

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

SANDA ŠKRINJARIĆ-CINCAR

**Razina imunoreaktivnog endotelina-1
u plazmi i induciranom iskašljaju
bolesnika s astmom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2008.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

SANDA ŠKRINJARIĆ-CINCAR

**Razina imunoreaktivnog endotelina-1
u plazmi i induciranom iskašljaju
bolesnika s astmom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2008.

Disertacija je izrađena na Odjelu za plućne bolesti, Odjelu za nuklearnu medicinu i Odjelu za biokemiju Kliničke bolnice Osijek

Voditelj rada: prof. dr. sc. Neven Tudorić

S osobitim poštovanjem zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Nevenu Tudoriću na povjerenju koje mi je ukazao prihvativši se mentorstva ovog rada i pomoći koju mi je pružio tijekom njegove izrade.

Posebno sam zahvalna prof. dr. sc. Svenu Kurbelu koji je posvetio mnogo svog vremena savjetujući me od prvih zamisli pa do konačne realizacije rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivanu Karneru, dipl. ing. Pašezadi Kosović, mr. sc. Vatroslavu Šeriću i prof. dr. sc. Željku Romiću na laboratorijskoj obradi učinjenoj za potrebe ovog rada.

Doc. dr. sc. Vesni Ilakovac zahvaljujem na informatičkoj obradi podataka.

Prof. dr. sc. Sandi Ham zahvaljujem na lektoriranju rada.

Prijateljici i kolegici Gordani Petrović, vms. Branki Boban i prof. Kristini Kralik zahvalna sam na nesebičnoj pomoći tijekom izrade rada i stalnoj prijateljskoj potpori.

Zahvaljujem, također, svim kolegicama i kolegama, kao i svom osoblju Odjela za plućne bolesti na potpori i sudjelovanju u uzorku skupine kontrolnih ispitanika.

I, na kraju zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju i strpljenju.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

ACQ	upitnik za procjenu kontrole astme (engl. <i>asthma control questionnaire</i>)
BAL	bronhoalveolarni ispirak
BHR	bronhalna hiperreaktivnost
DTT	ditiotreitol
ECE	endotelin konvertirajući enzim
ECM	izvanstanična stroma (engl. <i>extracellular matrix</i>)
ECP	eozinofilni kationski protein
EDTA	natrijeva sol etilendiamin tetraoctene kiseline
ET-1	endotelin-1
ET _A i ET _B	endotelinski receptori
FEV ₁	forsirani ekspiracijski volumen zraka izdahnut u 1. sekundi
FEF ₅₀	forsirani ekspiracijski protok pri 50% VC
FVC	forsirani vitalni kapacitet
GINA	Globalna inicijativa za astmu
IS	inducirani iskašljaj (engl. <i>induced sputum</i>)
ICS	inhalacijski kortikosteroidi
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
MMP	matriksne metaloproteinaze
NANK	neadrenergički-nekolinergički autonomni živčani sustav
NEP	neutralna endopeptidaza
NKA	neurokinin A
NO	dušikov oksid

PBS	otopina natrijevog klorida u fosfatnom puferu (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PEF	vršni ekspiracijski protok
SP	supstancija P
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteinaze
VAS	vizualna analogna skala
VC	vitalni kapacitet
VIP	vazoaktivni intestinalni peptid

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. Astma kao javnozdravstveni problem i znanstvenoistraživački izazov	1
1.1.1. Složenost nastanka astme	2
1.1.2. Imunopatogeneza astme	3
1.1.3. Neurogeni mehanizmi u astmi	4
1.1.4. Remodeliranje strukture dišnih putova i njegova uloga	5
1.1.5. Epitel kao regulator upale i remodeliranja	6
1.1.6. Funkcionalne i kliničke značajke astme	7
1. 2. Procjena upale dišnih putova	8
1.2.1. Eozinofilni kationski protein (ECP)	10
1.2.2. Indukcija iskašljaja	11
1.3. Endotelin-1 (ET-1): medijator u astmi?.....	14
2. HIPOTEZA	18
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
4. ISPITANICI I METODE	20
4.1. Uzorak ispitanika.....	20
4.2. Plan istraživanja.....	21
4.3. Metode	22
4.3.1. Subjektivne tegobe	22
4.3.2. Spirometrija	24
4.3.3. Metoda indukcije iskašljaja	24
4.3.4. Obrada induciranog iskašljaja	25
4.3.5. Laboratorijska mjerenja	25
4.4. Statistička obrada podataka	26
5. REZULTATI	29
5.1. Spirometrijska mjerenja.....	29
5.2. Bolesnički simptomi	31
5.3. Indukcija iskašljaja	31
5.4. Biokemijska mjerenja	37
5.5. Vrijednost ispitivanih pokazatelja u razlučivanju bolesnika i kontrolnih ispitanika.....	42
5.6. Povezanost između pokazatelja	52
6. RASPRAVA	54
6.1. Procjena ET-1 i ostalih ispitanih biokemijskih pokazatelja u astmi.....	54

6.2. Mogući razlozi nalaza niske razine ET-1 u IS u bolesnika s astmom	58
6.3. Uspješnost i sigurnost metode indukcije iskašljaja u bolesnika s astmom.....	65
6.4. Završna razmatranja	67
7. ZAKLJUČAK	69
8. SAŽETAK	72
9. SUMMARY	74
10. POPIS LITERATURE	76
11. ŽIVOTOPIS	95
12. POPIS PRILOGA	98

1. UVOD

1. 1. Astma kao javnozdravstveni problem i znanstvenoistraživački izazov

Izdajnički *wheezing* prepoznat je davno kao *puhanje bolesnog vjetra* kroz lako razdražljive dišne putove suženog lumena i zadebljane stjenke. Prema procjenama i izvješću međunarodne stručne skupine, u svijetu od astme boluje oko 300 milijuna ljudi. Iako neka istraživanja pokazuju da je porast možda dosegao vrhunac, prema nekim predviđanjima očekuje se da bi u narednih 20 godina broj oboljelih mogao narasti za još 100 milijuna (1).

Dosege toga javnozdravstvenog problema upotpunjuju činjenice da bolest izrazito narušava kvalitetu života bolesnika, a veliki troškovi liječenja ekonomski bitno opterećuju bolesnike, zdravstveni sustav i društvo (2).

Spoznajom da se u podlozi kliničkih zbivanja nalazi kronična upala dišnih putova, učinjen je ogroman napredak u razumijevanju bolesti, a time i njezinu liječenju. Smjernice Globalne inicijative za astmu (GINA) (1) svojim sveobuhvatnim programom zasada s velikim uspjehom utječu na prepoznavanje i kontrolu bolesti. Međutim, nemogućnost potpune kontrole astme ukazuje da još uvijek postoje ključne nepoznanice i potreba da se odgovori na još mnoga važna istraživačka pitanja. Među njima su osobito bitna ona iz područja složenih patogenetskih mehanizama kojih su nam potankosti još uvijek nepoznanica.

Biotehnološki razvitak u području molekularne biologije i drugih znanosti, posljednjih je godina omogućio precizan uvid u upalna zbivanja na dotad nepoznatoj razini. U središtu su istraživanja upalne i strukturne stanice, medijatori, citokini, neuropeptidi, receptori, geni, transkripcijski čimbenici te mnoge druge sastavnice složenog upalnoga zbivanja. Različitim izravnim i neizravnim metodama potvrđena je prisutnost i određena obilježja pokazatelja aktivne imunološke upale, a nastojanja idu u smjeru da se potvrdi i njihova veza s tijekom i ishodom bolesti. Iako je u ovom trenutku mala praktična korist od dosadašnjih spoznaja, smatra se nužnim nastaviti istraživanja radi pronalaska jednostavne, neinvazivne i izravne metode i pokazatelja upalnoga zbivanja, koja bi pronašla svoje mjesto, ne samo u istraživačkom radu, nego i u kliničkoj praksi.

1.1.1. Složenost nastanka astme

Današnje shvaćanje patogeneze astme je da je karakteristična imunološka upala stijenke dišnih putova odgovorna za smanjenje protoka zraka i bronhalnu hiperreaktivnost (BHR). Upala je vrlo složena u nastanku, reguliranju i rezultatu, a jednom uspostavljen proces upale trajno se održava.

Glavna su obilježja upale: kronična aktivacija upalnih stanica, izmijenjen epitel koji ima smanjenu sposobnost obnavljanja, strukturne promjene nazvane remodeliranje (3).

Smatra se da astma najvjerojatnije nastaje složenim međuodnosom više različitih gena i okolišnih čimbenika. Genetske promjene u podlozi astme još uvijek nisu sasvim rasvijetljene. Uočena su kromosomska područja i polimorfizam mogućih gena povezanih s astmom, razinom IgE-a i odgovorom na liječenje astme. Od 1990.g., kada su uočena prva kromosomska područja povezana s astmom, istražuje se radi prepoznavanja gena za inicijaciju, progresiju i težinu bolesti i povezanost s okolišnim čimbenicima. Izvještava se da je više od 70 mogućih varijanti gena povezano s različitim fenotipovima astme. Istraživanja na blizancima pokazala su da postoji snažna međusobna povezanost između astme, atopije i bronhalne hiperreaktivnosti koja se tumači preklapanjem gena koji su odgovorni za svaku od navedenih pojava (4).

Jednako tako okolišni čimbenici na složen način utječu na ekspresiju gena i nastanak fenotipa astme i atopije. Mnoge hipoteze pokušavaju izvanjskim utjecajima objasniti zemljopisnu varijabilnost, odnosno porast prevalencije astme u zapadnoj Europi. Istraživanja su pokazala da je osjetljivost na astmu određena tijekom fetalnog razvoja i prvih 3 – 5 godina života (5). Epidemiološki podatci osigurali su temelj za dvije glavne hipoteze koje objašnjavaju porast astme, a to su način ishrane i higijena. Obrnut odnos između izlaganja mikrobima u ranoj životnoj dobi i nastanka atopije objašnjava *higijenska hipoteza* (6). Uporaba antibiotika u ranom djetinjstvu povezana je s povećanim rizikom za razvoj astme u genetski predisponirane djece (7). Smatra se da bi u smanjivanju atopijskih bolesti najvažniju ulogu mogla imati zadovoljavajuća intestinalna mikrobna flora (8). Rezultati nekih istraživanja osobitu važnost pridaju čimbenicima koji dovode do onečišćenja zraka (9).

1.1.2. Imunopatogeneza astme

Upletenost je imunološkog sustava u patogenezu astme neosporna, ali precizna uloga specifične imunosti na različitim razinama procesa od senzibilizacije do kliničkih simptoma i napretka bolesti, nije sasvim jasna. Većina istraživanja ukazuje da se ne razlikuju imunološka zbivanja u atopijskoj i neatopijskoj astmi (10,11).

U patogenezi astme važnu ulogu imaju brojne migrirajuće i strukturne stanice koje otpuštaju svoje medijatore, citokine, kemokine i čimbenik rasta.

Čitav proces započinje, vođen je i održavan prisutnošću kronično aktiviranih Th2 CD4⁺ limfocita koji se diferenciraju i proliferiraju nakon što im se predoči obrađen antigen (10). Ovo usmjeravanje ima ključnu važnost za postizanje imunosnog odgovora, a ovisi o brojnim čimbenicima, osobito genetskim značajkama domaćina i citokinskom mikrokolišu (12,13). Jednom aktivirane Th2 stanice izlučuju IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-9, IL-3, GM-SCF i mnoštvo čimbenika rasta. Recipročno uređenom regulacijom Th1 i Th2 upalnog odgovora, istovremeno su inhibirani Th1 limfociti. Fetalni imunološki sustav je, zahvaljujući citokinima koje proizvodi placenta i amnion radi zaštite trudnoće, usmjeren prema Th2, a Th1 imuni odgovor je suprimiran (14). Učestale infekcije u djetinjstvu dovode do visoke proizvodnje INF- γ i IL-12 i mogu suprimirati Th2 odgovor te biti zaštita od astme. Smatra se da je vremenski razmak između virusne infekcije i izlaganja alergenu bitan za razvoj pojačane bronhalne podražljivosti (15).

IL-4 iz pomoćničkih limfocita i mastocita potiče diferencijaciju Th2 limfocita i ima središnje mjesto u alergijskom odgovoru (16). Međutim, nije potvrđeno da je ovaj citokin potreban za regulaciju eozinofilije, pojačanu podražljivost dišnih putova i stvaranje sekreta u žlijezdama, za razliku od IL-13 koji je za sve navedeno potreban (17). Suvremene studije pokazale su da u nekim slučajevima IL-4 i IL-13 u kombinaciji osiguravaju brzi nastanak Th2 odgovora. Smatra se da utječu na osobine epitelno-mezenhimalne jedinice u smislu ostvarenja uobičajene veze između stukturnih i upalnih stanica u dišnim putovima koje surađuju u stvaranju fenotipa astme (18). IL-13 i IL-4 podudaraju se u djelovanju poprilično 30%, a razlog je za to najvjerojatnije što receptor IL-4R- α dijele oba interleukina (19). Citokini Th2 profila odgovorni su za nakupljanje i aktivaciju upalnih stanica i proizvodnju IgE. Pojačavaju ekspresiju adhezijskih molekula ICAM i VCAM na endotelnim stanicama i omogućavaju migraciju eozinofila, mastocita, bazofila, limfocita i monocita u stijenku dišnih putova (20). Brojni kemokini i citokini pospješuju preživljavanje upalnih stanica u dišnim putovima u astmatičara (21).

Većina medijatora iz mastocita ima ulogu u ranom razdoblju upalnog odgovora, ali preko metabolita arahidonske kiseline i proizvodnje citokina IL-1, TNF α , INF γ mogu imati ulogu i u kasnom razdoblju upalnog odgovora (22). Selektivna migracija eozinofila regulirana je posebice pomoću IL-5 koji potiče i sazrijevanje, proliferaciju i otpuštanje eozinofilnih prekursora iz koštane srži, lokalnu diferencijaciju, aktivaciju i poboljšano preživljavanje u tkivu dišnih putova (23). Kada su jednom aktivirani, eozinofili sami proizvode IL-5 što ukazuje na moguće autokrino pojačavanje i obnavljanje procesa. Istraživanja su pokazala da povećan broj neutrofila nije samo u akutnim pogoršanjima, nego su stalno prisutni u velikom broju u dišnim putovima nekih teških astmatičara (24). Postoje eksperimentalni dokazi da su neutrofilni u dišnim putovima kontrolirani citokinima Th2 limfocita, a posebno IL-17 (25). Makrofagi oslobađaju mnoštvo različitih produkata koji imaju bitnu ulogu u oštećenju tkiva i njegovom obnavljanju, odnosno remodeliranju dišnih putova (26).

1.1.3. Neurogeni mehanizmi u astmi

Odavno je poznato da su kolinergički živci u akutnom napadaju, odnosno pogoršanju astme, snažni bronhokonstriktorni putovi. Sve do 50-ih godina prošlog stoljeća astma je bila liječena gotovo isključivo adrenalinom, atropinom i teofilinom i smatralo se da je osnovno zbivanje u astmi poremećaj inervacije dišnog sustava. Većina dokaza upućuje, iako je težište na imunološkim zbivanjima, da neurogeni mehanizmi u bitnoj mjeri pridonose patogenezi astme. Upalni medijatori i osjetni neuropeptidi podražuju parasimpatičke ganglije i na taj način mogu pojačati kolinergički refleksni mehanizam (27).

Bitni dio autonomnoga živčanoga nadzora u dišnim putovima odvija se neadrenergičko-nekolinergičkim živčanim sustavom (NANK) koji može biti inhibicijski i ekscitacijski. Inhibicijska vlakna tog sustava (i-NANK) jedina su bronhodilatacijska vlakna u dišnim putovima, osobito u velikim dišnim putovima. Najvažniji živčani prijenosnik i-NANK-a je dušikov oksid (NO). Neurogeno oslobođen iz inhibicijskih vlakana NANK-a modulira djelovanje kolinergičkog sustava vjerojatno putem funkcionalnog antagonizma s acetilkolinom (28). Drugi je mogući prijenosnik i-NANK-a vazoaktivni intestinalni peptid (VIP). Postoje izvješća o sniženoj VIP imunoreaktivnosti u plućima bolesnika umrlih od astme (29), ali to nije potvrđeno *in vivo* u biopsijskim uzorcima bronhalne sluznice u bolesnika s astmom (30).

Ekscitacijski učinak (e-NANK) ostvaruje se preko supstancije P (SP) i neurokinina A (NKA) otpuštenih iz nemijeliziranih C senzornih vlakana. Supstancija P ima upalni učinak u

dišnim putovima, pospješuje povećanu mikrovaskularnu permeabilnost i mukoznu sekreciju, a obje pridonose suženju dišnih putova. U bolesnika sa smrtonosnim ishodom astme pronađena je povišena imunoreaktivnost SP živaca (31), dok novije studije nisu potvrdile povišenu SP imunoreaktivnost u biopsijskim uzorcima bronha bolesnika oboljelih od astme (30). Međutim, postoje izvješća o povišenoj razini SP u BAL-u i induciranom iskašljaju bolesnika s astmom (32).

1.1.4. Remodeliranje strukture dišnih putova i njegova uloga

Drugo temeljno zbivanje u astmi proces je remodeliranja koji se odvija usporedo s upalom kroz aktivaciju i složene epitelno-mezenhimalne interakcije (18). Remodeliranje se definira kao mijenjanje strukture dišnih putova koje uključuje hiperplaziju glatkih mišićnih stanica, hipertrofiju mukoznih žlijezda, subepitelnu fibrozu, angiogenezu i promjene u ekstracelularnom matriksu. Sve to utječe na funkcionalne osobitosti u astmi (33,34).

Najvažnija posljedica tih promjena dodatno je suženje dišnih putova što bitno pridonosi povećanju otpora protoku zraka. U mnogih bolesnika prisutna je trajna opstrukcija dišnih putova usprkos liječenju kortikosteroidima, čak i u odsutnosti simptoma, a smatra se da odražava stanje nakon remodeliranja dišnih putova (35). S obzirom na moguće funkcionalne posljedice remodeliranja, postoje znanstvene nedoumice u vezi s njegovom ulogom – je li riječ o trajnom procesu od upale do cijeljenja ili možda o protektivnom odgovoru s obzirom na poremećenu mehaniku dišnih putova uslijed oštećenja elastičnih struktura plućnog tkiva (34).

Istraživanja su pokazala da strukturne stanice dišnih putova, ranije smatrane pasivnim i sekundarno promijenjenim, imaju sposobnost migracije, diferencijacije, sazrijevanja, te stvaranja citokina i čimbenika rasta. Tako je postalo jasno da one aktivno sudjeluju u upalnom imunološkom odgovoru i heterogenom procesu remodeliranja (36).

Središnje je zbivanje u procesu remodeliranja oštećenje epitela i njegov usporeni oporavak te prekomjerno stvaranje profibrotičkih čimbenika rasta (3). Promijenjene epitelne stanice kao odgovor na mehanički stres pojačano stvaraju i oslobađaju TGF- β (37) i ET-1 (38) koji zajedno s aktivnom uključenošću mezenhimalnih stanica imaju odlučujuću ulogu u strukturnim promjenama (37). Ispod oštećenih struktura epitela, fibroblasti se preobličuju u miofibroblaste i odlažu intersticijski kolagen. Izvanstanična stroma (ECM) dinamična je struktura određena ravnotežom sinteze i razgradnje njezinih sastavnica koje su pod utjecajem mišićnih stanica, ali i utječu na mišićne i upalne stanice te fibroblaste (26). Matriksne

metaloproteinaze (MMP-2 i MMP-9) i njihovi tkivni inhibitori (TIMP-1 i TIMP-2) imaju posebno mjesto u tom procesu (39). Zadebljani sloj neposredno ispod subepitelne bazalne opne bogat je kolagenom I, III, V i fibronektinom te proteoglikanima u dubljim dijelovima stijenke dišnih putova (36).

Mnoga istraživanja pokazala su da je masa glatkih mišića dišnih putova u astmatičara povećana od 25% do 200% (36). Izlaganjem glatkomišićnih stanica dišnih putova upali, u njima se mijenja homeostaza kalcija, te potiče hipertrofija i hiperplazija, a one same postaju sposobne proizvoditi citokine, kemokine i čimbenike rasta (40). Autokrini sposobnost također mijenja njihov kontraktilni i relaksirajući odgovor u smislu da su kapacitet i brzina skraćivanja povećani. Glatke mišićne stanice dišnih putova, sa svojom osobinom strukturnog mijenjanja, te kontraktilnom i sekretornom sposobnošću, imaju važnu imunoeffektivnu ulogu u održavanju upale i remodeliranju dišnih putova u astmi (41).

1.1.5. Epitel kao regulator upale i remodeliranja

Epitel dišnih putova, razdvajajući vanjski okoliš i unutarnji prostor pluća, služi kao prepreka, a u isto vrijeme kao ciljno mjesto za raznolike podražaje iz okoliša djeluje kao metabolički aktivna plućna sastavnica (42). Istraživanja su pokazala da epitelne stanice posjedovanjem potrebnih kostimulacijskih molekula na svojoj površini imaju sposobnost predočnih stanica za antigene i surađuju s limfocitima Th2. S druge strane pojačana je izraženost adhezijskih molekula koje omogućuje migraciju upalnih stanica, ali i ulazak humanog rinovirusa koji se povezuje s pogoršanjima astme (43). Epitel je dišnih putova u astmatičara oštećen čak i u vrlo blagim slučajevima (44). Tipično je oštećenje epitela u astmi odvajanje kolumnarnog sloja stanica od bazalnog i njegovo otpadanje. Nalazimo ga u iskašljaju astmatičara u obliku nakupina epitelnih stanica – kreolskih tjelešaca (45).

Cijeljenje i obnavljanje bronhalnog epitela u astmi ne događa se kao što je uobičajeno u zdravom organizmu. Aktivirane epitelne stanice tijekom oštećenja i obnavljanja proizvode mnoge medijatore, citokine i kemokine. Najvažniji su oksidativni metaboliti arahidonske kiseline (PGE₂, HETE), NO, ET-1, fibronektin, reaktivni kisik, α i β defensini, MCP-1, eotaksin, RANTES, TGF- β ₁ i TGF- β ₂, TNF- α , IL-1, IL-8, IL-16, IL-5, IL-13 (46). Na taj način epitel šalje signale imunim stanicama i mezenhimu smještenom neposredno ispod njega i postaje odlučan regulator upalne mreže u astmi. Rezultati istraživanja pokazuju da ET-1 potencijalno ima ulogu u inhibiciji obnavljanja epitela i pojačavanju procesa remodeliranja (47).

Epitelno oštećenje također vodi u pojačani bronhalni kontraktilni odgovor na upalne medijatore. Mehaničko odstranjivanje epitelnih stanica dišnih putova *in vitro* rezultira pojačanim kontraktilnim odgovorom na histamin, acetilkolin, leukotrijene i prostaglandin. Mnogo jači kontraktilni učinak bio je izazvan supstancijom P, neurokininom A i bradikininom koje razgrađuje neutralna endopeptidaza (NEP) predominantno lokalizirana u epitelnim stanicama dišnih putova (48).

1.1.6. Funkcionalne i kliničke značajke astme

Funkcionalne promjene povezane su s tipičnim simptomima astme, a to su kašalj, stezanje u prsima, piskanje ili *wheezing* te hipereaktivnost dišnih putova. Kašalj je vjerojatno uzrokovan podraživanjem osjetljivih vlakana upalnim medijatorima, a može biti jedini simptom astme (49). U nekih bolesnika, osobito u kroničnoj teškoj astmi, promjene aferentnih živčanih vlakana smatraju se odgovornim za smanjenu sposobnost osjećanja tegoba vezanih uz suženje dišnih putova (50).

