi je katalizovan citoplazmatskom aldehid oksidazom. Ostali deo nikotina se metaboliše na neki drugi način (4%) ili se ekskretuje urinom nepromenjen (9%). Metaboliti koji put ostalih 17% nikotina još uvek nije poznat (83, 84).

Vrednost nikotina u krvi fluktuiraju, poluživot mu je oko dva sata a urinarna ekskrecija brza, pa je zbog toga slab marker za praćenje izlaganja duvanskom dimu. Zbog toga se za izdvajanje pušača od nepušača koristi njegov metabolit kotinin u serumu sa pragom vrednosti od 500ng/ml (83). Kako je kotinin metabolit nikotina specifičan samo za duvan i on se široko koristi kao biomarker pasivnog pušenja jer obezbeđuje objektivnu procenu izloženosti duvanskom dimu tokom prethodnih dva dana (73, 82). Ima relativno dug poluživot i slobodno je distribuiran u svim delovima organizma. Njegovo merenje ima prednost nad upitnikom jer detektuje i postojanje eventualnih

drugih izvora duvanskog dima i lažno date podatke od strane ispitanika (85). Može da se meri u krvi, salivi i dlaci (73). Me utim, njega u svom sastavu imaju i neke namirnice koje se koriste u ishrani (krompir, plavi patli žan, zeleni aj). Spekuliše da njihovo konzumiranje može povećati nivo kortizola u organizmu (86).

Ugljen monoksid i karboksihemoglobin

U procesu aktivnog pušenja nastaje i CO kao produkt nepotpunog sagorevanja duvana. Kako je CO u gasovitom stanju, deo gasa se sakuplja u prostoriji a deo ga apsorbuju pasivni puša i. Dim cigarete sadrži oko 4% CO, ali zbog intermitentne ekspozicije i razređenosti udahnutog dima količina koja biva apsorbovana u organizam pasivnog pušača iznosi 0,04% (87).

Inhaliran CO se brzo resorbuje u krv i vezuje za hemoglobin 200 puta jače nego kiseonik, uz formiranje karboksihemoglobina (COHb) i na taj način remeti prenos kiseonika putem krvi što dovodi do hipoksije (70). Zbog toga se vrednost COHb u krvi može koristiti kao biomarker u evaluaciji pasivnog pušenja, mada se generalno ređe koristi zbog kratkog poluživota (3-4 sata) (83). Nivo COHb se kod pušača kreće od 5-6% pri pušenju 20 cigareta dnevno a do 9% pri pušenju 40 cigareta dnevno. Osmotna pasivna inhalacija CO u prostorijama gde se puši, pokazuje vrednosti COHb kod nepušača kao i da su aktivno ispušili pet cigareta za to vreme (87). U krvi nepušača se normalno može naći najviše 3% COHb a u izdahnutom vazduhu manje od 2ppm (70, 87).

Me utim, CO se u velikim količinama stvara i tokom raznih industrijskih procesa gde dolazi do sagorevanja benzina, drveta i gasa (štednjaci, kamini) (87). On se takođe može inhalirati iz tih izvora što može uticati na njegov nivo u krvi.

4.4. DUVANSKI DIM I SLOBODNI RADIKALI

Od posebnog značaja je činjenica da duvanski dim sadrži veliku koncentraciju reaktivnih slobodnih radikala i supstanci sposobnih da produkuju ove radikale. Slobodni radikali se u velikoj količini formiraju na vrhu cigarete koja gori ali im je poluživot dosta kratak, pa ih pušač odmah ne inhalira u velikoj količini. Me utim, vremenom njihova koncentracija raste u gasnoj fazi glavnog duvanskog dima, i maksimum dostiže nakon 1-2 minuta, što znači da se visoko reaktivni slobodni radikali tokom inhalacije

duvanskog dima formiraju kontinuirano u hemijskim procesima. Važan izvor produkcije slobodnih radikala su NO (koji se nalazi u visokoj koncentraciji do 400 ppm) i $O^{\cdot-}$. Oni se dominantno nalaze u gas fazi i međusobno odmah reaguju tako da formiraju reaktivni peroksinitrit molekul (NOO^{\cdot}). Pored toga NO se oksidiše i u mnogo reaktivniji NO_2 radikal koji dalje reaguje sa isoprenom koga takođe ima u duvanskom dimu u visokoj koncentraciji i dalje formiraju biološki aktivni slobodni radikali (71). I katran iz duvana sadrži visoku koncentraciju slobodnih radikala (kinoni, hidrokinoni i semikinoni) koji mogu da redukuju kiseonik do produkcije $O^{\cdot-}$, OH^{\cdot} i H_2O_2 na površini epitela disajnih puteva pušača. On je značajan i metalni helator koji može da veže gvožđe i produkuje tar-semikinin+tar- Fe^{2+} koji dalje kontinuirano generiše H_2O_2 (19). Kada cigareta gori nastaju i brojni metalni oksidi kao što su hrom, kadmijum i arsenik oksidi. Većina njih ili stvaraju kiseonikne radikale sama za sebe ili deluje kao katalizator zajedno sa azotnim komponentama u stvaranju radikala (81).

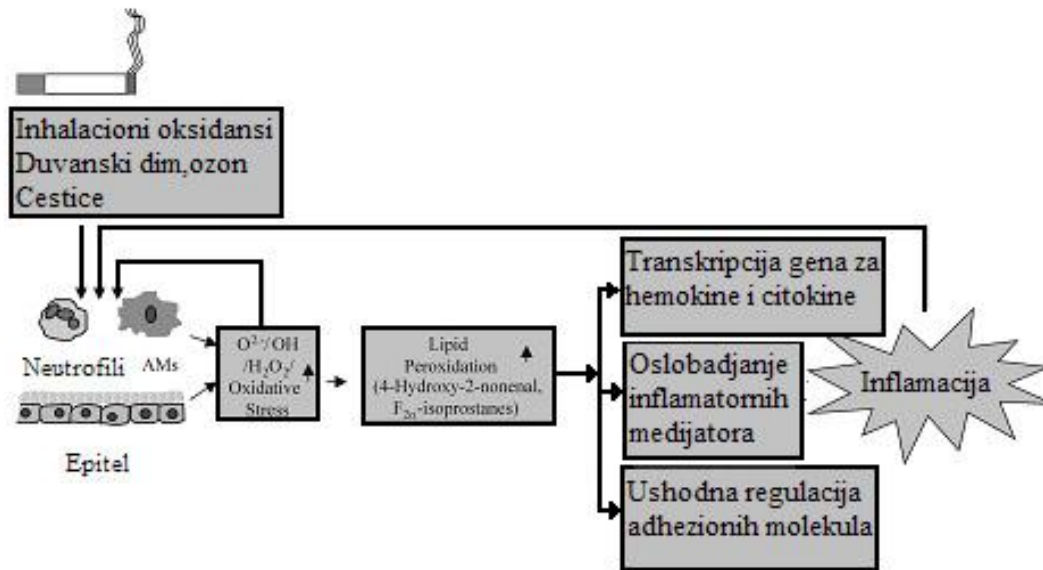
Smatra se da su negativni efekti duvanskog dima na respiratorni sistem direktno ili indirektno povezani sa inhaliranjem velike količine 1×10^{16} visoko reaktivnih slobodnih kiseoniknih radikala (71). Oni mogu uzrokovati lom DNA lanca i mostova, oštećenje DNA, hromozomske aberacije i oštećenje na formaciji mikronukleusa. Pored toga, mogu da utiču i na vretenasti mitotički aparat i na metilaciju promotor regiona za tumor supresor gene (81). Takođe je pokazano da aktiviraju i inflamatorne ćelije koje doprinose aktivaciji rasta njihovih faktora i matriks metaloproteinaza, što sve dalje uzrokuje disbalans proteaza i antiproteaza i destrukciju tkiva (72).

4.5. PUŠENJE I OKSIDATIVNI STRES PULMA

Eksperimentalne studije na animalnim modelima ukazuju da je pasivno pušenje povezano sa inflamacijom disajnih puteva sličnih karakteristika kao kada je uzrokovano aktivnim pušenjem (88). Inhaliranje duvanskog dima sa esticama, direktno dovodi do oksidativno posredovanog ćelijskog oštećenja i aktivacije inflamatornih odgovora u plućima (19). On uzrokuje značajan oksidativni stres u plućima koji se dalje pojačava regrutovanjem i aktivacijom inflamatornih ćelija, posebno neutrofila i makrofaga koje stvaraju visok nivo RVK, RVA i drugih toksičnih metabolita (slika 6.) (19, 26). Pored

toga on ushodno reguliše i redoks senzitivne traskripcione faktore u zaštitnim mehanizmima protiv ovih efekata. To ostvaruje promenama u histonskoj acetilaciji/deacetilaciji, ekspresiji proinflamatornih gena i indukcijom antioksidantnih gena (19).

Slika 6. Razvoj inflamacije plu a pod uticajem duvanskog dima (Rahman I 2002.)



Slika 7. Razvoj inflamacije plu a pod uticajem duvanskog dima (Rahman I 2002.)

U inflamatornim elijama plu a puša a utvr ena je i izmenjena aktivnost antioksidatnih enzima (26). Alveolarni makrofagi koji normalno žive nekoliko meseci, u puša kim plu ima žive zna ajno duže imaju i pove anu aktivnost MnSOD, HO-1 i katalaze (89). Tipi na slika antioksidatnog profila neutrofila kod onih koji puše je poja ana apoptoza i visok nivo aktivnosti katalaze a nizak nivo GSH-zavisnih enzima i skoro nedetektabilna aktivnost TRX i HO-1 (90). U alveolarnom epitelu puša a tranzitorno je indukovana ve a aktivnost MnSOD koja postaje nishodno regulisana kod teškog i/ili hroni nog izlaganja duvanskom dimu (38).

U kulturi epitelnih elija, duvanski dim uzrokuje depleciju intracelularnog GSH sa tranzitornim smanjenjem aktivnosti glukoza-6-fosfataze i GPx, i pove anjem ekspresije GPX3. Nakon ove inicijalne deplecije GSH dolazi do pove anja njegove koli ine. Kod ljudi je pokazano da akutno pušenje uzrokuje zna ajan oksidativni stres koji pove ava nivo GSH na površini epitelnih elija a da hroni no pušenje pove ava njegov nivo i na površini epitelnih elija i u BAL (91).

II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi nivo kotinina u serumu kao specifi nog markera pasivnog pušenja, TBARS supstanci u plazmi i aktivnost superoksid dizmutaze i glutacion peroksidaze u eritrocitima kod dece koja boluju od blage ili umereno teške perzistentne astme.

2. Utvrditi nivo kotinina u serumu kao specifi nog markera pasivnog pušenja, TBARS supstanci u plazmi i aktivnost superoksid dizmutaze i glutacion peroksidaze u eritrocitima kod zdravih ispitanika de jeg uzrasta.

3. Analizirati povezanost nivoa TBARS supstanci, aktivnost superoksid dizmutaze i glutacion peroksidaze kod astmatičara u zavisnosti od nivoa kotinina u serumu i primenjene kortikosteroidne terapije najmanje mesec dana pre uklju ivanja u ispitivanje.

III NAU NO-RADNE HIPO ZE

U ovom istraživanju su postavljene slede e nau no-radne hipoteze:

1.Nulta hipoteza

-Povezanost izme u pasivnog pušenja i oksidativnog stresa kod dece sa astmom ne postoji i ne zavisi od toga da li je dete na kortikosteroidnoj terapiji ili ne, najmanje mesec dana pre uklju ivanja u ispitivanje. Ako ova povezanost postoji onda je to slu ajno.

- Pasivno pušenje i oksidativni stres kod dece obolele od astme nezavisno od toga da li su na ili bez kortikosteroidne terapije najmanje mesec dana pre uklju ivanja u ispitivanje, nisu povezani sa: polom, uzrastom, poro ajnim merama, tipom poro aja, redosledom ro enja deteta, staroš u porodilje, dojenjem, brojem senzitivizacija deteta, pojavom ekcema, alergijskog rinitisa i vizinga u prvoj godini života deteta, brojem uku ana, veli inom stambene površine, mestom stanovanja, na inom grejanja stana, prisustva ku nog ljubimca, brojem popušenih cigareta u stanu u toku dana, dužinom puša kog staža majke, pušenjem majke tokom trudno e, pušenjem oca, edukacijom roditelja, dužinom radnog vremena majke i atopijskim statusom roditelja. Ukoliko ova povezanost i postoji, ona je slu ajna.

2.Radna hipoteza

-Povezanost izme u pasivnog pušenja i oksidativnog stresa kod dece sa astmom ne postoji i ne zavisi od toga da li su na kortikosteroidnoj terapiji ili ne, najmanje mesec dana pre uklju ivanja u ispitivanje i ako postoji ona je statisti ki zna ajna.

-Pasivno pušenje i oksidativni stres kod dece obolele od astme nezavisno od toga da li su na ili bez kortikosteroidne terapije minimalno mesec dana pre ukju ivanja u ispitivanje, sa prethodno navedenim potencijalnim rizik faktorima. Ukoliko ova povezanost i postoji, ona je statisti ki zna ajna.

IV MATERIJAL I METODI

Istraživanje je obavljeno na Klinici za De je interne bolesti u Nišu, Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra u Nišu i Medicinskom fakultetu u Nišu u periodu 2010. do 2013. godine.

1. GRUPE ISPITANIKA

U istraživanje je uključeno 110 ispitanika uzrasta od 7 do 18 godina. Roditelji svih ispitanika obavješteni su o cilju istraživanja i od njih je dobijena pismena saglasnost. Svi ispitanici su minimalno mesec dana pre uključivanja u istraživanje bili bez ikakve infekcije i nisu koristili multivitaminske preparate a dan pre ispitivanja nisu konzumirali čaj. Ispitanici su podeljeni u šest grupa u zavisnosti od prisustva astme, izloženosti duvanskom dimu potvrđene prisustvom kotinina u serumu i primenjene/nepremenjene kortikosteroidne terapije mesec dana pre uključivanja u ispitivanje. Svaka grupa sa astmom uključila je po 20 ispitanika dok su dve kontrolne grupe sa zdravim ispitanicima uključile po 15 ispitanika. Grupe su formirane i obeležene na sledeći način (tabela 5.):

Tabela 5. Prikaz ispitanika po grupama.				
Grupe	Terapija	N	N	Ukupno:
Kontrolna grupa (K)	KP (zdravi pasivni pušači)		15	30
	KNP (zdravi pasivni nepušači)		15	
Grupa astmatičara (A)	AP -TH (bez kortikoterapije)	20	40	80
	AP +TH (na kortikoterapiji)	20		
	ANP -TH (bez kortikoterapije)	20	40	
	ANP +TH (na kortikoterapiji)	20		

Analiza ispitivanih grupa je bila slede a:

- Povezanost astme sa oksidativnim stresom nezavisno od pasivnog pušenja i kortikoterapije, procenjena je izme u dece sa astmom i kontrolne grupe.
- Povezanost astme i oksidativnog stresa sa pasivnim pušenjem nezavisno od primenjene terapije procenjena je izme u grupa AP i ANP.
- Povezanost astme i oksidativnog stresa sa pasivnim pušenjem a bez uticaja kortikosteroidne terapije, procenjena je analizom izme u grupa AP-TH i ANP-TH.
- Povezanost astme i oksidativnog stresa sa pasivnim pušenjem i kortikosteroidnom terapijom, procenjena je analizom izme u grupa AP+TH i ANP+TH.
- Povezanost i potencijalni uticaj nekih naj eš ih rizik faktora na razvoj astme i oksidativni stres procenjen je u odnosu na prisustvo bolesti, izloženost duvanskom dimu i primenjenu terapiju.

2. METODI ISPITIVANJA

2.1. KLINI KA OBRADA PACIJENATA

Postavljanje dijagnoze i klasifikacija težine bolesti pacijenata sa astmom obavljeno je po preporukama vodi a koje su dale GINA i PRACTALL (1, 92) tj. na osnovu anamnesti kih podataka specifi nih za astmu, klini kog pregleda i dopunskih testova.

Dopunski testovi za postavljanje dijagnoze i procenu težine bolesti obuhvatili su procenu plu ne funkcije i test za procenu atopijskog statusa. Merenjem plu ne funkcije na elektronskom aparatu Spirovit SP-1 marke Schiller prema preporukama vodi a ATS/ERS 2005. (93), procenjivani su slede i parametri: forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1), forsirani vitalni kapacitet (FVC), forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi kao procenat vitalnog kapaciteta (FEV1/FVC), i forsirani ekspiratorni

protok vazduha koji se ostvaruje na nivou 50% forsiranog vitalnog kapaciteta (FEF 50%).

Kod svih ispitanika u trenutku ispitivanja procenjavani su nivo tj. prisustvo kotinina u serumu, nivo TBARS supstanci u plazmi, aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx) u eritrocitima, procenat karboksihemoglobina (COHb) u serumu, prisustvo lokalne eozinofilne inflamacije u plu ima merenjem nivoa azot monoksida u izdahnutom vazduhu (FeNO) i status sistemskog inflamatornog odgovora odreivanjem standardnih hematoloških i biohemijskih markera inflamacije, krvna slika sa procentom eozinofila i C-reaktivni protein.

Nivo kotinina u serumu odreivan je upotrebom kvalitativnog kompetitivnog enzim hemiluminiscentnog imunoeseja [komercijalni kit USA DRG Serum Cotinine Elisa Kit (EIA-3242) proizvođača RUO DRG International INC., USA] koji sadrži poliklonska zela kotininska antitela vezana za ašice. Prva inkubaciona faza testa se započinje dodavanjem uzoraka (standard i serum), odvija se na sobnoj temperaturi (20-27°C) i traje 25 minuta. Nakon dodatih uzoraka u reakcione ašice, dodatkom biotin konjugata započinje se druga inkubacija u trajanju od 30 minuta, kada se on vezuje za prethodno nastali kompleks antigen-antitelo. Nakon inkubacije, četiri puta se vrši ispiranje sa 350µL pufera za ispiranje, na automatskom ispiratoru. Na taj način je višak nevezanih antitela uklonjen u prvoj fazi reakcije. U sledećoj fazi, dodaje se enzim obeleživač (ren peroksidaza) koji se vezuje za prethodni kompleks, kada nastaje kompleks antigen-antitelo-enzim i on tada postaje četvrti član ovog kompleksa. Inkubacija traje 30 minuta i nakon ove faze vrši se ispiranje (da bi se uklonio nevezan enzim), pa se nakon toga dodaje hromogen tetrametilbenzidin (TMB) da se veže za enzim peroksidazu i započne kolor reakcija. Nakon 15 minuta bojena reakcija se prekida sumpornom kiselinom kao stoperom. Intenzitet nastale boje proporcionalan je koncentraciji kotinina i fotometriira na 450nm unutar 15 minuta, kako bi se eliminisale eventualne analitičke interference. Merenje absorbance se obavlja na aparatu Microplate reader LKB 5060-006. Nakon fotometriiranja i očitavanja ekstincije vrši se izrada standardne krive (uz pomoć šest standarda različitih koncentracija upotrebljenih u analizi) pa se preko nje vrši preračunavanje uzoraka na poznate koncentracije.

Svi uzorci, kalibratori i kontrole su testirani u duplikatu. Po uputstvu proizvođača pozitivan rezultat ne informiše o nivou koncentracije nikotina, već samo ukazuje da uzorak sadrži kotinin iznad cut-off nivoa. Obrnuto negativan rezultat ne ukazuje da kotinin nije prisutan, već da ne sadrži nivo kotinina iznad cut-off nivoa. Svaki uzorak sa absorbancom manjom ili jednakom sa 25ng/mL na kalibratoru smatra se pozitivnim i obrnuto svaki uzorak sa absorbancom većom od 25ng/mL na kalibratoru smatra se negativnim.

U plazmi su određivani produkti lipidne peroksidacije (TBARS) nakon reakcije sa tiobarbiturnom kiselinom u 1% puferu ortofosforne kiseline (pH 2,0) i dodavanja 1μmol ferosulfata. Zatim je apsorbancija merena na 535nm na Beckman DU 400 spektrofotometru.

U eritrocitima su na aparatu Olympus AU 400 određivane: aktivnost superoksid dizmutaze kolorimetrijskim testom sa reagensom "Rasond" firme Randox i aktivnost glutation peroksidaze UV metodom sa "Ransel" reagensom firme Randox.

Azot monoksid u izdahnutom vazduhu (FeNO) je meren single-breath on-line metodom, putem hemiluminiscentnog analizera NIOX MINO a vrednost je izražena u ppb (parts per bilion). Pri merenju je korišćen vodič sa preporukama ATS/ERS 2001. (94).

Nivo karboksi hemoglobina (COHb) u serumu venske krvi odreivan je metodom spektrofotometrije na aparatu DU-650. Krvna slika određivana je na aparatu Act Diff Coulter, a procenat eozinofila na preparatu perifernog razmaza krvi bojenim po Giemsi. CRP je meren na aparatu I lab 300.

Senzitizacija na najčešće inhalatorne alergene (grinje, kućna prašina, polen trave, polen korova, polen drveća, bujica, dlakavost i psora) procenjivana je kožnim prik testiranjem (SPT), alergenima koji su proizvedeni u Institutu za virusologiju i imunologiju Torlak u Beogradu. Pozitivnim alergen testom na alergen smatrana je pojava papule veličine od 3 ili više mm ili već od one izazvane fiziološkim rastvorom kao negativnom kontrolom.

Podaci o stepenu pasivnog pušenja tj. pušačkim navikama u kućnim i bolesti deteta dobijeni su anketiranjem roditelja, a podaci iz neonatalnog i ranog postnatalnog perioda dobijeni su iz kartona za novorođenčete koje je izdalo porodilište gde je dete rođeno.

U anketnom listu su traženi slede i anamnestički podaci: pol i uzrast deteta, mesto stanovanja, veličina stambene površine, veličina porodice, način grejanja, prisustvo kućnog ljubimca, pušačke navike roditelja (dužina pušačke staže majke, ukupan broj popušanih cigareta u toku dana, pušenje majke tokom trudnoće, pušenje oca), dužina radnog vremena majke, socioekonomski status porodice, stepen edukacije roditelja, atopijski status roditelja, redosled rođenja deteta, starost porođilje, dužina dojenja deteta, uzrast deteta kada su se javile prva bronhopneumonija, atopijski dermatitis i alergijska rinitis, učestalost respiratornih infekcija deteta unazad godinu dana, dužina i vrsta primenjenih preventivnih terapija poslednjih godinu dana. Iz novorođene karte uzeti su sledeći podaci: porođajna masa (PM) i porođajna dužina (PD), tip porođaja.

2.2. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za upisivanje, rangiranje, grupisanje i tabelarno i grafičko prikazivanje korišćen je Excel program iz Microsoft Office 2007 programskog paketa.

Statistička analiza je sprovedena korišćenjem SPSS programa verzije 15.0. U svim analizama je kao granica statističke značajnosti podrazumevana greška procene od 0,05 ili 5%.

Numerički podaci prikazivani su aritmetičkom sredinom (\bar{X}), standardnom devijacijom (SD) i medijanom (Me), a poređenje vrednosti između grupa ispitanika vršeno je Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka ili Mann-Whitney U testom, a izbor testa je zavisio od rezultata Shapiro-Wilk testa, odnosno od normalnosti raspodele numeričkih parametara poređenih grupa.

Pored toga, prikazivani su i frekvencija i procenat zastupljenosti parametara atributivnih obeležja. Poređenje zastupljenosti pojedinih kategorija atributivnih obeležja između grupa vršeno je Mantel-Haenszelovim Hi kvadrat testom (Mantel-Haenszel Chi square test), a dat je i OR uz vrednost 95% indeksa poverenja (CI – confidence interval).

V REZULTATI

1. DEMOGRAFSKI PODACI ISPITANIKA I PROCENA PASIVNOG PUŠENJA

Dobijeni rezultati istraživanja svih ispitanika de jeg uzrasta prvo su prikazani kroz osnovne demografske karakteristike ispitivanih grupa (tabela 6.).

Izme u svih pore enih grupa ne postoje statisti ki zna ajne razlike slede ih ispitanih demografskih podataka: pol, srednji uzrast, telesna masa i visina, mesto stanovanja, na in grejanja i broj popušenih cigareta od strane roditelja u toku dana. Izme u pore enih grupa sa astmom nije na ena statisti ki zna ajna razlika u težini bolesti, a kod onih koji su na terapiji, nema zna ajne razlike u primenjenoj dozi inhalatornih kortikosteroida, izraženoj u vidu ekvipotentne doze beklometazona. Svi dobijeni rezultati ukazuju na koheretnost ispitivanih grupa.