Poznata je činjenica da je glavni uzrok suženja dišnih putova, tijekom asmatskog napada, kontrakcija glatkih mišića bronha. Brojni spazmogeni osobađaju se endogeno kao histamin, triptaza, prostaglandin D₂ i leukotrijen C₄ iz upalnih stanica, neuropeptidi iz lokalnih živčanih vlakana, acetilkolin iz parasimpatičkih poslijeganglijskih eferentnih živaca i ET-1 iz strukturnih stanica (51). Aktivacija spazmogenom ostvaruje se preko receptora na površini stanice, što dovodi do naglog porasta kalcija i kontrakcije preko aktivacije niza enzima (48).

Naglo i snažno suženje dišnih putova, kao odgovor na provokacijske podražaje, poznato kao BHR, klinički je najbitnija fiziološka abnormalnost astme, ali još uvijek nije do kraja objašnjena (52). Mjerenja u astmatičara pokazala su da je pojačana kontraktilnost mišića povezana s pojačanom brzinom skraćivanja (53). Upalna sredina može izravno utjecati na kontraktilni odgovor (54,55). Neka istraživanja upućuju da varijabilnost u kontraktilnom odgovoru između bolesnika koji boluju od astme, proizlaze iz razlike u odgovoru njihovih glatkih mišićnih stanica na upalne podražaje (56).

Pojačan odgovor glatkih mišića dišnih putova može se procijeniti klinički davanjem progresivno rastućih doza aerosola farmakološkog agonista, kao što je histamin ili metakolin. Podražaji kao napor, udisanje hladnog suhog zraka, aerosola hipertonične otopine, destilirane vode ili adenzina nemaju izravnog djelovanja na glatke mišiće već potiču otpuštanje

medijatora iz mastocita, živčanih završetaka i strukturnih stanica i sličniji su onim pokretačima kontrakcije bronha što su uključeni u stvarna zbivanja u astmi (57,58).

Hipersekrecija je sljedeće važno obilježje astme, prisutno u velikog broja bolesnika svakodnevno, a osobito u pogoršanjima. Pokazatelj je loše kontrole bolesti, a pridonosi mortalitetu i morbiditetu (59,60). Nastaje kao posljedica hiperplazije i hipertrofije vrčastih stanica i submukoznih žlijezda, te degranulacije sekretornih stanica. Većina upalnih medijatora i neurogenih mehanizama uključenih u proces upale i remodeliranja ima učinak i na formiranje hipersekretornog fenotipa (60).

Ponavljajuće epizode simptoma i reverzibilnog smanjenja protoka zraka kroz dišne putove predstavljaju akutni upalni odgovor strukturno i funkcionalno izmijenjenih dišnih putova. Epizodična pogoršanja bolesti tipična su za kroničnu astmu. Za pogoršanja su odgovorni raznovrsni poticaji, a respiracijski virusi najčešći su uzrok pogoršanja (61). U bolesnika sa simptomima astme tijekom noći postoje neki dokazi o nakupljanja upalnih stanica u alveolama i peribronhalnom tkivu u ranim jutarnjim satima, a također tijekom sna u opuštenom ležećem položaju dolazi do izražaja poremećen međuodnos dišnih putova i alveola (62).

1. 2. Procjena upale dišnih putova

Procjena težine bolesti putokaz je za terapijsku odluku. Prema GINA smjernicama liječenje astme treba biti usmjereno smanjenju upale dišnih putova. Klinička procjena težine bolesti često se ne podudara s jačinom upale čak i u slučajevima kada je liječenje klinički učinkovito (63). Preporuka GINA-e iz 1995. bila je pronaći pouzdan neinvazivni test koji će odražavati upalu dišnih putova astmatičara u cilju potvrde dijagnoze, praćenja aktivnosti bolesti i procjene učinkovitosti liječenja (64).

U kliničkoj praksi o upali se uglavnom neizravno zaključuje na temelju plućne funkcije, simptoma, fizikalnog pregleda i učinka liječenja. Međusobni odnos tih kliničkih pokazatelja kao i njihov odnos s upalom često nije jednostavan i podudaran (65). U posljednjih 10 godina usavršenim endoskopskim metodama dobiveni su biopsijski uzorci bronhalne sluznice i BAL. Ta je analiza omogućila egzaktnu potvrdu postojanja upale u stabilnoj astmi. Postalo je jasno da se kronična upala dišnih putova nalazi u svim oblicima bolesti uključujući i blagi, pa i asimptomatski oblik astme (66). Neugodnost, neprimjerenost i rizici metode, bitno su ograničili njezinu primjenu u daljnjim istraživanjima. Spoznavanje činjenice da je astma upalna bolest još donedavno nije bilo odviše korisno u kliničkoj praksi

kada je o dijagnostici i liječenju riječ. Razlog je djelomice u tome što su metode kojima je moguće procijeniti upalu dišnih putova bile invazivne, skupe i nedostupne.

Jedan od najranijih testova za mjerenje upale bio je mjerenje serumskog eozinofilnog kationskog proteina (ECP) (67). Povišene serumske razine ECP odražavaju upalu u plućima, odnosno aktivaciju eozinofila u astmatičara. Eozinofilija u iskašljaju nalazi se u preko 80% bolesnika koji nisu primali inhalacijske kortikosteroide (ICS) i u 50% bolesnika liječenih ICS-ima. Mjerenje ECP-a u induciranom iskašljaju pokazalo se osjetljivijom i specifičnijom metodom od mjerenja u perifernoj krvi (68), ali se kao i mjerenjem drugih upalnih pokazatelja koristimo njome, još uvijek uglavnom u istraživačke svrhe. Smatra se da je moguća njezina buduća uporaba u kliničkoj praksi – za procjenu korisnosti učinka steroidne terapije u pojedinih bolesnika, odnosno praćenja učinka liječenja (69).

Razina je NO u izdahnutom zraku astmatičara povišena, a snižava se kao odgovor na liječenje kortikosteroidima (70). Ta vrijedna, izravna i potpuno neinvazivna metoda mjerenja NO u izdahnutom zraku našla je svoje mjesto u kliničkoj praksi, iako je još uvijek neprimjereno skupa i često nedostupna.

Veliki je broj istraživanja trenutno usmjeren na istraživanje brojnih upalnih pokazatelja u induciranom iskašljaju (71) i izdahnutom zraku (72). IS se smatra vjerodostojnom metodom za istraživanje upalnih pokazatelja, a izdahnuti zrak ne daje uvijek pouzdana mjerenja upalnih pokazatelja i zahtijeva još usavršavanja (73).

Procjena težine upale, kao mjere težine i kontrole astme, vrlo je važna zbog toga što se pokazalo da se smrtonosni slučajevi astme mogu dogoditi u klinički blagoj astmi. Procjena sveobuhvatne kontrole bolesti potrebna je u svrhu prognoze bolesti i rizika od smrtnih rezultata bolesti (74).

Dokaz trajne upale u dišnim putovima čak i tijekom remisije bolesti i odsutnosti simptoma, odnosno neslaganje između težine simptoma i težine upale, pokazuje potrebu za razvojem određenih *indeksa upale dišnih putova* koji bi se primijenili u sklopu kliničkih kriterija kontrole astme (75). S obzirom da je astma upalna bolest, smatra se da bi mjerenje upale u astmi svakako trebalo biti uključeno u smjernice za kontrolu astme. Za sada postoji prijedlog da se u sveukupnu procjenu kontrole uključe eozinofili u induciranom iskašljaju (76). Biopsija bronha i BAL vjerojatno nikada neće ući u smjernice zbog rizika, cijene, a nadasve neugodnosti za bolesnika. S obzirom na istraživanja koja se u tom smjeru provode, očekuje se da bi se neka jednostavna i praktična metoda mogla uskoro pojaviti u kliničkim smjernicama za kontrolu astme (77).

1.2.1. Eozinofilni kationski protein (ECP)

ECP heterogeni je sekretorni protein izoliran sedamdesetih godina prošlog stoljeća. Sintetizira se u promijelocitima, a u zrelih perifernih eozinofilima smješten je u specifičnim i malim granulama (78). U maloj količini nađen je pohranjen u monocitima i neutrofilima, ali se u njima ne stvara (79).

ECP se pojačano stvara i oslobađa u dišnim putovima astmatičara i od posebne je važnosti za razumijevanje uloge eozinofila u astmi. Posjeduje snažnu citotoksičnu aktivnost za mikroorganizme, tumorske stanice, stanice kardiovaskularnog i živčanog sustava, te respiratorni epitel. Također pokazuje netoksične učinke koji upućuju na njegovu imunoregulatornu ulogu, kao što je inhibicija proliferacije T limfocita kao odgovor na antigen, učinak na sintezu imunoglobulina, pospešivanja oslobađanja histamina iz mastocita i bazofila, te učinak na pojačanu ekspresiju receptora na epitelnim stanicama kao i athezivnih molekula (ICAM-1). ECP je također uključen u procese obnavljanja i fibrozacije, te stimuliranje mukusne sekrecije u dišnim putovima, a poznato je da ima učinak na koagulaciju, fibrinolizu i interakcije sa sustavom komplementa (78).

Mehanizam eozinofilne degranulacije *in vivo* nije sasvim poznat (80). Sekreciju sekretornih bjelančevina iz eozinofila mogu potaknuti brojni uzroci, a najčešće su to citokini kao IL-5, IL-3, GM-CSF, imunoglobulini i lipidni medijatori (78). Istraživanja su pokazala da za degranulaciju eozinofila mogu biti odgovorne epitelne stanice (81) i fibroblasti (82) koji su bogat izvor medijatora s takvom sposobnošću.

Osim u astmi, nađeni su visoke vrijednosti ECP i u drugim bolestima: KOPB-u, Hodgkinovoj bolesti, fibrozi pluća, te u raznim malignim i reumatskim bolestima. To jasno ukazuje da eozinofili i u ovim bolestima imaju ulogu. Sklonost povećanoj sekreciji ECP imaju atopične osobe i osobe s hipereozinofilnim sindromom (78).

Povišenje ECP odražava uključenost eozinofila u upalnom zbivanju, a u odsutnosti eozinofilne uključenosti, ne očekuje se povišenje ECP-a. Brojne studije pokazale su da je ECP kao pokazatelj aktivnosti upale u astmi koristan u dijagnostici i praćenju bolesti, ali u nekih potvrđenih aktivnih astmatičara vrijednosti su ECP normalne. U većini slučajeva eozinofili čine glavne stanice u upalnom procesu u astmi, ali u nekih astmatičara, osobito onih nealergijskih, analizom biopsijskih uzoraka eozinofili nisu pronađeni ili ih je bilo vrlo malo (83). To upućuje na činjenicu da metoda određivanja ECP u astmi nije univerzalno dobra za procjenu upale u svakog pojedinog bolesnika. Mjerenje ECP, odraza aktivnost eozinofila, ne

može zamijeniti druge načine procjene težine bolesti, ali je komplementarna metoda osobito kada se želi procijeniti potreba ili uspješnosti protuupalnog liječenja.

Razlikuje se koncentracija ECP u serumu i EDTA plazmi. Vrijednosti u plazmi točnije odražavaju stvarne vrijednosti u cirkulirajućoj krvi. Vrijednosti u serumu više su od vrijednosti u plazmi i odražavaju sekretornu aktivnost stanica, odnosno sklonost otpuštanja bjelančevina iz granula koja se u serumu nastavlja za razliku od plazme gdje EDTA inaktivira daljnje oslobađanje (84). Na taj način ECP u serumu bolje odražava razliku između bolesnih i zdravih osoba.

ECP se može izmjeriti u gotovo svim tjelesnim tekućinama gdje eozinofili sudjeluju u procesima kao u nosnom sekretu i suzama, pa čak i u procjeni upalnih bolesti crijeva. Dok mjerenja u serumu odražavaju aktivnost eozinofila u krvi, mjerenja u lokalnim tekućinama daju točnu procjenu uključenosti eozinofila u lokalne procese. Razina ECP u iskašljaju vjerno odražava broj i aktivaciju eozinofila (85). Mjerenja ECP u iskašljaju u istraživanjima korištena su za praćenje upale u astmi, KOPB i cističnoj fibrozi (68).

Prikupljanje uzorka i postupak obrade inducirano iskašljaja standardiziran je i upute su izdane od strane Europskog respiratornog društva (ERS) (86).

1.2.2. Indukcija iskašljaja

Potencijalne mogućnosti analize sekreta dišnih putova shvaćene su prije više od 100 godina kada su i učinjene prvi put u astmatičara. Kašalj, jedan od karakterističnijih simptoma astme, nerijetko je praćen iskašljavanjem, ali jednako tako veliki broj bolesnika s astmom ne iskašlja spontano u bitnijoj mjeri (49). Iskašljavanje obično izostaje u dobro nadziranoj bolesti. Sredinom prošlog stoljeća osmišljen je postupak inhalacije slane otopine kojim bi se potaknule na iskašljavanje osobe koje to ne mogu spontano (87). Razvoj metode tekao je pronalaskom i primjenom sredstava kojima je moguće razdvojiti disulfidne veze mukusa i postići disperziju stanica (88). Metoda je jedno vrijeme zaboravljena, a zatim je ponovo uvedena u istraživanje početkom 1990-ih godina. Prvi su svoja istraživanja analize inducirano iskašljaja i detaljan opis postupka indukcije i obrade iskašljaja, objavili Pin i suradnici (89). Metodu su prihvatili i drugi istraživači u istraživanju astme i drugih bolesti i usavršavali ju. Hansel i suradnici među prvima (90) analizirali su stanice u iskašljaju citospinom, a Fachy i suradnici (91) pokazali da se u supernatantu iskašljaja mogu uspješno mjeriti biokemijski pokazatelji.

Mehanizam kojim inhalacija slane otopine dovodi do iskašljavanja nije sasvim jasan. Metoda induciranog iskašljaja obuhvaća postupak inhaliranja aerosola otopine NaCl pomoću ultrazvučnog nebulizatora i standardiziranu pripremu svježe dobivenog iskašljaja. U uporabi su različite modifikacije postupaka koji su opisali Pin i suradnici (89). Ispitanici inhaliraju u pravilnim intervalima aerosol slane otopine u standardnoj ili rastućim koncentracijama uz stalno praćenje plućne funkcije. Nema kontroliranih studija ni jasnih preporuka koja koncentracija hipertonične otopine ili protokol su optimalni, a analiza iskašljaja ne pokazuje razlike u odnosu na indukciju izotoničnom slanom otopinom (92). Isto vrijedi i za nebulizatore. Preporučuju se ultrazvučni nebulizatori s malim izlazima 1 ml/min, što bi bilo dostatno za uspješnu indukciju, a prihvatljivo s obzirom na rizik za bolesnike s astmom (93).

Postupak indukcije treba izvoditi dobro obučeno osoblje uz strogo pridržavanje propisanoga postupka. To je osobito važno zbog sigurnosti bolesnika, te u slučaju multicentričnih istraživanja.

Kako bi se smanjila kontaminacija slinom tijekom izvođenja indukcije, preporučuju se različiti postupci kao ispuhivanje nosa, nošenje štipaljke za nos tijekom indukcije, ispiranje usta prije svakog iskašljavanja, brisanje usta papirnatim ubrusima, ali se najučinkovitijim od svega pokazalo stalno poticanje bolesnika na iskašljavanje *iz dubine pluća*. Dobiveni iskašljaj mora se obraditi tijekom dva sata kako ne bi došlo do razgradnje stanica i medijatora. U postupku obrade najčešće se primjenjuju dvije metode – cjeloviti iskašljaj i selekcionirani iskašljaj. Selekcionirani se iskašljaj dobije odvajanjem mukoidnih dijelova iskašljaja od primjesa sline. Najbolje je odvajanje dijelova iskašljaja pomoću inverznog mikroskopa, ali zahtijeva dodatnu opremu i vrijeme, tako da se u praksi uglavnom primjenjuje mehaničko odvajanje viskoznijih i čvršćih dijelova iskašljaja koje se pokazalo vrlo učinkovitim. Istraživanja su pokazala da se u selekcioniranom iskašljaju nalazi veći broj živih stanica, bolja je kvaliteta citospina i viša koncentracija ECP u supernatantu (94).

Nakon selekcioniranja slijedi postupak homogenizacije i razrjeđivanja koji omogućuju oslobađanje stanica i medijatora iz mukusa, te odvajanje stanica i supernatanta. U tako pripremljenim materijalima mogu se analizirati stanice, dijelovi stanica, aktivacijski pokazatelji na stanicama i u supernatantu, pokazatelji mukozne sekrecije i eksudacije seruma (87). Utvrđeno je da je broj stanica visoko reproducibilan te koje su normalne vrijednosti pojedinih stanica (95-97). Acidifikacija IS omogućuje ekstrakciju intracelularno smještenih medijatora, a lizat stanica i supernatant IS dali su podjednake rezultate analize (98).

U IS, uspoređujući ga sa spontanom, nalazi se veći broj živih stanica, sličan je odnos pojedinih stanica i nešto niža koncentracija ECP-a (99). Neke studije ispitivale su razlike

između IS kao izravne, a gotovo neinvazivne metode i invazivnih bronhoskopskih metoda kao što su BAL i bronhalni ispirak. Početne studije ukazuju da je broj stanica po mg u IS-u veći nego u BAL-u (95,100), ali da i po tom kriteriju IS zadovoljava kao moguća zamjena za BAL (101). IS je sličniji bronhalnom ispirku nego BAL-u, odražavajući porijeklo iz proksimalnijih dišnih putova. Jedna od analiza pokazala je da je u transbronhalnim biopsijskim uzorcima veća proporcija limfocita (102). Čini se da svaka od navedenih metoda pokazatelje upale dišnih putova mjeri u različitom dijelu dišnog sustava te da su u stvari komplementarne. Odabir metode trebao bi ovisiti o ciljevima pojedinih istraživanja. Inducirani iskašljaj (IS) uspješno ukazuje na pokazatelje upale u donjim dišnim putovima, a s obzirom da nije invazivna, metoda često ima prednosti pred drugima.

Analiza stanica IS učinjena u razmaku od 7 dana pokazala je odlične rezultate s iznimkom ukupnog broja stanica i limfocita (95). U istoj studiji potvrđena je vrijednost metode razlikama u nalazu asmaticara i zdravih ispitanika, te pušača. Ponovljivost za više ispitivanih biokemijskih pokazatelja u supernatanstu također je procijenjena zadovoljavajućom (103). U prilog dokazu osjetljivosti metode, rezultati su mnogih studija koji pokazuju promjene u induciranom iskašljaju bolesnika koje nastupaju pod utjecajem inhaliranog alergena ili kao rezultat liječenja (104). Mjerenja stanica u uzorcima uzetim u različito vrijeme tijekom iste indukcije, pokazala su mijenjanje udjela pojedinih stanica – broj neutrofila se smanjuje, a makrofaga raste u uzorcima uzetim kasnije (105).

Metoda indukcije iskašljaja neinvazivan je način dobivanja sekreta iz donjih dijelova dišnih putova. Na temelju iskustva mnogih studija, procijenjeno je da je metoda korisna za proučavanje i bolje razumijevanje upale u astmi, da zadovoljava kriterije dobre i pouzdane metode, da su joj rezultati ponovljivi i vrijedni, te osjetljivi na promjene. Istraživači su zaključili da bi se ovom relativno neinvazivnom, jednostavnom i jeftinom metodom mogla premostiti ranije spomenuta razlika između znanstvenih postignuća i njihove primjene u kliničkoj praksi (100).

1.2.2.1. Učinak neizravne bronhprovokacije i sigurnost metode

Hipertonična otopina, adenozin, tjelesni napor i eukapnička dobrovoljna hiperpnea s hladnim zrakom služe kao neizravni bronhprovokacijski testovi (57). Za razliku od izravnog testa bronhprovokacije, pojedinačnim farmakološkim agonistom acetilkolinom ili metakolinom, pozitivan odgovor na neizravnu bronhprovokaciju odraz je aktivne upale u vrijeme testa (106). Liječenje s ICS mijenja odgovor na neizravnu bronhprovokaciju za

nekoliko sati ili dana, a odgovor na izravnu tek za nekoliko mjeseci do godinu dana (107). S obzirom na taj učinak tijekom indukcija iskašljaja u astmatičara se preporučuje premedikacija s 200-400 µg salbutamola, a tijekom cijelog postupka indukcije praćenje plućne funkcije i subjektivnih tegoba. Indukcija izotoničnom i rastućim koncentracijama hipertonične otopine umanjuje mogućnost nastanka snažnog bronhospazma, a jednako tako i uporaba nebulizatora manje snage. Uz mjere opreza, koje uključuju pridržavanje protokola, metoda induciranog iskašljaja ocijenjena je kao sigurna (108).

1.3. Endotelin-1 (ET-1): medijator u astmi?

Sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća prvi put izoliran je iz kulture endotelinih stanica goveđe aorte jedan od najsnažnijih vazokonstriktornih peptida (109). Ubrzo nakon otkrića skupina japanskih znanstvenika je objavila njegovu strukturu i nazvala ga endotelin (110). Selektivni agonist endotelinskih receptora sarafotoksin 6c, zmijski je otrov vrste *Atractaspis engaddensis* koji u žrtve izaziva koronarnu vazokonstrikciju i smrt uslijed ishemije miokarda (111). Uz dobro istražene učinke na kardiovaskularni sustav pokazalo se da ET-1 ima brojne biološke učinke u više organskih sustava, kako u fetalnom razvoju tako i u odraslom organizmu (112).

Porodicu endotelina, koji su široko rasprostranjeni u različitim stanicama i tkivima, uz ET-1, čine još najmanje dva člana – ET-2 i ET-3 (113). Svi endotelini strukturno su slični, građeni od 21 aminokiseline, posjeduju disulfidne veze između cisteina na položaju 1-15 i 3-13 te mjesta na završetcima koja određuju afinitet i vezno mjesto za receptor. ET-2 i ET-3 razlikuju se od ET-1 u dvije, odnosno 6 aminokiselina (114), a svi se podudaraju u karbonskom završetku sa sarafotoksinom 6c (111). U mnogim tkivima ET-1 se oslobađa više od ET-2 i ET-3. Najviša razina ET-1 nađena je u plućima, ali je također prisutan u mozgu, hepatocitima, bubrezima, endometriju, Sertolijevim stanicama i epitelnim stanicama dojki. ET-2 ima slične biološke učinke kao ET-1, a pretežno je smješten u crijevima i bubrezima, te nešto manje u miokardu i palcenti. ET-3 nalazi se u visokim koncentracijama u CNS-u i smatra se da ima važnu ulogu u proliferaciji i razvoju neurona i astrocita. Također ga nalazimo u gastrointestinalnom traktu, plućima i bubrezima (115).

Prekursori svakog izomera kodirani su različitim genima (113). Gen za preproendotelin-1 (ppET-1) na kromosomu je 6p23-24 (112) i kodira peptid od 212 aminokiseline (116). Pod utjecajem endopeptidaza cijepa se na biološki neaktivan proendotelin-1 pET-1 (*big ET*) sastavljen od 38 aminokiselina koji ima samo 1% kontraktilne

aktivnosti zrelog peptida. U endotelnim stanicama konverzija iz pET-1 u ET-1 odvija se unutar vezikula (117). Biološki aktivan ET-1 nastaje u stanicama pod utjecajem endotelin konvertirajućeg enzima (ECE) (118).

U respiracijskom sustavu ET-1 izlučuju endotelne, epitelne i glatkomišićne stanice dišnih putova, fibroblasti, te u manjoj mjeri i neke druge stanice (119). Izrazita imunoreaktivnost ET-1 nađena je u mukoznim, seroznim i Clara stanicama, povremeno u pneumocitima tipa 2, ali ne u bazalnim i cilijarnim stanicama (120). Prisutnost imunoreaktivnosti u tkivu ne podrazumijeva nužno i sintezu ET-1 kao u slučaju neutrofila koji su sposobni konvertirati pET-1 u ET-1, ali ga ne stvaraju (121). Sinteza ET-1 u endotelnim i epitelnim stanicama regulirana je transkripcijom gena i ponovnom sintezom s obzirom da ove stanice ne sadrže zalihe sintetiziranog endotelina (121). Otpuštanje ET-1 iz epitelnih stanica obično je nešto odgođeno nakon podražaja, a mehanizam otpuštanja nije do kraja istražen. Stvaranje ET-1 u endotelnim stanicama mogu potaknuti brojni fizikalni i kemijski podražaji kao što su mehaničko istezanje i pritisak, hipoksija, brojni citokini, čimbenici rasta i bakterijski produkti (121). Učinak na otpuštanje ET-1 imaju i trombin, angiotenzin II, adrenalin, $\text{PGF}_{2\alpha}$, te sam ET-1 (122). Na smanjeno stvaranje ET-1 mogu utjecati prostaciklin, NO, atrijski natriuretski peptid, heparin, te snažno istezanje i pritisak (112). Istraživanja su pokazala da se ET-1 uravnoteženo otpušta tijekom 24 sata. Normalna koncentracija u plazmi je približno 1 fmol/ml. Približno 80% stvorenog ET-1 u endotelnim stanicama otpušta se u bazolateralne dijelove prema glatkomišićnim stanicama, a samo mali dio u lumen krvne žile tako da djeluje više parakrino ili autokrino (123). Koncentracija u tkivima može biti i do 100 puta veća nego u krvi. S obzirom da ipak cirkulira u krvi i izmjerene koncentracije mogu pokazivati promjene i biti od koristi (115,124). U zdravom su organizmu endotelini uključeni u staničnu proliferaciju, obnavljanje i razvoj tkiva. Napola se razgradi u vremenu od 4 do 7 minuta zbog brzog vezivanja za tkiva i brzog metabolizma pomoću specifičnih enzima koji ga razgrađuju. U plućima se ET-1 istovremeno i proizvodi i razgrađuje pod utjecajem ECE i NEP (38).

Endotelini djelovanje ostvaruju preko specifičnih receptora koji su široko rasprostranjeni i gusto smješteni u plućnom tkivu, u prvom redu glatkomišićnim stanicama traheje i bronha, živcima, alveolarnim septama, intrapulmonalnim žilama svih veličina (121) i parasimpatičkim ganglijima (125). U ljudi su poznata dva glavna podtipa receptora, ET_A i ET_B . Veći afinitet za ET-1 i ET-2 ima ET_A . Afinitet ET_A receptora za ET-1 je 1000 puta veći nego za ET-3. Sva tri endotelina imaju podjednak afinitet za ET_B . Treći podtip receptora ET_C koji je kasnije otkriven ima visoki afinitet za ET-3 (126). Razvojem specifičnih agonista i

antagonista endotelinskih receptora unaprijeđene su spoznaje o receptorima i djelovanju endotelina. Broj pojedinih receptora specifičan je za stanicu i reguliran različitim čimbenicima rasta što utječe na biološke učinke endotelina i razlike između tkiva i stanica. Receptori ET_A posreduju vazokonstrikciju, staničnu proliferaciju i nakupljanje strome. Uloga ET_B receptora u nekim je tkivima vazokonstriktorna i proliferativna i još se istražuje. U endotelnim stanicama posrednici su za otpuštanje NO i PGI₂ koji prekidaju vazokonstrikciju i mitogenezu preko ET_A receptora. Receptori ET_B vezani su uz autoindukciju sinteze ET-1. Stimulacijom oba receptora pospješuje se sinteza kolagena kao i indukcija adhezijskih molekula (ICAM-1, VCAM-1) i kemotaktičnih čimbenika (TNF α , MCP-1, IL-1b, IL-6, IL-8) (112).

Brojnim istraživanjima na životinjama nađena je najveća izraženost ET-1 mRNA u plućima odraslog miša, dok se u embriju gen dominantno izražavao u epitelnim i mezenhimalnim stanicama farinksa, te u endotelnim stanicama velikih krvnih žila (127). Istraživanja na genetski modificiranim miševima pokazala su važnu ulogu ET-1 u fetalnom razvoju (112).

Rezultati istraživanja na životinjama, potvrđeni su i u ljudi. Obilna prisutnost ET-1 potvrđena je i u ljudskim plućima i pretpostavlja se da ET-1 ima važnu ulogu u regulaciji plućne funkcije i plućnoj patofiziologiji. Uloga ET-1 u patofiziologiji bolesti respiracijskog sustava, a osobito bolestima dišnih putova, predmet je mnogih istraživanja u proteklih nekoliko godina (128,129).

Eksperimentalna istraživanja pokazala su da ET-1 sudjeluje u mnogim procesima koji su osobito važni za astmu. ET-1 je snažan bronhokonstriktor *in vitro* (130) i *in vivo* u bolesnika s astmom (131). Sva tri endotelina uzrokuju kontrakciju mišićnih stanica bronha. Naj snažniji učinak na bronhe u kojih je epitel neoštećen ima ET-1 (121), a na izolirane bronhe ogoljelog epitela učinak sva tri endotelina bio je podjednak. To upućuje na moguću ulogu epitela u oblikovanju učinaka ET-1 (132).

Kontrakcija bronha kojoj je posrednik ET-1, posljedica je njegova izravnoga učinka na ET_B receptore (133). U bronhalnim mišićima prevladava ET_B vrsta receptora. Poput drugih bronhokonstriktora, ET-1 vezivanjem za receptor aktivira enzim fosfokinaze (PLC) i G protein nakon čega dolazi do hidrolize fosfoinozitida i oslobađanja kalcija iz zaliha u stanici. Kalcij vezivanjem za kalmodulin pokreće enzime i omogućuje vezivanje aktina i ATP-aze na miozinu što dovodi do kontrakcije (51). Novije elektrofiziološke studije pokazale su da ET-1 izaziva odgođenu depolarizaciju glatkomišićnih stanica bronha u ljudi. Prvo se aktiviraju kalcijem upravljani kalcijски kanali, a zatim se aktiviraju neselektivni kationski kanali.

Nađeno je da ET-1 neselektivne kationske kanale aktivira u puno manjoj koncentraciji i snažnije od histamina. Bifazično raste kalcij unutar stanice, koji dolazi iz staničnih zaliha i izvana, preko voltažnih kanala. Taj porast kalcija ET-1 ostvaruje preko oba receptora što objašnjava rezultate nekih studija da su i ET_A i ET_B receptori uključeni u kontrakciju (134).

Kontrakcija bronha kojoj je posrednik ET_A receptor može biti važna u situacijama gubitka osjetljivosti ET_B receptora ili ogoljenja epitela dišnih putova, što se može dogoditi tijekom upale dišnih putova i tijekom kasnog, odgođenog odgovora na inhalacijske alergene. Kontrakcija bronhalnih mišića izazvanih ET-1 ne inhibira se ET_A antagonistima, a ET_A/ET_B antagonist bosentan ima snažan inhibitorni učinak. Sarafotoksin 6c, ET_B agonist ima jak učinak na kontrakciju glatkomišićnih stanica. Postoje dokazi da je odnos receptora u dišnim putovima astmatičara izmijenjen u korist ET_B receptora i pretpostavlja se da i to pridonosi pojačanoj kontrakciji bronha (135).

Osim uloge u kontrakciji bronha, potvrđena je i mitogena (136) i proinflamatorna uloga (137) ET-1 kojoj su posrednik ET_A receptori. Smatra se da upala pospješuje pojačanu sintezu ET-1 koji dodatno pridonosi upali i bronhoopstrukciji (138). Istraživanja su pokazala da ET-1 pojačava vaskularnu permeabilnost i utječe na otok stijenke dišnih putova (139), te ima učinke u procesu remodeliranja dišnih putova (38). Zapaženo je pojačano stvaranje ET-1 u upali kojom dominiraju eozinofili (140). Istraživanja na ljudskim izoliranim bronhima *in vitro* potvrdila su rezultate istraživanja na životinjama da ET-1 pojačava kontrakciju izazvanu podraživanjem kolinergičkih živaca (141).

Endothelin-1 primijenjen inhalacijski u bolesnika s astmom uzrokovao je kontrakciju bronha (131). Rezultati nekih istraživanja upućuju da pojačava bronhalnu podražljivost na inhalirane alergene (51,142). Kronična izloženost ljudskih glatkomišićnih stanica bronha beta-2 agonistima *in vitro*, posebno fenoterolu, pojačava kontrakcijski odgovor ET-1 utjecajem na endotelinske receptore (143).

2. HIPOTEZA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da se endotelin-1 pojačano stvara i ima bitnu ulogu u astmi. Glavni izvor ET-1 epitelne su stanice dišnih putova koje su u astmatičara imunoreaktivnije u odnosu na zdrave osobe i osobe oboljele od drugih bolesti respiracijskog sustava. Dosadašnja istraživanja *in vitro* također su pokazala da je imunoreaktivnost stanica simptomatskih bolesnika kao i bolesnika koji nisu liječeni s ICS veća nego u bolesnika koji nemaju simptome i koji nisu liječeni ICS-ma, te da se u eksperimentalnim uvjetima epitelne stanice astmatičara mogu potaknuti na stvaranje i izlučivanje ET-1.

Ovaj rad temelji se na hipotezi da se ET-1 u bolesnika s astmom pojačano stvara i oslobađa u lumen dišnih putova, osobito tijekom pogoršanja bolesti. S obzirom da je riječ o liječenim bolesnicima koji su bili klinički stabilni u vrijeme uključivanja u istraživanje, pretpostavka je, da ukoliko ICS nisu bili dostatni da spriječe kliničko pogoršanje bolesti, neće imati učinak ni na stvaranje i otpuštanje ET-1. Očekuje se da se ET-1 u dobivenom IS može imunokemijski izmjeriti i ustanoviti pretpostavljena razlika u koncentraciji između bolesnika i zdravih ispitanika, te između stabilne i pogoršane bolesti. Jednako tako, očekuje se da će metoda IS, uz predviđene mjere sigurnosti prema protokolu za postupak indukcije iskašljaja, u odabranih bolesnika biti sigurna i tijekom pogoršanja bolesti, a također da će u zdravih ispitanika biti uspješna kako bi se mogla učiniti odgovarajuća usporedba.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi:

- istražiti razlike u koncentraciji ET-1 u IS i plazmi između bolesnika i kontrolnih ispitanika, te između stabilne i pogoršane bolesti
- istražiti odnos koncentracije ET-1 u IS i plazmi
- istražiti odnos koncentracije ET-1 i plućne funkcije
- istražiti odnos koncentracije ET-1 i simptoma bolesti
- procijeniti vrijednost ET-1 kao pokazatelja bolesti u razlučivanju bolesnika i zdravih ispitanika i usporediti ga sa standardnim kliničkim pokazateljima
- procijeniti uspješnost i sigurnost metode indukcije iskašljaja.

Sporedni ciljevi:

- istražiti razlike u koncentraciji ECP u IS i serumu bolesnika i kontrolnih ispitanika, te između stabilne i pogoršane bolesti
- istražiti odnos koncentracije ECP-a u IS i serumu
- istražiti odnos koncentracije ECP i plućne funkcije
- istražiti odnos koncentracije ECP i simptoma bolesti
- istražiti međusobni odnos između koncentracije ET-1 i ECP u IS i u venskoj krvi
- procijeniti vrijednost ECP-a kao pokazatelja bolesti u razlučivanju bolesnika i zdravih ispitanika i usporediti ga sa standardnim kliničkim pokazateljima
- istražiti odnos između simptoma i plućne funkcije u ispitivanih bolesnika.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Uzorak ispitanika

U istraživanje je uključeno 46 bolesnika sa stabilnom kroničnom trajnom astmom liječenih u ambulanti Odjela za plućne bolesti KB Osijek. Dijagnoza bolesti postavljena je mnogo prije početka istraživanja rutinskom dijagnostičkom obradom. Svi su bolesnici anamnestički imali simptome astme, spirometrijski su potvrđene opstruktivne smetnje ventilacije s pozitivnim bronhodilatacijskim testom, te su alergološki obrađeni (ukupnim i specifičnim IgE i/ili kutanim testiranjem na inhalacijske alergene *prick* metodom). U vrijeme uključivanja u istraživanje odabrani bolesnici bili su klinički stabilni, bez osobitih pogoršanja simptoma astme unazad najmanje 6 mjeseci prije istraživanja. Svi bolesnici uključeni u istraživanje upotrebljavali su redovito ICS u individualnoj dozi kao jedini lijek ili u kombinaciji s drugim lijekovima za liječenje astme, najčešće inhalacijskim β -2 agonistima dugog djelovanja i/ili tbl teofilina, ovisno o težini njihove bolesti. U slučaju pogoršanja simptoma astme upotrijebili su simptomatski kratkodjelujući β -2 agonist salbutamol (Ventolin MDI). S obzirom da je bolest procijenjena kao dobro nadzirana, lijekovi i doziranje nisu mijenjani. Bolesnici s klinički teškim oblicima astme, nestabilnom i nepredvidljivom bolešću te lošom plućnom funkcijom nisu uključeni u istraživanje. Glavni kriterij za uključivanje bolesnika u istraživanje bila je stabilna bolest i uspješna indukcija iskašljaja.

Kontrolna skupina bili su zdravi ispitanici. Svi kontrolni ispitanici imali su uredan spirometrijski nalaz.

Bolesnici i kontrolni ispitanici s drugim bolestima respiracijskog sustava, te bolestima drugih organskih sustava nisu uključeni u istraživanje. Pušenje i akutna respiracijska infekcija u posljednja tri mjeseca prije istraživanja, bili su kriteriji za neuključivanje, kao i kriterij za isključivanje ukoliko bi akutna infekcija respiracijskog sustava bila poznati razlog pogoršanja astme. Iz istraživanja su isključeni svi bolesnici koji u istraživačkom razdoblju nisu imali pogoršanje bolesti, te svi bolesnici u kojih postupak indukcije iskašljaja nije bio uspješan.

U konačnici su ispitana 23 bolesnika u stabilnoj i u pogoršanoj bolesti i 21 kontrolni ispitanik u kojih je indukcija iskašljaja bila uspješna. Ukupno su isključena 23 bolesnika. Razlog za isključenje 16 bolesnika bio je što u ispitivanom razdoblju nisu imali pogoršanje bolesti, u 2 bolesnika postupak indukcije iskašljaja tijekom stabilne bolesti izazvao je bitno pogoršanje plućne funkcije i subjektivnih tegoba, tako da indukcija iskašljaja nije ponavljana u pogoršanju bolesti, a u pet bolesnika indukcija iskašljaja nije bila uspješna tijekom

pogoršanja bolesti. Među ispitanim bolesnicima blaži stupanj astme imalo je 9 bolesnika, umjereno teški također 9 bolesnika, a teži oblik astme imalo je 5 bolesnika. Najkraće trajanje bolesti bilo je 1 godinu, a najdulje 23 godine. Najkraće razdoblje do pogoršanja bolesti iznosilo je 3 mjeseca, a najdulje dvije godine.

Kliničke karakteristike ispitanika prikazane su u tablici 1. U objema skupinama bila je slična spolna i dobna raspodjela. U uzorku ispitivanih bolesnika i kontrolnih ispitanika bilo je više žena nego muškaraca. U objema skupinama prosječna starosna dob bila je podjednaka, prosječno 39 godina u skupini bolesnika s astmom i 42 godine u skupini kontrolnih ispitanika. Među bolesnicima bilo je 65% atopičara, a među kontrolnim ispitanicima ni jedan.

Tablica1. Obilježja bolesnika i kontrolnih ispitanika

Skupine ispitanika	Spol		Dob		Alergija		Prosječno trajanje bolesti godine	FEV ₁ %	REV %
	ž	m	Središnja vrijednost	raspon	broj	%			
Astma n= 23	15	8	39	19 - 64	15	65,2	11.7	84,7%	14,0%
Zdrave kontrole n= 21	16	5	42	18 - 70	0	0	–	108,5%	2,3%

Svi ispitanici potpisali su suglasnost za sudjelovanje u istraživanju nakon što su usmeno i putem pisanog materijala potanko obaviješteni o svim postupcima u okviru istraživanja.

4.2. Plan istraživanja

Nakon odabira bolesnika kliničkom procjenom kontrole bolesti i pristanka na sudjelovanje u istraživanju, dogovoreno je vrijeme za istraživanje u stabilnoj bolesti. Bolesnici su upućeni kako da pažljivo prate i bilježe svoje tegobe i uporabu lijekova, te kako da postupaju u slučaju pogoršanja simptoma astme. Vrijeme istraživanja određeno je dogovorno i za kontrolne ispitanike. Planom istraživanja, postupak indukcije iskašljaja radi neinvazivnog pribavljanja sekreta iz donjih dišnih putova za imunokemijsku analizu ET-1 trebalo je provesti u bolesnika s astmom dva puta, tijekom stabilne i tijekom pogoršane faze bolesti. U

slučaju pogoršanja simptoma astme bolesnici su se javili telefonom prema jasnim uputama. Ukoliko stanje bolesnika nije iziskivalo hitnu intervenciju i ukoliko je dopuštalo postupak indukcije iskašljaja istraživanje je dogovoreno treći dan od pogoršanja simptoma. Do zakazanog istraživanja upotrebljavali su svoje redovne lijekove i inhalacijski salbutamol prema potrebi. Nakon provedenih postupaka planom istraživanja pristupilo se potrebnom liječenju pogoršane bolesti.

Prilikom posjeta, stabilna bolest, odnosno pogoršanje bolesti procijenjeno je upitnikom za procjenu kontrole bolesti (ACQ) (144) za protekli tjedan i prosječnim zbrojem 24-satnih simptoma za posljednja 3 dana prema dnevniku koje su bolesnici vodili. Oba načina smatraju se vrlo vrijednim instrumentom u procjeni kliničke kontrole astme.

Nakon procjene simptoma, izmjerena je inicijalna plućna funkcija spirometrijski nakon čega je proveden postupak indukcije iskašljaja. Tijekom navedenog postupka praćene su subjektivne tegobe i promjene plućne funkcije ponavljanim spirometrijama. Nakon uspješne indukcije iskašljaja uzet je uzorak venske krvi. Uzorci iskašljaja i krvi laboratorijski su obrađeni i pohranjeni u hladnjak na -70°C za potrebe planirane biokemijske analize.

Istraživanje je odobreno na Komisiji za lijekove i Etičkom povjerenstvu Kliničke bolnice Osijek. Biokemijske analize učinjene su u laboratorijima Odjela za biokemiju KB Osijek i KB Dubrava te u laboratoriju Odjela za nuklearnu medicinu KB Osijek.

4.3. Metode

4.3.1. Subjektivne tegobe

Pokazatelji subjektivnih tegoba bolesnika čine bitan udio među pokazateljima kontrole astme. Nekoliko je kriterija za prosudbu valjane kontrole astme – odsutnost simptoma astme, uporaba simptomatskih lijekova svedena na najmanju moguću mjeru, prevencija pogoršanja bolesti i liječničkih intervencija mimo redovitih kontrola, te održavanje normalne plućne funkcije uz istovremeno nepostojanje neželjenih djelovanja lijekova (145). Pogoršanja su važan klinički događaj koji odražava neodgovarajuću kontrolu bolesti. Definiiraju se kao pogoršanje subjektivnih tegoba u odnosu na stanje u stabilnom razdoblju bolesti (146).

Subjektivne tegobe i stupanj kontrole bolesti ispitani su na dan dogovorene posjete tijekom stabilne bolesti kao i tijekom pogoršanja bolesti.

Težina i učestalost dnevnih i noćnih simptoma ocijenjeni su prema dnevniku simptoma. Simptomi tijekom dana i simptomi tijekom noći bodovani su i prikazani kao zbroj

24-satnih simptoma (prilog 2). Analizirani su podaci iz protekla tri dana prije istraživanja kako tijekom stabilne bolesti tako i za vrijeme pogoršanja bolesti. Mogući je zbroj dnevnih i noćnih simptoma od 0 do 8. Zbroj 0 označava odsutnost simptoma tijekom 24 sata, a 8 označava najveći mogući zbroj simptoma tijekom dana i tijekom noći i najteži je stupanj kojim bolesnik ocjenjuje težinu simptoma. Taj način zbrajanja simptoma upotrijebljen je u studijama koje su istraživale mogućnosti postizanja potpune kontrole astme prema GINA smjericama (147). Smatra se da je bolest dobro kontrolirana ukoliko simptoma nema ili ukoliko ih je vrlo malo (zbroj simptoma ≤ 1). Bolest nije dobro kontrolirana, pogoršana je u odnosu na stanje tijekom stabilne bolesti, ukoliko je zbroj simptoma > 2 , odnosno razlika između stabilne i pogoršane bolesti najmanje 2.

Za procjenu kontrole astme upotrijebljen je ACQ upitnik (148). Bolesnici su ocjenjivali buđenja tijekom noći zbog tegoba vezanih uz bolest, svoje jutarnje simptome, simptome tijekom tjelesne aktivnosti, osjećaj nedostatka zraka, *wheezing* i simptomatsku uporabu kratkodjelujućih beta-2 agonista i vlastiti doživljaj težine bolesti u razdoblju od tjedan dana (prilog 1). Originalni upitnik uključuje i bodovanje FEV₁, koji je u ovom slučaju bio izostavljen stoga jer je posebno analiziran u sklopu spirometrijskih pokazatelja. Smatra se da je ACQ jednostavniji za bolesnika i da je osjetljiviji na promjene od dnevnika simptoma (148).

Tijekom indukcije iskašljaja bolesnici su ocjenjivali stanje subjektivnih tegoba u odnosu na stanje prije početka indukcije simptoma. U tu svrhu načinjena je vrlo pojednostavljena ljestvica simptoma od 0 do 2 po uzoru na vizualne skale percepcije (149) i rangiranje intenziteta simptoma po Borgovoj ljestvici (150). Stupnjevi označavaju stanje od nepromijenjenog (0), preko blažeg i umjerenog (2) do teškog pogoršanja subjektivnih tegoba (3).

4.3.2. Spirometrija

Plućna funkcija mjerena je standardnom metodom spirometrije. Mjerilo se na spirometru Pneumoscreen tvrtke Jäger u skladu sa službenim preporukama Europske zajednice za čelik i ugljen i Europskog respiratornog društva (151). Prema protokolu istraživanja spirometrija je ponavljana više puta. Osnovna mjerenja i mjerenja nakon premedikacije salbutamolom, što odgovara bronhodilatacijskom testu, učinjena su inicijalno prije postupka indukcije. Tijekom postupka indukcije iskašljaja spirometrija je ponavljana prilikom svakog prelaska na inhaliranje jače koncentracije hipertonične otopine, u slučaju pogoršanja subjektivnih tegoba i na završetku postupka.

Analizirani su spirometrijski pokazatelji koji pokazuju opstruktivne smetnje ventilacije u tri etape mjerenja: inicijalno prije započinjanja indukcije iskašljaja, nakon bronhodilatacijskog testa, te na završetku postupka indukcije iskašljaja neovisno je li proveden u cijelosti ili ranije prekinut. FEV₁, PEF, FEF₅₀ izraženi su kao standardizirane vrijednosti u odnosu na referentne.

4.3.3. Metoda indukcije iskašljaja

Metoda indukcije iskašljaja (96) upotrijebljena je u ovom istraživanju u cilju neinvazivnog dobivanja sekreta dubljih dijelova donjih dišnih putova u bolesnika i zdravih ispitanika. Upotrijebljen je ultrazvučni nebulizator tvrtke Omron U07 (output 0,25 ml/min, veličina čestica 7 μm) i sterilne otopine hipertonične NaCl u trima različitim koncentracijama (3%, 4%, 5%).