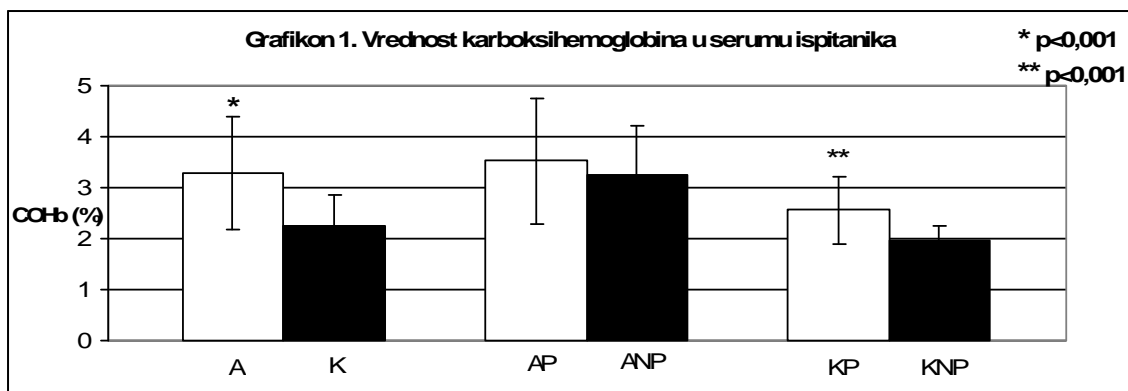
Tabela 6. Demografski podaci ispitivanih grupa

	A n=80	K n=30	KNP n=20	KP n=20	ANP-TH n=20	ANP+TH n=20	AP-TH n=20	AP+TH n=20
Pol (M/Ž)	48/32	15/15	8/7		14/6	8/12	13/7	13/7
Uzrast (god.)	11,32±3,05	12,15±3,05	11,2±3,7	13,1±2,4	10,9±3,0	11,4±2,8	11,2±2,7	11,8±3,7
TV (cm)	150,26±21,4	155,06±15,2	149,53±15,3	160,60±15,23	149,65±18,7	148,20±15,30	149,75±18,7	153,45±18,2
TM (kg)	44,5±17,88	47,36±14,39	40,33±12,03	54,40±16,76	44,05±18,01	41,55±14,16	43,95±18,14	48,45±21,14
Selo/grad (%)	36/43 (45/55)	14/16 (46,65/53,45)	7/8 (46,7/53,3)	7/8 (46,7/53,3)	10/10 (50/50)	11/9 (55/45)	8/12 (40/60)	7/13 (35/65)
Doza inhalatornog kortikosteroida ekvipotentna beklometazonu (µg/24h)	158,52±38,7					158,50±87,72		158,75±44,6
Težina bolesti laka ili umerena (%)	49/31 (61,2/38,7)				15/5 (75/25)	14/6 (70/30)	13/7 (65/35)	12/8 (60/40)
Grejanje drva/ugalj /ostalo (%)	52/28 (65/35)	21/9 (70/30)	10/5 (66,6/33,3)	11/4 (73,34/26,66)	15/5 (75/25)	13/7 (65/35)	13/7 (65/35)	11/9 (55/45)
Broj popušenih cigareta/24h od strane roditelja	25,85±12,11			27,33±13,65			25,61±10,73	24,75±11,97

Kod svih ispitanika je odreivanjem nivoa kotinina u serumu su provereni dobijeni heteroanamnesti ki podaci za izloženost duvanskom dimu. Na osnovu 100% slaganja heteroanamnesti kih podataka i serumskog nivoa kotinina za pozitivno/negativno izlaganje duvanskom dimu, precizno su formirane grupe ispitanika. Treba naglasiti da je u ispitivanju koriš en kvalitativan test koji ima 100% senzitivnost i specifi nost za kotinin i sigurno potvr uje/isklju uje izloženost duvanskom dimu ali ne precizira kvantitativnu vrednost kotinina u uzorku. Na tabeli 7. su prikazane srednje vrednosti apsorbance za kotinin u ispitivanim grupama.

Tabela 7. Nivo apsorbance kotinina u serumu ispitanika.				
Kotinin (ng/ml)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
A	80	33,67±26,45	24,50	1,50-94,50
K	30	34,07±33,34	19,20	1,10-100,50
AP	40	11,94± 6,52	11,85	1,50-24,00
ANP	40	55,41±20,14	50,75	25,00-94,50
KP	15	7,98±5,78	5,90	1,10-18,20
KNP	15	60,16±28,48	65,90	20,20-100,50
AP-TH	20	8,07±5,87	6,60	1,50-21,20
ANP-TH	20	49,61±17,85	47,75	25,00-83,70
AP+TH	20	15,82±4,61	15,60	5,10-24,00
ANP+TH	20	61,21±21,05	60,60	28,70-94,50

U istraživanju je za procenu izloženosti duvanskom dimu kao dopunski kvantitativni parametar koriš en nivo COHb u venskoj krvi. Ovo ispitivanje je pokazalo da astmatari imaju statisti ki zna ajno višu vrednost COHb u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$) i da su više izloženi ugljen monoksidu od zdrave dece, a da astmatari pasivni puša i iako imaju višu vrednost COHb u odnosu na one koji to nisu, ona nije statisti ki zna ajna. Me utim, zdrava deca izložena duvanskom dimu u odnosu na one koja to nisu, pokazano je da imaju zna ajno višu vrednost COHb ($p < 0,001$) (grafikon 1.).



Vrednost COHb u venskoj krvi u grupi astmati ara bez kortikosteroidne terapije, iako je niža kod pasivnih puša a u odnosu na one koji nisu pasivni puša i, razlika nije statisti ki zna ajna. U grupi astmati ara koji su na kortikoterapiji dobijena je viša vrednost COHb kod onih koji su pasivni puša i u odnosu na one koji to nisu, koja tako e nije statisti ki zna ajna. Ovakvi rezultati ne ukazuju da postoji zna ajna veza izme u COHb, pasivnog pušenja i terapijskog režima (tabela 8.).

Tabela 8. Vrednost karboksihemoglobina u serumu ispitanika u odnosu na terapijski režim.

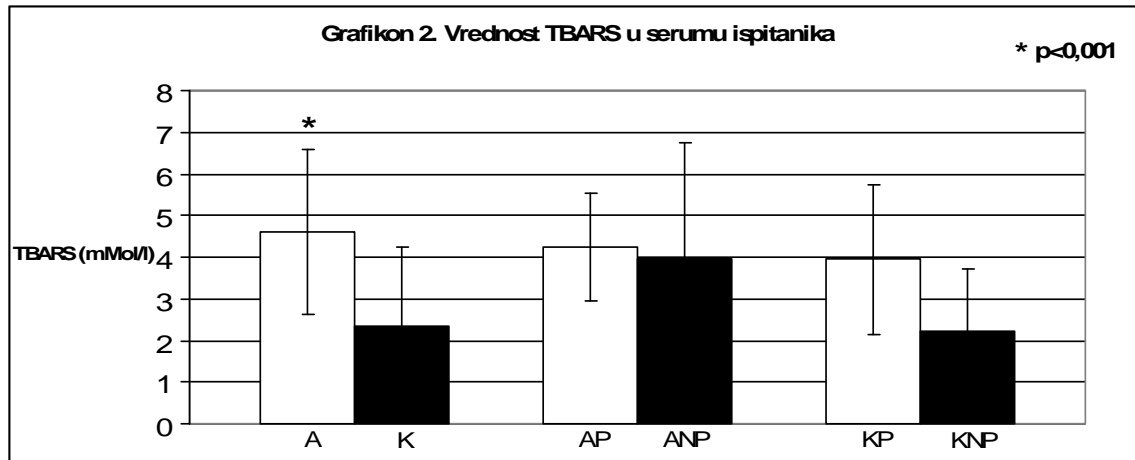
COHb (%)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
AP-TH	20	2,95±0,92	2,74	1,36-5,41
ANP-TH	20	3,01 ±0,89	3,05	1,54-4,64
AP+TH	20	4,10±1,26	3,98	1,71-5,98
ANP+TH	20	3,49±1,01	3,50	1,81-5,39

2. PROCENA EFEKATA ASTME I PASIVNOG PUŠENJA NA OKSIDATIVNI STRES

1. Procena efekta astme na ispitivane parametre oksidativnog stresa vršena je analizom dobijenih podataka izme u grupa A i K.
2. Procena mogu eg dopunskog efekta pasivnog pušenja kod astme na ispitivane parametre oksidativnog stresa vršena je analizom dobijenih podataka izme u grupa AP i ANP.

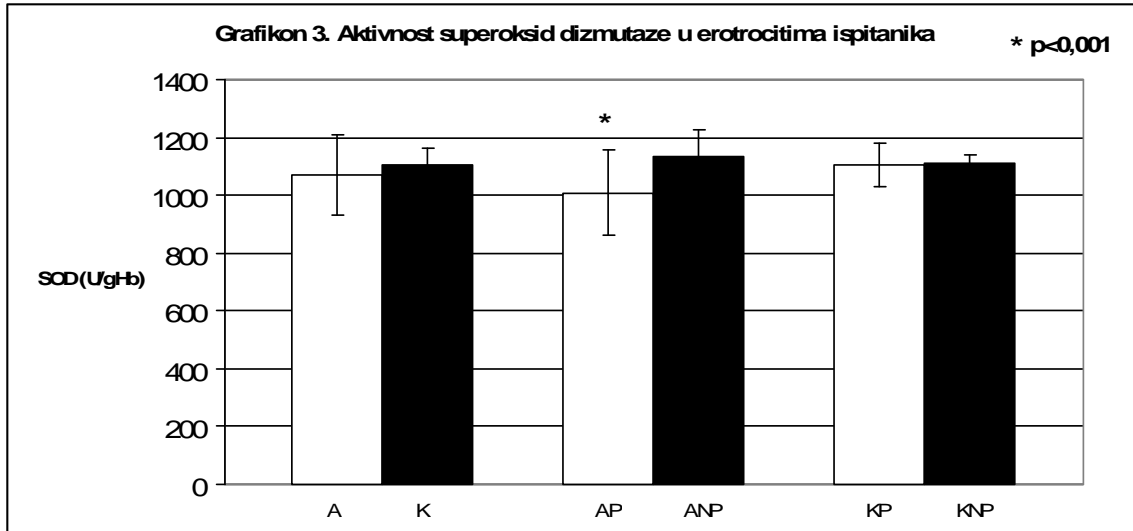
3. Procena mogućeg izolovanog efekta pasivnog pušenja kod zdrave dece na ispitivane parametre oksidativnog stresa, vršena je analizom dobijenih podataka između grupa KP i KNP

Da bi smo procenili postojanje oksidativnog stresa, po mnogima važnog mehanizma za nastanak, održavanje i egzacerbaciju inflamacije disajnih puteva u astmi, određivali smo nivo lipidne peroksidacije merenjem TBARS u serumu. Izmerena je viša vrednost TBARS kod astmatičara u odnosu na kontrolu i to statistički značajno ($p < 0,001$). U grupi gde su astmatičari, pasivni pušači su pokazali višu vrednost TBARS u serumu u odnosu na one koji to nisu, ali ona nije bila statistički značajna. Zdravi pasivni pušači u odnosu na one koji to nisu, takođe su pokazali višu vrednost TBARS, ali bez statističke značajnosti (grafikon 2.).

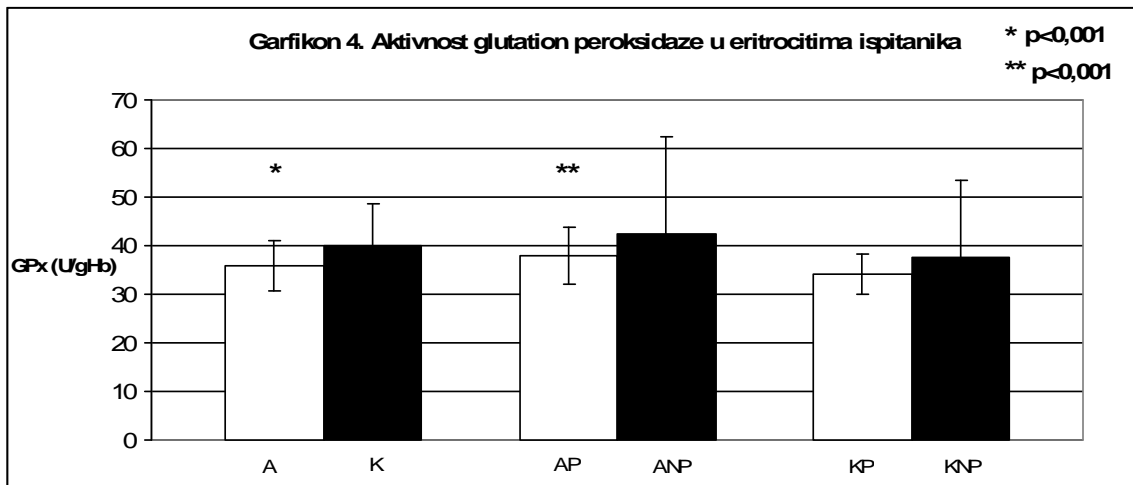


Nakon procene oksidativnog stresa, izvršeno je ispitivanje antioksidativnog odgovora prema slobodnim radikalima kod naših ispitanika. U tom cilju određivana je aktivnost antioksidativnih enzima SOD i GPx.

Ispitivanje antioksidativnog statusa merenjem aktivnosti SOD u eritrocitima, pokazalo je nižu aktivnost SOD kod astmatičara u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti. U grupi gde su astmatičari pasivni pušači, dobijena je značajno niža aktivnost SOD u eritrocitima u odnosu na one koji to nisu ($p < 0,001$). Kod zdrave dece, pasivni pušači imaju diskretno nižu aktivnost SOD u eritrocitima, ali bez statističke značajnosti. Dobijeni rezultati pokazuju da je pasivno pušenje kod obolelih od astme dodatni faktor za nižu aktivnost SOD u eritrocitima (grafikon 3.).



Procena aktivnosti GPx neophodnog za reakciju redukcije vodonik peroksida u prisustvu redukovanog glutationa u eritrocitima, pokazala je nižu aktivnost GPx kod astmatičara u odnosu na kontrolu i to značajno ($p < 0,01$). Astmatičari koji su pasivni pušači i takođe su pokazali značajno nižu aktivnost GPx u eritrocitima, u odnosu na one koji to nisu ($p < 0,001$). Kod zdrave dece, iako su pasivni pušači i pokazali nižu aktivnost GPx, ta razlika nije značajna u odnosu na one koji nisu izloženi duvanskom dimu (grafikon 4.).



U daljem ispitivanju procenjavani su intenzitet i ponašanje sistemske i lokalne inflamacije i status plućne funkcije pod uticajem pasivnog pušenja i kortikosteroidne terapije kod astmatičara u odnosu na zdravu decu. Sistemska inflamacija procenjavana je

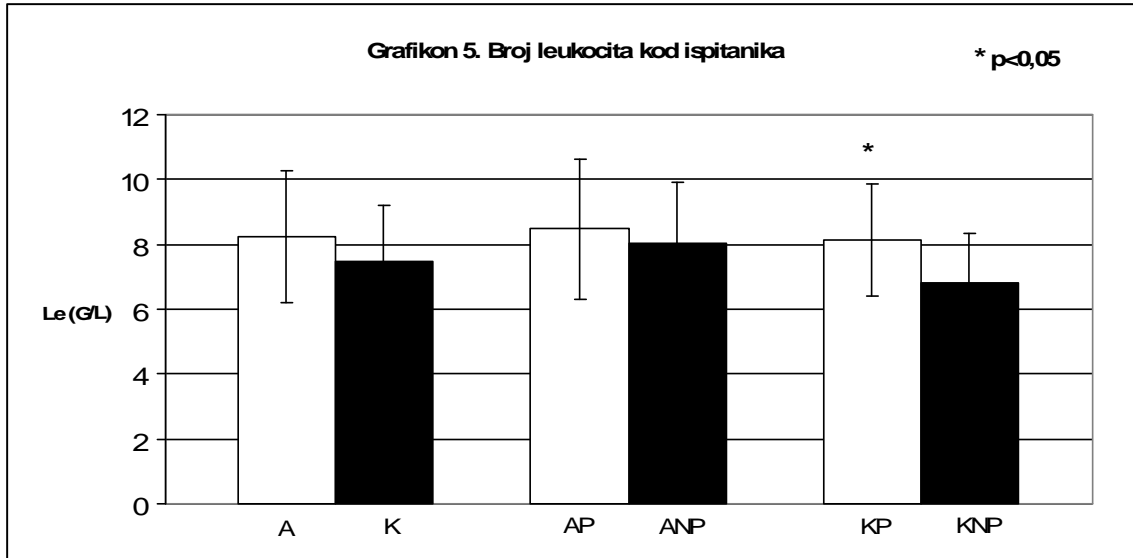
merenjem vrednosti CRP u serumu, odreivanjem broja leukocita i procenta eozinofila u perifernoj krvi. Lokalna eozinofilna inflamacija disajnih puteva, koja je u isto vreme i indirektan marker oksidativnog stresa uzrokovan RVA, odreivana je nivoom NO u izdahnutom vazduhu. Plu na funkcija je sagledavana merenjem FEV₁, FEV₁/FVC i FEF_{50%}.

Kod astmatikara se u odnosu na kontrolu, ispitivanje sistemske inflamacije merenjem CRP nije pokazalo statistički značajno. U grupi gde su samo astmatikari i u grupi gde su samo zdravi ispitanici, pasivni pušači su pokazali višu vrednost CRP u odnosu na one koji to nisu, ali bez statističke značajnosti. Dobijeni rezultati pokazuju da sistemska inflamacija nije značajno veća kod bolesnih u odnosu na zdrave, i nije pod uticajem pasivnog pušenja kod naših obolelih i zdravih ispitanika (tabela 9.).

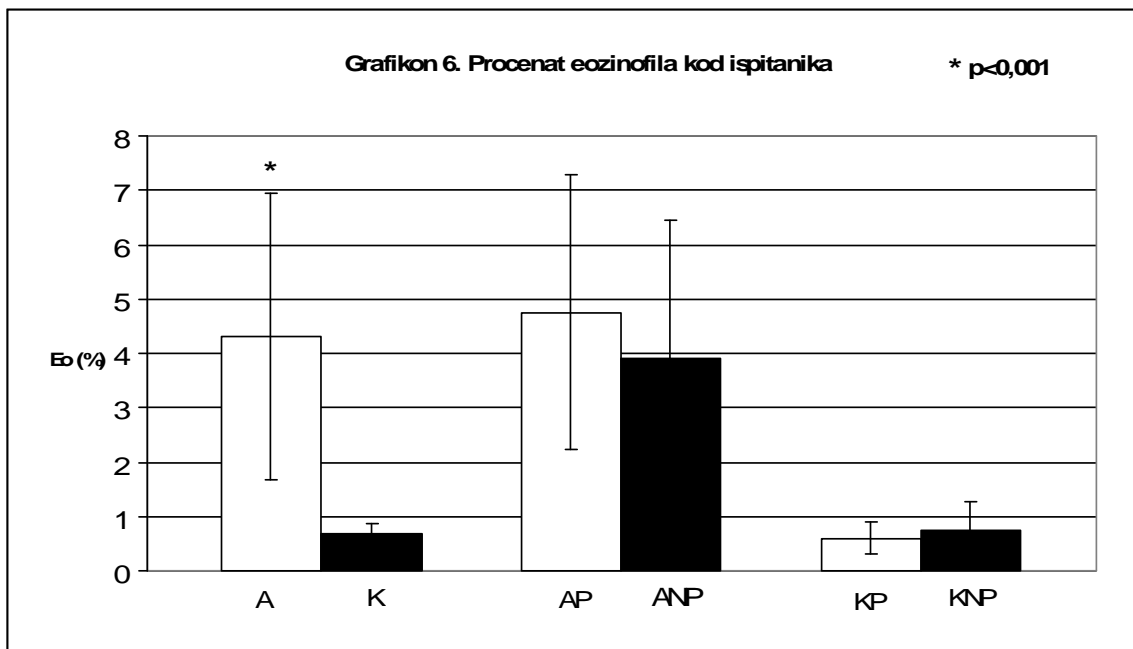
Tabela 9. Vrednost C-reaktivnog proteina u serumu ispitanika.

CRP (mg/L)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
A	80	2,67±1,68	2,49	0,20-9,09
K	30	2,40±1,49	1,90	0,50-5,13
AP	40	2,68±1,77	2,47	0,30-9,09
ANP	40	2,66±1,60	2,53	0,20-5,10
KP	15	2,31±1,45	1,80	0,63-5,03
KNP	15	2,50±1,57	2,69	0,50-5,13

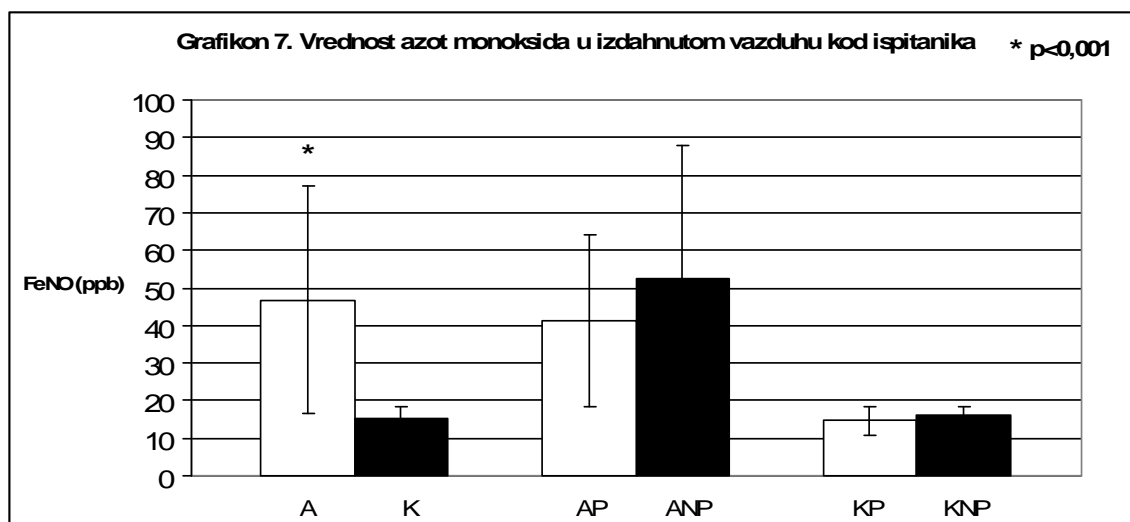
Ukupan broj leukocita u krvi u proceni eventualne stimulacije sistemske inflamacije u odgovoru na brojne inflamatorne medijatore, pokazao je veću vrednost kod astmatikara u odnosu na zdrave, ali bez statističke značajnosti. Astmatikari pasivni pušači su takođe pokazali statistički neznačajan veći broj leukocita u krvi u odnosu na one koji to nisu. Međutim zdrava deca, izložena duvanskom dimu u odnosu na one koji to nisu imaju statistički značajno veći broj leukocita u krvi u odnosu na one koji to nisu ($p < 0,05$) (grafikon 5.). Pokazalo se na osnovu dobijenih rezultata da je uticaj pasivnog pušenja na sistemsku inflamaciju značajan samo kod zdravih individua.



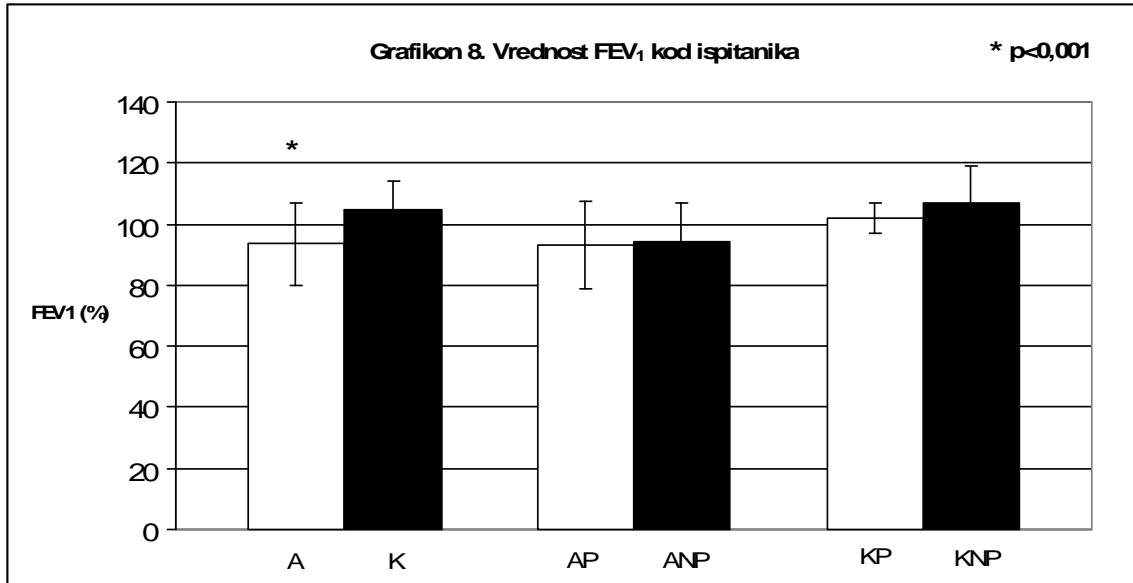
Procenat eozinofilnih elija bele loze u perifernoj krvi, odre ivan je u cilju procene stimulacije alergijskog odgovora tj. sistemske eozinofilne inflamacije. Pokazalo se da je on kod astmatičara u odnosu na kontrolu ve i, i to statistički značajno ($p < 0,001$). U grupama gde su astmatičari ili zdrava deca, pasivni puša i imaju ve i procenat eozinofila u odnosu na one koji to nisu, ali bez statističke značajnosti. Rezultati za ovaj parametar inflamacije pokazuju vezu samo sa astmom ali ne i sa pasivnim pušenjem (grafikon 6.).



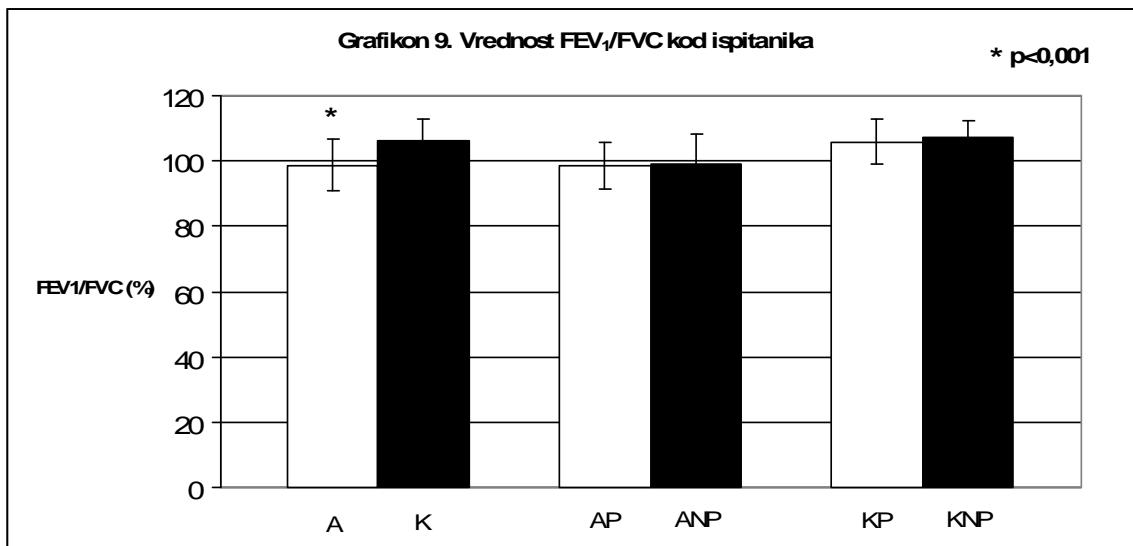
Kod astmatičara u odnosu na kontrolu dobijena je viša vrednost FeNO i to statistički značajno ($p < 0,001$). U grupi astmatičara, pasivni pušači u odnosu na one koji to nisu imaju nižu vrednost FeNO, ali statistički neznačajno. I zdrava deca koja su pasivni pušači u odnosu na one koji to nisu, imaju statistički neznačajno nižu vrednost FeNO. Rezultati ukazuju da kod astmatičara u odnosu na zdrave postoji značajno veća lokalna eozinofilna inflamacija, pa i oksidativni stres u plućima ima uzrokovan RVA ali bez značajnog dodatnog uticaja pasivnog pušenja (grafikon 7.).



Izmerena vrednost FEV_1 pokazala je značajan trend pada vrednosti kod astmatičara u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$), iako su dobijene vrednosti bile u referentnim vrednostima. U grupi gde su astmatičari pasivni pušači, takođe je izmerena niža vrednost FEV_1 ali ona nije statistički značajna. I kod zdravih ispitanika pasivni pušači imaju statistički neznačajno nižu vrednost FEV_1 . Ovaj parametar plućne funkcije potvrdio je vezu sa astmom i ne podleže uticaju pasivnog pušenja (grafikon 8.).

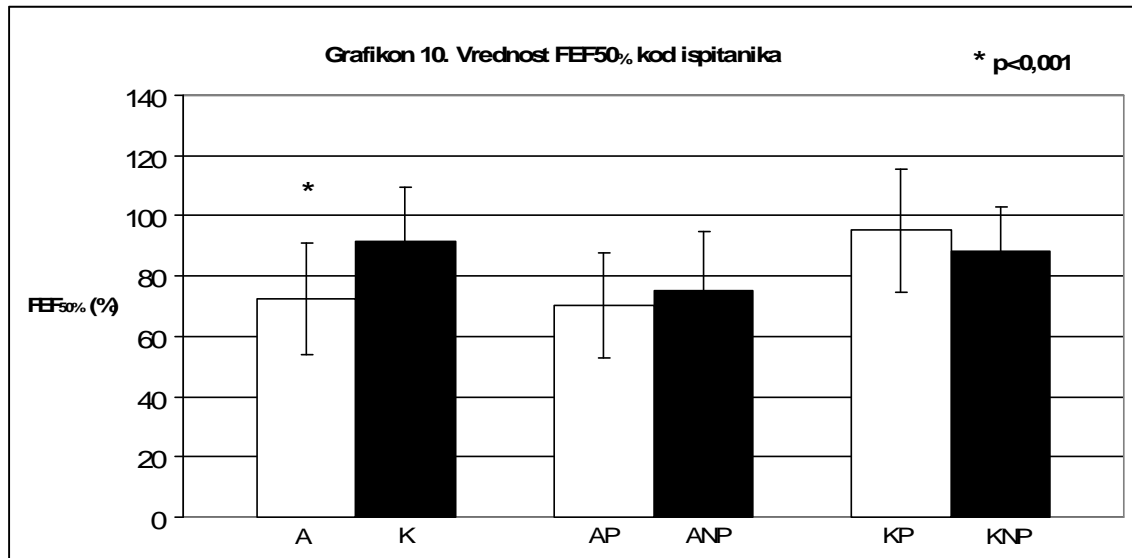


U našem ispitivanju se pokazalo da je niža vrednost FEV₁/FVC kod astmatičara u odnosu na zdrave i to statistički značajno ($p < 0,001$). U grupama gde su samo oboleli ili zdravi dobijena je niža vrednost FEV₁/FVC za pasivne pušače u odnosu na one koji to nisu ali statistički neznačajno (grafikon 9.). Uticaj pasivnog pušenja nije pokazan ni za ovaj parametar plućne funkcije.



Efekat pasivnog pušenja na funkciju malih disajnih puteva procenjen je merenjem FEF_{50%}. Ovaj parametar plućne funkcije je kod astmatičara u odnosu na kontrolu statistički

zna ajno niži ($p < 0,001$). U grupama gde su samo astmati ari ili zdravi pasivni puša i, tako e se beleže niže vrednost $FEF_{50\%}$ u odnosu na one koji to nisu ali bez statisti ke zna ajnosti. I ovaj parametar plu ne funkcije podleže uticaju bolesti dok efekat pasivnog pušenja na njega izostaje (grafikon 10.).



3. PROCENA EFEKATA PASIVNOG PUŠENJA NA OKSIDATIVNI STRES KOD ASTME U ZAVISNOSTI OD TERAPIJSKOG REŽIMA

1. Procena efekta pasivnog pušenja na ispitivane parametre oksidativnog stresa kod astme bez uticaja kortikoterapije vršena je analizom dobijenih izme u grupa AP-TH i ANP-TH.

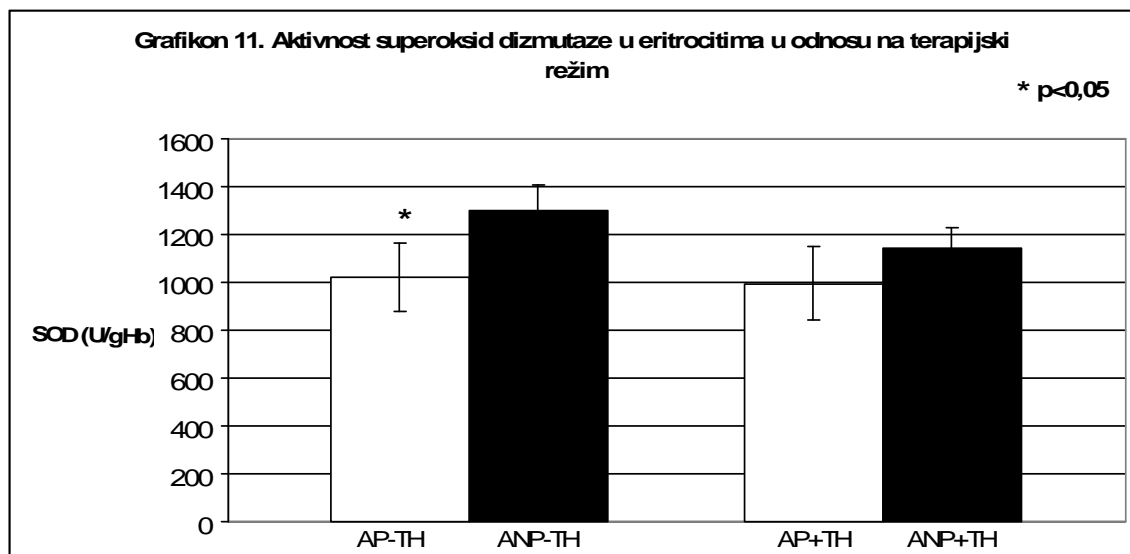
2. Procena efekta pasivnog pušenja i kortikoterapije na ispitivane parametre oksidativnog stresa u astmi vršena je analizom dobijenih podataka izme u grupa AP+TH i ANP+TH.

Kod astmatičara pasivnih pušača bez terapije u odnosu na one koji to nisu, vrednost TBARS u serumu je veća ali bez statističke značajnosti. Kod astmatičara na kortikoterapiji, iako postoji lak trend porasta vrednosti TBARS kod pasivnih pušača u odnosu na one koji to nisu, on je statistički neznačajan. Rezultati su ukazali da je

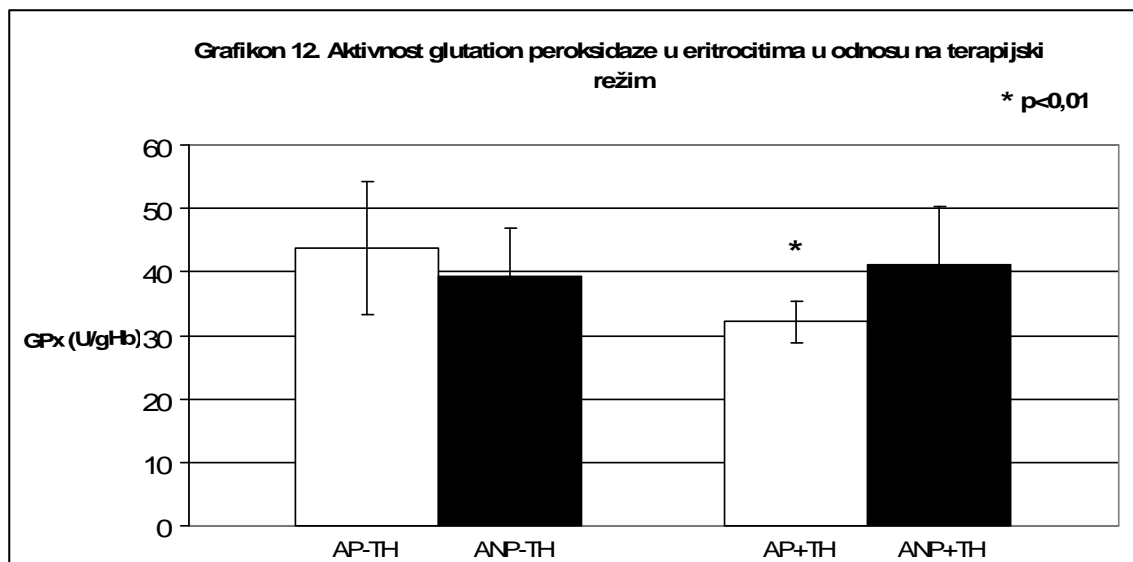
oksidativni stres nešto ve i kod ispitanika koji su pasivni puša i, on ipak nije zna ajno razli it kod pacijenata u odnosu na terapijski režim (tabela 10.).

Tabela 10. Vrednost TBARS u serumu ispitanika u odnosu na terapijski režim.				
TBARS (μmol/L)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
AP-TH	20	4,56±1,50	4,06	2,23-7,39
ANP-TH	20	4,11±3,16	2,34	0,76-11,19
AP+TH	20	3,92±0,99	4,04	2,19-5,66
ANP+TH	20	3,76±2,45	3,25	0,96-11,43

Aktivnost SOD u eritrocima kao parametra antioksidantnog statusa kod astme, je u grupi astmatičara koji su pasivni puša i bez terapije niža i to statistički zna ajno ($p < 0,05$) u odnosu na one koji nisu izloženi duvanskom dimu. Kod astmatičara koji su na kortikoterapiji, postoji tako e niža aktivnost SOD u eritrocitima kod pasivnih puša a ali je ona bez statističke zna ajnosti u odnosu na one koji to nisu (grafikon 11.).



Aktivnost GPx u eritrocitima kod astmatičara bez terapije, je ve a kod pasivnih puša a u odnosu na one koji to nisu, ali ta razlika nije statistički zna ajna. Analiza istog antioksidativnog parametra kod astmatičara koji su pasivni puša i i na kortikoterapiji, pokazuje statistički zna ajno nižu aktivnost GPx u eritrocitima ($p < 0,01$) u odnosu na one koji su na kortikoterapiji a izloženi duvanskom dimu (grafikon 12.)



Vrednost CRP kod astmatičara bez terapije, je viši kod onih koji nisu pasivni pušači i u odnosu na one koji to jesu, ali ta razlika nije statistički značajna. Kod astmatičara koji su na kortikoterapiji u odnosu na one koji to nisu, takođe je izmerena viša vrednost CRP kod pasivnih pušača, ali bez statističke značajnosti. Nije nađena povezanost kod obolelih od astme za CRP, pasivno pušenje i kortikosteroidnu terapiju (tabela 11.).

Tabela 11. Vrednost C-reaktivnog proteina u serumu ispitanika u odnosu na terapijski režim.

CRP (mg/L)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
AP-TH	20	2,56±1,61	2,30	0,30-5,00
ANP-TH	20	2,71±1,68	2,15	0,29-5,00
AP+TH	20	2,79±1,95	2,80	0,35-9,09
ANP+TH	20	2,61±1,56	2,69	0,20-5,10

Ukupan broj leukocita u krvi u grupi astmatičara bez terapije, pokazao je veći vrednost u odnosu na one koji nisu pasivni pušači, ali bez statističke značajnosti. Kod astmatičara koji su na kortikoterapiji, takođe postoji veći broj leukocita ali bez statističke značajnosti kod pasivnih pušača u odnosu na one koji to nisu. Sistemska inflamacija procenjena ukupnim brojem leukocita u krvi nije pokazala povezanost sa pasivnim pušenjem i kortikosteroidnom terapijom kod obolelih od astme (tabela 12.).

Tabela 12. Broj leukocita kod ispitanika u odnosu na terapijski režim.				
Le (G/L)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
AP-TH	20	8,48±2,12	8,65	5,20-11,80
ANP-TH	20	7,61±1,91	7,00	4,60-11,90
AP+TH	20	8,45±2,26	8,10	5,20-14,00
ANP+TH	20	8,40±1,90	8,25	4,70-11,80

Sistemska eozinofilna inflamacija tj. procenat eozinofila u perifernoj krvi kod astmatičara bez terapije a izloženim duvanskom dimu, je statistički neznačajno veći u odnosu na one koji nisu pasivni pušači. Kod astmatičara na kortikoterapiji, procenat eozinofila kod pasivnih pušača iako veći u odnosu na one koji to nisu, on nije statistički značajan. Sistemska eozinofilna inflamacija kod astmatičara nije u vezi sa pasivnim pušenjem i kortikoterapijom (tabela 13.).

Tabela 13. Procenat eozinofila kod ispitanika u odnosu na terapijski režim.				
Eo (%)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
AP-TH	20	5,45±5,91	3,00	0,00-24,00
ANP-TH	20	3,85±4,13	3,50	0,00-16,00
KP+TH	20	4,05±3,17	4,00	0,00-10,00
KNP+TH	20	3,95±5,06	1,00	0,00-18,00

Eozinofilna inflamacija pluća ili lokalni oksidativni stres uzrokovan RVA, procenjen merenjem FeNO ima trend pada kod pasivnih pušača a u odnosu na one koji to nisu, ali bez statističke značajnosti. Astmatičari na kortikoterapiji izloženi duvanskom dimu takođe pokazuju opadajući trend vrednosti FeNO u odnosu na one koji to nisu, ali je i on bez statističke značajnosti. Ispitivanje pokazuje da nema značajne povezanosti nivoa FeNO kod obolelih od astme sa pasivnim pušenjem i kortikosteroidnom terapijom (tabela 14.).

Tabela 14. Vrednost azot monoksida u izdahnutom vazduhu kod ispitanika u odnosu na terapijski režim.				
FeNO (ppb)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
AP-TH	20	51,75±24,85	55,00	21,00-111,00
ANP-TH	20	64,05±39,27	54,00	13,00-189,00
AP+TH	20	30,60±14,76	26,00	11,00-58,00
ANP+TH	20	40,55±28,01	31,00	9,00-124,00

Efekat pasivnog pušenja na plućnu funkciju astmatičara u odnosu na kortikoterapiju pokazao je sledeće rezultate.

Za FEV₁ u grupi astmatičara bez terapije, nađena je niža vrednost kod pasivnih pušača u odnosu na one koji to nisu, ali bez statističke značajnosti. U grupi astmatičara koji su na kortikoterapiji iako postoji viša vrednost FEV₁ kod pasivnih pušača u odnosu na one koji to nisu, ona nije statistički značajna (tabela 15.). Dobijeni rezultati ne ukazuju na povezanost FEV₁ kod astmatičara sa pasivnim pušenjem u odnosu na kortikoterapiju.

Tabela 15. Vrednost FEV₁ kod ispitanika u odnosu na terapijski režim.

FEV ₁ (%)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. – Maks.
AP-TH	20	92,90±13,28	94,50	66,00-131,00
ANP-TH	20	96,85±14,42	93,00	75,00-128,00
AP+TH	20	93,05±15,75	95,00	62,00-122,00
ANP+TH	20	91,50±11,07	89,00	69,00-116,00

U grupi astmatičara bez terapije, izmerena je statistički neznačajno niža vrednost FEV₁/FVC kod pasivnih pušača u odnosu na one koji to nisu. Kod astmatičara na kortikoterapiji izmerena je takođe statistički neznajno viša vrednost FEV₁/FVC kod onih koji su pasivni pušači u odnosu na one koji to nisu. Pasivno pušenje u odnosu na kortikoterapiju kod astmatičara nije pokazalo značajnu povezanost sa ovim parametrom plućne funkcije (tabela 16.).

Tabela 16. Vrednost FEV₁/FVC kod ispitanika u odnosu na terapijski režim.

FEV ₁ /FVC (%)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. – Maks.
AP-TH	20	98,35±5,77	97,00	89,00-111,00
ANP-TH	20	99,40±10,77	101,00	67,00-114,00
AP+TH	20	98,80±8,13	99,00	82,00-115,00
ANP+TH	20	98,45±7,41	100,00	85,00-109,00

Procenjena funkcija malih disajnih puteva tj. FEF_{50%} kod astmatičara bez i na kortikoterapiji, pokazala je nižu statistički neznajnu vrednost kod pasivnih pušača, u odnosu na one koji to nisu. I za ovaj parametar se kod astmatičara ne beleži povezanost sa pasivnim pušenjem u odnosu na kortikoterapiju (tabela 17.).

Tabela 17. Vrednost FEF ₅₀ % kod ispitanika u odnosu na terapijski režim.				
FEF₅₀% (%)	N	Sr. vr. ± SD	Medijana	Min. - Maks.
AP-TH	20	70,30±16,04	69,50	47,00-106,00
ANP-TH	20	77,65±23,19	72,00	41,00-137,00
AP+TH	20	69,70±18,67	65,00	40,00-103,00
ANP+TH	20	72,35±15,26	73,00	52,00-105,00

4. PROCENA POVEZANOSTI I UTICAJA DOPUNSKIH FAKTORA RIZIKA NA RAZVOJ ASTME, ZAVISNO OD PASIVNOG PUŠENJA I TERAPIJSKOG REŽIMA

1. Procena povezanosti dopunskih faktora rizika (pol, uzrast, poro ajne mere, tip poro aja, redosled ro enja deteta, starost porodilje, dojenje, broj senzibilizacija deteta, pojava ekcema, alergijskog rinitisa i vizinga, broj uku ana, veli ina stambene površine, mesto stanovanja, na in grejanja stana, prisustvo ku nog ljubimca, broj popušenih cigareta u stanu u toku dana, dužina puša kog staža majke, pušenje majke tokom trudno e, pušenje oca, edukacija roditelja, dužina radnog vremena majke, atopijski status roditelja) sa astmom u odnosu na kontrolnu zdravu grupu dece, pasivno pušenje i terapijski režim vršena je analizom podataka izme u grupa: A i K, AP i ANP, kao i A+TH i A-TH.

2. Procena uticaja istih dopunskih faktora rizika na razvoj astme zavisno od pasivnog pušenja i terapijskog režima, vršena je analizom podataka izme u grupa AP i ANP kao i A+TH i A-TH.

Procena povezanosti dopunskih faktora rizika sa astmom u odnosu na kontrolnu grupu, pokazala je statisti ku zna ajnost kod astmatičara za ve i broj senzitivizacija ($p < 0,001$), pojavu ekcema ($p < 0,001$), alergijskog rinitisa ($p < 0,001$) i vizinga ($p < 0,001$), što je potvrdilo njihov doprinos u etiopatogenezi ove bolesti (tabela. 18.).

Procena povezanosti dopunskih faktora sa astmom u odnosu na pasivno pušenje, pokazala je statisti ki zna ajnu povezanost kod dece sa astmom koja su pasivni puša i, za niži stepen edukacije majki ($p < 0,01$) i kra e radno vreme majke ($p < 0,01$) uz prisustvo puša a u ku i, ve i broj dnevno popušenih cigareta u ku i, ve i broj dnevno popušenih cigareta od strane majke, ve u dužinu puša kog staža majke ($p < 0,001$). Deca iz ANP grupe

pokazalo se da značajno više žive u stanovima veće površine ($p<0,05$) (tababela 19.).

Procena povezanosti dopunskih faktora rizika sa astmom u odnosu na terapijski režim, pokazala je da su astmatičari bez kortikosteroidne terapije, statistički značajno veće porođajne mase ($p<0,01$) i dužine na rođenju ($p<0,05$), dok je srednji broj senzitivizacija statistički značajno veći u grupi kod astmatičara na kortikosteroidnoj terapiji ($p<0,05$) (tababela 20.).

Na osnovu prikaza frekvencija i procenta zastupljenosti dopunskih atributivnih faktora rizika i uticaja na razvoj astme zavisno od pasivnog pušenja, pokazalo se da je u grupi AP statistički značajno više dece koja su prvorođena ($p<0,05$), a da je pojava ekcema u prvoj godini života statistički značajno veća u ANP grupi ($p<0,05$). Pored toga u porodicama roditelja pušača, prvorođena deca imaju 2,85 puta veću verovatnoću da dobiju astmu (tabela 21.).