Nakon inicijalne spirometrije je učinjena premedikacija sa 4 inhalacije salbutamola (200 μg) i nakon 20-ak minuta započeo je postupak indukcije iskašljaja pri čemu se pridržavalo uputa iz protokola (prilog 3). Metoda indukcije iskašljaja sastoji se od inhaliranja čestica aerosola hipertonične otopine iz nebulizatira. Hipertonična otopina u rastućim koncentracijama primijenjena je u intervalima tijekom 7 minuta. Ispitanici su neposredno prije postupka indukcije isprali usnu šupljinu i ždrijelo običnom vodom te ispuhali sekret iz nosne šupljine u papirni ubrus. Postupak je trajao 21 minutu, ukoliko je izveden u cijelosti. Prekidao se ukoliko bi došlo do bitnijeg pogoršanja plućne funkcije ili subjektivnih tegoba bolesnika. Tijekom inhaliranja bolesnici su poticani na kašalj, a kada bi osjetili nadražaj, isplahnuli bi usta vodom kako bi se uklonila nakupljena slina, a potom iskašljali sekret iz dišnih putova u plastične Petrijeve zdjelice.

Ukoliko je došlo do težeg pogoršanja subjektivnih tegoba ili je pogoršanje FEV₁ bilo veće od 20%, postupak indukcije bi se prekidao. Za praćenje plućne funkcije u slučaju indukcije iskašljaja, ne preporučuju se pokazatelji protoka pri određenim udjelima volumena FVC, s obzirom da se pri različitim etapama mjerenja ne radi o istom FVC (57). U slučaju bronhospazma primijenjeni su bronhodilatatori u obliku otopine za inhaliranje, a ovisno o težini kliničke slike i plućne funkcije po potrebi i drugi lijekovi i postupci.

4.3.4. Obrada inducirano iskašljaja

Dobiveni uzorak inducirano iskašljaja obrađen je najkasnije u roku 2 sata, a obično odmah po završenoj indukciji. Postupak obrade IS (prilog 4) započeo je mehaničkim odvajanjem viskoznih i čvršćih dijelova iskašljaja koji su odlagani u prethodno izvaganu plastičnu kušalicu. Potom je kušalica ponovo izvagana s iskašljajem, a količina iskašljaja izračunana iz razlike dvaju mjerenja. Sve je mjereno na Metlerovoj mehaničkoj laboratorijskoj vagi (srednja vrijednost od 3 mjerenja na tri decimale). Dobiveni podatci mjerenja i izračunavanja upisivani su u posebno pripremljen obrazac (prilog 5). Nakon odabira iskašljaja dodavane su četverostruke količine otopine 10% ditiotreitola DTT (Sputolysin) i fosfatnog pufera (PBS) u svrhu homogenizacije. Nakon dodavanja otopina uslijedio je postupak vrtloženja tijekom 60 odnosno 30 sekundi. Postupak je nastavljen procesom laganog miješanja tijekom 60 minuta. Homogenizirana otopina filtrirana je kroz 70 µm plastičnu mrežicu te potom sadržaj centrifugiran je na 1500 okretaja tijekom 15 minuta. Nakon odvajanja od taloga, tri uzorka supernatanta pohranjena su do analize u hladnjak na -70° C .

4.3.5. Laboratorijska mjerenja

1. Mjerenje ECP-a u inducirano iskašljaju i serumu

Za mjerenje ECP u serumu i IS upotrijebljen je imunofluorescentni test Pharmacia CAP System ECP FEIA, tvrtke Pharmacia Diagnostics (Uppsala, Švedska).

2. Mjerenje ET-1 u IS i plazmi

Za mjerenje ET-1 u plazmi i IS upotrijebljen je endothelin ELISA (1-21) BI 20052 nove generacije za višenamjensku uporabu (plazma, urin, supernatanti staničnih kultura), tvrtke Biomedica Gruppe (Beč, Austrija).

3. Mjerenje ukupnih bjelančevina i albumina u IS

Za određivanje ukupnih bjelančevina u IS upotrijebljen je turbidimetrijski test Proteins U/CSF, a za određivanje albumina upotrijebljen je imunoturbidimetrijski test Tina-Quant® *albumin in urine*. Za oba testa tvrtke Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Njemačka) korišten je kalibrator C.f.a.s. PUC. Obje metode inače upotrebljavaju se za određivanje bjelančevina u mokraći i cerebrospinalnom likvoru.

Koncentracija ukupnih bjelančevina i koncentracija albumina je izmjerena, a nealbumnski udio bjelančevina izračunan je kao razlika navedenih izmjerenih vrijednosti.

Kako bi se umanjio učinak mogućeg, a nemjerljivog razrjeđenja IS drugim tekućim sadržajima tijekom postupka dobivanja uzorka, dobivene vrijednosti medijatora prikazane su i izražene u odnosu na miligram ukupnih bjelančevina, miligram albumina i miligram nealbuminskih bjelančevina u istom uzorku iskašljaja.

4.4. Statistička obrada podataka

Brojčani podatci opisani su osnovnim mjerama sredine i raspršenja. Opisni podatci predočeni su frekvencijama. Testiranje razlike učinjeno je za skupine bolesnika i kontrolnih ispitanika, te za bolesnike u dvama različitim stupnjevima bolesti. Za istraživanje razlike između dviju nezavisnih skupina upotrijebljen je Man-Whitney test. Za istraživanje razlike između dvaju zavisnih uzoraka upotrijebljen je Wilcoxonov test. Za ocjenu povezanosti upotrijebljen je Spearmanov koeficijent korelacije (ρ). Za testiranje podudarnosti između parova podataka za promjene subjektivnih tegoba između stabilne i pogoršane bolesti upotrijebljen je Bowkerov test simetrije. Za dvije kategorije, $k=2$, test je isti kao McNemarov test (152).

S obzirom da je riječ o eksperimentalno dobivenim kvantitativnim podacima teško je utvrditi koji pokazatelj kojom vrijednošću najbolje kvalitativno razlučuje normalan i

promijenjen nalaz. Osjetljivost i specifičnost testa ovise o uzorku ispitanika (153). Da bi se procijenila vrijednost spirometrijskih i biokemijskih pokazatelja, upotrijebljena je metoda izračuna ROC krivulje kojom se stupnjevito mijenjaju vrijednosti koje razlučuju normalne od promijenjenih nalaza (od engl. Receiver Operating Characteristic) (154). Metoda ROC-krivulje odabrana je kao jednostavan način odabira relevantne 2x2 tablice kontigencije koja omogućuje točnu procjenu razlike pojedinog pokazatelja između pojedinih skupina bolesnika i kontrolnih ispitanika. Za takav izračun, vrijednosti pokazatelja bolesnika, za oba stupnja bolesti, i kontrolnih ispitanika ustrojani su u obliku baze podataka na osobnom računaru. Za pojedine skupine stupnjevito je mijenjana točka razlučivanja (engl. cut-off point), kako bi se stvaranjem ROC-krivulje moglo objektivno utvrditi koja vrijednost najbolje razlučuje usporedene skupine.

Poslije odabira točke razlučivanja, za svaki je pokazatelj moguće postaviti dva upita:

1. U koliko je bolesnika vrijednost pokazatelja veća ili jednaka točki razlučivanja, a u koliko je zdravih ispitanika vrijednost pokazatelja manja od točke razlučivanja?
2. U koliko je bolesnika vrijednost pokazatelja manja od točke razlučivanja, a u koliko je zdravih ispitanika vrijednost pokazatelja veća ili jednaka točki razlučivanja?

Kako nema racionalne osnove za pretpostavku koje je od ta dva pitanja točno za pojedini pokazatelj, neizostavno je uvijek postaviti oba pitanja, a rezultati će pretraživanja pokazati što je znakovito. Odgovori su na ta pitanja u tablicama različito obilježeni.

Rabljene su sljedeće formule:

$$\text{Osjetljivost} = a/(a+c)$$

$$\text{Specifičnost} = d/(b+d)$$

$$\text{Točnost} = (a+d)/(a+b+c+d)$$

(a-broj istinito pozitivnih nalaza, b-broj lažno pozitivnih nalaza, c-broj lažno negativnih nalaza, d-broj istinito negativnih nalaza).

Osjetljivost je mjera uspješnosti metode u otkrivanju nazočnosti bolesti, dok je specifičnost mjera otkrivanja odsutnosti bolesti. Obje mjere su ujedinjene u točnosti čija je

vrijednost blizu 1 za metodu koja pravilno razlučuje bolesne i zdrave, uz mali broj lažno pozitivnih i lažno negativnih nalaza.

Pri procjeni neke metode ROC-krivuljom izračunava se površina pod krivuljom koja je u vrijednih metoda blizu 1, a u bezvrijednih oko 0,5. Kako je u radu izračunan veliki broj ROC krivulja, tablično su prikazane samo vrijednosti koje su po vrijednosti χ^2 testa najbolje razlikovale uspoređene skupine odabrane prema vrijednosti.

Rabljeni su izvorno pisani programi za baze podataka te statistički paket Statistica for Windows 2005 (inačica 7.1, StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

Za ocjenu bitnosti dobivenih rezultata odabrana je razina bitnosti $\alpha = 0.05$

5. REZULTATI

5.1. Spirometrijska mjerenja

Osnovne vrijednosti spirometrijskih pokazatelja FEV₁, PEF, FEF₅₀ izmjerene u bolesnika s astmom i kontrolnih ispitanika prikazane su u tablici 2. Vrijednosti mjerene tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti prikazane su u tablici odvojeno.

Tablica 2. Osnovni spirometrijski nalazi bolesnika i kontrolnih ispitanika

Skupina		Vrijednosti osnovnih spirometrijskih pokazatelja (% referentnih)					
		FEV ₁		PEF		FEF ₅₀	
		medijan	25-75%	medijan	25-75%	medijan	25-75%
ASTMA	STABILNA	86.81	63.26- 100.24	82.58	70.17- 105.52	51.91	37.53- 73.26
	POGORŠANA	74.31	52.32- 91.82	61.87	50.22- 101.48	36.59	24.53- 66.88
KONTROLA		106.00	103.88- 113.40	103.76	97.04- 115.48	92.87	85.73- 109.41
* STABILNA VS. KONTROLA		p<0.001		p= 0.003		p<0.001	
*POGORŠANA VS. KONTROLA		p<0.001		p<0.001		p<0.001	
† STABILNA VS. POGORŠANA		p= 0.002		p= 0.001		p= 0.001	

*Mann-Whitney U-test

†Wilcoxonov test

Vrijednosti ispitivanih spirometrijskih pokazatelja osnovnog mjerenja u kontrolnoj skupini očekivano nisu odstupale od referentnih vrijednosti. U bolesnika s astmom, također očekivano, izmjerene vrijednosti bile su snižene, osobito tijekom pogoršanja bolesti.

Razlika u osnovnim spirometrijskim nalazima između bolesnika i kontrolnih ispitanika visoko je statistički bitna za FEV₁ i FEF₅₀ (p<0.001) te PEF (p= 0.003) tijekom stabilne bolesti, a tijekom pogoršane bolesti za sva tri pokazatelja (p<0.001). Između stabilne i pogoršane bolesti razlike su u spirometrijskim nalazima manje, ali također statistički bitne za FEV₁ (p= 0.002), PEF (p= 0.001), FEF₅₀ (p= 0.001).

Vrijednosti spirometrijskih pokazatelja nakon premedikacije salbutamolom (bronhodilatacijski test) prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Spirometrijski nalazi bolesnika i kontrolnih ispitanika nakon primjene bronhodilatatora

Skupina		Vrijednosti spirometrijskih pokazatelja nakon primjene salbutamola (% referentnih)					
		FEV ₁		PEF		FEF ₅₀	
		medijan	25-75%	medijan	25-75%	Medijan	25-75%
ASTMA	STABILNA	86.54	80.39-107.91	92.01	76.63-107.48	57.63	45.79-102.22
	POGORŠANA	90.48	74.01-95.97	79.59	70.02-103.44	53.50	40.45-89.33
KONTROLA		111.02	104.96-116.38	104.90	97.97-124.53	99.72	96.67-125.09
* STABILNA VS. KONTROLA		p= 0.001		p= 0.004		p= 0.001	
* POGORŠANA VS. KONTROLA		p<0.001		p= 0.001		p<0.001	
† STABILNA VS. POGORŠANA		p= 0.017		p= 0.108		p= 0.136	

*Mann-Whitney U-test

†Wilcoxonov test

Nakon primjene salbutamola kako u stabilnoj tako i u pogoršanoj bolesti, očekivano, vrijednosti svih triju spirometrijskih pokazatelja su veće, ali ne dosežu referentne vrijednosti kao u kontrolnoj skupini. Razlika između bolesnika i kontrolnih ispitanika u spirometrijskim nalazima nakon salbutamola je statistički bitna za sva tri spirometrijska pokazatelja, za FEV₁ i FEF₅₀ (p= 0.001), za PEF (p= 0.004) tijekom stabilne bolesti, te za FEV₁ i FEF₅₀ (p<0.001),

kao i PEF ($p= 0.001$) tijekom pogoršane bolesti. Između stabilne i pogoršane bolesti razlika u nalazu nakon salbutamola statistički je bitna samo za FEV₁ ($p= 0.017$), dok za PEF ($p= 0.108$) i FEF₅₀ ($p= 0.136$) nije nađena statistički bitna razlika.

5.2. Bolesnički simptomi

Analiza podataka upitnika za kontrolu bolesti tijekom stabilne bolesti ukazuje na vrlo dobru ili potpunu kontrolu astme, a tijekom pogoršanja bolesti na loše kontroliranu bolest. Zbroj 24-satnih simptoma tijekom stabilne bolesti iznosio je 1 ili 0, a tijekom pogoršanja bolesti između 3 do 6 (11 bolesnika tijekom pogoršanja bolesti imao je zbroj simptoma 5).

Za oba testa razlika između simptoma tijekom stabilne bolesti i tijekom pogoršanja bolesti testirana Wilcoxonovim testom bila je statistički visoko bitna ($p<0.001$).

5.3. Indukcija iskašljaja

Prosječno trajanje indukcije iskašljaja u skupini kontrolnih ispitanika bilo 21 minutu (interkvartilni raspon 14 - 21 minuta), a u bolesnika i tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti 14 minuta (interkvartilni raspon 14 – 21 minuta). Razlika u trajanju indukcije iskašljaja testirana Wilcoxonovim testom nije bila statistički bitna između kontrolnih ispitanika i bolesnika, kako u stabilnoj bolesti ($p= 0.371$), tako i u pogoršanoj bolesti ($p= 0.424$), a ni između stabilne i pogoršane bolesti ($p= 0.586$).

Postupak indukcije iskašljaja primijenjen je na sveukupno 77 ispitanika, od toga 46 bolesnika i 31 kontrolnog zdravog ispitanika. Izvedeno je ukupno 100 indukcija, a u 83 je dobiven iskašljaj koji je bio zadovoljavajući za obradu i analizu. U bolesnika s astmom uspješnost je bila 89%, a u kontrolnih zdravih ispitanika 67,7%.

Inhaliranje hipertonične otopine u ispitanih bolesnika imalo je različit učinak na subjektivne tegobe i plućnu funkciju u pojedinim bolesnika. Sukladno očekivanju u kontrolnih ispitanika ni u jednom slučaju nisu zabilježene subjektivne tegobe ni pogoršanje plućne funkcije. Nasuprot tome, u nemalog broja bolesnika, usprkos liječenju ICS-ima i premedikaciji salbutamolom, registrirano je pogoršanje simptoma tijekom ili nakon postupka indukcije iskašljaja.

Subjektivne tegobe za bolesnike tijekom indukcije iskašljaja prikazane su u tablici 4. O pogoršanju subjektivnih tegoba izjasnilo se u razdoblju stabilne bolesti 9 bolesnika, a u razdoblju pogoršanja bolesti 13 bolesnika.

Tablica 4. Procjena subjektivnih tegoba tijekom postupka indukcije iskašljaja (N= 23)

POGORŠANJE	Stabilni bolesnici	Pogoršani bolesnici
NIJE NASTUPILO (0)	14	10
BLAGO /UMJERENO (1)	2	5
TEŠKO (2)	7	8

Razlika u pogoršanju simptoma u bolesnika tijekom indukcije iskašljaja između stabilne i pogoršane bolesti testirana Bowkerovim testom simetrije nije statistički bitna ($p= 0.261$).

Vrijednosti spirometrijskih pokazatelja nakon indukcije iskašljaja prikazane su u tablici 5.

Razlika u spirometrijskim nalazima nakon indukcije iskašljaja i nadalje je očekivano statistički bitna između kontrolnih ispitanika i bolesnika, kako u stabilnoj tako i u pogoršanoj bolesti, za sva tri spirometrijska pokazatelja ($p<0.001$). Između stabilne i pogoršane bolesti nije nađena statistički bitna razlika ni za jedan od tri ispitivana spirometrijska pokazatelja.

Tablica 5. Spirometrijski nalazi bolesnika i kontrolnih ispitanika nakon postupka indukcije

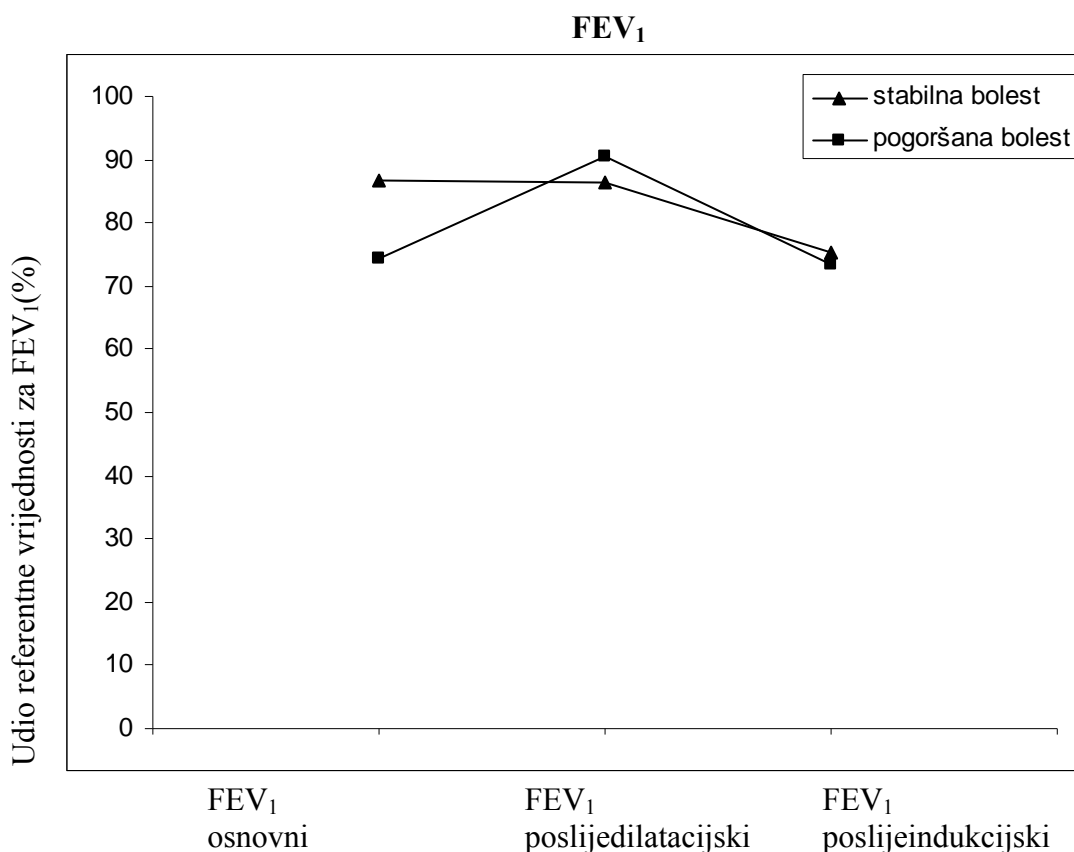
Skupina		Vrijednosti spirometrijskih pokazatelja nakon indukcije iskašljaja (%)					
		FEV ₁		PEF		FEF ₅₀	
		medijan	25-75%	medijan	25-75%	medijan	25-75%
ASTMA	STABILNA	75.44	58.67-99.68	67.24	48.77-89.33	45.30	27.86-88.75
	POGORŠANA	73.36	52.76-90.40	69.04	37.22-92.25	38.26	24.02-78.44
KONTROLE		113.33	104.50-117.76	104.56	96.86-117.01	98.88	89.35-122.10
*STABILNA VS. KONTROLA		p<0.001		p<0.001		p<0.001	
*POGORŠANA VS. KONTROLA		p<0.001		p<0.001		p<0.001	
†STABILNA VS. POGORŠANA		p= 0.115		p= 0.808		p= 0.088	

*Mann-Whitney U-test

†Wilcoxonov test

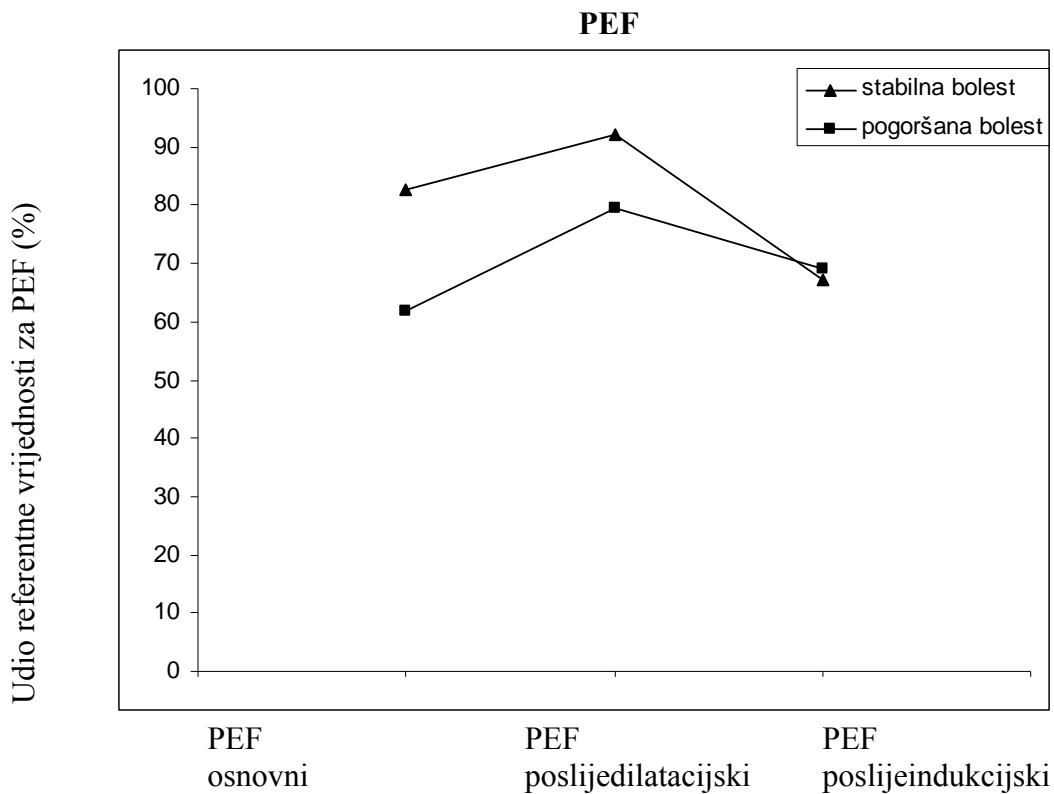
Razlike između osnovnih, poslijedilatacijskih i poslijeindukcijskih spirometrijskih nalaza bolesnika za stabilnu i za pogoršanu bolest testirane su Wilcoxonovim testom i prikazane su na slikama 1., 2. i 3.

Iz slike 1. razvidno je da se središnja vrijednost osnovnih nalaza FEV₁ u bolesnika tijekom stabilne i pogoršane bolesti razlikuje. Reverzibilnost nakon primjene bronhodilatatora jasno je izražena tijekom pogoršane bolesti, dok se tijekom stabilne bolesti središnje vrijednosti osnovnih i poslijedilatacijskih nalaza ne razlikuju, iako je većina bolesnika imala pozitivan bronhodilatacijski test prema kliničkim kriterijima. Nakon postupka indukcije iskašljaja vrijednosti FEV₁ u oba slučaja pogoršavaju se u odnosu na poslijedilatacijske i zadržavaju se na razini osnovnih vrijednosti u pogoršanoj bolesti.