Na osnovu prikaza frekvencija i procenta zastupljenosti dopunskih atributivnih faktora rizika i njihovih mogućih uticaja na razvoj astme, zavisno od terapijskog režima, pokazalo se da je senzitivizacija na tri i više alergena, statistički značajno veća u grupi A+TH ($p<0,01$) i da ta deca imaju 4,33 puta veću verovatnoću da imaju astmu koja zahteva kortikosteroidnu preventivnu terapiju (tabela 22.).

Tabela 18. Procena povezanosti dopunskih faktora sa astmom u odnosu na kontrolnu grupu

	A (80)		Kontrola (30)			Ukupno (110)			
	X±	SD	Me	X±	SD	Me	X±	SD	Me
PM (g)	3467,88±	439,42	3450,0	3300,33±	506,38	3475,0	3422,18±	462,37	3450,0
PD (cm)	52,19±	1,90	52,0	52,10±	2,44	52,0	52,16±	2,05	52,0
Srednji broj senzibilizacija	2,79±	1,69*	2,0	0,00±	0,00	0,0	2,03±	1,90	2,0
Dužina dojenja (meseći)	7,48±	6,09	6,0	7,17±	8,00	5,5	7,39±	6,63	6,0
Vreme pojave ekcema (meseći)	10,34±	22,94*	0,0	0,00±	0,00	0,0	7,52±	20,07	0,0
Vreme pojave alergijske kijavice (meseći)	46,20±	44,08*	36,0	0,00±	0,00	0,0	33,60±	42,85	0,0
Vreme pojave vizinga (meseći)	42,76±	38,29*	36,0	4,90±	10,58	0,0	32,44±	37,14	24,0
Starost porodilje (godine)	26,34±	4,65	25,0	26,14±	5,26	25,0	26,28±	4,79	25,0
Ukupan broj uku ana	4,36±	1,07	4,0	4,23±	1,01	4,0	4,33±	1,05	4,0
Površina stana (m ²)	80,83±	30,71	80,0	83,03±	30,67	80,0	81,43±	30,57	80,0
Broj puša u ku i	0,73±	0,83	0,5	0,80±	0,92	0,5	0,75±	0,85	0,5
Broj popušanih cigareta za 24h u ku i	12,93±	15,54	3,0	14,33±	17,55	6,0	13,31±	16,04	3,0
Broj popušanih cigareta majke za 24h u ku i	4,84±	7,55	0,0	3,77±	7,15	0,0	4,55±	7,43	0,0
Dužina puša kog staža majke (godine)	4,65±	6,99	0,0	4,83±	7,87	0,0	4,70±	7,21	0,0
Stepen edukacije majke (broj godina)	12,03±	1,49	12,0	11,57±	2,06	12,0	11,90±	1,67	12,0
Stepen edukacije oca (broj godina)	11,68±	1,95	12,0	11,27±	1,96	12,0	11,56±	1,95	12,0
Radno vreme majke (broj sati dnevno)	4,03±	4,37	0,0	3,83±	4,33	0,0	3,97±	4,34	0,0
Radno vreme oca (broj sati dnevno)	6,23±	4,32	8,0	7,47±	4,17	8,0	6,56±	4,29	8,0
Muški pol	26,16±	4,92	25,0	26,87±	4,00	26,0	26,38±	4,61	25,0
Ženski pol	26,46±	4,51	26,0	25,36±	6,40	23,5	26,21±	4,96	25,0

* – p<0,001

Tabela 19. Povezanosti dopunskih faktora sa astmom u odnosu na pasivno pušenje

	AP (40)			ANP (40)			Ukupno (80)		
	X±	SD	Me	X±	SD	Me	X±	SD	Me
PM (g)	3429,50±	347,71	3425,0	3506,25±	516,92	3575,0	3467,88±	439,42	3450,0
PD (cm)	52,25±	1,53	52,0	52,13±	2,23	52,0	52,19±	1,90	52,0
Srednji broj senzibilizacija	2,83±	1,81	2,0	2,75±	1,58	2,0	2,79±	1,69	2,0
Dužina Dojenja (meseći)	6,80±	5,83	6,0	8,15±	6,35	6,0	7,48±	6,09	6,0
Vreme pojave ekcema (meseći)	11,00±	24,88	0,5	9,68±	21,12	0,0	10,34±	22,94	0,0
Vreme pojave alergijske kijavice (meseći)	39,60±	40,60	24,0	52,80±	46,89	54,0	46,20±	44,08	36,0
Vreme pojave vizinga (meseći)	39,80±	36,56	30,0	45,73±	40,19	36,0	42,76±	38,29	36,0
Starost Porodilje (godine)	26,35±	4,58	26,0	26,33±	4,77	25,0	26,34±	4,65	25,0
Ukupan broj uku ana	4,28±	0,96	4,0	4,45±	1,18	4,0	4,36±	1,07	4,0
Površina Stana (m ²)	73,05±	23,93	70,0	88,60±	34,84*	80,0	80,83±	30,71	80,0
Broj puša a u ku i	1,45±	0,55***	1,0	0,00±	0,00	0,0	0,73±	0,83	0,5
Broj popušenih cigareta za 24h u ku i	25,85±	12,11***	20,0	0,00±	0,00	0,0	12,93±	15,54	3,0
Broj popušenih cigareta majke za 24h	9,68±	8,21***	10,0	0,00±	0,00	0,0	4,84±	7,55	0,0
Dužina Puša kog staža majke (godine)	9,30±	7,40***	10,0	0,00±	0,00	0,0	4,65±	6,99	0,0
Stepen edukacije majke (godine)	11,60±	1,46**	12,0	12,45±	1,41	12,0	12,03±	1,49	12,0
Stepen edukacije oca (godine)	11,53±	2,31	12,0	11,83±	1,52	12,0	11,68±	1,95	12,0
Radno vreme majke (broj sati dnevno)	2,65±	3,93**	0,0	5,40±	4,40	8,0	4,03±	4,37	0,0
Radno vreme oca (broj sati dnevno)	6,50±	3,99	8,0	5,95±	4,65	8,0	6,23±	4,32	8,0
Muški pol	26,54±	4,53	26,0	26,36±	4,58	25,5	26,46±	4,51	26,0
Ženski pol	26,00±	4,84	25,0	26,28±	5,12	25,0	26,16±	4,92	25,0

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Tabela 20. Povezanosti dopunskih faktora sa astmom u odnosu na terapijski režim

	A+TH (40)			A-TH (40)			Ukupno (80)		
	X±	SD	Me	X±	SD	Me	X±	SD	Me
PM (g)	3338,00±	436,64	3275,0	3597,75±	407,27 ^{**}	3600,0	3467,88±	439,42	3450,0
PD (cm)	51,68±	2,08	52,0	52,70±	1,57 [*]	52,5	52,19±	1,90	52,0
Srednji Broj senzibilizacija	3,30±	1,79 [*]	3,0	2,28±	1,43	2,0	2,79±	1,69	2,0
Dužina dojenja (meseći)	6,90±	5,76	6,0	8,05±	6,43	6,0	7,48±	6,09	6,0
Vreme pojave ekcema (meseći)	7,35±	14,67	1,0	13,33±	28,85	0,0	10,34±	22,94	0,0
Vreme pojave alergijske kijavice (meseći)	0,05±	0,22	0,0	0,03±	0,16	0,0	0,04±	0,19	0,0
Vreme pojave vizinga (meseći)	0,35±	0,48	0,0	0,25±	0,44	0,0	0,30±	0,46	0,0
Starost porodilje (godine)	27,13±	4,85	26,0	25,55±	4,35	24,0	26,34±	4,65	25,0
Ukupan broj uku ana	4,35±	1,17	4,0	4,38±	0,98	4,0	4,36±	1,07	4,0
Površina stana (m ²)	77,23±	26,34	73,0	84,43±	34,50	80,0	80,83±	30,71	80,0
Broj puša a u ku i	0,70±	0,79	0,5	0,75±	0,87	0,5	0,73±	0,83	0,5
Broj popušenih cigareta za 24h u ku i	12,88±	14,63	5,0	12,98±	16,59	3,0	12,93±	15,54	3,0
Broj popušenih cigareta majke za 24h u ku i	4,63±	7,71	0,0	5,05±	7,48	0,0	4,84±	7,55	0,0
Dužina puša kog staža majke (godine)	4,35±	6,99	0,0	4,95±	7,07	0,0	4,65±	6,99	0,0
Stepen edukacije majke (godine)	12,00±	1,57	12,0	12,05±	1,43	12,0	12,03±	1,49	12,0
Stepen edukacije oca (godine)	11,48±	2,47	12,0	11,88±	1,22	12,0	11,68±	1,95	12,0
Radno vreme majke (broj sati dnevno)	4,10±	4,48	0,0	3,95±	4,31	0,0	4,03±	4,37	0,0
Radno vreme oca (broj sati dnevno)	6,80±	4,20	8,0	5,65±	4,41	8,0	6,23±	4,32	8,0
Muški pol	27,19±	4,88	26,0	25,89±	4,19	25,0	26,46±	4,51	26,0
Ženski pol	27,05±	4,95	25,0	24,85±	4,76	23,0	26,16±	4,92	25,0

* – p<0,05, ** – p<0,01

Tabela 21. U estalost dopunskih faktora i njihov uticaj na razvoj astme zavisno od pasivnog pušenja

	AP		ANP		χ^2 (M-H)	OR	95% CI					
	DA	NE	DA	NE								
Prvorono dete	*28	70,0%	12	30,0%	18	45,0%	22	55,0%	5,05	2,85	1,03	7,97
Rođenje carski rezom	2	5,0%	38	95,0%	1	2,5%	39	97,5%	0,34	2,05	0,14	59,84
Nedonošenje	8	20,0%	32	80,0%	5	12,5%	35	87,5%	0,82	1,75	0,45	6,98
Pušenje trudnice	**19	47,5%	21	52,5%	0	0,0%	40	100,0%	24,61			
Majka atopičar	10	25,0%	30	75,0%	12	30,0%	28	70,0%	0,25	0,78	0,26	2,32
Otac atopičar	16	40,0%	24	60,0%	13	32,5%	27	67,5%	0,48	1,38	0,50	3,82
Kući ljubimac	15	37,5%	25	62,5%	23	57,5%	17	42,5%	3,17	0,44	0,16	1,19
Alergijski rinitis u 1. god.	1	2,5%	39	97,5%	2	5,0%	38	95,0%	0,34	0,49	0,02	7,30
Ekcem u prvoj godini	12	30,0%	28	70,0%	*21	52,5%	19	47,5%	4,13	0,39	0,14	1,07
Viziting u prvoj godini	12	30,0%	28	70,0%	12	30,0%	28	70,0%	0,00	1,00	0,35	2,89
Senzibilizacija na grinje	36	90,0%	4	10,0%	38	95,0%	2	5,0%	0,18	0,47	0,06	3,28
Senzibiliz. na ≥ 3 alerg.	19	47,5%	21	52,5%	19	47,5%	21	52,5%	0,00	1,00	0,38	2,64
Drugi puša u kući	3	7,5%	37	92,5%	0	0,0%	40	100,0%	3,08			
Grejanje na drva	24	60,0%	16	40,0%	27	67,5%	13	32,5%	0,48	0,72	0,26	1,99
Nepotpuna porodica	5	12,5%	35	87,5%	2	5,0%	38	95,0%	1,39	2,71	0,42	21,77
Muški pol	26	65,0%	14	35,0%	22	55,0%	18	45,0%	0,82	1,52	0,56	4,13
Život u gradu	25	62,5%	15	37,5%	19	47,5%	21	52,5%	1,80	1,84	0,69	4,97
Otac puša	**27	67,5%	13	32,5%	0	0,0%	40	100,0%	40,25			

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

Tabela 22. U estalost dopunskih faktora i njihov uticaj na razvoj astme zavisno od terapijskog režima

	A+TH		A-TH		χ^2 (M-H)	OR	95% CI					
	DA	NE	DA	NE								
Prvorono dete	22	55,0%	18	45,0%	24	60,0%	16	40,0%	0,20	0,81	0,30	2,17
Rođenje carski rezom	2	5,0%	38	95,0%	1	2,5%	39	97,5%	0,34	2,05	0,14	59,84
Nedonošenje	7	17,5%	33	82,5%	6	15,0%	34	85,0%	0,09	1,20	0,32	4,60
Pušenje trudnice	6	15,0%	34	85,0%	13	32,5%	27	67,5%	3,34	0,37	0,11	1,22
Majka atopičar	14	35,0%	26	65,0%	8	20,0%	32	80,0%	2,23	2,15	0,70	6,70
Otac atopičar	11	27,5%	29	72,5%	18	45,0%	22	55,0%	2,62	0,46	0,16	1,30
Kući ljubimac	16	40,0%	24	60,0%	22	55,0%	18	45,0%	1,78	0,55	0,20	1,45
Alergijski rinitis u 1. god.	2	5,0%	38	95,0%	1	2,5%	39	97,5%	0,34	2,05	0,14	59,84
Ekcem u prvoj godini	18	45,0%	22	55,0%	15	37,5%	25	62,5%	0,46	1,36	0,51	3,67
Viziting u prvoj godini	14	35,0%	26	65,0%	10	25,0%	30	75,0%	0,94	1,62	0,55	4,75
Senzibilizacija na grinje	36	90,0%	4	10,0%	38	95,0%	2	5,0%	0,71	0,47	0,06	3,29
Senzibiliz. na ≥ 3 alerg.	**26	65,0%	14	35,0%	12	30,0%	28	70,0%	9,70	4,33	1,54	12,44
Drugi puša u kući	1	2,5%	39	97,5%	2	5,0%	38	95,0%	0,34	0,49	0,02	7,30
Grejanje na drva	24	60,0%	16	40,0%	27	67,5%	13	32,5%	0,48	0,72	0,26	1,99
Nepotpuna porodica	4	10,0%	36	90,0%	3	7,5%	37	92,5%	0,15	1,37	0,24	8,43
Muški pol	21	52,5%	19	47,5%	27	67,5%	13	32,5%	1,85	0,53	0,19	1,45
Život u gradu	22	55,0%	18	45,0%	22	55,0%	18	45,0%	0,00	1,00	0,38	2,65
Otac puša	16	40,0%	24	60,0%	11	27,5%	29	72,5%	1,38	1,76	0,62	5,01

** – $p < 0,01$

VI DISKUSIJA

Sve se više spekuliše da je visoka prevalencija astme posledica delovanja brojnih faktora iz spoljašnje sredine, poput izlaganja duvanskom dimu i drugim aerorozagadjiva ima, ishrane sa malo antioksidanasa (npr. vitamin E) i puno masti i proteina, pre- i peri-natalno izlaganje snažnim oksidativnim stimulusima (npr. Paracetamol) i infekcije specifičnim respiratornim virusima. Smatra se da ovi faktori aktivacijom lokalnih tkivno specifičnih operativnih gena demaskiraju preegzistiraju u osetljivost za ovu bolest i na taj način utiču na njen razvoj (95). Kako se plućni razvoj odvija tokom dužeg vremenskog perioda, mnogo je prozora tj. prilika za štetan efekat ovih faktora. Ovi efekti su veoma različiti i zavise od dužine delovanja ali i trenutne razvojne faze respiratornog sistema u trenutku njihovog delovanja. Kada deluju tokom ranog plućnog razvoja štetan efekat je irverzibilan i perzistira u odraslom dobu (96).

Na osnovu ovakvih spekulacija i različitih rezultata brojnih studija, odlučili smo da u našoj studiji ispitamo kakav efekat ima pasivno pušenje na astmu indirektnom procenom statusa inflamacije disajnih puteva preko oksidativnog stresa kao ključnog patogenetskog mehanizma ove bolesti.

Analiza svih demografskih podataka u našem ispitivanju, ukazuju na koheretnost ispitivanih grupa. Između poređenih grupa (u odnosu na bolest, pasivno pušenje i terapijski režim), ne postoje statistički značajne razlike sledećih ispitanih podataka: pol, srednji uzrast, telesna masa i visina, mesto stanovanja, način grejanja i broj popušanih cigareta od strane roditelja u toku dana. Između poređenih grupa dece sa astmom, nije nađena statistički značajna razlika u težini bolesti, a kod onih koji su na terapiji, nema značajne razlike u primenjenoj dozi inhalatornih kortikosteroida, izraženoj u vidu ekvivalentne doze Beklometazon dipropionata. Dobijeni rezultati su nam omogućili ili dalje adekvatno sagledavanje parametara oksidativnog stresa kod obolelih od astme (tabela 6.).

1. PROCENA PASIVNOG PUŠENJA

Izlaganje dece duvanskom dimu je univerzalni problem, zbog pušenja odraslih na mestima gde ona borave. Procenjuje se da je oko 50% dece u različitim delovima sveta,

nezavisno od uzrasta izloženo duvanskom dimu (Honk Kong 53,1%, Amerika oko 50%, Engleska 42%, Škotska 60%) (73). Pušenje majke predstavlja najveći i izvor duvanskog dima tokom fetalnog i ranog razvojnog perioda deteta, a kasnije kako deca rastu izlaganje drugim izvorima duvanskog dima postaje veće (72, 73). Stepen izloženosti duvanskom dimu, zavisi od broja pušača, količine dima, veličine i ventilacionih karakteristika ambijenta i trajanja izlaganja (73).

Kako koncentraciju duvanskog dima u zatvorenom prostoru ili procenu izlaganja svim njegovim sastojcima, zbog njegovog kompleksnog i promenljivog sastava nije moguće direktno izmeriti, za tu svrhu se koriste dva različita indirektna načina. Prvi način uključuje upitnik sa podacima o pušačkim navikama ljudi u sredini gde provode vreme a drugi merenje komponenti duvanskog dima ili njegovih metabolita u uzorku vazduha, serumu, salivi, urinu i dlaci ispitanika (nikotin, kotinin, CO, karboksihemoglobin i tiocijanat jon) (82, 83). Informacije iz upitnika o navikama pušenja roditelja daju validniju procenu za srednju dužinu pasivnog pušenja, dok merenje kotinina u urinu s obzirom da je njegov poluživot kratak kod dece (6-54 sati) odražava samo kratkotrajno izlaganje duvanskom dimu (74, 97). Iako stepen metabolizma kotinina može individualno da varira, pokazano je da on ipak bolje koreliše sa prisustvom aktuelne bolesti kod dece, u odnosu na podatke procenjene upitnikom (85).

Analiza naših rezultata prvo je bazirana proceni izloženosti duvanskom dimu ispitivanih podgrupa kvalitativnim određivanjem nivoa kotinina u serumu, u odnosu na postojanje bolesti i primenjenu terapiju. Rezultati su potvrdili i isključili heteroanamnestičke podatke za izloženost duvanskom dimu u 100% ispitivanih slučajeva (samo je jedan ispitanik imao vrednost jako blizu pozitivne) ali bez preciziranja kvantitativne vrednosti kotinina u serumu (tabela 7.).

Nedavno je u jednoj studiji kod nepušača je kvalitativno određivanje kotinina u urinu pokazalo pozitivnost u 50-70% slučajeva i prouzrokovalo teško tumačenje rezultata. Ovakav nalaz može imati višestruko značenje: ili da postoji opšte izlaganje nepušača velikoj količini duvanskog dima pa se oni zbog toga mogu lažno svrstati u pušače iako to nisu ili da test nije lažno negativan već da se zaista radi o pušaču koji ne priznaje da to jesu kao i da je konzumiranje neke hrane (krompir, plavi patližan) pre samog ispitivanja možda povećalo njegov nivo do pozitivnosti (86). Da bi se to

izbeglo u našem istraživanju je za procenu izloženosti duvanskom dimu korišćen je kao dopunski kvantitativni parametar nivo COHb u venskoj krvi. Rezultati su pokazali da astmatičari imaju statistički značajno višu vrednost COHb u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) (grafikon 1.). Takav je u skladu sa nalazima Zaslau i saradnika (2002) koji nalaze povišen nivo COHb kod inflamatornih bolesti pluća uključujući i astmu, pneumonije i idiopatsku fibrozu pluća koji se redukuje nakon primene antiinflamatorne terapije. Pored toga, isti autori nalaze i dobru korelaciju nivoa COHb sa nivoom izdahnutog CO, kao lokalnim markerom oksidativnog stresa u plućima i smatraju da ga on može zameniti u proceni stepena inflamacije disajnih puteva (98).

Međutim, kod obolelih od astme zavisno od pasivnog pušenja i kortikoterapije u našem ispitivanju nema značajne razlike u nivou COHb. Međutim, kao je kod zdrave dece koja su izložena duvanskom dimu utvrđena statistički značajno viša vrednost COHb u krvi u odnosu na one koji nisu pasivni pušači ($p < 0,001$) (tabela 8.), to je ukazalo da pasivno pušenje nije jedini razlog za njegovu povišenu vrednost. Najverovatnije da su na ovakav nalaz imali uticaja grejanje na ugljen i drva, život ili boravak u sredini sa veštačkim saobraćajnim zagađenjem tj. gradovima koje se ne razlikuje statistički između ovih grupa ali se ipak nešto beleži kod pasivnih pušača (tabela 6.). U prilog ovoj spekulaciji su nalazi Vazquez i saradnika (1997) jer pokazuju da deca koja žive u kući sa pušačima ili gde se greje na drva, ugljen ili gas imaju veće vrednosti COHb u krvi u odnosu na one koji se greju na struju (99). A studija Estrella i saradnika (2005) nalazi da deca imaju veće vrednosti COHb u krvi ukoliko žive u blizini veštačkog saobraćajnog aerozagađenja (100). Na osnovu ovih rezultata zaključili smo da nivo COHb u krvi nije adekvatan parametar za procenu izloženosti duvanskom dimu. Zbog toga je za naše ispitivanje dalja analiza ispitivanih parametara vršena samo na osnovu kvalitativnog testa za kotinin.

2. ASTMA, OKSIDATIVNI STRES I PASIVNO PUŠENJE

2.1. Astma i oksidativni stres

Astma je hronična inflamatorna bolest disajnih puteva, za koju je jasno da je inflamacija definisana i izmenama u redoksu. Utvrđeno je da su redoks posredovane post-transkripcione modifikacije koje dovode do promena u strukturi i funkciji proteina, prisutne čak i kod blage dobro kontrolisane astme. Ove abnormalnosti u redoksu se

povećavaju tokom egzacerbacije u odgovoru na infekcije, izlaganje oksidativnim polutantima ili alergenskim trigerima kod atopičara (16).

Astmatičari u odnosu na zdrave imaju povećanu produkciju RVK od strane makrofaga, eozinofila, neutrofila, monocita i bronhijalnih epitelnih ćelija (19). Veoma bitne ćelije za inflamaciju u astmi kao što su eozinofili, neutrofil i monociti imaju važnu ulogu i u oksidativnom stresu astme zbog velikog potencijala da produkuju O_2^- i druge RVK u perifernoj krvi (19, 16, 101). Veliki porast nivoa mnogih markera oksidativnog stresa (O_2^- , MDA, TBARS i H_2O_2) nalazi se u urinu, plazmi, sputumu, BAL i plućnom tkivu pacijenata sa astmom. Njihov nivo je često obrnuto povezan sa težinom i stepenom stabilnosti bolesti (37). Uz porast peroksidacionih produkata u plućima, krvi i urinu kod astmatičara, postoji i povećanje H_2O_2 , 8-izoprostana i CO u izdahnutom vazduhu i povećana inicijalna aktivnost GPx i SOD u epitelnim ćelijama pluća (102). Kod dece sa astmom utvrđen je povezan oksidativni stres ne samo u ćelijama plućnog tkiva već i u cirkulaciji (33, 40).

Primarna posledica oksidativnog stresa je lipidna peroksidacija koja uz krajnje produkte ovog procesa (MDA, TBARS, 4-HNE, F2-izoprostani) povećava dalje patološke efekte (19). Povišeni nivoi MDA i TBARS detektovani su u urinu, plazmi, sputumu i BAL kod astmatičara i u vezi su sa težinom bolesti i FEV_1 (16). Kod odraslih i dece sa stabilnom astmom i u akutnom napadu u jednoj studiji, u kondenzatu izdahnutog vazduha i plazmi na koja je povišena vrednost MDA koja se smanjuje na primenu kortikosteroidne terapije (47). Povećan oksidativni stres procenjen srednjim nivoom MDA u krvi kod 42 dece sa astmom i 20 zdrave dece, potvrdio je da je on značajno veći kod bolesnih u odnosu na zdrave (46). I Babusikova i saradnici (2009) kod dece sa astmom nalaze značajno povećan nivo TBARS koji je još veći u egzacerbaciji nego u stabilnoj fazi bolesti (103). I naše ispitivanje je utvrdilo da u određenoj uzrastu kod pacijenata sa stabilnom astmom u odnosu na zdrave postoji povećanje nivoa prooksidativnih produkata (TBARS) ($p < 0.001$) (grafikon 2.).

Pluća poseduju adekvatan zaštitni kapacitet protiv uticaja egzogenog kiseonika i RVK: mucin, GSH, albumin, transferrin, feritin, ceruloplazmin, laktoferin, metalotionin, antioksidativni enzimi, hidrosolubilne i liposolubilne vitamine (26). Kada se balans

izme u nivoa reaktivnih vrsta i ove antioksidatne odbrane naruši u korist reaktivnih vrsta, to onda prouzrokuje oksidatno posredovana ošte enja (16).

U brojnim studijama je potvr eno da takav poreme aj postoji u astmi. Sa povišenim nivoom produkata lipidne peroksidacije ilustrovano je da je kod astme antioksidatni kapacitet plazme smanjen (37). Kod astmatičara Stone i saradnici (1989) nalaze na površini epitela pluća niske koncentracije askorbinske kiseline i alfa-tokoferola, uz paralelno povećanje koncentracije oksidisanog glutationa (33). Kod dece sa atopijskom astmom u odnosu na zdrave, na en je zna ajno niži nivo antioksidanta alfa-karotena u serumu (104).

Mnoge kontrolisane studije ukazuju da je kod astmatičara ošte ena aktivacija enzimskih puteva u plućima ili cirkulaciji koja služi da zaštiti elije pluća od oksidantasa (33). U akutnom astmatskom odgovoru kod atopijske astme, gubitak aktivnosti SOD je rapidan unutar par minuta i u relaciji je sa dvostrukim stvaranjem O_2^- nakon provokacije antigenom tj. pokazuje korelaciju sa stepenom reaktivnosti disajnih puteva (43). Gubitak aktivnosti SOD u cirkulaciji kod astmatičara pokazano je da koreliše i sa plućnom funkcijom i da je karakteristi an samo za astmu a ne i HOBP (16). I u stabilnoj astmi u odnosu na zdrave je pokazano da je aktivnost CuZnSOD u disajnim putevima niža kod onih koji su bez kortikosteroidne terapije (41). Combhair i saradnici (2005) kod odraslih astmatičara nalaze tako e nižu aktivnost SOD u serumu ali bez promene u aktivnosti GPx (105). osi (2005) kod odraslih astmatičara u serumu, nalazi porast lipidnih peroksida (TBARS) uz smanjenje aktivnosti SOD a povećanje aktivnosti GPx i katalaze u eritrocitima (106). U našem ispitivanju aktivnost SOD je bila zna ajno niža kod astmatičara u odnosu na zdravu decu (grafikon 3.).

Me utim, postoje i radovi koji ukazuju da je u serumu snižena aktivnost CuZnSOD a da u eritrocitima periferne krvi astmatičara aktivnost SOD ima tendenciju porasta, a (106, 107). Kod dece sa astmom je na ena povećana aktivnost SOD i u eritrocitima i serumu (108). Merenje aktivnosti CuZnSOD, MnSOD i katalaze u mononuklearnim elijama periferne krvi kod 28 dece sa stabilnom astmom (11 sa blagom perzistentnom and 17 sa srednje teškom perzistentnom astmom) i 12 zdrave dece, pokazalo je pove anu aktivnost CuZnSOD u krvi ali bez izmena u aktivnosti MnSOD i katalaze izme u ispitivanih grupa (109). U jednoj studiji kod dece aktivnost SOD u eritrocitima je

bila slična kod astmatičara i zdravih (23). Značajna razlika u aktivnosti SOD u eritrocitima ni u studiji koja je ispitala odrasle astmatičare i zdrave nije potvrđena ($p > 0.05$) (34).

Spekuliše se da gubitak antioksidativne aktivnosti SOD, koji se javlja u disajnim putevima astmatičara, može biti povezan i sa strukturom samog enzima i njegovom funkcijom i/ili njegovom različitom intracelularnom lokalizacijom (16). Evaluacija antioksidativnog kapaciteta u serumu kod dece sa astmom i antioksidativnog statusa u eritrocitima periferne krvi kod odraslih astmatičara međutim, pokazuje da gubitak aktivnosti SOD, može nastati i zbog toga što ona sama može biti modulirana kiseonikom i azotnim reaktivnim vrstama, posebno od strane snažnog peroksinitrita koji može da je inaktivira (45), što bi išlo u prilog našem nalazu. Pored toga, spekuliše se da i smanjen unos Mn, Cu i Zn koje su komponente ovog antioksidativnog enzima može da smanji njegovu aktivnost jer je utvrđeno da inverzno koreliše sa bronhijalnom reaktivnošću u sezonskim alergijskim simptomima (110). Pošto za sada nema vrstih dokaza da smanjeni unos ovih mikronutrijenata smanjuje aktivnost SOD u samoj astmi, time se ne mogu objasniti naši rezultati.

Poznato je da su izmene u nivou i odnosu GSH i GSSG prisutne u plućima astmatičara. Posle provokacije antigenom na površini epitela, dolazi do brzih promena intra i ekstracelularnih GSH i GSSG. Par minuta nakon provokacije, nivo GSH pada a nivo GSSG raste što potvrđuje gubitak redukcionog potencijala, koji doprinosi inhibiranju produkcije Th1 citokina i/ili favorizuje dalje ubrzanje i održavanje Th2 odgovora u astmi. GSH redoks sistem koji održava redukovanu homeostazu unutar ćelije, uključuje enzime koji su važni u detoksikacionim reakcijama: GPx, GSR i G-6P-D. Ovaj enzim se može naći i na površini epitelnih ćelija pluća jer je u značajnoj meri sintetišu alveolarni makrofagi i bronhijalne epitelne ćelije i označen je kao ekstracelularna GPx (eGPx) (16).

Za eGPx je pokazano da je prisutna u većoj količini u plućima kod pacijenata sa astmom, kao posledica indukcije eGPx mRNA i proteinske ekspresije od strane bronhijalnih epitelnih ćelija u odgovoru na povećane intracelularne ili ekstracelularne RVK (48). Ali svaki oksidativni stres ne može dovesti do porasta njene aktivnosti. Na primer, izlaganje ozonu smanjuje nivo njene aktivnosti a izlaganje NO_2 njenu aktivnost

uopšte ne menja (49). Multicentri na studija kod pacijenata sa teškom i blagom astmom, u odnosu na kontrolu ne nalazi razliku u aktivnosti eGPx i nivoa eGPx proteina (106). I Fitzpatrick i saradnici (2009) iako nalaze niži nivo GSH a pove an GSSH, ne beleže zna ajnu razliku za GR i GPx u plu ima kod dece sa teškom astmom u odnosu na kontrolu (9).

U serumu, trombocitima i eritrocitima se kod astmatičara beleži smanjenje aktivnosti GPx i njegovog kofaktora selena (33). I Sackesen sa saradnicima utvrđuje smanjenu aktivnost GPx i SOD kod pacijenata sa astmom (111). To je potvrđeno i u studiji kod odraslih (130 astmatičara i 70 zdravih) gde su na ene smanjene aktivnosti SOD ($p < 0.05$) i GPx ($p < 0.01$) u eritrocitima u poređnju sa kontrolnom grupom (112). Ima istraživača koji ukazuju da aktivnost GPx kod odraslih astmatičara, može da varira u zavisnosti od elijske linije ili telesne tenosti gde se određuje. Oni iznose da aktivnost GPx može biti niža u trombocitima, normalna ili niža u eritrocitima, niža ili povišena u plazmi i normalna ili niža u punoj krvi (16).

I za dečiji uzrast ispitivanja pokazuju slične rezultate. U jednoj studiji kod 46 dece sa astmom utvrđena je zna ajno niža aktivnost GPx u serumu nego u kontrolnoj grupi kod 52 zdrave dece (113). To je potvrđeno i u studiji kod 37 zdrave dece i 44 dece sa astmom, gde je u serumu aktivnost GPx bila zna ajno niža kod bolesnih nego kod zdravih (34). I tokom i posle akutnog napada astme aktivnost GPx u eritrocitima periferne krvi kod 56 dece sa astmom, pokazano je da je zna ajno niža u odnosu na zdravu decu. Takva snižena aktivnost se održava i nakon nedelju dana od napada astme iako su pacijenti sa blagom simptomatologijom (114). Marcal i saradnici me utim, kod 44 dece i adolescenata sa intermitentnom ili perzistentnom astmom (blaga/srednje teška i teška) i 10 zdrave dece nalaze sličnu aktivnost GPx u granulocitima i monocitima i to evidentnije između onih na kortikosteroidnoj terapiji i zdravih (115). U našem ispitivanju procena antioksidativnog statusa kod ispitanika, određivanjem aktivnosti GPx u eritrocitima pokazala je statistički zna ajno nižu aktivnost GPx kod astmatičara ($p < 0,01$) iako su neki bili na kortikoterapiji, u odnosu na kontrolnu grupu (grafikon 4.). Naš rezultat je možda posledica uticaja i eventualne deficijencije selena, s obzirom da je ona esta na području Srbije (116) a kako se navodi redukcija GPx u eritrocitima i leukocitima kod atopičnih i neatopičnih astmatičara može biti u vezi sa smanjenim

nivoom selena u krvi (117). Na osnovu kontrolisanih studija ima i suprotnih mišljenja, jer nije dokazana značajna korist od kratkotrajne suplementacije selenom kod pacijenata sa intrinzičnom astmom (118) kao i na osnovu toga da nije uočena povećana prevalencija astme u regionima gde postoji endemska deficijencija selena (Kina, Severna Koreja) (119).

2.2. Astma, oksidativni stres i pasivno pušenje

U astmi se oksidativni stres javlja ne samo kao rezultat endogene inflamacije već i zbog uticaja egzogenih aerozagađivača, među kojima važno mesto zauzima duvanski dim jer je bogat oksidansima i malim aerodinamičnim česticama. Pored toga utvrđeno je da on sam može da indukuje stvaranje RVK i RVA i tako promoviše dalje oksidativno oštećenje u plućima. Preko solubilne tranzicije metala i organskih molekula adsorbovanih na površini, aerodinamične čestice duvana su sposobne da stvaraju reaktivne kiseonikne intermedijate u plućima i aktiviraju redoks senzitivne transkripcione faktore da pojačaju inflamatorne reakcije (120). Za neke patogenetske mehanizme astme kao što su pojačana inflamacija, formiranje Th2 citokinskog miljea i produkcija alergenspecifičnih IgE antitela je pokazano da mogu biti povezani oksidativnim stresom usled pasivnog pušenja (121).

Negativan efekat pasivnog pušenja na oksidativni balans kod dece je evidentiran veoma rano dok su mnogi organski sistemi još u razvoju i tada je on značajno veći nego kasnije. Načeno je da je nivo F2-izoprostana u krvi iz pupčanika već i kod novorođenčadi i krvi odojčeta uzrasta tri meseca rođenih od majki koje puše, u odnosu na decu čije majke ne puše. Čak je kod te dece nađena i pozitivna korelacija između nivoa F2-izoprostana i nivoa kortizola u urinu (122). Nedavno je i kod dece uzrasta 9-13 godina, koja su izložena duvanskom dimu u odnosu na decu koja to nisu, utvrđeno značajno veći oksidativni stres (meren nivoom peroksida u plazmi) i redukovani ukupan antioksidativni odgovor (120).

Naši rezultati pokazuju povišen trend vrednosti TBARS kod pasivnih pušača (i kod astmatičara i kod zdravih) ali statistički neznajno u odnosu na one koji nisu bili izloženi duvanskom dimu (grafikon 2.), što je pokazalo da pasivno pušenje nema značajan dodatni uticaj na povećanje oksidativnog stresa kod astmatičara. Međutim, treba imati u vidu da je na ovakav dobijeni rezultat moglo da utiče i to što su neki astmatičari

bili na antiinflamatornoj kortikosteroidnoj terapiji za koju je pokazano može imati uticaja na redukciju oksidativnog stresa.

Važan aspekt oksidativnog oštećenja pluća indukovano pasivnim pušenjem je i oštećenje antioksidativnog sistema. Utvrđeno je da ono postoji već u ranom postnatalnom periodu jer je pokazano da je pušenje majke povezano sa deplecijom serumskih antioksidativnih parametara (vitamin C, tioli i totalni antioksidativni kapacitet) kod odojčadi uzrasta 6-28 nedelja (122). Takođe je potvrđeno da aktivnost MnSOD može biti nishodno regulisana u plućima tokom teškog i/ili hroničnog izlaganja duvanskom dimu (123) i da oksidativno opterećenje u plućima nije adekvatno kontrabalansirano aktivnošću ovog enzima kod hroničnog pušenja (9). Za nove sintetičke molekule sa aktivnošću sličnom SOD je u nekoliko eksperimentalnih modela pluća pokazano da smanjuju inflamaciju pluća oštećenih duvanskim dimom, što je još jedan indirektni pokazatelj njene smanjene aktivnosti u plućima (26). I naše ispitivanje je našlo statistički značajno nižu aktivnost SOD u eritrocitima u grupi astmatičara pasivnih pušača u odnosu na one koji to nisu ($p < 0,001$) i pokazalo da pasivno pušenje kod obolelih od astme može biti dodatni faktor za nižu aktivnost SOD u eritrocitima (grafikon 3.).

Za akutno izlaganje duvanskom dimu je pokazano da dovodi do naglog intracelularnog pada koncentracije redukovano GSH i povećane aktivnosti GPx koja ga koristi za detoksikaciju H_2O_2 i lipidnih produkata a da bi nakon nekoliko sati GSH produkcija porasla a aktivnost GPx opala (9). Do sada, prema našim saznanjima, nema objavljenih studija u vezi aktivnosti GPx kod dece izložene duvanskom dimu. Mi nalazimo da astmatičari pasivni pušači u odnosu na one koji to nisu imaju statistički značajno nižu aktivnost GPx ($p < 0,001$), a da zdrava deca pasivni pušači u odnosu na one koji nisu iako su pokazuju nižu aktivnost GPx ona nije značajna. Pokazalo se da pasivno pušenje kod astmatičara može predstavljati dodatni faktor za redukciju aktivnosti GPx u eritrocitima (grafikon 4.).

Za bolje i detaljnije objašnjenje promena redoksa u astmi pod uticajem duvanskog dima i različitih rezultata u literaturi, treba imati u vidu i mogući uticaj brojnih genskih polimorfizama, skoro svih antioksidanata ali i detoksikacionih enzima poput glutation transferaza (GST) koje učestvuju u ovom procesu. GST imaju ulogu u humanim odgovorima na oksidativni stres jer katalizuju konjugaciju elektrofilnih supstrata do

glutationa, a imaju i važnu ulogu u aktivnostima peroksidaza i izomeraza i u velikom broju detoksikacionih procesa pa i komponenti duvanskog dima koji predstavljaju esencijalni mehanizam za minimiziranje njegovih toksi nih efekata. Utvr eno je da genske izmene nekih izoformi GST enzima, mogu da menjaju sposobnost disajnih puteva da se bore sa ovim toksi nim supstancama poput duvanskog dima i tako uti u na razvoj inflamacije disajnih puteva, pa se zbog toga i svrstavaju u gene kandidate za astmu (124).

In utero izlaganje duvanskom dimu dece sa deficijencijom GSTM1, GSTT1 ili GSTP1 izoforme GST enzima pokazano je da pove ava prevalenciju rane pojave astme (OR 1,6), astme sa aktuelnim simptomima (OR 1,7), perzistetne astme (OR 1,6), anamneze za vizing (OR 2,1), vizinga koji zahteva le enje (OR 2,2), posete hitnoj pomo i (OR 3,7) (125), zna ajnog pada u plu noj funkciji i vizinga koji perzistira od odoja kog doba do polaska u školu (124, 126). GSTM1 i GSTP1 predstavljaju i važne citoprotektivne faktore za redukciju alergijskih odgovora kod pasivnog pušenja (126). Ovakvi polimorfizmi mogu e je da su prisutni i kod naših pacijenata i da uti u na dobijene rezultate.

3. EFEKAT PASIVNOG PUŠENJA NA OKSIDATIVNI STRES KOD ASTME ZAVISNO OD TERAPIJSKOG REŽIMA

Za naj eš e koriš ene lekove u terapiji astme (bronhodilatatori i kortikosteroidi), još uvek nije kompletno razjašnjeno kakav efekat imaju na oksidativni stres u okviru inflamacije plu a (20).

Što se ti e efekta kortkosteroida na oksidativni stres brojne studije iznose razli ite rezultate. In vitro je pokazano da samo visoke koncentracije kortikosteroida mogu da imaju inhibitorni efekat na produkciju RVK kod humanih granulocita. Za deksametazon je pokazano da nema efekat na stvaranje RVK u humanim makrofagima periferne krvi ali da ima na monocite. Ispitivan je njihov efekat i na oksidativni stres u astmi. Majori i saradnici (1998) nalaze da terapija inhalatornim i sistemskim kortikosteroidima (hidrokortizon) redukuje O^{2-} produkciju u monocitima periferne krvi astmatičara i to u korelaciji sa redukcijom respiratornih simptoma (127). Pored toga, za glikokortikoide je dokazano i da smanjuju nivo H_2O_2 , ukupnih nitrata i nitrita u kondenzatu izdahnutog vazduha astmatičara i normalizuju aktivnost CuZnSOD (57) . Nizak pH u kondenzatu

izdahnutog vazduha koji je marker povećanog azotnog stresa u egzacerbaciji astme, pokazano je da raste nakon primene kortikosteroidne terapije (16). S obzirom da je veća RVK u astmi produkovana od strane inflamatornih ćelija poput eozinofila, inhibicija prekomerne produkcije oksidantata spekulira se da se postiže antiinflamatornim dejstvom kortikosteroida na ove ćelije (25). Leu i saradnici (1998) su pokazali da lečenje astmatičara inhaliranim Flutikazon propionatom tokom dva meseca, može značajno da smanji nivo lipidnih peroksida u plazmi (128). Međutim, Lantreio i saradnici (1999) primećuju da kortikosteroidi nemaju značajnog efekta na produkciju oksidantata od strane eozinofila (129). Na osnovu sposobnosti inhalatornih kortikosteroida da redukuju loše efekte aerozagadivača (SO₂, NO₂, PM_{2,5}) indirektno je pokazano da redukuju i inflamaciju i oksidativni stres (smanjenje nivoa TBARS) u disajnim putevima (130).

Međutim, ima i druga mišljenja. Corradi i saradnici (2003) kod 12 astmatičara u odnosu na kontrolu, nalaze u egzacerbaciji i pet dana nakon terapije pronizonom, veći nivo MDA u kondenzatu izdahnutog vazduha pre i nakon terapije (47). Baraldi i saradnici takođe nalaze da deca sa astmom imaju povećan oksidativni stres meren nivoom izdahnutog 8-izoprostana u stabilnoj fazi bolesti, koji je relativno rezistentan na tretman inhalatornim kortikosteroidima u dozi od 300mcg dnevno (131). Nedavno je u još jednom ispitivanju, pokazano da pacijenti sa astmom, koji su dobro kontrolisani inhalatornim kortikosteroidima i dugodelujućim β₂ agonistima imaju veći nivo lipidnih peroksida u poređenju sa zdravima (132). Ispitivanje kod 14 pacijenata sa srednje teškom astmom, mesec dana pre i nakon tretmana Flutikazon propionatom od 500mcg dnevno, nalazi da je uprkos redukciji nivoa MDA kod astmatičara posle lečenja, njegov nivo i dalje značajno viši nego kod zdravih ispitanika iako su astmatičari bili bez simptoma (133).

Kada je oksidativni stres kao vodeća snaga Th2 zavisnog imunskog inflamatornog odgovora jako izražen kao što je u teškoj astmi, dokazano je da on tada može uticati na smanjenje kortikosenzitivnosti. Visok nivo NO koji dovodi do formiranja peroksinitrita, nitracije tirozina i produkcije lipidne peroksidacije povezuje se najviše sa ovom pojavom (92). Povećanje oksidativnog stresa i kortikorezistenciji pokazano je da može doprineti i sam duvanski dim, preko redukcije ekspresije HDAC2, što je zabeleženo u više od 95% pacijenata sa HOBP. Takođe je pokazano da ova rezistencija može dugo

da perzistira zbog perzistiranja i oksidativnog stresa (134). Ovakav nalaz je zabeležen i kod dece sa teškom astmom (135).

U literaturi prema našim saznanjima nema izveštaja kakav efekat imaju kortikosteroidi na oksidativni stres kod astmatičara izloženih duvanskom dimu. Naši rezultati pokazuju da astmatičari pasivni pušači i devojčice uzrasta bez obzira na terapijski režim pokazuju tendenciju nešto većeg oksidativnog stresa ali bez statističke značajnosti (tabela 10.) tj. da inhalatorni kortikosteroidi nisu pokazali značajan efekat na oksidativni stres kod astmatičara sa blažom formom bolesti izloženih duvanskom dimu kao i da kortikorezistencija nije stoji u pozadini.

Kortikosteroidi mogu da imaju direktan efekat na oksidativni stres ne samo preko smanjenja broja i/ili aktivnosti enzima uključenih u stvaranje RVK već i povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (7). Oni direktno povećavaju aktivnosti SOD, GPx i katalaze sakupljaju reaktivne molekule i tako utiču na njihov nivo. De Raevé i saradnici (1997) potvrđuju da je aktivnost SOD kod astmatičara bez kortikosteroidne terapije niža u bronhijalnom epitelu u odnosu na zdrave i one na terapiji (41). Penings sa saradnicima (1999) ukazuje da je smanjenje inflamacije disajnih puteva astmatičara inhalatornim kortikosteroidom prouzrokuje povećanje aktivnosti katalaze u eritrocitima (136).

Ove opservacije međutim ne podržavaju sve studije. Na primer, Fenech i saradnici (1998) nalaze kod odraslih astmatičara niži nivo aktivnosti SOD u eritrocitima u odnosu na zdrave bez razlike u aktivnosti GPx kao i da inhaliranje Beclometason dipropionata nema efekat na aktivnost ovih enzima. Terapija pronisonom u ovoj studiji je povećala samo koncentraciju selena u serumu bez efekata na aktivnost ispitivanih enzima (137).

Procena antioksidativnog statusa u našem ispitivanju merenjem aktivnosti SOD u eritrocitima statistički značajno ($p < 0,05$) je niža samo u grupi astmatičara koji su pasivni pušači ali bez kortikoterapije (grafikon 11.). Merenje aktivnosti GPx u eritrocitima, pokazalo se da je statistički značajno niže ($p < 0,01$) kod pasivnih pušača u odnosu na one koji to nisu, ali samo ukoliko su na kortikoterapiji (grafikon 12.). Iako su neki pacijenti povremeno dobijali bronhodilatatore mesec dana pre uključivanja u ispitivanje, ta količina primljenih lekova nije mogla da utiče značajno na povećanje oksidativnog stresa, jer primenjene doze nisu bile velike da bi mogle postići

antioksidativni efekat kako se navodi u literaturi (54). Za sada nema objavljenih rezultata o mogućem uticaju pasivnog pušenja na aktivnost antioksidativnih enzima kod dece obolele od astme, sa kojom bi mogli da uporedimo naše rezultate.

4. NIVO LOKALNE I SISTEMSKE INFLAMACIJE I PROCENA PLUČNE FUNKCIJE U ASTMI ZAVISNO OD NIVOA PASIVNOG PUŠENJA I TERAPIJSKOG REŽIMA

Za procenu intenziteta inflamacije i njenog ponašanja u bronhijalnoj astmi kod dece i njene eventualne povezanosti sa oksidativnim stresom pod uticajem pasivnog pušenja i kortikosteroidne terapije, u ovom ispitivanju su određivani neki od najčešćih standardnih parametara sistemske inflamacije (CRP i ukupan broj leukocita sa procentom eozinofila u perifernoj krvi) i lokalni eozinofilni marker inflamacije, azot monoksid u izdahnutom vazduhu (FeNO).