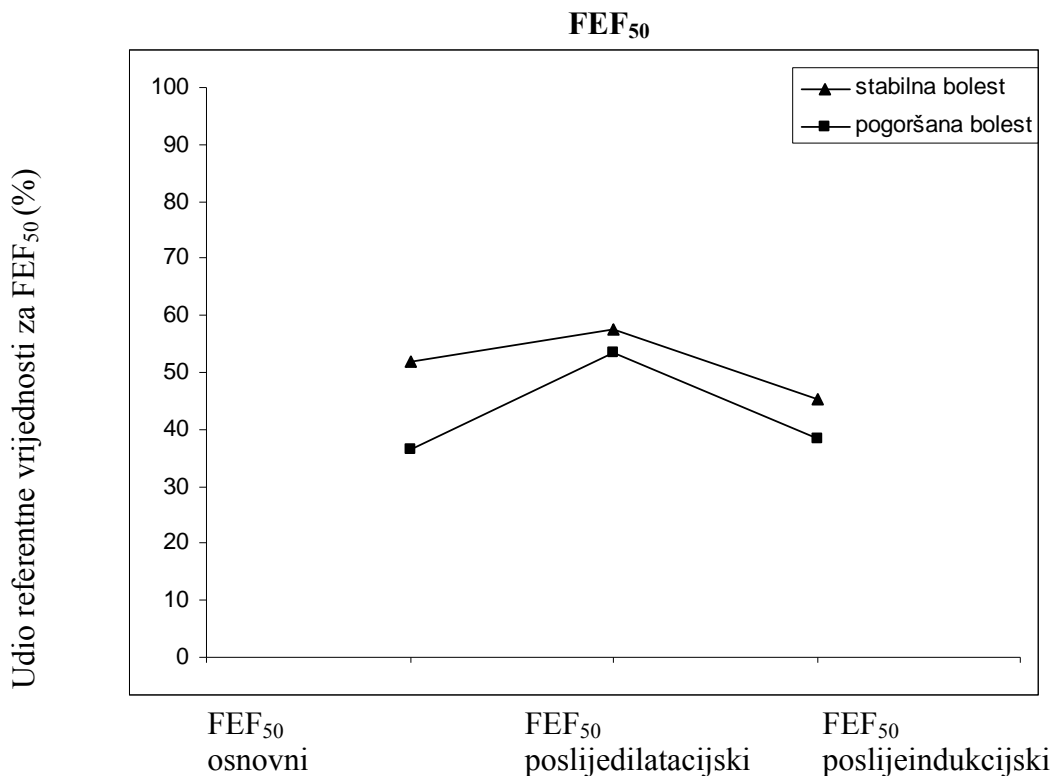
Slika 1. Promjene FEV₁ kroz mjerenja u bolesnika tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti prikazane su kao udio referentne vrijednosti
 Stabilna bolest: osnovni vs.nakon indukcije p= 0.105.
 Pogoršana bolest: osnovni vs nakon indukcije p= 0.622.

Razlika između osnovnih i poslijedilatacijskih nalaza, kao i između poslijedilatacijskih i poslijeindukcijskih nalaza za FEV₁, kako u stabilnoj tako i u pogoršanoj bolesti, statistički je bitna (p<0.001). Razlika između osnovnog FEV₁ i FEV₁ nakon indukcije iskašljaja nije bila statistički bitna ni u bolesnika tijekom stabilne bolesti (p= 0.105), ni tijekom pogoršane bolesti (p= 0.622). Nakon indukcije iskašljaja tijekom stabilne bolesti došlo je do većeg pogoršanja FEV₁ u odnosu na osnovne vrijednosti dok je u pogoršanoj bolesti donekle održan bronhodilatacijski učinak i vrijednosti FEV₁ na malo višoj razini u odnosu na osnovne.



Slika 2. Promjene PEF kroz mjerenja u bolesnika tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti prikazane su kao udio referentne vrijednosti.
 Stabilna bolest: osnovni vs nakon indukcije $p < 0.001$
 Pogoršana bolest: osnovni vs nakon indukcije $p = 0.899$

Iz slike 2. se vidi razlika između osnovnih središnjih vrijednosti PEF-a tijekom stabilne i pogoršane bolesti i razmjerni bronhodilatacijski učinak. Nakon indukcije uvjerljivo je veće sniženje PEF-a tijekom stabilne bolesti nego tijekom pogoršane, a da se pri tom poslijeindukcijske vrijednosti između stabilne i pogoršane bolesti međusobno ne razlikuju. Tijekom stabilne bolesti razlika između osnovnih i poslijedilatacijskih, poslijedilatacijskih i poslijeindukcijskih, te osnovnih i poslijeindukcijskih nalaza za PEF bila je statistički bitna u sva tri slučaja redom ($p = 0.009$) ($p = 0.003$) ($p < 0.001$). Tijekom pogoršane bolesti razlika u nalazima PEF-a bila je kao u slučaju FEV_1 statistički bitna između osnovnih i poslijedilatacijskih vrijednosti ($p < 0.001$), te između poslijedilatacijskih i poslijeindukcijskih vrijednosti ($p = 0.001$), a između osnovnih i poslijeindukcijskih vrijednosti razlika nije bila statistički bitna ($p = 0.899$).



Slika 3. Promjene FEF₅₀ kroz mjerenja u bolesnika tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti prikazane kao udio referentne vrijednosti.
 Stabilna bolest: osnovni vs nakon indukcije p= 0.580
 Pogoršana bolest: osnovni vs nakon indukcije p= 0.160

Za središnje vrijednosti FEF₅₀ opažamo gotovo istu promjenu u bolesnika tijekom stabilne i pogoršane bolesti, s tim da je bronhodilatacijski učinak bolji u bolesnika tijekom pogoršane bolesti. Razlika je statistički bitna između osnovnog i mjerenja nakon primjene bronhodilatatora ($p < 0.001$), te između nalaza nakon primjene bronhodilatatora i nakon indukcije iskašljaja ($p = 0.001$). Razlika između osnovnog FEF₅₀ i FEF₅₀ nakon indukcije iskašljaja nije bila statistički bitna kako u bolesnika tijekom stabilne bolesti ($p = 0.580$), tako i tijekom pogoršane bolesti ($p = 0.160$).

Iako promjena FEV₁ nakon indukcije iskašljaja nije statistički bitna u odnosu na osnovne nalaze, u nekolicine bolesnika zabilježeno je sniženje FEV₁ veće od 20%. To je bio razlog za prekid indukcije iskašljaja u 4 bolesnika tijekom stabilne bolesti, a u 5 bolesnika tijekom pogoršane bolesti. Nasuprot tom, u 5 bolesnika, na kraju indukcije iskašljaja tijekom pogoršane bolesti nađene vrijednosti FEV₁ bile su više za 20% od osnovnih, odnosno bronhodilatacijski zaštitni učinak salbutamola održan je tijekom cijelog postupka. Gotovo iste promjene zapažaju se za PEF i FEF₅₀.

U uzorku ispitanih bolesnika za koje su navedeni rezultati nije bilo osobitih neželjenih događaja tijekom postupka indukcije. Bolesnici, usprkos tegobama i mogućem prekidu indukcije, jednako kao i kontrolni ispitanici, ocijenili su test dobro podnošljivim. Međutim, u tijeku prikupljanja uzorka ispitanika u dva stabilna bolesnika zabilježeno je teže pogoršanje plućne funkcije tijekom indukcije iskašljaja. S obzirom da se postupak indukcije nije namjeravao ponavljati u razdoblju pogoršanja bolesti, navedeni bolesnici su isključeni. Osobito je važno istaći slučaj jedne bolesnice koja je, pod slikom dobro kontrolirane bolesti, tijekom indukcije iskašljaja u prvoj minuti inhaliranja 3% hipertonične otopine razvila snažan astmatični napadaj.

U svih bolesnika u kojih je došlo do subjektivnog pogoršanja ili pogoršanja plućne funkcije, nakon prekidanja postupka indukcije, vrlo je brzo došlo do potpune normalizacije, spontano ili uz primjenu lijekova.

5.4. Biokemijska mjerenja

Rezultati analize biokemijskih pokazatelja prikazani su u tablicama od 6 do 9.

U tablici 6 prikazani su rezultati analize bjelančevina u IS. U bolesnika s astmom izmjerena je u IS viša koncentracija ukupnih bjelančevina i albumina nego u kontrolnih ispitanika. Nađena razlika bila je statistički bitna za ukupne bjelančevine ($p= 0.030$) i albumine ($p= 0.005$) između kontrolnih ispitanika i bolesnika tijekom pogoršanja bolesti, ali ne i između kontrolnih ispitanika i bolesnika tijekom stabilne bolesti. Nije nađena statistički bitna razlika između bolesnika i kontrolnih ispitanika za nealbuminske bjelančevine. Također nije nađena statistički bitna razlika za ukupne bjelančevine, albumine i nealbuminske bjelančevine u IS između stabilne i pogoršane bolesti.

Tablica 6. Koncentracija ukupnih bjelančevina, albumina i nealbuminskih bjelančevina izmjerena u IS

Skupina		Bjelančevine u IS					
		Ukupne bjelančevine (mg/l)		albumini (mg/l)		‡Nealbuminske bjelančevine (mg/l)	
		medijan	25-75%	medijan	25-75%	medijan	25-75%
ASTMA	STABILNA	2003.6	937.8-3679.0	138.0	61.6-421.0	1807.2	843.6-3102.8
	POGORŠANA	2268.8	1152.8-3223.2	239.6	106.0-645.4	1964.0	943.8-2920.0
KONTROLE		1176.6	760.6-2146.6	75.2	28.0-187.8	1084.0	624.8-1966.8
*STABILNA VS. KONTROLA		p= 0.182		p= 0.064		p= 0.121	
*POGORŠANA VS. KONTROLA		p= 0.030		p= 0.005		p= 0.066	
†STABILNA VS. POGORŠANA		p= 0.661		p= 0.295		p= 0.778	

*Mann-Whitney U-test

†Wilcoxonov test

‡Nealbuminske bjelančevine (razlika ukupnih bjelančevina i albumina izmjerenih u IS)

Rezultati analize ET-1 u IS prikazani su u tablici 7. Nije nađena statistički bitna razlika u koncentraciji ET-1 u IS između kontrolnih ispitanika i bolesnika, ni tijekom stabilne bolesti, ni tijekom pogoršanja bolesti. Koncentracija ET-1 u IS također se nije statistički bitno razlikovala između stabilne i pogoršane bolesti.

Tablica 7. Koncentracija ET-1 u IS

Skupina		ET-1 u IS					
		ET-1(pg/ml)		‡ET-1alb x 10 ⁻⁹		§ET-1nealbprot x 10 ⁻⁹	
		medijan	25-75%	medijan	25-75%	medijan	25-75%
ASTMA	STABILNA	22.51	17.77- 26.00	0.144	0.143- 0.434	0.013	0.006- 0.029
	POGORŠANA	20.28	18.54- 27.30	0.082	0.034- 0.280	0.009	0.006- 0.032
KONTROLE		22.24	19.29- 29.00	0.301	0.173- 0.800	0.019	0.012- 0.042
*STABILNA VS. KONTROLA		p= 0.422		p= 0.073		p= 0.115	
*POGORŠANA VS. KONTROLA		p= 0.411		p= 0.009		p= 0.079	
†STABILNA VS. POGORŠANA		p= 0.578		p= 0.147		p= 0.658	

*Mann-Whytney U-test

†Wilcoxonov test

‡ET-1alb (ET-1 izražen u odnosu na albumine u IS)

§ET-1nealbprot (ET-1 izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS)

Kada su vrijednosti ET-1 izražene u odnosu na bjelančevine u istom uzorku IS, razlika između bolesnika tijekom pogoršanja bolesti i kontrolnih ispitanika postaje statistički bitna za ET-1 izražen u odnosu na ukupne bjelančevine (P= 0.036) i ET-1 izražen u odnosu na albumine (P= 0.009). ET-1 u IS tako izražen bio je bitno niži u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti nego u kontrolnih ispitanika. Ta razlika nije nađena za ET-1 izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine.

Tablica 8. Koncentracija ECP-a u IS

Skupina		ECP u IS					
		ECP ($\mu\text{g/l}$)		†ECPalb x 10^{-6}		§ECPnealbprot x 10^{-6}	
		Medijan	25-75%	medijan	25-75%	medijan	25-75%
ASTMA	STABILNA	243,00	131.80- 1246,00	1.798	0.595- 3.813	0.187	0.058- 0.348
	POGORŠANA	832.00	178.40- 1600.00	1.680	1.039- 3.914	0.310	0.177- 0.473
KONTROLA		30.76	16.00- 87.22	0.590	0.282- 1.240	0.042	0.019- 0.062
*STABILNA VS. KONTROLA		p<0.001		p= 0.005		p<0.001	
*POGORŠANA VS. KONTROLA		p<0.001		p= 0.001		p<0.001	
†STABILNA VS. POGORŠANA		p= 0.024		p= 0.872		p= 0.260	

*Mann-Whytney U-test

†Wilcoxonov test

‡ECPalb (ECP izražen u odnosu na albumine u IS)

§ECPnealbprot (ECP izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS)

Rezultati analize za ECP u IS prikazani su u tablici 8. U bolesnika, tijekom stabilne bolesti, a osobito tijekom pogoršane bolesti, koncentracija ECP-a bila je statistički bitno viša nego u kontrolnih ispitanika ($p<0.001$). Razlika u koncentraciji ECP-a IS bolesnika bila je također statistički bitna između stabilne i pogoršane bolesti ($p= 0.024$).

Kada su izmjerene vrijednosti ECP u IS izrečene u odnosu na koncentraciju ukupnih bjelančevina, albumina, odnosno nealbuminskih bjelančevina, razlike su manje, ali i nadalje postoji statistički bitna razlika za sve izvedene pokazatelje između kontrolnih ispitanika i bolesnika, kako tijekom stabilne tako i tijekom pogoršane bolesti. ECP izrečen u odnosu na nealbuminski dio ukupnih bjelančevina u potpunosti se podudara s ECP-om izrečenim u odnosu na ukupne bjelančevine, a razlika između bolesnika i kontrolnih ispitanika u oba slučaja statistički je bitna ($p<0.001$). Međutim, naprijed opisana razlika u izmjerenoj

koncentraciji ECP u IS bolesnika prestaje biti bitnom između stabilne i pogoršane bolesti ukoliko se ECP iskaže u odnosu na bjelančevine iskašljaja.

Tablica 9. Koncentracija ET-1 i ECP u venskoj krvi

Skupina		Biokemijski pokazatelji u krvi			
		ET-1 (pg/ml)		ECP (µg/l)	
		medijan	25-75%	medijan	25-75%
ASTMA	STABILNA	1.063	0.546-1.956	10.900	8.130-22.400
	POGORŠANA	0.828	0.499-1.721	17.500	11.200-28.000
KONTROLA		1.024	0.452-1.615	11.550	7.852-19.000
*STABILNA VS. KONTROLA		p= 0.670		p= 0.922	
*POGORŠANA VS. KONTROLA		p= 0.855		p= 0.113	
†STABILNA VS. POGORŠANA		p= 0.649		p= 0.048	

*Mann-Whitney U-test

†Wilcoxonov test

Koncentracija ET-1 u venskoj krvi nije se statistički bitno razlikovala između kontrolnih ispitanika i bolesnika, kako tijekom stabilne bolesti tako i tijekom pogoršane bolesti. Također nije nađena statistički bitna razlika u koncentraciji ET-1 u venskoj krvi između stabilne i pogoršane bolesti.

Nije nađena niti statistički bitna razlika u koncentraciji ECP-a u venskoj krvi između bolesnika s astmom, kako u stabilnoj tako i u pogoršanoj bolesti, i kontrolnih ispitanika. Nasuprot tome koncentracija ECP u venskoj krvi bolesnika bila je statistički bitno viša tijekom pogoršanja bolesti, nego tijekom stabilne bolesti (p= 0.048).

5.5. Vrijednost ispitivanih pokazatelja u razlučivanju bolesnika i kontrolnih ispitanika

Rezultati analize izračuna ROC krivulje za spirometrijske i biokemijske pokazatelje prikazani su u tablicama od 10. do 15. Svaki redak u navedenim tablicama prikazuje tablicu kontigencije koja je s najvećom vrijednošću χ^2 razlučivala uspoređene skupine. Iz zadnjeg stupca tablice razvidna je bitnost izračunatih χ^2 testova.

U tablicama od 10. do 12. prikazani su rezultati izračuna ROC krivulje za spirometrijske pokazatelje prethodno standardizirane u odnosu na referentne vrijednosti. Prikazan je izračun za sva tri analizirana pokazatelja u sva tri mjerenja: osnovnom, nakon primjene bronhodilatatora i nakon postupka indukcije iskašljaja.

Rezultati analize spirometrijskih pokazatelja za kontrolne ispitanike i bolesnike tijekom stabilne bolesti prikazane su u tablici 10., za kontrolne ispitanike i bolesnike tijekom pogoršanja bolesti u tablici 11., a između stabilne i pogoršane bolesti u tablici 12. Svi spirometrijski pokazatelji s visokom statističkom bitnošću razlučuju kontrolne ispitanike i bolesnike, kako u stabilnoj tako i u pogoršanoj bolesti ($p < 0.001$). Stanje stabilne i stanje pogoršane bolesti statistički bitno razlučuju samo osnovni PEF ($p = 0,016$) i osnovni FEF₅₀ ($p = 0,028$).

Osnovni spirometrijski pokazatelji pokazuju visoku točnost te osobito visoku specifičnost u razlučivanju skupine kontrolnih ispitanika i skupine bolesnika. Pri tom su FEV₁ i FEF₅₀ visoko osjetljivi, osobito u slučaju pogoršanja bolesti. PEF je u oba slučaja vrlo nisko osjetljiv u otkrivanju bolesti, ali ne daje lažno pozitivnih nalaza. Vrijednost osnovnih spirometrijskih pokazatelja u razlučivanju stanja stabilne i pogoršane bolesti manja je nego u slučaju razlučivanja bolesnika i kontrolnih ispitanika.

Nakon primjene bronhodilatatora, sva tri spirometrijska pokazatelja i nadalje pokazuju visoku točnost u razlučivanju bolesnika i kontrolnih ispitanika. Pri tom, slično kao i u slučaju osnovnih pokazatelja, pokazuju osobito visoku specifičnost i relativno nisku osjetljivost. Najveću vrijednost ima FEV₁ koji je visoko osjetljiv i točan, a najmanju PEF koji ima najnižu osjetljivost i točnost. U razlučivanju bolesnika tijekom stabilne i pogoršane bolesti poslijedilatacijski spirometrijski pokazatelji nemaju osobitu vrijednost, a razlika nije statistički bitna ni za jedan ispitivani pokazatelj.

Nakon indukcije iskašljaja sva tri spirometrijska pokazatelja imaju visoku točnost, gotovo 100% specifičnost, uz nižu osjetljivost u razlučivanju skupine kontrolnih ispitanika i bolesnika, kako tijekom stabilne tako i tijekom pogoršane bolesti. U razlučivanju bolesnika

tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti, poslijeindukcijski spirometrijski pokazatelji također se nisu pokazali vrijednima.

Iz svega navedenog slijedi da su spirometrijski pokazatelji u svim mjerenjima vrlo vrijedni u razlučivanju kontrolnih ispitanika i bolesnika, osobito tijekom pogoršanja bolesti. Svi pokazatelji pokazuju izrazito visoku, često 100% sposobnost razlučivanja nalaza viših od optimalne razlučne točke, koji pripadaju kontrolnim ispitanicima, dok je sposobnost prepoznavanja nižih nalaza koji pripadaju bolesnicima mnogo manja. Pri tome su se pojedini pokazatelji pokazali vrjednijima od drugih. Najveću osjetljivost u razlučivanju ima osnovni i poslijeindukcijski FEV₁ (0,913) u skupini kontrolnih ispitanika i bolesnika tijekom pogoršanja bolesti, dok PEF ima gotovo uvijek nižu osjetljivost, osobito u skupini stabilnih bolesnika i kontrolnih ispitanika (0,478).

Vrijednost spirometrijskih pokazatelja u razlučivanju bolesnika tijekom stabilne i pogoršane bolesti pokazala se mnogo manjom i ograničenom samo na osnovni PEF i FEF₅₀.

Tablice 13. do 15. prikazuju rezultate analize izračuna ROC krivulje za biokemijske pokazatelje.

Tablica 13. prikazuje razlike u biokemijskim nalazima stabilnih bolesnika i kontrolnih ispitanika. Nemali broj pokazatelja (ET-1, ukupne bjelančevine, nealbuminske bjelančevine u IS, te ET-1 i ECP u venskoj krvi) ni najboljom tablicom kontigencije nije statistički bitno razlučivao uspoređene skupine, te su se pokazali nedostatnim za tu namjenu. Za razliku od njih, statističku bitnost u razlučivanju uspoređenih skupina pokazali su ECP u IS ($p < 0.001$), albumini u IS ($p = 0,043$), te ET-1 i ECP u IS izraženi u odnosu na ukupne bjelančevine ($p = 0,046$; $p < 0.001$), u odnosu na albumine ($p = 0,005$; $p = 0,023$), te u odnosu na nealbuminske bjelančevine ($p = 0,034$, $p = 0,002$).

Tablica 14. prikazuje razlike u biokemijskim nalazima bolesnika tijekom pogoršanja bolesti i kontrolnih ispitanika. Ponovno neki od pokazatelja kao što su nealbuminske bjelančevine u IS, te ET-1 i ECP u venskoj krvi, ni najboljom tablicom kontigencije nisu statistički bitno razlučivali uspoređene skupine, te su se pokazali nedostatnim za tu namjenu. Blizu razine bitnosti bili su ET-1 i albumini u IS.

Statističku bitnost u razlučivanju navedenih skupina pokazali su ECP u IS ($p < 0.001$) i ukupne bjelančevine u IS ($p = 0,027$), ET-1 i ECP u IS izraženi u odnosu na ukupne bjelančevine ($p = 0,002$; $p < 0.001$), te u odnosu na albumine ($p < 0.001$; $p = 0,014$), kao i u odnosu na nealbuminske bjelančevine ($p = 0,002$; $p < 0.001$).

Tablica 15. prikazuje razlike u biokemijskim nalazima u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti i tijekom stabilne bolesti. Većina biokemijskih pokazatelja nije pokazala statističku

bitnost u razlučivanju stanja stabilne i stanja pogoršane bolesti. Blizu razine bitnosti bio je ECP izražen u odnosu na ukupne bjelančevine iskašljaja koji je u pogoršanju bolesti bio povećan ($p=0,074$). Navedena stanja bolesti statistički je bitno razlučivao samo ET-1 izražen u odnosu na albumine ($p=0,017$) koji je u pogoršanju bolesti bio bitno niži, a što je u suglasju s prije opisivanim tablicama.

Podatci izračuna ROC krivulje za biokemijske pokazatelje pokazuju da među svim biokemijskim pokazateljima jedino ECP u IS, uz optimalnu razlučnu točku, ima visoku i osjetljivost i specifičnost, a razlika između uspoređenih skupina bolesnika i kontrolnih ispitanika testirana χ^2 testom statistički je visoko bitna ($p<0,001$). U razlučivanju bolesnika sa stabilnom i pogoršanom bolesti, ECP u induciranom iskašljaju bolesnika pokazao se manje vrijedan, a razlika nije bila statistički bitna.

U induciranom iskašljaju ET-1 ima relativno visoku osjetljivost, ali prema svemu ostalomu malu vrijednost u razlučivanju kontrolnih ispitanika od bolesnika, kako u stabilnoj tako i u pogoršanoj bolesti. Podjednako slabo razlučuje bolesnike tijekom stabilnoga i pogoršanoga stupnja bolesti.