Poput mnogih inflamatornih medijatora tokom inflamacije i CRP može imati proinflamatornu i antiinflamatornu ulogu u zavisnosti od mnogih okolnosti (138). Njegova uloga u astmi u više studija pokazano je da je proinflamatorna. Naime, Kony i saradnici (2004) nalaze vezu između povišene vrednosti CRP i BHR kod astmatičara (139), a Galez i saradnici (2006) kod dece sa astmom i alergijskim rinitisom, nalaze vezu između koncentraciju CRP u odnosu na zdravu decu, uz vezu i broj leukocita u perifernoj krvi (140).

Međutim, mi ne nalazimo statistički značajnu vezu između CRP kod astmatičara u odnosu na kontrolnu grupu, što je ukazalo da sistemska inflamacija nije značajna kod naših pacijenata (tabela 9.) što se može objasniti lakšom formom bolesti kod njih koja je u skladu sa izborom naših pacijenata. U prilog našim nalazima idu i rezultati studije Panaszeka i saradnika (2007) koji u svom ispitivanju ukazuju da koncentracija CRP u serumu nije povezana sa astmatskom inflamacijom izraženom preko BHR, i da se ne može uzeti kao marker za inflamatorni proces u plućima kod atopijske i neatopijske astme (141).

Moguća je povezanost između aktivnog i pasivnog pušenja i CRP nalazi nekoliko studija. U studiji Olafsdottir i saradnika (2005) kod odraslih pušača u odnosu na nepušače, nađena je veza između povišenog nivoa CRP kod ispitanika sa respiratornim

tegobama, nealergijskom astmom i ve im BMI (142). U još jednoj studiji je uo eno da puša i imaju povišen nivo CRP i da prekid pušenja redukuje njegovu vrednost (143). Rezultati Chiu i saradnika (2011) ukazuju da je ve i nivo kotinina u plazmi ($>0,05\text{ng/ml}$) kod pasivnih puša a povezan sa ve im CRP ($>1,5\text{mg/l}$) (144). Me utim, Merghani i saradnici (2012) ne nalaze zna ajnu razliku za vrednost CRP u plazmi kod zdrave dece koja su pasivni puša i u odnosu na one koji to nisu (145). Naši rezultati pokazuju da kod dece sa astmom u zavisnosti od izloženosti duvanskom dimu nema zna ajne razlike za CRP (tabela 9.).

Kako je sinteza CRP regulisana proinflamatornim citokinima za koje je poznato da imaju važnu ulogu u patofiziologiji astme (TNF- NF-kB, IL-6 i IL-1), tretman ove bolesti kortikosteroidima indirektno bi onda trebalo da uti e i na redukciju CRP. Kod odraslih astmati ara bez terapije inhalatornim kortikosteroidima, pokazan je ve i nivo CRP u odnosu na one koji ih dobijaju i one koji su zdravi. Kod onih bez terapije nivo CRP je u negativnoj korelaciji sa plu nom funkcijom a pozitivnoj sa brojem eozinofila u sputumu (146). Sli ne rezultate iznosi i Elbehidz sa saradnicima (2010) (147). Kod astmati ara de jeg uzrasta, utvr ena je zna ajno ve a koncentracija CRP u odnosu na zdrave, kao i ve a koncentracija CRP kod nekontrolisane astme bez kortikoterapije u odnosu na kontrolisanu astmu na kortikoterapiji (148).

Vrednost CRP kod astmati ara bez kortikosteroidne terapije u našem ispitivanju, iako je viša kod onih koji nisu pasivni puša i u odnosu na one koji to jesu, ona nije statisti ki zna ajna. I u grupi astmati ara koji su na kortikoterapiji, iako je izmerena viša vrednost CRP kod pasivnih puša a u odnosu na one koji to nisu, ona nije statisti ki zna ajna. Na osnovu dobijenih rezultata mo ne nalazimo povezanost izme u nivoa CRP, pasivnog pušenja i lakše forme stabilne de je astme, bez obzira na terapijski režim (tabela 11.).

Ukupan broj leukocita u krvi kao drugi marker sistemske inflamacije u našem ispitivanju se pokazalo da je ve i kod astmati ara u odnosu na zdrave, kao i kod astmati ara pasivnih puša a u odnosu na one koji to nisu, ali bez statisti ke zna ajnosti. Me utim, interesantno je da zdrava deca pasivni puša i imaju statisti ki zna ajno ve i ($p < 0,05$) broj leukocita u krvi, u odnosu na one koji to nisu. To je pokazalo da je sama izloženost duvanskom dimu bitan faktor za pove anje sistemske inflamacije (grafikon 5.).

Ukupan broj leukocita u krvi samo kod astmatičara, u odnosu na pasivno pušenje i terapijski režim je pokazao veći u vrednost kod pasivnih pušača a u odnosu na one koji to nisu, ali bez statističke značajnosti. Sistemska inflamacija procenjena na ovaj način, nije pokazala povezanost pasivnog pušenja u odnosu na kortikoterapiju kod naših pacijenata (tabela 12.).

Efekat aktivnog i pasivnog pušenja na broj i vrstu leukocita kod zdravih analiziran je i potvrđen u više studija i u skladu je sa našim rezultatom. Međutim, nema literaturnih podataka u vezi sa astmom. Islam i saradnici kod odraslih aktivnih pušača muškog pola, nalaze značajno veći broj leukocita u odnosu na nepušače (149). Uo čeno je da broj leukocita u krvi povišen čak i kod lakšeg stepena aktivnog pušenja (150). Andrews i saradnici (2006) ukazuju da pušači imaju za 30% veći broj leukocita u odnosu na nepušače i da su svi elementi kompletne krvne slike (neutrofili, bazofili, monociti i limfociti) povećani. Utvrđeno je da se broj leukocita povećava sa brojem popušanih cigareta dnevno i dubinom i intenzitetom inhaliranja duvanskog dima (151). Međutim, Sunyer i saradnici (1996) nalaze da je broj leukocita samo povišen na račun neutrofila i eozinofila uz pad broja limfocita i ukazuju da iako se broj leukocita vraća na normalnu vrednost za šest nedelja od prestanka aktivnog pušenja, on je i dalje viši kod bivših pušača u odnosu na zdrave koji nikada nisu pušili (152).

I pasivno pušenje ima uticaja na elemente kompletne krvne slike. Kod odraslih nepušača Dinas i saradnici (2013) iznose da posle jednosatnog izlaganja duvanskom dimu, broj leukocita značajno raste kod njih i nakon četiri sata uz pozitivnu korelaciju između broja leukocita i nivoa kortizola u krvi (153). Panagiotakos i saradnici (2004) u ATTICA studiji nalaze povećan broj leukocita za $600 \text{ eozinofila}/\mu\text{L}$ krvi kod osoba izloženih pasivnom pušenju više od tri dana nedeljno (154).

Broj eozinofilnih eozinofila bele loze u perifernoj krvi u našem ispitivanju određivan je u cilju procene stimulacije alergijskog odgovora i njene uloge u oksidativnom stresu. Pokazalo se da je on kod astmatičara u odnosu na kontrolu veći, i to statistički značajno ($p < 0,001$). U grupama gde su samo astmatičari i samo zdrava deca, pasivni pušači su pokazali veći procenat eozinofila u odnosu na one koji to nisu ali bez statističke značajnosti. To znači da pasivno pušenje nema uticaj na eozinofilnu sistemska inflamaciju kod dece sa lakšom formom astme (grafikon 6.).

Dobro je poznato da je aktivacija eozinofilnog odgovora prisutna u alergijskoj astmi. Me utim, iako mi to nismo utvrdili kod bolesne i zdrave dece, na mogu nost pove anja broja eozinofila u krvi pod uticajem pasivnog pušenja ukazuju neke objavljene studije. Matsumoto i saradnici (1998) pokazuju na animalnom modelu, da ponavljano izlaganje duvanskom dimu dovodi do zna ajnog pove anja broja eozinofila u BAL, i nakon 14 dana od po etka pasivnog pušenja koje ne traje duže od sedam dana od prestanka pasivnog pušenja (155). Kod dece Berrak i saradnici (2002) ukazuju na pove anu indukciju broja eozinofila i porasta nivoa IgE u krvi iz pup anika, sa pove anjem popušenih cigareta roditelja (156). A Shunsuke i saradnici (2010) ak ilustruju mogu akutni razvoj eozinofilne pneumonije nakon kratkotrajnog izlaganja duvanskom dimu, sa eozinofilijom u perifernoj krvi od ak 24% (157). Konkretno za efekat pasivnog pušenja na broj eozinofila u astmi prema našim saznanjima nema podataka.

Kod odraslih aktivnih puša a sa blagom astmom, inhalatorna kortikosteroidna terapija (Fluticason 1000mcg dnevno) nije pokazala redukciju u broju eozinofila u sputumu kod puša a, u odnosu na one koji su dobijali placebo (158). Me utim, Lazarus i saradnici (2007) kod odraslih puša a sa astmom, nalaze nakon primene Beklometazon propionata redukciju ne samo u broju eozinofila u sputumu ve i u novou eozinofilnog katjonskog proteina (159). U našem ispitivanju kortikoterapija nema efekat na broj eozinofila kod pasivnih puša a sa blagom astmom (tabela 13.).

Astmati ari sa atopijskom formom bolesti a bez steroidne terapije imaju ve u koncentraciju NO, pove anu NOS₂mRNA i proteina u epitelnim elijama disajnih puteva (16). Malmberg i saradnici (2003) su kod 21 deteta koja imaju astmu i koja su le ena samo -2 agonistima pokazali da je zna ajno ve i ($p < 0.0001$) nivo FeNO nego što je to kod 62 zdrava deteta (160). U našem ispitivanju lokalna eozinofilna inflamacija koja je u isto vreme i indirektni marker lokalnog plu nog oksidativnog stresa uzrokovan RVA u stabilnoj atopijskoj lakoj i umereno teškoj astmi, nezavisno od primene kortikosteroida, procenjivana je merenjem nivoa NO u izdahnutom vazduhu (FeNO). Dobijena je statisti ki zna ajno ($p < 0,001$) viša vrednost FeNO kod astmatičara u odnosu na kontrolu (grafikon 7.), što je u skladu sa rezultatima prethodno navedenih studija.

Akutno izlaganje duvanskom dimu, indukuje značajnu tranzitornu redukciju u nivou FeNO kod odraslih sa astmom ali i bez nje, koja je povezana sa negativnom povratnom aktivnošću u iNOS, pod uticajem visoke koncentracije NO koja je prisutna u samom duvanskom dimu. Kod dužeg izlaganja duvanskom dimu, redukcija nivoa FeNO je izgleda posledica progresivne negativne povratne sprege koja može da dovede do inhibicije genske ekspresije iNOS (23). Nivo FeNO je pod uticajem duvanskog dima naročito redukovan ukoliko su astmatičari atopičari (161). Navodi se da za ovakav nalaz mogu biti i odgovorni polimorfizmi za NOS, za koje je utvrđeno da utiču na nivo FeNO kod izloženih duvanskom dimu. Naime, utvrđeno je da polimorfizam gena (mutacija na eksonu 7) za NO sintetazu (NOS₃), može da modifikuje efekat nikotinskog izlaganja na nivo FeNO verovatno preko smanjenja aktivnosti ovog enzima. Kod dece sa astmom su četiri NOS2A singl nukleotidna polimorfizma (SNP) i jedan ARG2 SNP povezana sa nižim nivoom FeNO (23).

Prema našim saznanjima još nijedna studija do sada nije pokazala vezu između pasivnog pušenja i FeNO kod zdrave dece. Za decu sa astmom prikazani rezultati u literaturi su različiti. Laoudi i saradnici (2010) nalaze da je kod dece sa alergijskom astmom niži nivo FeNO, ukoliko su izložena duvanskom dimu u odnosu na one koja to nisu (162). Međutim, drugi autori nalaze više nivoa FeNO kod dece sa astmom izložene duvanskom dimu u odnosu na onu koja to nisu (23). Nalazi za FeNO u našem ispitivanju pokazuju da je pasivno pušenje, i kod astmatičara i kod zdrave dece u vezi sa trendom njegovog pada, ali bez statističke značajnosti (grafikon 7.).

Postoje brojni podaci koji ukazuju da je FeNO povišen kod astmatičara koji nisu na kortikosteroidnoj terapiji i obrnuto. Nicolini i saradnici (2010) su pokazali da se bronhijalni nivo FeNO značajno redukuje nakon primene Beclometazon dipropionata (163). A Fujisawa sa saradnicima (2005) u izdahnutom vazduhu nalazi povišen NO kod astmatičara koji se redukuje nakon terapije inhalatornim kortikosteroidom ali i antagonistom leukotrijena (25). Kod dece sa astmom koja su izložena lakšem stepenu pasivnog pušenja, De la Riva-Velasco i saradnici (2012) nalaze da su niske i srednje doze inhalatornih kortikosteroida u vezi sa nižim nivoima FeNO u poređenju sa ispitanicima koji nisu izloženi duvanskom dimu (164). Drugi autori nalaze da je pušenje majke povezano sa povišenim nivoom FeNO i slabijom plućnom funkcijom kod dece

predškolskog uzrasta, koja imaju vizing i nisu na kortikosteroidnoj terapiji (165). U našim rezultatima nema razlike što se tiče nivoa FeNO kod dece koja su pasivni puša i (iako je zabeležen lako snižen trend njegove vrednosti) u odnosu na terapijski režim (tabela 14.).

Poznato je da je u astmi plućna funkcija oštećena. Da na nju pasivno pušenje može imati dopunski štetan efekat ilustrovano je u nekoliko studija. Cook sa saradnicima (1998) potvrđuje da je pasivno pušenje povezano sa blagim ali konstatnim oštećenjem plućne funkcije kod dece (166). Habby i saradnici (1994) nalaze da je pasivno pušenje kod dece sa astmom povezano sa redukcijom u FEV₁ i FEF_{50%} a kod one koja nisu imala astmu sa redukcijom samo u FEF_{50%} (167).

Procena plućne funkcije kod naših ispitanika tj. težina bolesti i uticaj pasivnog pušenja na nju, obavljena je merenjem FEV₁, FEV₁/FVC i FEF_{50%}. Sva tri parametra su pokazala trend pada vrednosti kod astmatičara u odnosu na kontrolu, i to značajno ($p < 0,001$). U grupi gde su samo astmatičari i samo zdravi pasivni puša i u odnosu na one koji to nisu, izmerene su niže vrednosti svih plućnih parametara, ali bez značajnosti. Ovi parametri plućne funkcije pokazali su da je stabilna astma iako blažeg stepena, jedini razlog za lako sniženu plućnu funkciju (grafikoni 8., 9. i 10.). I Magnussen sa saradnicima (1992) ne nalazi značajnu razliku u plućnoj funkciji a ni u hiperreaktivnosti disajnih puteva kod dece i odraslih, ukoliko su izložena duvanskom dimu u odnosu na one koji to nisu (168). Takođe, i Lebowitz i saradnici (1984) zaključuju da uticaj pasivnog pušenja na plućnu funkciju i respiratorne simptome kod dece nije pozitivan (169).

Kod odraslih aktivnih pušača i nepušača iako sa blagom astmom nakon primene flutikazona u dozi od 1000mcg dnevno tri nedelje, nađen je samo kod nepušača značajan porast jutarnjeg PEF i FEV₁ uz značajno smanjenje eozinofila u sputumu (158). Lazarus i saradnici (2007) takođe kod odraslih, nalaze da nakon primene Beklometazon propionata, značajno raste FEV₁ kod astmatičara nepušača u odnosu na pušače (159). Kod 180 dece školskog uzrasta sa astmom Halterman sa saradnicima (2004) je pokazao da je nakon primene inhalatornih kortikosteroida, redukovana broj dana bez tegoba uz značajno manju upotrebu svih lekova za astmu i hitnih poseta lekaru, ali samo u grupi koja nije bila izložena pasivnom pušenju (170). Mi međutim, ne nalazimo u našem ispitivanju nikakvu

razliku u plućnoj funkciji u zavisnosti od primenjene kortikosteroidne terapije i izloženosti duvanskom dimu (tabele 15.,16. i 17.).

5. POVEZANOST DOPUNSKIH FAKTORA RIZIKA SA ASTMOM I NJIHOV UTICAJ NA NJEN RAZVOJ

Kako je naše ispitivanje pokazalo da postoje izmene u oksidativnom stresu (više antioksidativnih parametara) kod blaže forme astme izložene duvanskom dimu, dalja analiza ovog ispitivanja imala je za cilj da utvrdi koji su još potencijalni faktori rizika u vezi sa astmom (a indirektno i sa inflamacijom i oksidativnim stresom) koji bi mogli dodatno da uti u na naše rezultate.

Procena povezanosti dopunskih faktora rizika sa astmom u odnosu na kontrolnu grupu, pokazala je statističku značajnost kod astmatičara za veći broj senzitivizacija ($p<0,001$), pojavu ekcema ($p<0,001$), alergijskog rinitisa ($p<0,001$) i vizinga ($p<0,001$) (tabela 18.).

Takvih nalaza ima i u drugim studijama. Brojni su literaturni podaci koji povezuju senzitivizaciju sa pojavom i razvojem astme kod dece. Udeo atopije u astmi kod dece, procenjen kožnim prik testom kreće se od 25-63% (171). Nemačka multicentrična studija za alergije, pokazuje da senzitivizacija na kućne grinje u ranom životu predstavlja rizik faktor za razvoj astme u školskom uzrastu kao i da senzitivizacija na bilo koji alergen u ranom životu i inhalatorne alergene do sedme godine života, povećava deset puta rizik za razvoj astme u tom uzrastu koji je još veći i ukoliko je majka astmatičar (172). Studija koja je upoređivala različite markere senzitivizacije sa atopskom bolešću, ukazala je da je kombinacija ekcema, alergije na hranu i kožna reaktivnost ili specifični IgE na grinje, u uzrastu od 12 meseci predstavlja najjači kombinovani rizik faktor za razvoj astme u uzrastu deteta od 24 meseca (173). Smatra se da je ova veza čak doznano zavisna, jer je izloženost grinjama tokom prve godine života u jakoj vezi sa većom prevalencijom senzitivizacije u petoj godini života deteta (174). Kod odojčadi je pokazano da je izlaganje alergenu grinje u količini većoj od 10 μ g alergena grinja na gram prašine povezano sa razvojem astme u uzrastu od sedam godina kao i da je rizik za razvoj astme sa kasnim početkom povećan pet puta (175). Međutim ima i studija koje ne potvrđuju direktnu vezu između izlaganja alergenu i razvoja alergijske astme iako je senzitivizacija na alergene

zatvorenog prostora jasno povezana sa alergijskom astmom (176). Do 50% dece senzitisane na grinje i 44% senzitisane na alergen ma ke pokazuje simptome astme u uzrastu od etiri godine (177). Postoje podaci koji ukazuju da izlaganje alergenu ma ke u ranom životu predstavlja rizik faktor za pojavu alergije i astme, ali i to da može imati protektivni efekat (178, 179). Neki autori ukazuju na primer da je izlaganje alergenu psa, povezano sa pove anim izlaganjem komponentama bakterija kao što je endotoksin, što može da moduliše imunski odgovor i da smanjuje rizik za alergiju i astmu (180).

I povezanost atopijskog dermatitisa/ekcema sa astmom je odavno uo ena. Wuthrich i saradnici (1999) notiraju veliku prevalenciju atopijskog dermatitisa do puberteta (40-60%) kao i visok stepen razvoja alergijskog rinitisa i/ili astme kod takve dece (177). Sa ovim se u vezu dovodi ošte enje kožne barijere (zbog nedostatka filagrina) kod ekcema koji predisponira razvoj senzitivacije i dalji razvoj astme i alergijskog rinitisa tj. progresivni atopijski marš (181). Van der Hulst i saradnici (2007) su analiziraju i nekoliko prospektivnih studija, našli da jedno od troje dece sa ekcemom razvija astmu tokom kasnijeg detinjstva (182) a Resnick i saradnici (1996) smatraju da e ak polovina onih koji ga imaju u odoja kom periodu ili detinjstvu, razviti alergijske respiratorne simptome (183).

U studiji kod 620 odoj adi ro enih u Melburnu, sa porodi nom anamnezom za alergijsku bolest, je na eno da atopijski ekcem (ekcem plus senzitivacija) kod odoj eta daje ve i rizik za pojavu astme kod dece uzrasta 6-7 godina (OR 3,52), alergijski rinitis (OR 2,91), astmu i alergijski rinitis (OR 6,3) nego kod odoj adi sa neatopijskim ekcemom (184). Povezanost sa razvojem astme je posebno ve a ukoliko je ekcem koji je po eo u prvih šest meseci života bio sa teškom klini kom slikom (185). U studiji sprovedenoj u Tasmaniji je na eno da je de iji ekcem zna ajno povezan sa novom pojavom astme u preadolescentom periodu HR 1,70, adolescentnon periodu HR 2,14 i odraslom periodu HR 1,63 (186).

Kada su ispitivana novoro en ad, od kojih je jedan deo njih imao pove an rizik za atopijsku bolest, pokazalo se da rani ekcem (pojava pre druge godine života) i pojava astme u one dece sa ranim ekcemom i konkominatnim ranim vizingom (u prve tri godine života) pove avaju rizik za aktuelni vizing ili bronhijalnu hiperreaktivnost u uzrastu od sedam godina. Suprotno ovome, ve ina dece sa ranim atopijskim dermatitisom a bez

ranog vizinga, nije sa pove anim rizikom za aktuelni vizing i BHR u istom uzrastu. Pored toga, u one dece sa konkominatnim atopijskim dermatitisom i ranim vizingom, polovina je imala atopijski dermatitis koji je po eo pre ili sa vizingom a polovina po etak vizinga pre atopijskog dermatitisa (187).

Za sada još uvek nije precizirano da li alergijski rinitis reprezentuje raniju klini ku manifestaciju alergijske bolesti kod atopi ara koji e kasnije razviti astmu ili nazalna bolest sama za sebe uzrokuje astmu. Settipane i saradnici (2000) nalaze da je kod dece i odraslih koje u pratili 23 godine u svojoj studiji, alergijski rinitis rizik faktor za razvoj astme (188). Alergijski rinitis, potvr en od strane lekara u odoja kom periodu, povezuje se sa dvostrukim rizikom za razvoj astme u jedanaestoj godini života (189). U uzrastu od pet godina u jednoj studiji, alergijski rinitis zna ajno predvi a incidenciju vizinga u uzrastu od 5-13 godina, sa relativnim rizikom od 3,82 (190). Prema Horaku (1989) posle devetogodišnjeg bolovanja od alergijskog rinitisa, 40% individua razvija astmu (191).

Najnoviji podaci ukazuju da alergijski marš tj. razvoj adultne astme od ranog vizinga posledica delovanja kako atopije tako i estih virusnih vizing infekcija (192). Do skoro se smatralo da je samo predispozicija za alergiju glavni razlog tj. mehanizam za koji se mislilo da je u vezi sa ranim vizingom i daljim razvojem astme, ali se sada zna da je i predodre enost za infekcije rinovirusom klju ni dopunski faktor za ovu vezu (193). Mala deca koja e razviti astmu, obi no imaju rekuretne epizode vizinga, kašlja i teško e pri disanju (tzv. perzistetni vizeri) koje su u vezi sa virusnim infekcijama u 90% slu ajeva (194). Skorašnji podaci, rasvetljavaju da je rinovirus indukovani vizing tokom ranih godina života veoma važan faktor za dalji razvoj perzistetnog vizinga/astme, i to više nego RSV bronhiolitis (195). ak je utvr eno da postoji uro ena predodre enost za rinovirusne infekcije koja je povezana sa deficitom interferona gama koji je odgovoran za dugotrajnu osetljivost za akutne vizing epizode (196, 197). Caliskan i saradnici (2013) nalaze da je za to odgovoran gen u regionu 17q21 sa svoje dve ekspresivne varijante (198). Smatra se tako da ponavljane akutne infekcije mogu da posreduju doga ajima koji reprogramiraju uro ene, adaptivne i/ili regulatorne imunske odgovore u smeru hroni ne inflamacije disajnih puteva (199).

Kussel i saradnici (2007) su zapazili da se u uzrastu od pet godina, četiri puta češće javlja astma, kod onih koji su imali rinovirusni ili RSV vizing u ranom životu, u odnosu na one koji ga nisu imali, a ova observacija je zabeležena i među decom koja su se senzitivisala na alergene, pre druge godine života (200). Od rođenja pa do treće godine života su RSV vizing, RV vizing i oba povezani sa povećanim rizikom za astmu u šestoj godini života (OR 2,6, OR 9,8, OR 10, za svaki ponaosob). U prvoj godini života zajedno RV vizing (OR 2,8) i senzitivizacija na aeroalergene (OR 3,6) povezani su sa astmom u šestoj godini života. Sa tri godine života, RV vizing je izrazito jako povezan sa astmom u šestoj godini života (OR 23,6), u odnosu na alergijsku senzitivizaciju (OR 3,4). Skoro 90% dece koja su imala RV vizing sa tri godine i imati astmu u šestoj godini života (194). U studiji gde su dugotrajno praćeni pacijenti posle bronhiolitisa, procenjen uticaj na pojavu astme nakon rinovirus indukovano vizinga tokom ranog detinjstva, je češći nego nakon RSV bronhiolitisa. Rinovirus vizing tokom prve tri godine života povećava rizik da deca imaju astmu u šestoj godini života i to 40 puta, što je mnogo više nego senzitivizacija na alergene ili RSV infekcije (201).

Procena povezanosti dopunskih faktora rizika sa astmom samo kod dece koja su pasivni pušači i u ovom ispitivanju, pokazala je statističku značajnost za niži stepen edukacije majki ($p < 0,01$), njeno kraće radno vreme ($p < 0,01$), uz prisustvo pušača koji dosta puše u kućima u kojima je i majka sa dugim pušačkim stažom ($p < 0,001$). Deca koja nisu pasivni nepušači, statistički značajno više žive u stanovima čija je površina veća ($p < 0,05$) (tabela 19.).

Količina dobijenih štetnih hemikalija iz duvanskog dima u okolini (oksidi azota, nikotin, CO i različiti kancerogeni) zavisi od broja pušača, stepena pušenja, tipa cigareta (sa/bez filtera, sa niskim katranom, količina nikotina), blizine pasivnog pušača, trajanja izlaganja, veličine ambijenta, ventilacionog sistema, sezone u godini i mnogih drugih varijabli (202). Pokazano je da je doza izlaganja tj. veličina i broj pušača koji žive u kući je u pozitivnoj korelaciji sa incidencijom simptoma nalik astmi kod dece (202), što se slaže sa našim rezultatima.

Lannero i saradnici (2002) navode da je pušenje roditelja u industrijalizovanim zemljama u negativnoj vezi sa indikatorima socijalnog statusa, među kojima je i nivo edukacije roditelja, što je takođe u skladu sa našim rezultatima. Rizik za tranzitorni

vizing kod dece ije su majke pušile 10 i više cigareta dnevno i imale 12 i više godina edukacije, pove an je 2,5 puta u pore enju sa decom majki nepuša a istog stepena edukacije. Za ve i stepen edukacije majke, nije na ena povezanost. Predškolska deca koja su pasivni puša i, imaju ve i rizik za astmu nego deca školskog uzrasta (OR 1,44 naspram 1,26) a pušenje majke tokom trudno e pove ava rizik za astmu u pore enju sa izlaganjem samo posle ro enja (204). Dužina izlaganja duvanskom dimu tako e ima uticaja. Meta analiza pet kohorti, ukazuje da desetogodišnje izlaganje duvanskom dimu, više od petogodišnjeg izlaganja pove ava rizik za astmu (OR 1,42) (205).

Na osnovu prikaza frekvencija i procenta zastupljenosti dopunskih atributivnih faktora rizika i njihovog uticaja na razvoj astme zavisno od pasivnog pušenja, u našem ispitivanu se pokazalo da je u grupi astmatičara koji su pasivni puša i statistički zna ajno više dece koja su prvoro ena ($p < 0,05$), da je pojava ekcema nakon prve godini života statistički zna ajno eš a u grupi kod astmatičara koji nisu pasivni puša i ($p < 0,05$) i ta su trudnice u toj grupi eš e pušile ($p < 0,001$). U porodicama roditelja puša a, prvoro ena deca imaju 2,85 puta ve u verovatno u da dobiju astmu (tabela 21.). Rezultati direktno pokazuju koji faktori rizika imaju važnu ulogu u razvoju ove bolesti pa i oksidativnog stresa u okviru inflamacije koja stoji u njenoj patogenezi trostruki rizik ima prvoro enost.

Ve duže vreme se spekuliše da i veličina porodice ima uticaja na razvoj atopije i alergijskih bolesti kod potomaka. Naime, najverovatnije je da prisustvo starijeg srodnika u porodici, pove ava u ustalost izlaganja mla ih ve em broju virusnih infekcija, što može da uti e na imunski sistem mla eg deteta, da ne razvije atopiju a kasnije i alergijske bolesti poput astme. Mogu e objašnjenje za ovakavu pojavu je i da mutiple trudno e majke, menjaju njen imunski status na na in koji štiti svako naredno dete od razvoja atopskih bolesti. (206). Me utim, u Engleskoj i Novom Zelandu gde je ura eno 14 studija, koje su pokušale da otkriju povezanost astme sa veličinom porodice i redosledom ro enja deteta nije pokazano da se rizik za astmu zna ajno pove ava za drugoro eno u odnosu na prvoro eno dete i da je on sli an za svu narednu ro enu decu. Ovakva analiza se ne slaže sa tim da veličina porodice uti e na razvoj astme kod potomaka (207). Nema podataka u literaturi vezano za ovu povezanost kod ispitanika izloženih duvanskom dimu.

Procena povezanosti dopunskih faktora rizika sa astmom u odnosu na terapijski režim, pokazala je da su deca sa astmom koja nisu na terapiji, statistički značajno veća porođajne mase ($p < 0,01$) i dužine na rođenju ($p < 0,05$), dok je srednji broj senzitivizacija statistički značajno veći i u grupi kod dece sa astmom na terapiji ($p < 0,05$) (tabela 20.). To znači da se u astmi dopunski faktori rizika koji su u vezi sa inflamacijom i indirektno sa oksidativnim stresom razlikuju u odnosu na težinu bolesti tj. onih koji su na i bez kortikoterapije.

U literaturi se mogu naći i nalazi da je u dvanaestoj godini života astma je češća kod dece sa malom PM u porođenju sa terminskom decom i da takva deca imaju četiri puta veći rizik za razvoj astme. Koja je pozadina ovog većeg rizika za razvoj astme kod dece sa malom porođajnom masom nije u potpunosti razjašnjeno. Možda su to: prematuritet sam po sebi, intrauterina retardacija rasta, veća upotreba antibiotika tokom neonatalnog perioda, primenjena mehanička ventilacija sa oksigenoterapijom ili pozitivna porodna anamneza za alergije, pušenje majke tokom trudnoće i odojčkog perioda deteta, antenatalna primena kortikosteroida, rođenja carskim rezom, starost majke na porođaju, prisustvo straje dece u porodici (208). Međutim, smatra se i da su PM veća od 3800g i veći ponderalni indeks, mogući faktori rizika za nastanak astme u detinjstvu. I ova pojava je u osnovi još uvek bez razjašnjenog mehanizma. Kombinovani rezultati devet studija, pokazuju da veća porođajna masa povećava rizik za nastanak astme 1,2 puta (209). Deca sa porođajnom dužinom preko 56cm (89 percentil) imaju relativni rizik za astmu 6,4 u odnosu na one koji imaju porođajnu dužinu 50-56cm, tj. manja porođajna dužina ide sa manjim rizikom za razvoj astme (210). To pokazuju i naši rezultati.

Na osnovu prikaza frekvencija i procenta zastupljenosti dopunskih atributivnih faktora rizika i njihovih mogućih uticaja na razvoj astme u ovoj studiji, zavisno od terapijskog režima, pokazalo se da je senzitivizacija na tri i više alergena, statistički značajno češća u grupi astmatičara na terapiji ($p < 0,01$) i da 4,33 puta češće verovatno u da imaju astmu (tabela 22.). To potvrđuje i jedna studija koja je pokazala da je polisenzitivizacija na inhalacione alergene u osoba sa astmom uzrastno nezavistan faktor rizika i za teži oblik bolesti i za upotrebu kortikosteroida (211).

U prouavanju bronhijalne astme sa profilaktičkog, dijagnostičkog i terapijskog aspekta, treba imati u vidu izuzetno kompleksne mehanizme koji vladaju tokom pojave, razvoja i lečenja ove bolesti. Samo sveobuhvatan pristup astmi i dobro poznavanje redoksa u njenoj patogenezi, daje mogućnost primene adekvatnih terapijskih i preventivnih procedura (sprečavanje pasivnog pušenja dece, dopuna antioksidansima uobičajenoj terapiji) koje nepovoljne procese mogu da preusmere u željenom povoljnom pravcu, uz adekvatne rezultate. Sa druge strane, nepoštovanje ovih suptilnih mehanizama koji odražavaju oksidativno/antioksidativni balans i tokom terapijskih procedura, može imati kontraproduktivan efekat.

Danas pulmologija daje sve veći značaj proceni oksidativnog stresa i mogućnostima kontrolisanja balansa pro/antioksidanasa. Brojne kliničke studije zasnovane na eksperimentima, nagoveštavaju novi pristup u prevenciji i terapiji plućnih bolesti. Može se reći da nalazi našeg ispitivanja, daju adekvatan doprinos u terapijskom pristupu posebnog tzv. pušačkog fenotipa/endotipa astme kod dece.

Nedostaci ovog istraživanja su: mali broj uključeni ispitanici jer smanjuje statističku vrednost ispitivanja, kvalitativno merenje kortizola u serumu zbog manje objektivnosti u proceni intenziteta pasivnog pušenja i njegov kratak poluživot koji daje informaciju o izlaganju duvanskom dimu samo unazad 50 sati, ispitivanje astmatičara sa stabilnom i blažom formom perzistentne bolesti jer ne odražava i stanje kod i kod pacijenata sa nestabilnom i težom formom bolesti kao i nepoznavanje genskih polimorfizama antioksidativnih i detoksikacionih enzima kod naših ispitanika koji su takođe mogli da utiču na dobijene rezultate.

VII ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata prezentovanih u ovom istraživanju može se zaključiti sledeće:

1. Kvalitativno ispitivanje nivoa kotinina u serumu kod ispitanika, u 100% slučajeva je potvrdilo slaganje sa anamnestičkim podacima dobijenim od strane roditelja za izloženost duvanskom dimu.

Nivo venskog COHb nije pokazao značajno slaganje sa anamnestičkim podacima za pasivno pušenje jer je pod uticajem brojnih spoljašnjih faktora.

2. Kod lake i umereno teške astme dece u odnosu na zdrave, sistemski oksidativni stres procenjen merenjem nivoa TBARS u serumu je značajno povišen.

Uticaj pasivnog pušenja na sistemski oksidativni stres u astmi kod dece nije značajan.

Kod astmatičara izloženih duvanskom dimu nezavisno od toga da li su na kortikostereoidnoj terapiji, sistemski oksidativni stres se ne razlikuje značajno.

3. Sistemski antioksidativni status procenjen merenjem aktivnosti enzima SOD i GPx pokazao je značajnu redukciju za aktivnost GPx kod astmatičara u odnosu na zdrave.

Pasivno pušenje kod obolelih značajno redukuje aktivnost oba enzima.

Kod astmatičara pasivnih pušača bez kortikoterapije značajno je snižena aktivnost SOD dok je kod obolelih pasivnih pušača na kortikoterapiji značajno snižena aktivnost GPx.

4. Sistemska inflamacija (vrednost CRP i ukupan broj leukocita u perifernoj krvi), se ne razlikuje kod bolesnih i zdravih. Kod dece sa astmom nema značajne razlike u sistemske inflamaciji u odnosu na pasivno pušenje i kortikosteroidni terapijski režim.

Eozinofilna sistemska inflamacija (procenat eozinofila u perifernoj krvi) značajno je veća kod obolelih od astme u odnosu na zdrave i ne razlikuje se kod obolelih u odnosu na pasivno pušenje i terapijski režim.

Kod zdrave dece je zabeležen značajan uticaj pasivnog pušenja na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi.

5. Ispitivanje nivoa lokalne alergijske inflamacije u plućima i azotnog stresa, merenjem azot monoksida u izdahnutom vazduhu, pokazalo je značajno višu vrednost kod astmatičara u odnosu na zdrave ispitanike.

Pasivno pušenje i kortikosteroidna terapija kod astmatičara nemaju značajan uticaj na alergijsku inflamaciju u plućima.

6. Plućna funkcija procenjena merenjem FEV₁, FEV₁/FVC, i FEF_{50%}, značajno je redukovana kod astmatičara za sva tri ispitivana parametra, u odnosu na zdrave, ali nije značajno drugačija kod obolelih u odnosu na izloženost duvanskom dimu i primenjenu kortikoterapiju.

7. Većina povezanost dopunskih faktora sa hroničnom inflamacijom kod astme, na primer za veći broj senzibilizacija i raniju pojavu ekcema, alergijskog rinitisa i vizinga.

Kod astmatičara koji su pasivni pušači i povezanost je značajna za veći broj pušača u kućima, veći broj dnevno popušanih cigareta u kućima, veći broj dnevno popušanih cigareta od strane majke, veću dužinu pušačkog staža majke, niži stepen edukacije majki i njeno vreme rada i manju površinu stana i manju površinu stana.

Povezanost dopunskih faktora sa astmom na kortikoterapiji značajna je za veći i srednji broj senzibilizacija a kod astme bez terapije za veću porođajnu masu i dužinu. Svi navedeni značajni faktori povezani sa astmom predstavljaju dopunske faktore za oksidativni stres u astmi.

8. Analiza frekvencija i procenta zastupljenosti dopunskih atributivnih faktora i njihovog potencijalnog rizika za pojavu astme, pa i direktnog uticaja na oksidativni stres kod dece koja su pasivni pušači, posebno je značajna za prvorođenu decu jer imaju 2,85 puta veću verovatnoću da obole od astme. Kod izloženih duvanskom dimu potencijalni rizik za razvoj astme je značajno veći i ukoliko je majka pušila u toku trudnoće i pojava ekcema nakon prve godine života.

Astmatičari na inhalatornoj kortikosteroidnoj terapiji, imaju četverostruko veći rizik za razvoj bolesti kada su senzibilisani na tri i više alergena. Kod pacijenata bez kortikosteroidne terapije ispitivani dopunski atributivni faktori nisu potencijalni rizik za razvoj bolesti.

9. Ovo istraživanje ukazuje na značajnu redukciju pasivnog pušenja u razvoju i lečenju astme kod dece.

LITERATURA

1. Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention. National health, lung and blood institute, national institutes of health. Update 2011.
2. Rees J. ABC of asthma. *BMJ* 2005; 331: 443-445.
3. Živkovi Z. Uсталost astme, rinitisa i ekcema kod dece u Beogradu i Srbiji. *De ija pulmologija* 2002; 10: 27-43.
4. Holgate T, Arshad S, Roberts C et al. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clin Sci* 2010; 118: 439-450.
5. Cho S, Moon H. The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010; 2 (30): 183-187.
6. Comhair S, Erzurum S. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med* 2003; 35 (3): 213-225.
7. Sahiner U, Birben E, Erzurum S et al. Oxidative stress in asthma. *World Allergy Organ J* 2011; 4: 151-158.
8. Peterson J, Herzenberg L, Vasquez K et al. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response pattern. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3071-3076.
9. Fitzpatrick A, Teague W, Holguin F et al. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 146-152.
10. Terada LS. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. *J Cell Biol* 2006; 174: 615-623.
11. Lee S, Park J, Park C. The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011; 3: 236-244.
12. Lotval J, Akdis A, Bacharier B et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 355-360.
13. Agache I, Akdis C, Jutel M et al. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy* 2012; 67: 835-846.

14. Rumley A, Paterson J. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 181-200.
15. or evi V. Slobodni radikali u biološkim sistemima. Biohemijski markeri oksidativnog stresa u eksperimentalnoj i klini koj medicini. Zbornik radova. Medicinski fakultet Niš, 2006: 13-17.
16. Comhair S, Erzurum S. Redox control of asthma: molecular mechanism and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12; 93-124.
17. Crapo DJ. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *Eur Respir J* 2003; 22: 4s-6s.
18. Ciencewicky J, Trivedi S, Kleeberger S. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 456-470.
19. Rahman I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr Drug Ttargets Inflamm Allergy* 2002; 1: 291-315.
20. Cramori G, Papi A. Oxidants and asthma. *Thorax* 2004; 59: 170-173.
21. Cvetkovi T, Pavlovi D, Koci G. Slobodni radikali. Paradoksi i kontraverze njihove funkcije. *Acta Fac Med Naiss* 1998; 15(130): 53-57.
22. Stone J, Yang S. Hydrogen peroxide: signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 243-70.
23. Andreadis A, Hazen S, Comhair S, Erzurum S. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 213-215.
24. Pavlovi D. Antioksidativni potencijal elije. Biološka uloga reaktivnih vrsta kiseonika i azota. Biohemijaki markeri oksidativnog stresa u eksperimentalnoj i klini koj medicini. Zbornik radova. Medicinski fakultet Niš 2006: 28-32.
25. Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 505-509.
26. Kinnula V. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax* 2005; 60: 693-700.
27. osi V. Specifi nost antioksidativnog odgovora kod plu nih bolesti. Biološka uloga reaktivnih vrsrta kiseonika i azota. Bihemijski markeri oksidativnog stresa u

eksperimentalnoj i klini koj medicini. Zbornik radova. Medicinski fakultet Niš 2006: 70-74.

28. Misso N, Thomson P. Oxidative stress and antioxidant deficiencies in asthma: potential modification in diet. *Redox Rep* 2005; 10: 247-255.

29. Wood L, Gibson O, Garg M. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J* 2003; 21: 177-186.

30. Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 2000; 55: s51-s53.

31. Romagnani , McNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000; 16: 534-554.

32. Maes T, Provoost S, Lanckacker A et al. Mouse models to unravel the role of inhaled pollutants on allergic sensitization and airway inflammation. *Respir Res* 2010; 11: 7-16.

33. Stone J, Hinks LJ, Beasley R et al. Reduced selenium status of patients with asthma. *Clin Sci (Lond.)* 1989; 77: 495-500.

34. Ahmad A, Shameen M, Husain Q. Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. *Ann Thorac Med* 2012; 7(40): 226-232.

35. Demoly P, Vachier I, Pene J et al. IgE produces monocytes superoxide anion release: correlation with CD23 expresion. Comparison of patients with asthma, patients with rhinitis and normal subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 108-116.

36. Sanders S, Zweier J, Harrison S et al. Spontaneous oxygen radical production at sites of antigen challenge in allergic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1725–1733.

37. Nadeem A, Chhabra S, Masood A et al. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 72-78.

38. Clerch L. Post-transcriptional regulation of lung antioxidant enzyme gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 103–111.

39. Chang R, Feng M, Liu W et al. Nitric oxide increased interleukin-4 expresion in T lymphocytes. *Immunology* 1997; 90: 364- 369.

40. Ricciardolo F, Sterk P, Gaston B et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84: 731-765.

41. De Raeve H, Thunnissen F, Kaneko F et al. Decreased Cu, Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo. *Am J Physiol* 1997; 271: L148-154.
42. Calhoun W, Reed H, Moest D et al. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 317–325.
43. Comhair S, Xu W, Ghosh S et al. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *Am J Pathol* 2005; 166: 663–674.
44. Kinnula V, Lehtonen S, Koistinen P et al. Two functional variants of the superoxide dismutase genes in Finnish families with asthma. *Thorax* 2004; 59: 116–119.
45. Suresh R, Shally A, Mahdi A et al. Assessment of association of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with bronchial asthma and oxidative stress in children: A case control study. *Indian J Occup Environ Med* 2009; 13(1): 33-37.
46. Novak Z, Nemeth I, Gyurkovits K et al. Examination of the role of oxygen free radicals in bronchial asthma in childhood. *Clin Chim Acta* 1991; 201: 247–251.
47. Corradi M, Folesani G, Andreoli R et al. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Resp Crit Care Med* 2003; 167: 395–399.
48. Comhair S, Bhatena P, Farver C et al. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: Evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J* 2001; 15: 70–78.
49. Avissar N, Reed C, Cox C et al. Ozone, but not nitrogen dioxide, exposure decreases glutathione peroxidases in epithelial lining fluid of human lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1342–1347.
50. Hasselmark L, Malmgren R, Unge G et al. Lowered platelet glutathione peroxidase activity in patients with intrinsic asthma. *Allergy* 1990; 45: 523–527.
51. Misso N, Powers K, Gillon R et al. Reduced platelet glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in atopic asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 838–847.

52. Misso N, Brooks-Wildhaber J, Ray S et al. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 2005; 26: 257–264.
53. Kelly F, Mudway I, Blomberg A et al. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet* 1999; 354: 482–483.
54. Gillissen A, Jaworska M, Scharling B, et al. Beta-2-agonists have antioxidant function in vitro. 1. Inhibition of superoxide anion, hydrogen peroxide, hypochlorous acid and hydroxyl radical. *Respiration* 1997; 64: 16–22.
55. Lapenna D, De Gioia S, Mezzetti A et al. Aminophylline: could it act as an antioxidant in vivo? *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 464–70.
56. Ascock M, Caramori G, Chung F. New targets for drug development in asthma. *Lancet* 2008; 372: 1073-1087.
57. Kharitonov S, Barnes P. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1693–722.
58. Kanazawa H, Hirata K, Yoshikawa J. Nitrogen oxides reduce albuterol induced bronchodilation in patients with bronchial asthma. *Respiration* 2002; 69: 490–495.
59. Bjelakovi G. Glikokortikoidi i oksidativni stress. Biohemijski markeri oksidativnog stresa u ekspreimentalnoj i klini koj medicini. Zbornik radova. Medicinski fakultet Niš. 2006: 62-69.
60. Barnes P. Inhaled corticosteroids. *Pharmaceuticals*. 2010; 3: 514-540.
61. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 476–94.
62. Kinnula V, Crapo J. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1600–1619.
63. Rahman I, Biswas S, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 222–239.
64. Gvozdjakova A, Kucharska J, Bartkovjakova M et al. Coenzyme Q10 supplementation reduces corticosteroids dosage in patients with bronchial asthma. *Biofactors* 2005; 25: 235–240.
65. Jindal S, Jha L, Gupta D. Bronchial hyper-responsiveness of women with asthma exposed to environmental tobacco smoke. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 1999; 41: 75–82.

66. Ram F, Rowe B, Kaur B. Vitamin C supplementation for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (3): CD000993.
67. Pearson P, Lewis S, Britton J et al. Vitamin E supplements in asthma: a parallel group randomised placebo controlled trial. *Thorax* 2004; 59: 652–656.
68. Hasselmark L, Malmgren R, Zetterstrom O et al. Selenium supplementation in intrinsic asthma. *Allergy* 1993; 48: 30–36.
69. Fryer A, Bianco A, Hepple M et al. Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1437–1442.
70. Cook G, Strachan P. Health effects of passive smoking. 3. Parental smoking and prevalence of respiratory symptoms and asthma in school age children. *Thorax* 1997; 52: 1081-1094.
71. Behr J, Nowak D. Tobacco smoke and respiratory disease. *Eur Respir Mon* 2002; 21: 161-179.
72. Pietinalho A, Pelkonen A, Rytala P. Linkage between smoking and asthma. *Allergy* 2009; 64: 1722-1727.
73. Chan M, Dinich H. Respiratory health effects of exposure to environmental tobacco smoke. *Respirology* 2003; 8: 131-139.
74. Woodward E, Al-Delaimy W. Measures of exposure to environmental tobacco smoke. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 895: 156-172.
75. Von Ehrenstein O, Von Mutius E. Smoking and the lung. *Eur Respir Mon* 2002; 19: 60-80.
76. Jindal K, Gupta D. The relationship between tobacco smoke and bronchial asthma. *Indian J Med Res* 2004; 120: 443-453.
77. USDHHS. US Department of Health and Human Services. The health consequences of smoking: a report of the surgeon general. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2004.
78. Mannino D, Homa D, Redd S. Involuntary smoking and asthma severity in children: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Chest* 2002; 122: 409–415.