Ukupne bjelančevine, albumini i nealbuminski udio bjelančevina u iskašljaju ispitivanih bolesnika i kontrolnih ispitanika nisu se pokazali osobito vrijedni pokazatelji u razlučivanju tih skupina. Pri tom su albumini u iskašljaju visoko osjetljivi u razlučivanju stabilnih bolesnika i kontrolnih ispitanika, a u razlučivanju bolesnika tijekom pogoršanja bolesti i kontrolnih ispitanika veću osjetljivost imaju ukupne bjelančevine. Nealbuminske bjelančevine nemaju gotovo nikakvu sposobnost razlučivanja ovih skupina. Vrijednost ovih pokazatelja u razlikovanju bolesnika tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti još je manja.

Kada su ET-1 i ECP u iskašljaju prikazani u odnosu na ukupne bjelančevine, albumine i nealbuminski udio bjelančevina, dobili smo specifičnije i manje osjetljive pokazatelje u razlikovanju stabilnih bolesnika i kontrolnih ispitanika. Pri tom su se pokazali kao bolji i točniji pokazatelji ET-1 izražen u odnosu na albumine, te ECP izražen u odnosu na ukupne bjelančevine i nealbuminske bjelančevine koji statistički bitno razlikuju stabilne bolesnike i kontrolne ispitanike. U razlučivanju bolesnika tijekom pogoršanja bolesti i kontrolnih ispitanika isti pokazatelji još su specifičniji, osjetljiviji i točniji, a razlika testirana χ^2 testom statistički je bitna.

U razlučivanju bolesnika tijekom stabilne bolesti i tijekom pogoršane bolesti ti pokazatelji imaju malu sposobnost razlučivanja. Osjetljivost, specifičnost i točnost relativno su niski, a razlika je statistički bitna samo za ET-1 izražen na albumine.

Vrijednost je ECP i ET-1 u venskoj krvi u razlučivanju kontrolnih ispitanika i bolesnika, kako u stabilnoj tako i u pogoršanoj bolesti mala, a jednako i u razlučivanju bolesnika tijekom stabilne i pogoršane bolesti. Ti pokazatelji imaju vrlo nisku osjetljivost i točnost, s tim da ECP ima relativnu specifičnost u razlikovanju kontrolnih ispitanika i bolesnika, kako tijekom stabilne tako i pogoršane bolesti.

Tablica 10. Usporedba spirometrijskih nalaza kontrolnih ispitanika i bolesnika tijekom stabilne bolesti

Spirometrijski pokazatelji		Kontrolni ispitanici	Točka razlučivanja %	Stabilni bolesnici	a	b	c	d	osjetljivost	specifičnost	točnost	χ^2	p
Osnovni	FEV ₁	veći/jednak	100.4	manji	18	2	5	19	0.783	0.905	0.841	20.918	<0.001
	PEF	veći/jednak	80	manji	11	0	12	21	0.478	1.000	0.727	13.391	<0.001
	FEF ₅₀	veći/jednak	70.2	manji	17	1	6	20	0.739	0.952	0.841	21.714	<0.001
Nakon primjene bronhodilatatora	FEV ₁	veći/jednak	90	manji	12	0	11	21	0.522	1.000	0.750	15.065	<0.001
	PEF	veći/jednak	85	manji	11	1	12	20	0.478	0.952	0.705	10.263	0.001
	FEF ₅₀	veći/jednak	70	manji	14	0	9	21	0.609	1.000	0.795	18.747	<0.001
Nakon indukcije iskašljaja	FEV ₁	veći/jednak	90	manji	16	0	7	21	0.696	1.000	0.841	22.956	<0.001
	PEF	veći/jednak	90	manji	18	2	5	19	0.783	0.905	0.841	20.918	<0.001
	FEF ₅₀	veći/jednak	60	manji	16	0	7	21	0.696	1.000	0.841	22.956	<0.001

Tablica 11. Usporedba spirometrijskih nalaza kontrolnih ispitanika i bolesnika tijekom pogoršane bolesti

Spirometrijski pokazatelji		Kontrolni ispitanici	Točka razlučivanja %	Pogoršani bolesnici	a	b	c	d	osjetljivost	specifičnost	točnost	χ^2	p
Osnovni	FEV ₁	veći/jednak	100	manji	21	2	2	19	0.913	0.905	0.909	29.427	< 0.001
	PEF	veći/jednak	80	manji	15	0	8	21	0.652	1.000	0.818	20.779	< 0.001
	FEF ₅₀	veći/jednak	80.2	manji	21	3	2	18	0.913	0.857	0.886	26.263	< 0.001
Nakon primjene bronhodilatatora	FEV ₁	veći/jednak	100	manji	19	2	4	19	0.826	0.905	0.864	23.502	< 0.001
	PEF	veći/jednak	85	manji	15	1	8	20	0.652	0.952	0.795	17.337	< 0.001
	FEF ₅₀	veći/jednak	90	manji	18	2	5	19	0.783	0.905	0.841	20.918	< 0.001
Nakon indukcije iskašljaja	FEV ₁	veći/jednak	98.4	manji	21	0	2	21	0.913	1.000	0.955	36.680	< 0.001
	PEF	veći/jednak	75	manji	14	0	9	21	0.609	1.000	0.795	18.747	< 0.001
	FEF ₅₀	veći/jednak	69.8	manji	17	0	6	21	0.739	1.000	0.864	25.294	< 0.001

Tablica 12. Usporedba spirometrijskih nalaza tijekom stabilne bolesti i tijekom pogoršane bolesti

Spirometrijski pokazatelji		Stabilna bolest	Točka razlučivanja %	Pogoršana bolest	a	b	c	d	osjetljivost	specifičnost	točnost	χ^2	p
Osnovni	FEV ₁	veći/jednak	55	manji	7	2	16	21	0.304	0.913	0.609	3.453	0.063
	PEF	veći/jednak	70	manji	13	5	10	18	0.565	0.783	0.674	5.841	0.016
	FEF ₅₀	veći/jednak	36	manji	11	4	12	19	0.478	0.826	0.652	4.847	0.028
Nakon primjene bronhodilatatora	FEV ₁	veći/jednak	96	manji	18	12	5	11	0.783	0.478	0.630	3.450	0.063
	PEF	veći/jednak	81	manji	14	8	9	15	0.609	0.652	0.630	3.136	0.077
	FEF ₅₀	veći/jednak	100	manji	21	16	2	7	0.913	0.304	0.609	3.453	0.063
Nakon indukcije iskašljaja	FEV ₁	veći/jednak	98	manji	20	17	3	6	0.870	0.261	0.565	1.243	0.265
	PEF	veći/jednak	39	manji	6	3	17	20	0.261	0.870	0.565	1.243	0.265
	FEF ₅₀	veći/jednak	87	manji	20	17	3	6	0.870	0.261	0.565	1.243	0.265

Tablica 13. Usporedba biokemijskih nalaza kontrolnih ispitanika i bolesnika tijekom stabilne bolesti

Biokemijski pokazatelji		Kontrolni ispitanici	Točka razlučivanja	Stabilni bolesnici	a	b	c	d	osjetljivost	specifičnost	točnost	χ^2	p
IS	ET-1	veći/jednak	18	manji	7	2	16	19	0.304	0.905	0.591	2.950	0.086
	ECP	manji	70	veći/jednak	20	6	3	15	0.869	0.714	0.795	15.479	<0.001
	Ukupne bjelančevine	manji	990	veći/jednak	17	12	6	9	0.739	0.428	0.590	1.373	0.241
	Albumini	manji	40	veći/jednak	21	14	2	7	0.913	0.333	0.636	4.095	0.043
	Nealb. bjelančevine	manji	1600	veći/jednak	13	9	10	12	0.565	0.571	0.568	0.819	0.365
	*ET-1ukprot	veći/jednak	0.007	manji	8	2	15	19	0.348	0.905	0.614	3.987	0.046
	†ET-1alb	veći/jednak	0.19	manji	14	4	9	17	0.609	0.810	0.705	7.942	0.005
	‡ET-1nealbprot	veći/jednak	0.01	manji	10	3	13	18	0.435	0.857	0.636	4.494	0.034
	§ECPukprot	manji	0.078	veći/jednak	15	2	8	19	0.652	0.904	0.772	14.361	<0.001
	ECPalb	manji	1.655	veći/jednak	12	4	11	17	0.521	0.809	0.659	5.205	0.023
	¶ECPnealbprot	manji	0.09	veći/jednak	15	4	8	17	0.652	0.809	0.727	9.537	0.002
Venska krv	ET-1	veći/jednak	1.25	manji	16	11	7	10	0.696	0.476	0.591	1.367	0.242
	ECP	manji	20	veći/jednak	7	4	16	17	0.304	0.809	0.545	0.759	0.384

*ET-1 ukprot (ET-1 izražen u odnosu na ukupne bjelančevine u IS)

†ET-1alb (ET-1 izražen u odnosu na albumine u IS)

‡ET-1nealbprot (ET-1 izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS)

§ECP ukprot (ECP izražen na ukupne bjelančevine u IS)

||ECPalb (ECP izražen u odnosu na albumine u IS)

¶ECPnealbprot (ECP izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS)

Tablica 14. Usporedba biokemijskih nalaza kontrolnih ispitanika i bolesnika tijekom pogoršane bolesti.

Biokemijski pokazatelji		Kontrolni ispitanici	Točka razlučivanja	Pogoršani bolesnici	a	b	c	d	osjetljivost	specifičnost	točnost	χ^2	p
IS	ET-1	veći/jednak	19	manji	9	3	14	18	0.391	0.857	0.614	3.416	0.065
	ECP	manji	100	veći/jednak	20	5	3	16	0.869	0.761	0.818	17.840	<0.001
	Ukupne bjelančevine	manji	1000	veći/jednak	20	12	3	9	0.869	0.428	0.659	4.919	0.027
	Albumini	manji	150	veći/jednak	14	7	9	14	0.608	0.666	0.636	3.336	0.068
	Nealb. bjelančevine	manji	1800	veći/jednak	12	8	11	13	0.521	0.619	0.568	0.877	0.349
	*ET-1ukprot	veći/jednak	0.008	manji	12	2	11	19	0.522	0.905	0.705	9.204	0.002
	†ET-1alb	veći/jednak	0.1	manji	16	3	7	18	0.696	0.857	0.773	13.672	<0.001
	‡ET-1nealbprot	veći/jednak	0.01	manji	14	3	9	18	0.609	0.857	0.727	10.047	0.002
	§ECPukprot	manji	0.1	veći/jednak	19	2	4	19	0.826	0.904	0.863	23.502	<0.001
	ECPalb	manji	0.65	veći/jednak	19	10	4	11	0.826	0.523	0.681	5.981	0.014
	¶ECPnealbprot	manji	0.1	veći/jednak	18	4	5	17	0.782	0.809	0.795	15.395	<0.001
venska krv	ET-1	veći/jednak	0.9	manji	15	9	8	12	0.652	0.571	0.614	2.213	0.137
	ECP	manji	20	veći/jednak	9	4	14	17	0.391	0.809	0.590	2.126	0.145

*ET-1 ukprot (ET-1 izražen u odnosu na ukupne bjelančevine u IS)

†ET-1alb (ET-1 izražen u odnosu na albumine u IS)

‡ET-1nealbprot (ET-1 izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS)

§ECP ukprot (ECP izražen na ukupne bjelančevine u IS)

||ECPalb (ECP izražen u odnosu na albumine u IS)

¶ECPnealbprot (ECP izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS)

Tablica 15. Usporedba biokemijskih nalaza tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti.

Biokemijski pokazatelji		Stabilna bolest	Točka razlučivanja	Pogoršana bolesti	a	b	c	d	osjetljivost	specifičnost	točnost	χ^2	p
IS	ET-1	veći/jednak	24	manji	16	12	7	11	0.696	0.478	0.587	1.460	0.227
	ECP	manji	240	veći/jednak	16	11	7	12	0.695	0.521	0.608	2.241	0.134
	Ukupne bjelančevine	manji	1000	veći/jednak	20	17	3	6	0.869	0.260	0.565	1.243	0.265
	Albumini	manji	200	veći/jednak	14	10	9	13	0.608	0.565	0.586	1.393	0.238
	Nealb. bjelančevine	veći/jednak	3250	manji	20	17	3	6	0.870	0.261	0.565	1.243	0.265
	*ET-1ukprot	veći/jednak	0.008	manji	12	7	11	16	0.478	0.304	0.391	2.241	0.134
	†ET-1alb	veći/jednak	0.125	manji	17	9	6	14	0.739	0.609	0.674	5.661	0.017
	‡ET-1nealbprot	veći/jednak	0.01	manji	14	9	9	14	0.609	0.609	0.609	2.173	0.140
	§ECPukprot	manji	0.21	veći/jednak	16	10	7	13	0.695	0.565	0.630	3.184	0.074
	ECPalb	veći/jednak	1.4	manji	12	6	11	15	0.522	0.714	0.614	1.415	0.234
	¶ECPnealbprot	manji	0.25	veći/jednak	15	11	8	12	0.652	0.521	0.586	1.415	0.234
Venska krv	ET-1	veći/jednak	0.9	manji	15	10	8	13	0.500	0.565	0.538	2.190	0.139
	ECP	manji	15	veći/jednak	13	8	10	15	0.565	0.652	0.608	2.190	0.139

*ET-1 ukprot (ET-1 izražen u odnosu na ukupne bjelančevine u IS)

†ET-1alb (ET-1 izražen u odnosu na albumine u IS)

‡ET-1nealbprot (ET-1 izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS)

§ECP ukprot (ECP izražen na ukupne bjelančevine u IS)

||ECPalb (ECP izražen u odnosu na albumine u IS)

¶ECPnealbprot (ECP izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS)

5.6. Povezanost između pokazatelja

Između simptoma i većine pokazatelja plućne funkcije u ispitanih bolesnika nađena je statistički bitna povezanost. Tijekom stabilne bolesti zbroj simptoma negativno je korelirao s osnovnim PEF ($\rho = -0.461$, $p = 0.027$) i FEF₅₀ ($\rho = -0.429$, $p = 0.041$), te sa sva tri poslijeindukcijska pokazatelja FEV₁ ($\rho = -0.588$, $p = 0.003$), PEF ($\rho = -0.477$, $p = 0.021$) i FEF₅₀ ($\rho = -0.445$, $p = 0.033$). Tijekom pogoršanja bolesti zbroj simptoma bitno negativno korelira sa sva tri osnovna spirometrijska pokazatelja FEV₁ ($\rho = -0.473$, $p = 0.023$), PEF ($\rho = -0.485$, $p = 0.019$) i FEF₅₀ ($\rho = -0.455$, $p = 0.029$), ali povezanost s poslijeindukcijskim spirometrijskim nalazima nije nađena. Pogoršanje subjektivnih tegoba tijekom indukcije iskašljaja koreliralo je statistički bitno negativno s nalazom sva tri poslijeindukcijska spirometrijska pokazatelja, tijekom stabilne bolesti za FEV₁ ($\rho = -0.665$, $p = 0.001$), PEF ($\rho = -0.772$, $p < 0.001$), FEF₅₀ ($\rho = -0.578$, $p = 0.004$), i tijekom pogoršane bolesti za FEV₁ ($\rho = -0.434$, $p = 0.039$), PEF ($\rho = -0.529$, $p = 0.009$), FEF₅₀ ($\rho = -0.444$, $p = 0.034$).

U ispitanih bolesnika tijekom stabilne, kao i tijekom pogoršane bolesti, te u kontrolnih ispitanika nije nađena statistički bitna povezanost između koncentracije ET-1 u IS i koncentracije ET-1 u venskoj krvi ($\rho = 0.346$, $p = 0.114$; $\rho = -0.040$, $p = 0.857$; $\rho = -0.112$, $p = 0.637$). Međutim, kada je koncentracija ET-1 u IS izražena u odnosu na koncentraciju albumina, a također i nealbuminskih bjelančevina u IS, nađena je bitna povezanost s koncentracijom ET-1 u venskoj krvi stabilnih bolesnika ($\rho = 0.436$, $p = 0.030$; $\rho = 0.455$, $p = 0.033$). U bolesnika tijekom pogoršanja bolesti i u kontrolnih ispitanika ne pronalazi se povezanost na ovaj način izražene koncentracije ET-1 u IS s koncentracijom ET-1 venske krvi. Kao i u slučaju ET-1, koncentracija ECP u IS nije statistički bitno korelirala s koncentracijom ECP u venskoj krvi ni u jednoj ispitivanoj skupini. Kada je ECP u IS izražen u odnosu na nealbuminske bjelančevine u IS nađena je bitna negativna korelacija s ECP-om venske krvi u kontrolnih ispitanika ($\rho = -0.515$, $p = 0.035$). Takav nalaz nije opažen u bolesnika.

Nađena je bitna negativna povezanost između ET-1 i ECP samo u IS bolesnika tijekom stabilne bolesti ($\rho = -0.473$, $p = 0.026$). Takva povezanost ne opaža se u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti, a ni u kontrolnih ispitanika. Međutim, kada je ET-1 u IS izražen u odnosu na ukupne bjelančevine, albumine i nealbuminske bjelančevine, nađena je bitna negativna povezanost s ECP-om u IS bolesnika, tijekom stabilne ($\rho = -0.622$, $p = 0.002$; $\rho = -0.713$, $p < 0.001$; $\rho = -0.547$, $p = 0.008$), ali i pogoršane bolesti ($\rho = -0.565$, $p = 0.005$; $\rho = -0.859$, $p < 0.001$; $\rho = -0.691$, $p = 0.001$), a također i u kontrolnih ispitanika ($\rho = -0.618$,

$p= 0.004$; $\rho= -0.672$, $p= 0.002$; $\rho= -0.604$, $p= 0.008$). Nije nađena povezanost između ET-1 i ECP u venskoj krvi ni u jednoj ispitivanoj skupini, u bolesnika tijekom stabilne bolesti ($\rho= -0.076$, $p= 0.730$), tijekom pogoršane bolesti ($\rho= 0.129$, $p= 0.557$) i u kontrolnih ispitanika ($\rho= -0.249$, $p= 0.291$).

U kontrolnih ispitanika, bolesnika tijekom stabilne bolesti, kao i tijekom pogoršanja bolesti ECP u IS bitno je korelirao s ukupnim bjelančevinama ($\rho= 0.635$, $p= 0.003$; $\rho= 0.574$, $p= 0.005$; $\rho= 0.740$, $p<.001$), albuminima ($\rho= 0.663$ $p= 0.003$; $\rho= 0.650$, $p= 0.001$; $\rho= 0.777$, $p<0.001$), kao i nealbuminskim dijelom bjelančevina u IS ($\rho= 0.662$, $p= 0.006$; $\rho= 0.584$, $p= 0.004$; $\rho= 0.748$, $p<0.001$).

U bolesnika tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti, ET-1 u IS negativno je korelirao s ukupnim bjelančevinama ($\rho= -0.575$, $p= 0.005$; $\rho= -0.480$, $p= 0.020$) i nealbuminskim bjelančevinama u IS ($\rho= -0.608$, $p= 0.003$; $\rho= -0.559$, $p= 0.010$), a s albuminima u IS samo u stabilnoj bolesti ($\rho= -0.508$, $p= 0.016$). U kontrolnih ispitanika nije nađena ovakva povezanost.

Nije nađena izravna povezanost između ET-1 u IS i venskoj krvi ni s jednim spirometrijskim pokazateljem. Nasuprot tomu, ECP u IS korelirao je bitno s osnovnim FEV₁ ($\rho= -0.429$, $p= 0.041$) i PEF ($\rho= -0.430$, $p= 0.041$) u pogoršanoj bolesti. U stabilnoj bolesti povezanost ECP-a sa spirometrijskim pokazateljima nije nađena.

Kada su ispitivani pokazatelji promatrani kroz promjene nađene u pogoršanju bolesti u odnosu na stabilno stanje, prikazane kao omjer nalaza pogoršana/stabilna bolest, nađeno je da je promjena ET-1 u venskoj krvi korelirala bitno s promjenom osnovnog FEF₅₀ ($\rho= 0,479$, $p= 0,021$). Tijekom pogoršanja bolesti većina bolesnika očekivano je imala niže vrijednosti FEF₅₀ u odnosu na stabilnu bolest. Bolesnici u kojih su nalazi ET-1 u venskoj krvi tijekom pogoršanja bolesti bili niži nego tijekom stabilne bolesti, u isto vrijeme imali su i mnogo niže osnovne vrijednosti FEF₅₀. Obrnuto, bolesnici koji su tijekom pogoršanja bolesti imali više vrijednosti ET-1 nego tijekom stabilne bolesti, u isto vrijeme imali su nepromijenjene ili neznatno promijenjene vrijednosti osnovnog FEF₅₀. Regresijski pravac upućuje da je u bolesnika, u kojih je tijekom pogoršanja bolesti došlo do porasta ET-1 u venskoj krvi, istodobno zabilježeno manje pogoršanje osnovnog FEF₅₀ (omjer pogoršanje bolesti/stabilna bolest manji od 1,2). Proizlazi da je povezanost koncentracije ET-1 u venskoj krvi s FEF₅₀ u promatranih bolesnika bila u smislu da su vrijednosti FEF₅₀ tijekom pogoršanja bolesti održane na razini stabilnih uz istovremeni porast vrijednosti ET-1 u plazmi. Nije nađena povezanost ispitivanih biokemijskih pokazatelja sa simptomima bolesti, ni u stabilnoj, ni u pogoršanoj bolesti.

6. RASPRAVA

Ovaj rad imao je za cilj istražiti mogućnost primjene imunokemijskog mjerenja ET-1 u IS i venskoj krvi i procijeniti vrijednost takvog mjerenja u razlučivanju bolesnika oboljelih od astme od zdravih ispitanika, te stanja pogoršane bolesti od stanja stabilne bolesti.

6.1. Procjena ET-1 i ostalih ispitanih biokemijskih pokazatelja u astmi

S velikom vjerojatnošću možemo smatrati da u venskoj krvi između ispitanih bolesnika i kontrolnih ispitanika ne postoji razlika u koncentraciji ET-1, a također ni između stabilne i pogoršane bolesti. Izrazito povišena koncentracija ET-1 u arterijskoj krvi nađena je u kongestivnom popuštanju srca (124) te ranoj fazi ARDS (155) što kao i povezanost s težinom bolesti ukazuje na povećano stvaranje tog medijatora u krvnim žilama. U ARDS nalaz se normalizira oporavkom plućne funkcije te se smatra da je porast ET-1 najvjerojatnije posljedica njegove smanjene razgradnje u oštećenim plućima. Dakle, u ovom se slučaju pluća isključuju kao mogući izvor njegovog povećanog stvaranja. U dvije studije nađene su povišene koncentracije ET-1 u perifernoj krvi astmatičara i kad nije bilo simptoma (157,158). U nekoliko ranijih istraživanja povišena koncentracije ET-1 nađena je tijekom akutnog astmatičnoga napadaja i u venskoj krvi (156,157) i u arterijskoj krvi (158). U naših bolesnika nalaz koncentracije ET-1 u venskoj krvi tijekom pogoršanja bolesti odražava stanje nakon 3 dana te stoga nije usporedivo s povišenim vrijednostima u akutnim napadima astme u navedenim studijama.

U ovom istraživanju serumski ECP, jedan od najstarijih poznatih biokemijskih pokazatelja za procjenu eozinofilne upale, nije se razlikovao bitno između bolesnika i kontrolnih ispitanika. U mnogim istraživanjima do sada, serumski ECP nađen je povišen u astmatičara (159-161). Nalaz u bolesnika, ispitivanih za potrebe ovoga rada, objašnjava se uzorkom bolesnika koji nisu bili isključivo atopičari, te osobito činjenicom da je riječ o bolesnicima koji su liječeni protuupalnim lijekovima. Usprkos tomu, nađena je mala, ali ipak statistički bitna razlika u koncentraciji ECP u serumu između stabilne i pogoršane bolesti, što upućuje na aktivnost upale tijekom pogoršanja. Ovaj nalaz u suglasju je s rezultatima studija u kojima su povišene serumske koncentracije ECP nađene u pogoršanju bolesti kao odraz slabijeg odgovora na protuupalno liječenje, odnosno nedostane kontrole bolesti (162,163). Nalaz visokog ECP-a smatra se više odrazom loše kontrole nego težine bolesti (164,165).

Rezultati mjerenja u ET-1 i ECP pokazali su da su koncentracije medijatora najmanje 20 puta veće u IS nego u venskoj krvi što ukazuje da oba medijatora nastaju lokalno u respiracijskom sustavu. U studijama sa životinjama dokazano je da se stanje degranulacije eozinofila odvija unutar dišnih putova (166,167). Dokazano je također da se u dišnom sustavu ET-1 primarno stvara u epitelnim stanicama (168,169), u manjoj mjeri u endotelnim (170).

Koncentracija ET-1 u IS, jednako kao i nalaz venske krvi, nije se statistički bitno razlikovala između bolesnika i kontrolnih ispitanika, a ni između stabilne i pogoršane bolesti. Međutim, u bolesnika je zapažena velika varijabilnost nalaza ET-1 u IS. U nekih bolesnika nađene su krajnje visoke vrijednosti ET-1 tijekom stabilne bolesti, u nekih drugih bolesnika tijekom pogoršane bolesti, dok slično ne opažamo u kontrolnih ispitanika. Neočekivano je što su koncentracije ET-1 u IS tijekom pogoršanja bolesti ipak bile niže, a kada je ET-1 izražen u odnosu na albumine razlika postaje statistički bitna. Ranija eksperimentalna istraživanja *in vivo* i *in vitro* otklanjaju kao mogući razlog za takav nalaz smanjeno stvaranje ET-1 tijekom pogoršanja jer su pružila dokaze o njegovoj umiješanosti u patogenetska i patofiziološka zbivanja u astmi, od klinički dokazanog učinka bronhospazma (131,171), do učinaka na proliferaciju mioblasti, fibroblasta, zadebljanje stijenke, odnosno uloge u procesu remodelacije bronha (38). Na samom pragu otkrića ET-1, Nomura i suradnici još su 1989. objavili slučaj mnogostrukog porasta koncentracije ET-1 u BAL-u u jednog bolesnika tijekom bronhospazma (sa 0.03 pg/ml na 0.5 pg/ml) (172). Poslije su uslijedila istraživanja na kulturama stanica koja su potvrdila da se ET-1 pojačano stvara u plućima bolesnika oboljelih od astme, te da je u epitelnim stanicama dišnih putova pohranjena velika količina ET-1. Početkom 90-ih, endotelinska imunoreaktivnost, izražavana kao postotak svih epitelnih stanica po jedinici duljine bazalne opne, dokazana je samo u epitelu dišnih putova bolesnika s astmom (168,170) (173). Iako je već tada bilo poznato da je zreli ET-1 i ET-3 prisutan u stanicama žljezdanog epitela i epitelu dišnih putova u zdravim odraslim ljudskim plućima (169), imunoreaktivnost nije nađena u stanicama zdravih ispitanika (168,170), a u bolesnika s KOPB-om samo iznimno (168). Istraživanja su također pokazala da je imunoreaktivnost u epitelnim stanicama veća u bolesnika koji imaju simptome astme, nego u onih bez simptoma (173). Dokazano je također da bronhalne epitelne stanice astmatičara u kulturi *in vitro* spontano otpuštaju ET-1 u velikim količinama tijekom 48 sati, za razliku od KOPB-bolesnika i zdravih ispitanika u kojih je količina bila ispod razine mjerljivosti (168). Epitelne stanice asimptomatskih bolesnika otpuštale su ET-1 u neznatnim količinama pa se mogao otkriti tek nakon 24 sata (173).

Kurokawa i suradnici izvješćuju o bitnom porastu ET-1 u iskašljaju nakon alergijske provokacije u odnosu na stanje prije provokacije (174). U istraživanjima Chalmersa i suradnika nađene su bitno povišene koncentracije u slini i iskašljaju u odnosu na plazmu (175), dok razlika između bolesnika s astmom i zdravih ispitanika nije bila bitna, iako se u literaturi pogrešno citira suprotno (176). Činjenicu da je najviša koncentracija ET-1 izmjerena u slini, važno je imati na umu pri interpretaciji rezultata IS s obzirom da se opisanom metodom gotovo ne može postići čistoća iskašljaja bez ikakvih primjesa sline.

Međutim, kada je ET-1 analiziran u BAL, uzorku sekreta dišnih putova koji ne sadrži primjese sline, dobiveni su rezultati oprječni i zbunjujući. U jednom istraživanju nađene su povišene koncentracije ET-1 u BAL-u bolesnika sa stabilnom astmom u odnosu na zdrave ispitanike (177). Trakada i suradnici potvrdili su to zapažanje nalazom bitno više koncentracije ET-1 u BAL-u tijekom akutnog napada, ali i tijekom stabilne bolesti u odnosu na zdrave ispitanike (158). Nasuprot tomu, u jednom istraživanju, u BAL-u astmatičara tijekom spontanih noćnih napadaja astme, nađene su snižene koncentracije ET-1 (178). U bolesnika s astmom nađeno je, također, da je u BAL-u, uzetom iz segmenta u kojem je alergenom eksperimentalno izazvan bronhospazam, ET-1 bio neočekivano snižen u odnosu na koncentracije ET-1 u segmentu u kojem je stanje bilo stabilno (179). Iako se u literaturi ističe da IS može zamijeniti BAL, ti uzorci razlikuju se i s obzirom na dio bronhalnog stabla odakle potječu. Klinička istraživanja koncentracije ET-1 u sekretu dišnih putova pokazuju različite rezultate, a nalaz neočekivano snižene razine ET-1 u IS astmatičnih bolesnika u ovom istraživanju nije u suprotnosti sa svim dosadašnjim ispitivanjima. Iako se rezultati našeg istraživanja, s obzirom na razlike u metodi i uzorku bolesnika, ne mogu odgovarajuće usporediti s rezultatima navedenih studija, isto ukazuju na vjerojatnu neujednačenost promjena koncentracije ET-1 tijekom spontanih ili izazvanih pogoršanja bolesti.

U IS bolesnika ECP bio je bitno viši od ECP kontrolnih ispitanika i pokazao se najvrjedniji od svih biokemijskih pokazatelja. Rezultati ranijih istraživanja pokazali su da je nalaz ECP u IS bolji u procjeni astme od broja eozinofila (180), te da je mnogo točniji i osjetljiviji od serumskog ECP-a (181). Nalaz izrazito visokih vrijednosti ECP-a u IS tijekom pogoršanja bolesti potvrđuje rezultate ranijih istraživanja koja ukazuju da ECP u induciranom iskašljaju vjerno odražava stanje kontrole bolesti (85,182-184). Brojna istraživanja, također, potvrđuju da je učinkovito protuupalno liječenje praćeno bitnim snižavanjem ECP u IS (185-188). Nalaz visokih vrijednosti ECP u IS u bolesnika tijekom stabilne bolesti ukazao je na postojanje nekontrolirane upale dišnih putova usprkos odsutnosti simptoma i liječenju.

Nedovoljna kontrola upale objašnjava zašto su upravo ti bolesnici u ispitivanom razdoblju imali pogoršanje bolesti.

Ukupne bjelančevine i albumini mjereni su s namjenom dobivanja dodatnih podataka o kvaliteti iskašljaja, razlikovali su se u ispitivanih skupina. Više koncentracije ukupnih bjelančevina, te osobito albumina u IS bolesnika, nego u kontrolnih ispitanika, u skladu su sa postojećim znanjima o povećanoj ekstravazaciji iz plazme, osobito tijekom pogoršanja bolesti (189,190). Iako su rezultati nekih istraživanja pokazali da se albumini u IS astmatičara bez simptoma i zdravih ispitanika ne razlikuju (167) većina istraživanja ukazuje da su u sekretu dišnih putova astmatičara uz albumine povišene i druge bjelančevine kao alfa makroglobulin, fibrinogen i ceruloplasmin (191). Povišene koncentracije albumina nađene su u astmatičara, osobito tijekom pogoršanja bolesti (192,193) i tijekom bronhoprovokacije histaminom (194). Veća koncentracija albumina nađena je tijekom neizravne bronhoprovokacije, nego tijekom izravne bronhoprovokacije metakolinom (195,196). U ispitivanom uzorku nemoguće je procijeniti u kojem omjeru je nalaz albumina u IS posljedica bolesti, a u kojem posljedica neizravne bronhoprovokacije uzrokovane inhalacijom hipertonične otopine tijekom postupka indukcije iskašljaja. Iako nema istraživanja u kojima je procjenjivana vrijednosti albumina i ukupnih bjelančevina u sekretu dišnih putova u astmi, zanimljivo je spomenuti istraživanja u kojima su albumini u bronhalnom ispirku metodom izračuna ROC krivulje procijenjeni korisnim u razlikovanje malignih i nemalignih bolesti pluća (197).

U ovom istraživanju nije nađena povezanost ET-1 niti s jednim kliničkim pokazateljem. Nasuprot tome, nađena je jasna negativna korelacija s ECP u IS sa spirometrijskim pokazateljima tijekom pogoršanja bolesti. U malom broju studija ispitivana je i nađena povezanost koncentracije ET-1 u plazmi tijekom akutnog bronhospazma (156), i koncentracije ET-1 u BAL-u (177,198) sa spirometrijskim pokazateljima opstrukcije.

U većem broju istraživanja nađena je negativna povezanost koncentracije ECP sa spirometrijskim pokazateljima FEV₁ (199), FEV₁/ FVC (200) jutarnjim PEF-om (182). Nađena je također povezanost ECP sa simptomima astme (159,182) što u ovom istraživanju nije bio slučaj. Rosi i suradnici zaključili su da su pokazatelji upale u IS općenito neovisni od kliničkih i funkcionalnih pokazatelja (201).

6.2. Mogući razlozi nalaza niske razine ET-1 u IS u bolesnika s astmom

U ovom radu nađena koncentracija ET-1 u IS bolesnika, ne samo što nije potvrdila postavljenu hipotezu, već je potpuno neočekivano bila snižena u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti. Razmotreni su mogući razlozi neočekivano niskih koncentracija ET-1 koji se odnose na niz okolnosti *in vivo* i *in vitro* koje su mogle utjecati na to.

Sveukupna razina stvorenog i otpuštenog ET-1 u dišnim putovima bolesnika proizlazi iz složene interakcija s brojnim citokinima, medijatorima, neurotransmiterima i drugim sudionicima upale. Istraživanja su pokazala da je ET-1 snažan kemotaktički čimbenik za neutrofile, monocite i eozinofile, te povećava lokalnu razinu IL-5 i IL-13 (202). ET-1 potiče monocite na stvaranje TNF- α , IL-8, GM-CSF, IL-1, IL-6 (203) Interakcija u smislu uzajamnog poticanja stvaranja i sekrecije ET-1 i GM-CSF smatra se da bi mogla pridonositi pogoršanjima kronične upale dišnih putova (204,205). U eksperimentalno izazvanoj eozinofilnoj upali u štakora se već nakon 15-ak minuta u plućnom tkivu otkriva porast mRNAET-1 koji počinje opadati nakon 2 sata. Sinteza ostalih citokina slijedi u kasnijim fazama upalnog odgovora. U BAL-u se pojavljuju najprije LTB₄, IL-8 i TNF- α , a ET-1 nakon 6 sati s maksimumom nakon 24 sata. Blokada endotelinskih receptora bosentanom rezultira smanjenjem ispitanih citokina TNF- α , IL-4, IL-1 β , INF- γ (206). Inkubacija epitelnih stanica astmatičara s IL-1 β i histaminom rezultirala je pojačanom prisutnošću mRNAET-1 i njegovim pojačanim otpuštanjem iz stanica, a koncentracije u mediju su bile ovisne o dozi i vremenu proteklom od stimulacije (173). Rezultati ovih istraživanja sugerirali su da ET-1 čak prethodi eozinofilnoj upali i potiče stvaranje drugih citokina. Moguće je da u induciranom iskašljaju bolesnika s astmom nije nađen bitniji porast koncentracije ET-1 stoga što se on prema navedenim istraživanjima događa u ranoj fazi upalnog odgovora, te pored toga ovisi ne samo o prisustvu već i o koncentraciji pojedinih medijatora.

U astmi u kojoj dominira neutrofilna upala (207-209) očekivao bi se iz navedenog razloga porast ET-1 kao što je to slučaj u bronhiektazijama (210), cističnoj fibrozi i KOPB (211). Bakterijski produkt, lipopolisaharid (LPS) koji potiče neurofilnu upalu, potaknuo je *in vitro* sintezu ET-1 u stanicama alveolarnih makrofaga (212), ali primijenjen u štakora *in vivo* intratrahealno nije doveo do bitnije izraženosti ET-1mRNA u plućnom tkivu niti do bitnijeg porasta ET-1 u BAL-u. Nasuprot tome u eksperimentalno izazvanoj eozinofilnoj upali u štakora intratrachelnom primjenom dekstrana SDX uslijedio je značajan porast ET-1 (140).

Istraživanja *in vitro* su pokazala uzajamnu povezanost ET-1 s TNF- α u eozinofilnoj upali. TNF- α potaknuo je oslobađanje ET-1 iz kulture glatkomišićnih bronhalnih stanica

goveda u kojima se u bazalnim uvjetima ne otkriva njegova aktivnost (204). ET-1 potaknuo je oslobađanje TNF- α iz alveolarnih makrofaga bolesnika sa stabilnom astmom, ali ne i u bolesnika s nestabilnom astmom koji su spontano otpuštali puno više TNF- α od stabilnih, a niti u zdravih ispitanika koji su ga spontano oslobađali vrlo malo (212). U studiji Finsnesa i suradnika u eksperimentalno izazvanoj upali u štakora nije nađeno da je porast TNF- α potakao sintezu ET-1 u plućima *in vivo* (140).

U regulaciji vaskularnog i bronhalnog tonusa NO i ET-1 su u ravnoteži. NO i prostaciklin nađeni su povišeni u bolesnika s astmom kao i enzimi koji sudjeluju u njihovoj sintezi iNOS i COX-2 (213). Istraživanja u plućnoj hipertenziji pokazuju da je inhaliranje NO povezano sa sniženjem ET-1 u plazmi (214). Inhibicijom sinteze NO dolazi do izražaja vazokonstriksijski učinak ET-1, koji se može oslabiti neselektivnom blokadom ili selektivnom blokadom ET_B receptora (215). S druge strane ET-1 preko ET_A receptora potiče oslobađanje NO i prostaciklina, te njegov učinak može biti i suprotan (216). Inhalirana doza ET-1 koja dovodi do kontrakcije bronha nije imala učinak na upalne stanice, TNF- α , IL-1 β , NO₂ i albumina niti na kasnu kontrakciju bronha (217).

Učinak pojedinih medijatora je stimulacijski i uzajaman, a u nekim slučajevima stimulacija pojedinih od strane ET-1 može imati za posljedicu povratnu inhibiciju stvaranja i otpuštanja ET-1. U složenosti upale u astmi prisutnost pojedinih medijatora nije konstantna, što ovisi o utjecaju drugih medijatora i ne pokazuje stroge i nepromjenljive odnose.

Sukladno istraživanjima Wagnera i suradnika na endotelnim stanicama (123) može se pretpostaviti da se u astmi ET-1 stvoren u epitelnim stanicama oslobađa samo djelomično u lumen, a djelomično prema tkivu gdje ostvaruje svoje djelovanje.

Koncentracije ispitivanih biokemijskih pokazatelja u induciranom iskašljaju u svim skupinama ispitanika varirale su u velikom rasponu. U stvaranju iskašljaja sudjeluju raznovrsne stanice, strukturne stanice respiracijskog sustava i one koje u njega dolaze migracijom iz drugih dijelova tijela. Iskašljaj nastaje u različitim dijelovima bronhalnog stabla i nije za očekivati da se pojedini medijator koji nastojimo odrediti u iskašljaju izlučuje u podjednakoj mjeri u svih bolesnika. Iako je biološka varijabilnost prilikom mjerenja biokemijskih pokazatelja očekivana, postavlja se pitanje, je li koncentracija medijatora u IS bolesnika promijenjena u tijeku bolesti uslijed promjene kvalitete ili količine sekreta spontano ili pod utjecajem indukcije iskašljaja. Promjena koncentracije medijatora u bolesnika moguća je posljedica promjene njegova stvaranja, razgradnje, vezivanja ili razrjeđenja tvarima koje ne sadrže medijator kojeg mjerimo, a koje utječu na izmjerene vrijednosti.

Povećana sekrecija žlijezda ili permeabilnosti kapilara rezultira većom količinom tvari i tekućine u lumenu dišnih putova. Za pravilnu interpretaciju koncentracije neke tvari izražene u jedinici volumena bilo bi potrebno točnije utvrditi koja količina te tvari se nalazi u dišnim putovima kao normalni sastojak, odnosno koliki je volumen iskašljaja koji postoji u dišnim putovima u nekom trenutku. Kako nije moguće izmjeriti realnu količinu iskašljaja u danom trenutku i kako nisu poznate normalne koncentracije pojedinih medijatora u iskašljaju, ideja je bila da se koncentracija medijatora pokuša vezati uz koncentraciju bjelančevina u IS, odnosno iskaže dijeljenjem s koncentracijom izmjerenih albumina i ukupnih bjelančevina, te nealbuminskih bjelančevina koji su izračunati kao udio iz razlike izmjerenih bjelančevina. Ukoliko imamo nepoznato razrjeđenje iskašljaja vezivanjem koncentracije medijatora za koncentraciju bjelančevina moglo bi se doći do pokazatelja koji bi bili manje osjetljivi na teško određivu mjeru razrjeđenja.

Rezultat ovakvog načina izražavanja koncentracije medijatora pokazao je da je koncentracija ET-1 izražena u odnosu na koncentraciju albumina niža od izmjerene te postaje čak statistički bitno niža u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti nego u kontrolnih ispitanika. Ovaj nalaz podudara se s nalazom bitno niže koncentracije ET-1 u BAL-u koji je izražen u odnosu na bjelančevine u BAL-u u bolesnika tijekom noćnih simptoma astme (178). Sličan rezultat nađen je u bolesnika sa sistemskom sklerozom gdje je koncentracija ET-1 u BAL-u, izražena u odnosu na koncentraciju albumina, iako ne statistički bitno, bila niža u bolesnika nego u kontrolnih ispitanika (218). Na ovaj način izražena koncentracija ET-1 u naših ispitanika pokazuje bitnu povezanost s koncentracijom ET-1 u venskoj krvi tijekom stabilne bolesti kao i ECP-om u IS u svih ispitivanih skupina, a što prvobitno nije bio slučaj. U slučaju ECP-a izraženog na ovaj način stanje se ne mijenja bitno u odnosu na izmjerene koncentracije, s obzirom da su promjene u koncentracijama podudarajuće. Ovaj je nalaz u skladu s rezultatima drugih istraživanja u kojima je istovremeno mjeren albumin korelirao s ECP (167,219).

Opažena veza s količinom albumina u IS upućuje da albumini ili neki drugi čimbenici možda prikrivaju otkrivanje ET-1 ili utječu na njegovu bržu razgradnju, te su u tom smislu odgovorni za nalaz puno nižih koncentracija nego što je bilo očekivano. Istraživanja su pokazala da je u iskašljaj astmatičara nađena povećana koncentracija neutrofilne elastaze i drugih proteaza (220) koje nepredvidivo razgrađuju ET-1. Poluvrijeme razgradnje ET-1 u trahealnom sekretu je nepoznato i ovisi o koncentraciji proteaza (221). Moguće je da je u nekim slučajevima ET-1 u sekretu dišnih putova zbog razgradnje najniži upravo u bolesnika s najtežom upalom.

ET-1 u IS izražen u odnosu na albumine pokazao se podjednako vrijedan u razlučivanju bolesnika i kontrolnih ispitanika kao i ECP. Iako je nalaz sniženog ET-1 u pogoršanju bolesti neočekivan, ET-1 izražen u odnosu na albumine pokazao se vrijedniji u razlučivanju stabilne i pogoršane bolesti od ostalih biokemijskih pokazatelja koji općenito u tom pogledu imaju malu vrijednost.

Vodeći računa o sigurnosti bolesnika i etičnosti samog istraživanja, bolesnici su tijekom istraživanja liječeni ICS-ima. Primjena ICS budesonida prije upalnog podražaja u eksperimentalnih životinja poništila je učinak upalnog podražaja i ranije zapaženo višestruko povećanje ET-1 (222). Eksperimentalnim i kliničkim ispitivanjima ova zapažanja utjecaja ICS na sintezu i otpuštanje ET-1 djelomično su potvrđena i u ljudi. S razvojem osjetljivijih i boljih metoda detekcije ET-1 u biopsijskim uzorcima bronhalnog epitela u astmatičara s blagom astmom potvrđeno je da bolesnici koji nisu koristili ICS imaju više ET-1, nego bolesnici koji koriste ICS, a količina ET-1 podudarala se s brojem eozinofila u epitelnom i subepitelnom dijelu stijenke dišnih putova (223). U supernatantu kulture epitelnih stanica astmatičara inkubiranih s hidrokortizonom nađena je bitno niža koncentracija ET-1 u odnosu na stanice koje nisu bile tretirane. Međutim, utjecaj na otpuštanje ET-1 iz stanica nije bio proporcionalan utjecaju na smanjivanje mRNA za sintezu preproendotelina u stanicama, već naprotiv, bitno veći postotak stanica tretiranih hidrokortizonom nego onih koje nisu bile tretirane bio je imunokemijski pozitivan. Posumnjalo se da je hidrokortizon možda produljio poluživot mRNA za preproendotelin i pobudilo sumnju da možda ovisno o koncentraciji i trajanju izlaganja postoji bifazični učinak na prekursore ET-1 i oslobađanje zrelog ET-1 (168). U Springalovoj studiji imunokemijski pozitivne stanice na ET-1 nađene su i u bolesnika koji su liječeni ICS (170). O povišenim koncentracijama ET-1 u BAL-u bolesnika koji su liječeni s ICS izvještava Trakada (158). U istraživanju Redingtona i suradnika koncentracija ET-1 u BAL-u nije se razlikovala između bolesnika koji su liječeni i onih koji nisu liječeni s ICS. Taj odnos nije se promijenio niti kada je koncentracija ET-1 prikazana u odnosu na ukupne bjelančevine mjerene u istom uzorku BAL-a (177). Tijekom eksperimentalno izazivanog bronhospazma u lokaliziranom segmentu bronhalnog stabla u bolesnika koji nisu liječeni s ICS došlo je do neočekivanog sniženja koncentracija ET-1 u BAL-u što nije uočeno u bolesnika koji su liječeni s ICS (179). Chalmers i suradnici u IS nisu našli razliku u koncentraciji ET-1 između bolesnika koji su uzimali inhalacijske kortikosteroide i u onih koji su uzimali samo kratkodjelujuće β_2 agoniste, iako se ovaj nalaz objašnjava uzorkom bolesnika s različitim težinom bolesti (175).

Neki autori izvješćuju o smanjenoj imunoreaktivnosti ET-1 nakon provedene imunoterapije (224) i nakon liječenja montelukastom (225,226). Međutim, među našim ispitanicima nije bilo bolesnika koji su liječeni na ovaj način.

Prema dobivenim rezultatima nije moguće utvrditi u kojoj su mjeri ICS utjecali na koncentraciju ET-1 u IS u uzorku naših bolesnika. Uzimajući u obzir izvještaje dosadašnjih bazičnih i kliničkih studija o nađenim koncentracijama ET-1 u bolesnika liječenih s ICS, učinak ovih lijekova je nepoznat jednako koliko je nepoznato u kojoj bi se mjeri u pojedinim bolesnika ET-1 stvarao u slučaju da nisu liječeni. U tom smislu bilo bi potrebno istražiti ET-1 u bolesnika prije započinjanja liječenja s ICS te pratiti učinak liječenja na koncentracije ET-1. Ukoliko su protuupalni lijekovi u primijenjenim dozama bili nedostadni da spriječe pogoršanje simptoma i pogoršanje plućne funkcije u ispitivanih bolesnika ostaje pitanje jesu li i u kojoj mjeri utjecali na stvaranje i otpuštanje ET-1.