79. Cook D, Strachan D. Effects of maternal and paternal smoking on children's respiratory health. International consultation on environmental tobacco smoke and child health. World Health Organization, 1999.
80. Larsson M, Frisk M, Hallstrom J et al. Environmental tobacco smoke exposure during childhood is associated with increased prevalence of asthma in adults. *Chest* 2001; 120: 711–717.
81. Popper H, Timens W. Smoking induced lung disease. *Eur Respir J* 2007; 39: 134-152.
82. Harrison P. Lifestyle and indoor air pollution: irritative agents. *Eur Respir Mon* 2002; 21: 117-132.
83. Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine and cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 155-168.
84. Hukkanen J, Jacob P, Benowitz L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 79-115.
85. Le Souef NP. Tobacco related lung diseases begin in childhood. *Thorax* 2000; 55: 1063-1067.
86. Domino F. Nontobacco sources of cotinine in the urine of nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57: 479.
87. Vidakovi A. Ugljenmonoksid u Profesionalne bolesti izazavane hemijskim agensima. Medicinski fakultet Beograd 2000; 844-949.
88. Coggins C, Ayres P, Mosberg A, Ogden M, Sagartz J, Hayes A. Fourteen day inhalation study in rats, using aged and dilluted sidestream smoke from a reference cigarette. *Fundam Appl Toxicol* 1992; 19: 133–141.
89. Barnes P. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* 2004; 1: 59–70.
90. Pietarinen-Runtti P, Lakari E, Raivio K, et al. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: 118–125.
91. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999; 277: 1067–1088.
92. Bacharier L, Boner A, Carlsen K et al. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008; 63: 5-34.

93. ATS/ERS task force: standardisation of lung function testing 2005. *Eur Respir J* 2005; 26: 319-338.
94. ERS task force. Measurement of exhaled nitric oxide in children 2001 *Eur Respir J* 2002; 20: 1-13.
95. Holgate T, Davies E, Powell M et al. Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *Eur Respir J* 2007; 29: 793-803.
96. Mullane D, Le Souef N. Genetic and environmental factors influencing lung growth and lung function. *Eur Respir Mon* 2010; 47:16-31.
97. Collier A, Goldstein G, Shrewsbury R. Cotinine elimination following ETS exposure in young children as a function of age, sex and race. *Proc Indoor Air* 1993; 1: 669–674.
98. Zasuda H, Zamaza M, Zanai M et al. Increased blood carboxyhaemoglobin concentrations in inflammatory pulmonary diseases. *Thorax* 2002; 57: 779-783
99. Vazquez P, Lopey-Herce J, Galaron , Morello Godino C. Carboxyhaemoglobin levels and risk factors of carbon monoxide poisoning. *Med Clin (Barc)* 1997; 108: 1-3
100. Estrella B, Estrella R, Oviedo J et al. Acute respiratory disease and carboxyhemoglobin status in school children of Quito, Ecuador. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 607-611.
101. Vachier I, Damon M, Le Doucen C et al. Increased oxygen species in blood monocytes of asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1161-1166.
102. Jarjour N N, Busse W W, Calhoun W J. Enhanced production of oxygen radicals in nocturnal asthma. *Am Rev. Respir Dis* 1992; 146: 905-911.
103. Babusikova E, Jesenak M, Kirscherova R et al. Association of oxidative stress and GST-T1 gene with childhood bronchial asthma. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: s27-s30.
104. Schock BC, Young IS, Brown V et al. Antioxidants and oxidative stress in BAL fluid of atopic asthmatic children *Pediatr Res* 2003; 53: 375-381.
105. Combhair S, Ricci K, Arroliga M et al. Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care* 2005; 172; 306-313.

106. osi V. Me uzavisnost citokina, antioksidanata i sistema azot-monoksida kod bolesnika sa bronhijalnom astmom. Doktorska teza. Univerzitet Niš. Medicinski fakultet Niš 2005.
107. Mak J, Leung H, Ho S et al. Systemic oxidative and antioxidative status in Chinese patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114; 260–264.
108. Szlagatys-Sidorkiewicz A, Korzon M, Malaczynska T et al. The antioxidative-prooxidative balance in children with asthma treated with inhaled corticosteroids and long acting beta-2-agonist. *Pneumol Alergol Pol* 2005; 73(2): 178-181.
109. Perisic T, Sreckovic M, Matic G: Changes of antioxidant enzyme activity and heat shock protein content in lymphocytes of children with asthma. *Arch Biol Sci* 2007; 59(4): 257-266.
110. Soutar A, Seaton A, Brown K. Bronchial reactivity and dietary antioxidants. *Thorax* 1997; 52: 166–170.
111. Sackensen C, Ercan H, Dizdar E et al. A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(1): 79-85.
112. Petlevski R, Zuntar I, Dodig S et al. Malonaldehyde and Erythrocyte Antioxidant Status in Children with Controlled Asthma. *Coll. Antropol* 2009; 33(4): 1251–1254.
113. Liao M, Chen C, Hsu M. Evaluation of serum antioxidant status in children. *Acta Pediatr Taiwan* 2004; 45(4): 213-217.
114. Bibi H, Schesinger M, Tabachnik E et al. Erythrocyte glutathione peroxidase activity in asthmatic children. *Ann Allergy* 1988; 61(5): 339-340.
115. Marcal L, Rehder J, Newburger P et al. Superoxide release and cellular glutathione peroxidase activity in leukocytes from children with persistent asthma. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1607-1613.
116. Maksimovic Z, Djujic I. Selenium research in Serbia, Yugoslavia. *J Enviromen Pathol Toxicol Oncolo* 1998; 17 (3-4):165-171.
117. Shaheen S, Sterne J, Thompson R et al. Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1823–1828.
118. Baker JC, Ayres JG. Diet and asthma. *Respir Med* 2000; 94: 925–934.

119. Flatt A, Pearce N, Thomson CD et al. Reduced selenium in asthmatic subjects in New Zealand. *Thorax* 1990; 45: 95-99.
120. Kosecik M, Erel O, Sevinc E et al. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol* 2005; 100: 61-64.
121. Church D, Pryor W. Free-radical chemistry of cigarette smoke and toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 111-126.
122. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int* 2005; 47: 635-639.
123. Katsoulis K, Kontakiotis T, Leonardopoulos I et al. Serum total antioxidant status in severe exacerbation of asthma: correlation with the severity of the disease. *J Asthma* 2003; 40: 847-854.
124. Kabesch M, Hoefler C, Carr D et al. Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma. *Thorax* 2004; 59: 569-573.
125. Gilland D, Li Y, Dubeau L et al. Effects of glutathione S transferase M1, maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 457-463.
126. Gilland D, Li Y, Gong H et al. Glutathione S transferases M1 and P1 prevent aggravation of allergic responses by second hand smoke. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1335-1341.
127. Majori M, Vachier I, Godard P et al. Superoxide anion production by monocyte of corticosteroid-treated asthmatic patients. *Eur Respir J* 1998; 11: 133-138.
128. Leu P, Rascu A, Otelea M et al. Study of fluticasone propionate efficacy in the treatment of patients with bronchial asthma not controlled by other inhaled corticosteroids. *Rom J Intern Med* 1998; 36: 105-111.
129. Lantero S, Oddera S, Silvestri M, et al. Budesonide down-regulates eosinophil locomotion but has no effects on ECP release or on H₂O₂ production. *Lung* 1999; 177: 219-228.
130. Liu L, Poon R, Chen L et al. Acute effects of air pollution on pulmonary function, airway inflammation and oxidative stress in asthmatic children. *Environ Health Perspect* 2008; 117: 668-674.

131. Baraldi E, Ghiro L, Piovan V et al. Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Chest* 2003; 124: 25-31.
132. Alzoghaibi M, Bahammam AS Lipid peroxides in stable asthmatics receiving inhaled steroids and long-acting beta-2-agonist. *Respirology* 2007; 12: 439-442.
133. Ozaras R, Tahan V, Turkmen S et al. Changes in malonaldehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta 2 agonist. *Respirology* 2000; 5: 289-292.
134. Ito K, Hanazawa T, Tomita K et al. Oxidative stress reduces histone deacetylase-2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 240-245.
135. Kobazashi Z, Bossley C, Gupta A et al. Passive smoking impairs histone deacetylase-2 in children with severe asthma. *Chest* 2014; 145(20): 305-312.
136. Pennings H, Borm P, Evelo C et al. *Eur Respir J* 1999; 13: 1260-1266.
137. Fenech A, Ellul-Micallef R. Selenium, glutathione peroxidase and super oxide dismutase in Maltese asthmatic patients: effect of glucocorticoid administration. *Pulm Pharmacol Ther* 1998; 11: 301-308.
138. Black S, Kushners I, Samols D. C-reactive protein. *J Biol Chem* 2004; 279(47): 48487-48490.
139. Kony S, Zureik M, Driss F, Neukirch C, Leynaert B, Neukirch F. Association of bronchial hyperresponsiveness and lung function with C reactive protein: a population based study. *Thorax* 2004; 59: 892-896.
140. Galez D, Dodig S, Raos M et al. C-reactive protein in children with asthma and allergic rhinitis. *Biochemia medica* 2006; 16(2): 163-9.
141. Panasyek B, Liebhart E, Liebhart J et al. Serum concentration of C-reactive protein is not a good marker of bronchial hyperresponsiveness. *Arch immunol Ther Exp (Warsz)* 2007; 55: 341-345.
142. Olafsdottir I, Gislason T, Thjodleifsson B et al. C reactive protein levels are increased in non-allergic but not allergic asthma a multicentre epidemiological study. *Thorax* 2005; 60: 451-454.

143. Jopusilahti P, Salomaa V, Hakala K et al. The association of sensitive systemic inflammation markers with bronchial asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 381-385.
144. Chiu ZHM, Spiegelman D, Dockert DW, Garshick E, Hammond SK, Smith TJ, Hart JE, Laden F. Secondhand smoke exposure and inflammatory markers in nonsmokers in the Trucking industry. *Environ Health Perspect* 2011; 119(9): 1294-1300.
145. Merghani T, Saeed A, Alaward A. Changes in plasma IL-4, TNF- α and CRP in response to regular passive smoking at home among healthy school children in Khartoum, Sudan. *Afr Health Sci* 2012; 12(10): 41-47.
146. Takemura M, Matsumoto H, Niimi A et al. High sensitivity C-reactive protein in asthma. *Eur Respir J* 2006; 27: 908-912.
147. Elbehidz R, Amr G, Radwan H. High sensitivity C reactive protein as novel marker for airway inflammation and steroid responsiveness in asthmatic children. *Egyptian Journal of Bronchology* 2010; 4(2); 79-87.
148. Deraz T, Kamel T, El-Kerdany T et al. High-sensitivity C reactive protein as biomarker for grading of childhood asthma in relation to clinical classification, induced sputum cellularity and spirometry. *Pediatr Pulmonol* 2012; 47(3): 220-225.
149. Islam M, Amin M, Begum S et al. Total count of white blood cells in adult male smokers. *J Bangladesh Soc Physiol* 2007; 2: 49-53.
150. Wantabe N, Fukushima M, Taniguchi A et al. Smoking, white blood cell counts, and TNF system activity in Japanese male subjects with normal glucose tolerance. *Toxicol Induc Dis* 2011; 9: 12-17.
151. Andrews J, Tingen M. The effect of smoking, smoking cessation and passive smoke exposure on common laboratory values in clinical settings: a review of the evidence. *Crit Care Nurs Clin N Am* 2006; 18: 63-69.
152. Sunyer J, Munoz A, Peng Y et al. Longitudinal relation between smoking and white blood cells. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 734-741.
153. Dinas PC, Metsios GS, Jamurtas AZ et al. Acute effects of second hand smoke on complete blood count. *Int J Environ Health Res* 2014; 24: 56-62.
154. Panagiotakos D, Pitsavos C, Chrysoschoou C et al. Effect of exposure to secondhand smoke on markers of inflammation: The ATTICA study. *Am J Med* 2004; 116: 145-150.

155. Matsumoto K, Aizawa H, Inoue H et al. Eosinophilic airway inflammation induced by repeated exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J* 1998; 12: 387-394.
156. Berrak S, Ozek E, Cebeci D. Increased cord blood eosinophil counts and prenatal exposure to tobacco smoke: a concern for development of atopy early in childhood. *Marmara medical Journal* 2002; 15: 86-91.
157. Shunsuke A, Shinji T, Komiza K et al. Short term passive smoking may cause acute eosinophilic pneumonia: an evidence of very high urinary cotinine and nicotine levels. *Chest* 2010; 138: 538-542.
158. Chalmers G, Macleod K, Little S et al. Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma. *Thorax* 2002; 57: 226-230.
159. Lazarus S, Chinchilli V, Rollings N et al. Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonist in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 783-790.
160. Malmberg L, Pelkonen A, Haahtela T et al. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax* 2003; 58: 494-499.
161. Nadif R, Matran R, Maccario J et al. Passive and active smoking and exhaled nitric oxide levels according to asthma and atopy in adults. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 104(5): 385-393.
162. Laoudi Y, Nikasinovic L, Sahraoui et al. Passive smoking is major determinant of exhaled nitric oxide levels in allergic asthmatic children. *Allergy* 2010; 65(4): 491-497.
163. Nicolini G, Chetta A, Somonazzi A et al. Both bronchial and alveolar exhaled nitric oxide are reduced with extrafine beclomethasone dipropionate in asthma. *Allergy Asthma Proc* 2010; 31(5): 85-90.
164. De la Riva-Velasco E, Krishan S, Dozor A. Relationship between exhaled nitric oxide and exposure to low-level environmental tobacco smoke in children with asthma on inhaled corticosteroids. *J Asthma* 2012; 49(7): 673-678.
165. Kalliola S, Pelkonen A, Malmberg L et al. Maternal smoking affects lung function and airway inflammation in young children with multiple-trigger wheeze. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(3): 730-735.

166. Cook D, Strachan D, Carey I. Health effects of passive smoking. 9. Parental smoking and spirometric indices in children. *Thorax* 1998; 53: 884-893.
167. Haby MM, Peat JK, Woolcock AJ. Effect of passive smoking, asthma and respiratory infection on lung function in Australian children. *Pediatr Pulmonol* 1994; 18(5): 3232-3329.
168. Magnussen H, Jorres R, Oldigis M. Effect of one hour of passive cigarette smoking on lung function and airway responsiveness in adults and children with asthma. *Clin Investig* 1992; 70: 368-371.
169. Lebowitz M. Influence of passive smoking on pulmonary function: a survey. *Prev Med* 1984; 13(6): 645-655.
170. Halterman J, Szilagyi P, Yoos J et al. Benefits of a school based asthma treatment program in the absence of secondhand smoke exposure. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004; 158: 460-467.
171. Kihlstrom A, Lilja G, Pershagen G et al. Exposure to birch pollen in infancy and development of atopic disease in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 78-84.
172. Illi S, von Mutius E, Lau S et al. Perennial sensitisation early in life and chronic asthma in children. *Lancet* 2006; 368: 763-770.
173. Iaan MP, Baert MRM, Bijl AMH. Markers of early sensitization and inflammation in relation to clinical manifestations of atopic disease up to 2 years of age in 133 high risk children. *Clin Exp Allergy* 2000; 30; 944-953.
174. Lau S, Illi S, Sommerfeld C et al. Early exposure to house dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. *Lancet* 2000; 356: 1392-1397.
175. Celedon J, Milton D, Ramsey C et al. Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 144-149.
176. Lau S. Role of allergen exposure on the development of asthma in childhood. *Eur Respir Mon* 2012; 56: 128-133.
177. Wuthrich B. Clinical aspects, epidemiology and prognosis of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 83: 464-470.

178. Svanes C, Heinrich J, Jarvis D et al. Pet keeping in childhood and adult asthma and hay fever: European community respiratory health survey. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 289-300.
179. Bertelsen R, Lodrup Carlsen K, Carlsen K et al. Childhood asthma and early life exposure to indoor allergens, endotoxin and (1,3)-glucans. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 307-316.
180. Campo P, Karla H, Levin L et al. Influence of dog ownership and high endotoxin on wheezing and atopy during infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 18: 1271-1278.
181. Burgess J, Lowe A, Matheson M et al. Does eczema lead to asthma? *J Asthma* 2009; 46: 429-436.
182. Van der Hulst A, Klip H, Brand P. Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: a systematic review. *Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 565-569.
183. Resnick S, Hornung R, Konrad T. A comparison of dermatologist and generalist, management of childhood atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 1996; 132: 1047-1052.
184. Lowe A, Abramson M, Hosking C et al. The temporal sequence of allergic sensitization and onset of infantile eczema. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 536-542.
185. Almqvist C, Li Q, Britton W et al. Early predictors for developing allergic disease and asthma: examining separate steps in the allergic march. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1296-1302.
186. Burgess J, Dharmage S, Byrnes G et al. Childhood eczema and asthma incidence and persistence: a cohort study from childhood to the middle age. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 280-285.
187. Illi S, von Mutius E, Lau S et al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 925-931.
188. Setticone R, Setticone G. IgE and the allergy-asthma connection in the 23-year follow-up of Brown University students. *Allergy Asthma Proc* 2000; 21: 221-225.
189. Wright A, Holberg C, Martinez F et al. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics* 1994; 94: 985-901.
190. Rochat M, Illi S, Ege M et al. Allergic rhinitis as a predictor for wheezing onset in school age children. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 1170-1175.

191. Horak G. The role of allergy within the scope of rhinosinusitis. *Wien Med Wochenschrift Suppl* 1989; 104: 67-68.
192. Holt P, Sly P, Martinez F et al. Drug development strategies for asthma: in search of a new paradigm. *Nat Immunol* 2004; 5: 695-698.
193. Martinez F. Toward asthma prevention-does all that really matters happen before we learn to read? *N Engl J Med* 2003; 349: 1473-1475.
194. Jackson D, Gangnon R, Evans M et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high risk children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 667-672.
195. Bartlett N, Walton RP, Edwards M et al. Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic inflammation. *Nat Med* 2008; 14: 199-204.
196. Martinez F. The connection between early life wheezing and subsequent asthma: the viral march. *Allergol Immunopathol* 2009; 37: 249-251.
197. Stern D, Guerra S, Halonen M et al. Low IFN-gamma production in the first year of life as predictor of wheeze during childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 835-841.
198. Caliskan M, Bochkov Y, Kreiner-Moller E et al. Rhinovirus wheezing illness and genetic risk of childhood-onset asthma. *N Engl J Med* 2013; 11: 1398-1407.
199. Xepapadaki P, Skevaki C, Papadopoulos N. The role of viral and bacterial infections on the development and exacerbations of asthma. *Eur Respir Mon* 2012; 56: 115-127.
200. Kusel M, de Klerk N, Keadaze T et al. Early life respiratory viral infections, atopic sensitisation and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1105-1110.
201. Kotaniemi-Syrjanen A, Laatikainen A, Waris M et al. Respiratory syncytial virus infection in children hospitalized for wheezing: virus specific studies from infancy to preschool years. *Acta Paediatr* 2005; 94: 159-165.
202. Bartal M. Health effects of tobacco use and exposure. *Monaldi Arch Chest Dis* 2001; 56: 545-554.
203. McQuaid E, Walders N, Borelli B. Environmental tobacco smoke exposure in pediatric asthma: overview and recommendations for practice. *Clin Pediatr (Phila)* 2003; 42: 775-87.

204. Lannero E, Kull I, Wickman M et al. Environmental risk factor for allergy and socioeconomic status in birth cohort (BAMSE). *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13: 182-187.
205. Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency. Health effects assessments for environmental tobacco smoke . Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency, 2005.
206. Wickens K, Pearce N, Crane J et al. Antibiotic use in early childhood and the development to asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 766-771.
207. Strachan D, Taylor E, Carpenter R. Family structure, neonatal infection and hay fever in adolescence. *Arch Dis Child* 1996; 74: 422-426.
208. Mai X, Gaddlin P, Nilsson L et al. Asthma, lung function and allergy in 12 year old children with very low birth weight; A prospective study. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 184-192.
209. Flaherman V, Rutherford GW. A meta-analysis of the effect of high weight on asthma. *Arch Dis Child* 2006; 91: 334-339.
210. Leadbitter P, Pearce N, Cheng S et al. Relationship between fetal growth and the development of asthma and atopy in childhood. *Thorax* 1999; 54: 905-910.
211. Wickman M. When allergies complicate allergies. *Allergy* 2005; 60(79): 14-18.

Biografija

Mr sc med Dr Maja Slavkovi Jovanovi ro ena je 30.5.1967. u Nišu, gde je završila osnovnu i srednju školu kao nosilac diploma "Vuk Karadži ". Medicinski fakultet u Nišu upisala je školske 1986/87.g., a diplomirala 25.11.1991.g., sa prose nom ocenom tokom studija 9,22. Tokom studija je dve godine bila lan redakcije sveske za medicinske nauke stru nog asopisa studenata Univerziteta u Nišu "Nau ni podmladak". U okviru me ufakultetske saradnje, 1991.g. boravila mesec dana u Bohumu (Nema ka) na Univerzitetskoj Hirurškoj klinici Rurskog Univerziteta.

Po obavljenom obaveznom lekarskom stažu, 25.1.1993.g. položila stru ni ispit pred komisijom Ministarstva zdravlja republike Srbije. Od 1.7.1993. do 30.4.1994. radila na Medicinskom fakultetu u Nišu na osposobljavanju za nau no-istraživa ki rad iz oblasti fundamentalnih biomedicinskih nauka. Od 1.5.1994.g. je u radnom odnosu na Klinici za De je interne bolesti Klini kog centra Niš. Specijalisti ki ispit iz pedijatrije je položila pred komisijom Medicinskog fakulteta u Nišu 12.10.1998.g. sa odli nim uspehom i prvih pet godina radila na Odeljenju intenzivne nege i neonatologije. Od 2003. godine radi na Odeljenju za pulmologiju Klinike za De je interne bolesti Klini kog centra Niš, gde je u periodu od 01.12. 2004. do 15.09.2012. bila na elnik odeljenja.

Magistarsku tezu iz oblasti pneumoftizilogije pod nazivom "Uloga doprinose ih faktora u etiopatogenezi ekstrinzi k de je astme" odbranila je 28.11.2003. godine pred Komisijom Medicinskog fakuleta u Nišu. Naziv Primarijus joj je dodeljen 24.01.2008. godine, od strane Ministra zdravlja Republike Srbije.

Autor je i koautor u oko 80 stru nih i nau nih radova, publikovanih u asopisima ili prezentovanih na kongresima i nau nim skupovima u zemlji i inostranstvu. U estvovala je 2000.g. u ispitivanju u okviru ISAAC studije za Jugoslaviju (Internacionalna studija za astmu i alergiju u detinjstvu). Završila je više kurseva i seminara u zemlji i inostranstvu iz oblasti pulmologije, alegologije i pedijatrije.

lan je Evropske respiratorne asocijacije (ERS), Evropske akademije alergologa i klini kih imunologa (EACCI), Udruženja alergologa i klini kih imunologa Srbije, Udrženja pedijatarata Srbije i Srpskog lekarskog društva. Aktivno se služi engleskim kao i kompjuterskim programima Windows office paketa.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ЕФЕКАТ ПАСИВНОГ ПУШЕЊА НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС
КОД ДЕТЕ ОБОЛЕЛЕ ОД БРОНХИЈАЛНЕ АСТМЕ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кришио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 26. 6. 2014.

Аутор дисертације: МАЈА СЛАВКОВИЋ ЈОВАНОВИЋ

Потпис докторанда:
Маја Славковић Јовановић



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора: МАЈА ШАНКОВИЋ ЈОВАНОВИЋ

Студијски програм: МЕДИЦИНА

Наслов рада: ЕФЕКАТ ПАСИВНОГ ПУШЕЊА НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС
КОД ДЕЦЕ ОБОЛЕЛЕ ОД БРОНХИЈАЛНЕ АСТМЕ

Ментор: ПРОФ. ДР. ИВАНА ШАНКОВИЋ

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 26.6.2014.

Аутор дисертације: МАЈА ШАНКОВИЋ ЈОВАНОВИЋ

Потпис докторанда:

Маја Шанковић Јовановић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ЕФЕКАТ ПАСИВНОГ ПУШЕЊА НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС
КОД ДЕТЕ ОБОЛЕЛЕ ОД БРОНХИЈАЛНЕ АСТМЕ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молио да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 26.6.2014.

Аутор дисертације: Мара Јанковић Јовановић

Потпис докторанда:

Мара Јанковић Јовановић