U ispitivanjima o astmi u kojima je prisutan ET-1 u povećanim koncentracijama treba uzeti u obzir da sav ET-1 nužno ne potječe iz epitelnih stanica. Pokazalo se da sposobnost stvaranja i otpuštanja ET-1 imaju tkivni makrofagi te krvni monociti, kao njihovi prekursori (212,218,227). U kulturi tkivnih makrofaga dokazana je prisutnost mRNA za sintezu ET-1, te potvrđeno je da se ET-1 u alveolarnim makrofagima stvara i otpušta, a ne kako se prvobitno mislilo, da je preuzet u makrofage tijekom metabolizma u plućima (227). Drugi izvori ET-1 razlog su povišene razine ET-1 u drugim bolestima i stanjima dišnog sustava u kojima nije nađena povećana ET-1 imunoreaktivnost u epitelnim stanicama. Alveolarni makrofagi bolesnika sa sistemskom sklerozom u kulturi nakon stimulacije otpuštali su bitno veće količine ET-1 od zdravih, iako se bazične koncentracije u supernatantu nisu razlikovale (218). U bolesnika s astmom zreli alveolarni makrofazi pokazali su izrazitiju imunoreaktivnost u odnosu na zdrave ispitanike, iako otpuštanje iz kulture, spontano, kao i nakon stimulacije s lipopolisaharidom, nije bilo veće u bolesnika nego u kontrolnih zdravih ispitanika (212).

Postoji niz dokaza kojima se porast koncentracije ET-1 dovodi u svezu s infekcijom respiracijskog sustava mikroorganizmima. U bolesnika s pneumonijama nađena je povišena koncentracija ET-1 u krvi, a osobito uzrokovanih *Mycoplasma pneumoniae* u bolesnika u kojih je bio prisutan *wheezing*. S obzirom da je u tih bolesnika koncentracija ET-1 bitno korelirala s IgE, nalaz povišenog ET-1 upućuje na njegovu moguću umiješanost u patogenezu akutnog *wheezinga*, odnosno pogoršanja astme povezane s infekcijom *Mycoplasma pneumoniae* u atopičnih bolesnika (228).

Povišene koncentracije ET-1 u perifernoj krvi i drugim tjelesnim tekućinama nađene su i u drugih bolesti u kojima infekcija ima bitnu ulogu. U bolesnika sa stabilnim

bronhiektazijama ET-1 je bio bitno povišen samo u serumu onih bolesnika u kojih je bio prisutan *Pseudomonas aeruginosa*, dok u iskašljaju nije bilo razlike u koncentraciji ET-1 s obzirom na prisutnost ove bakterije (210). Povišen nalaz u serumu u odnosu na iskašljaj upućuje da u ovom slučaju ET-1 djeluje više perivaskularno nego intrabronhalno i da moguće zajedno s drugim medijatorima ima ulogu u nakupljanju neutrofila i patogenezi bronhiektazija (210).

U iskašljaju bolesnika s cističnom fibrozom nađena je izrazito, a u KOPB bolesnika umjereno povišena koncentracija ET-1. U obje bolesti povišenje je bilo bitno u odnosu na zdrave ispitanike. U obje bolesti među analiziranim stanicama u iskašljaju dominirali su neutrofilima (211).

Roland i suradnici u bolesnika s umjerenom i teškom KOPB tijekom pogoršanja bolesti nalaze bitno više koncentracije ET-1 u spontanom i induciranom iskašljaju. U 1/3 ovih bolesnika PCR analizom nazalnog aspirata dokazana je prisutnost rinovirusa i klamidije pneumonie. U ovih bolesnika, iako ne statistički bitno, ET-1 je bio viši nego u ostalih (176). Ne postoje dokazi da neutrofilima mogu sintetizirati ET-1 *de novo*, ali mogu bigET-1 konvertirati u ET-1 (229) te je moguće da u nekih bolesnika na taj način pridonose povećanju količine ET-1 u dišnim putovima.

Etiologija pogoršanja u ispitanih je bolesnika bila nepoznata. Bolesnici kao i kontrolni ispitanici s kliničkim znacima respiracijskog infekta nisu uključeni u istraživanje. Iako nisu bili prisutni jasni znaci respiracijskog infekta, ipak postoji mogućnost da je u nekih bolesnika infekcija bila uzrok pogoršanju bolesti. Jednako tako, u ispitivanjima čiji rezultati govore o povišenom ET-1 u astmi nije istražena moguća veza s respiracijskom infekcijom. Stoga bi bilo korisno da su tijekom istraživanja učinjene mikrobiološke, virusološke i serološke analize kako bi se u bolesnika koji su imali izrazito povišene vrijednosti ET-1 ovaj porast možda mogao dovesti u vezu s postojanjem neke latentne klinički neprepoznate infekcije.

Jedan od poznatih poticaja za stvaranje ET-1 u nastanku plućne hipertenzije i plućnog srca je hipoksija (230). Bitno povišen ET-1 u arterijskoj krvi nađen je u hipoksemičnih KOPB bolesnika (231). ET-1 u hipoksemičnih KOPB bolesnika bio je bitno viši tijekom noćnih razdoblja desaturacije nego tijekom dana (232). U jednom eksperimentalnom istraživanju hipoksija je smanjila stvaranje ET-1 u primarnoj kulturi pneumocita tipa 2 (233). U ispitivanih bolesnika tijekom istraživanja niti u jednom trenutku nije registrirana hipoksemija niti klinički znaci koji bi pobudili sumnju na moguću hipoksemiju.

Iako metodi induciranog iskašljaja neki istraživači daju prednost u odnosu na invazivne bronhoskopske metode (234), a mjerenja medijatora upale su dala vrijedne podatke,

postoje brojne nedoumice u pogledu utjecaja same metode na koncentraciju pojedinih medijatora. Istraživanja su pokazala da premedikacija salbutamolom i albuterolom (235,236) i inhalacija hipertonične otopine (237) nije imala utjecaja na koncentracije ECP u induciranom iskašljaju. U literaturi se ne nalaze podatci o istraživanju ovakvog utjecaja na koncentracije ET-1 u IS. Međutim, Acerman i suradnici ispitivali su i našli da se u biopsijskim uzorcima sluznice bronha asptomatskih bolesnika s astmom endotelinska aktivnost nakon 8-dnevnog uzimanja salbutamola nije razlikovala u odnosu na stanje prije uzimanja salbutamola (173). Makker i suradnici našli su u BAL-u bolesnika s astmom nakon bronhoprovokacije niže koncentracije ET-1 u segmentima bronhalnog stabla koji su bili izloženi hipertoničnoj otopini nego u segmentima koji su bili izloženi izotoničnoj otopini. Sukladno nalazu niskog ET-1 zaključili su da on nije odgovoran za bronhospazam tijekom inhalacije hipertonične otopine (238).

Metodom indukcije iskašljaja, neminovna je barem minimalna kontaminacija i razrjeđenje iskašljaja slinom, usprkos svim pokušajima da se taj problem otkloni. Rezultati jednog istraživanja pokazali su da se koncentracija IL-8 nije promijenila bitno sve dok kontaminacija slinom nije bila 70 - 80%. Pokušaj korekcije s ukupnim bjelančevinama u slučaju nalaza eksperimentalno sniženog IL-8 razrjeđivanjem sa salivom nije promijenio rezultat (239). U slučaju ET-1 u IS, kontaminacija slinom dodatno otežava problem s obzirom da se pokazalo da je koncentracija u slini čak viša nego u iskašljaju (175). Inhaliranje hipertonične otopine moguće dovodi do razrjeđenja iskašljaja u nepoznatoj mjeri povlačenjem tekućine iz tkiva u lumen bronhalnog stabla i učinkom na permeabilnost kapilara. Nije poznato da li koncentracija inhalirajuće otopine ima učinak na pojedine medijatore. Također nije poznato da li snažniji nebulizatori osim povećane opasnosti od neželjenih događaja tijekom postupka indukcije mijenjaju stanični ili biokemijski sadržaj u IS.

Pokazalo se da DTT mogućim učinkom denaturacije epitopa smanjuje mogućnost otkrivanja eotaxina (240). Chalmers i suradnici objavili su da DTT mijenja standardnu krivulju ET-1 (175). Rezultati ovga istraživanja ne razlikuju se od rezultata koji su objavili Chalmers i suradnici koji u obradi nisu koristili DTT. Osim što su istraživanja pokazala da DTT ne utječe na koncentraciju ECP u IS, može se općenito smatrati da je utjecaj DTT na ET-1, kao i na većinu drugih medijatora u IS nepoznat (241).

Dodatak inhibitora proteaza pri obradi IS, u nekim ispitivanjima nije uspio spriječiti pojačanu razgradnju medijatora (240), najvjerojatnije zbog toga što se pojačana razgradnja događa još *in vivo*.

Istraživanja su pokazala da trajanje indukcije iskašljaja utječe na koncentraciju pojedinih medijatora (93). Iako se trajanje indukcije prekidalo u bolesnika samo u slučaju nužde, a statistički se nije bitno razlikovalo između ispitivanih skupina, za točniju procjenu izmjerenih medijatora u IS bilo bi idealno u svih ispitanika postići ujednačeno trajanje indukcije.

6.3. Uspješnost i sigurnost metode indukcije iskašljaja u bolesnika s astmom

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je procijeniti uspješnost i sigurnost metode indukcije iskašljaja. Uspješnost postupka indukcije bila je bolja u bolesnika (89%) nego u kontrolnih ispitanika (67,7%). Sličan rezultat glede uspješnosti indukcije iskašljaja objavljen je i u drugim istraživanjima (95,242,243). Nađena je niska uspješnost indukcije iskašljaja u djece (60%) (244), a rezultati više studija pokazuju da se ta uspješnost u djece povećava s dobi, te da se u bolesnika smanjuje kao posljedica protuupalnog liječenja (245).

Nađena razlika između bolesnika i kontrolnih ispitanika glede uspješnosti indukcije, podnošljivosti i trajanja postupka indukcije iskašljaja bila je očekivana. Inhaliranje hipertonične otopine imalo je učinak na subjektivne tegobe i plućnu funkciju u većine bolesnika usprkos liječenju s ICS i premedikaciji salbutamolom, ali samo u četvrtine bilo je razloga za prekid postupka indukcije prije završetka predviđenog protokolom. U jednom istraživanju postupak indukcije iskašljaja morao je biti prekinut u 23% ispitanih bolesnika što se također slaže s nalazom u ovom istraživanju (108). Liječenje s ICS smatra se vrlo učinkovitim u smanjenju hipereaktivnosti bronha (246), a primjena salbutamola korisnom u prevenciji bronhospazma tijekom inhaliranja hipertonične otopine (247). U istraživanju u bolesnika s blagom i umjerenom astmom (248), nakon premedikacije salbutamolom i inhaliranja hipertonične otopine, zabilježeno je tek blago sniženje FEV₁. Nakon uvođenja visokih doza ICS u bolesnika s blagom astmom, u manjeg broja bolesnika postignut je normalan bronhoproprovokacijski odgovor na metakolin, a u svih ostalih poboljšanje je bilo djelomično (249).

Podnošljivost i trajanje indukcije iskašljaja nisu se bitno razlikovali tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti. Tijekom indukcije iskašljaja u bolesnika, kako u stabilnoj tako i pogoršanoj bolesti, dolazi do sniženja FEV₁ koje je bitno u odnosu na nalaze nakon premedikacije salbutamolom, ali ne i u odnosu na osnovne vrijednosti. Bolesnici su bili čak nešto osjetljiviji na podražaj hipertoničnom otopinom tijekom stabilne bolesti, nego tijekom pogoršane bolesti. Latentna hiperreaktivnost koja se pokazala u ispitanih bolesnika tijekom

inhalacije hipertoničnom otopinom neizravno upućuje na nekontroliranu upalu dišnih putova u klinički stabilnoj bolesti (106,107). Tijekom pogoršane bolesti zabilježen je bolji bronhodilatacijski učinak salbutamola koji se dijelom i održao tijekom indukcije, te su stoga veću korist od premedikacije imali bolesnici tijekom pogoršane bolesti, nego tijekom stabilne.

Indukcija iskašljaja smatra se sigurnom i u bolesnika s nekontroliranom astmom ukoliko se spriječi sniženje FEV₁ za više od 20% (57). U studiji Wonga i suradnika na velikom uzorku astmatičara s težim oštećenjem plućne funkcije, 14% bolesnika imalo je sniženje FEV₁ za više od 20%, a najveće sniženje FEV₁ je bilo za 69% (250). Istraživanja navode da bolesnici s teškom nestabilnom astmom imaju jači odgovor na bronhoprovokaciju hipertoničnom otopinom nego bolesnici s teškom stabilnom astmom (192). Neka istraživanja pokazala su da je pogoršanje FEV₁ bilo veće u bolesnika s lošijom osnovnom plućnom funkcijom i većim postotkom eozinofila u IS (251). U studiji in' tVeena i suradnika odgovor na hipertoničnu otopinu u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti bio je jači ukoliko je pogoršanje nastupilo kao posljedica isključenja ICS, nego ukoliko je nastupilo spontano. Autori zaključuju da je neizravni bronhoprovokacijski podražaj vrlo dobar pokazatelj nestabilnosti bolesti (192).

U ovom istraživanju, statistički bitno pogoršanje, u odnosu na osnovne nalaze, zabilježeno je samo za PEF u bolesnika tijekom stabilne bolesti. O nalazu najvećeg sniženja PEF-a među spirometrijskim pokazateljima tijekom indukcije iskašljaja izvještavaju i drugi (245). Izračunom ROC krivulje taj je pokazatelj manje točan i osjetljiv od FEV₁. U standardnim preporukama za praćenje plućne funkcije tijekom indukcije iskašljaja, PEF se preporučuje samo ukoliko se ne može pratiti FEV₁ (57).

Nalaz održanog FEV₁ nakon indukcije iskašljaj na razini osnovnih vrijednosti u bolesnih ispitanika posljedica je mjera opreza sprovedenih prema zadanom protokolu, a pogoršanje bi FEV₁, u slučaju nastavka indukcije moglo biti mnogo teže. S obzirom da je i među bolesnicima bilo dosta razlika u podnošljivosti indukcije iskašljaja, može se zaključiti da je, usprkos kliničkoj stabilnosti, riječ o heterogenoj skupini bolesnika različitih stupnjeva kontrole, a moguće i različitih patofizioloških mehanizama pogoršanja bolesti.

Može se zaključiti da se metoda inducirano iskašljaja u uzorku ispitanih bolesnika, uz strogo pridržavanje uputa, pokazala podjednako sigurnom i u bolesnika tijekom stabilne bolesti i u bolesnika tijekom pogoršane bolesti. Tako su tu metodu ocijenili i drugi istraživači (248).

Treba napomenuti, a na temelju iskustva s bolesnicom koja je naglo razvila osobito teški bronhospazam te je isključena iz daljnjeg istraživanja, potreban je osobit oprez s *brittle*

astmom. Taj rijetki oblik astme, koji klinički može ostavljati utisak stabilne i dobro kontrolirane, ima visoku smrtnost te se klasificira kao teška astma. Osobito treba prepoznati tip 2 bolesnika s *brittle* astmom koji imaju vrlo blage simptome, te se u razdobljima stabilne bolesti prava narav njihove bolesti može previdjeti (252). U preporukama za bronhoprovokacijske testove upozorava se na oprez i izvještava o jednom smrtnom slučaju bolesnice s astmom uslijed bronhospazma koji je nastupio kao odgovor na standardiziranu provokaciju destiliranom vodom (usmena komunikacija Sterk-Fabbri) (57). Takve bolesnike u prvom redu treba prepoznati, a postupak indukcije iskašljaja ne bi trebalo izvoditi. Pogoršanje simptoma i plućne funkcije u ispitivanih bolesnika tijekom stabilne bolesti, a potaknuto inhalacijom hipertonične otopine, upućuje na stanje upale i indikativno je u procjeni osjetljivosti i na druge vanjske podražaje.

6.4. Završna razmatranja

Višestruko veće koncentracije ET-1 u IS nego u venskoj krvi zdravih osoba, te izrazito povišene vrijednosti ET-1 u IS u pojedinim astmatičnih bolesnika, ukazuju da ET-1 zasigurno ima bitnu fiziološku i patofiziološku ulogu u respiracijskom sustavu. Sva dosadašnja istraživanja pokazuju da je količina ET-1 u respiracijskom sustavu bolesnika s astmom neujednačena i ne pokazuje pravilnosti, te se stoga, za sada, ne može zaključivati o njegovoj točnoj ulozi u tim zbivanjima. S obzirom na veliku heterogenost zbivanja, u astmi postoji mogućnost da je određeni fenotip bolesnika karakteriziran visokom koncentracijom lokalno stvorenog ET-1 ili da u određenih bolesnika pojedine okolnosti dovode do toga. Dosadašnja su istraživanja u pravilu bila na malom uzorku bolesnika odabranih na temelju grubih kliničkih kriterija, te se na temelju ispitanih uzoraka ne bi moglo utvrditi koji bolesnici imaju tu sklonost.

Iskašljaj je specifična tjelesna tekućina u kojoj se nužno događaju interakcije između njegovih pojedinih sastavnica, a današnjim metodama nije moguće točno odrediti njegovu količinu u bronhalnom stablu. Utjecaji na koncentraciju ET-1 u iskašljaju koji se događaju u sklopu bolesti ili kao odgovor na intervencije tijekom postupka indukcije i obrade iskašljaja, također nisu sasvim poznati. Stoga je za svaku interpretaciju koncentracije određene tvari potreban oprez i prisiljeni smo se ograničiti na informaciju da je neka tvar prisutna u uzorku iskašljaja koji smo testirali i da je metoda valjana za dokazivanje prisutnosti te tvari.

Istraživanja u kojima se mjeri koncentracija ET-1 u sekretu dišnih putova *in vivo* ne daju izravne informacije o staničnom podrijetlu ET-1, a ni jasne kliničke dokaze o izravnoj

uzročnoj vezi povišene koncentracije ET-1 i stanja bolesti. Nalaz ET-1 ne pokazuje ni stalnost ni pravilnost pojavljivanja u astmi. Njegovo mjesto i uloga u patogenezi i patofiziologiji te okolnosti u kojima stvara, otpušta i djeluje samo se naslućuju. Iz rezultata ovog istraživanja, a također i rezultata drugih istraživanja uloge ET-1 u astmi, razvidno je da se za sada ne može sa sigurnošću povezati ET-1 s kliničkim zbivanjima.

Dosadašnja su malobrojna istraživanja pokazala da je ET-1 u međusobnoj vezi i/ili ravnoteži s drugim sudionicima upale. U budućim istraživanjima trebalo bi uključiti veći broj bolesnika i istražiti istovremeno više drugih medijatora, citokine i neurohumoralne čimbenike uključene u upalni proces, kako bi se ustanovile moguće povezanosti. Također bi trebalo istražiti utjecaj infekcije u bolesnika s astmom, osobito u pogoršanju bolesti, kako bi se ustanovio mogući utjecaj na nalaz viokog ET-1 u IS pojedinih bolesnika.

Sve upućuje da pri interpretaciji nalaza izmjerenih medijatora treba uzeti u obzir složenost utjecaja *in vivo* i *in vitro*. Usprkos potvrdama eksperimentalnih istraživanja o brojnim biološkim osobinama ET-1 bitnih za patofiziologiju astme, do sada nije nađena izravna povezanost endotelinske aktivnosti i kliničkog stanja bolesti. Nepostojanost nalaza imunoreaktivnog ET-1 u stanjima astme u respiracijskom sustavu i nedostatak točne povezanost s bolesti, čine njegovu ulogu još uvijek neuhvatljivom.

7. ZAKLJUČAK

- Koncentracija ET-1 u IS i venskoj krvi nije se statistički bitno razlikovala između ispitivanih kontrolnih ispitanika i bolesnika, kako tijekom stabilne tako i tijekom pogoršane bolesti. Također nije nađena statistički bitna razlika u koncentraciji ET-1 u IS i venskoj krvi između stabilne i pogoršane bolesti. Kada je ET-1 u IS izražen u odnosu na ukupne bjelančevine ($p= 0.036$), a osobito kada je izražen u odnosu na albumine u IS ($p= 0.009$), nađena je bitno niža koncentracija u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti nego u kontrolnih ispitanika. Za razliku od ET-1, u IS bolesnika nađena je tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti statistički bitno viša koncentracija ECP-a nego u kontrolnih ispitanika ($p<0.001$). Razlika je bila također statistički bitna između stabilne i pogoršane bolesti ($p= 0.024$). Koncentracija ECP-a u venskoj krvi statistički se bitno razlikovala samo u bolesnika između stabilne i pogoršane bolesti ($p= 0,048$), dok između kontrolnih ispitanika i bolesnika, tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti nije nađena statistički bitna razlika.
- Nije nađena statistički bitna povezanost između koncentracija u IS i koncentracija u venskoj krvi ni u jednoj ispitivanoj skupini ni za ET-1 niti za ECP. Međutim, kada je ET-1 u IS izražen u odnosu na albumine ($\rho= 0.436$, $p= 0.030$) i u odnosu na nealbuminske bjelančevine ($\rho= 0.455$, $p= 0.033$), zapaženo je da statistički bitno korelira s koncentracijom ET-1 u plazmi bolesnika tijekom stabilne bolesti, ali ne i u pogoršanju bolesti. Nije nađena statistički bitna povezanost između koncentracije ET-1 u IS i venskoj krvi sa spirometrijskim pokazateljima ni za jednu ispitivanu skupinu. Nasuprot tome, ECP u IS korelirao je bitno s osnovnim FEV₁ ($\rho= -0.429$, $p= 0.041$) i PEF ($\rho= -0.430$, $p= 0.041$), ali samo u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti. U slučaju kada su promatrane promjene nalaza tijekom stabilne i pogoršane bolesti, zapažena je statistički bitna povezanost promjene koncentracije ET-1 u venskoj krvi s promjenom osnovnog FEF₅₀ ($\rho= 0,479$, $p= 0,021$) u smislu da su bolesnici koji su imali više vrijednosti koncentracije ET-1 tijekom pogoršanja bolesti, u isto vrijeme imali i manje pogoršan nalaz FEF₅₀. Nije nađena bitna povezanost ET-1 i ECP-a sa simptomima bolesti ni u stabilnoj ni u pogoršanoj bolesti. Samo u bolesnika tijekom stabilne bolesti nađena je bitna negativna korelacija ET-1 i ECP u

IS ($\rho = -0.473$, $p = 0.026$), te ET-1 i albumina u IS ($\rho = -0.508$, $p = 0.016$). Takva se povezanost ne opaža u pogoršanih bolesnika, a ni u kontrolnih ispitanika.

- ET-1 u IS i venskoj krvi ima izrazito malu vrijednost u razlučivanju bolesnika i kontrolnih ispitanika, a isto tako i u razlučivanju bolesnika tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti. Vrijednost je pokazao samo ET-1 u IS izražen u odnosu na albumine koji statistički bitno razlučuje kontrolne ispitanike i bolesnike tijekom stabilne bolesti ($p = 0,005$), a osobito bolesnike tijekom pogoršanja bolesti ($p < 0,001$), kao i stabilnu i pogoršanu bolest ($p = 0,017$). Za razliku od ET-1, ECP u IS ima visoku osjetljivost i specifičnost i statistički visoko bitno razlučuje kontrolne ispitanike i bolesnike, i tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti ($p < 0,001$), međutim ima malu vrijednost u razlučivanju bolesnika tijekom stabilne i pogoršane bolesti. ECP u serumu pokazao se podjednako nevrijedan u razlučivanju kontrolnih ispitanika i bolesnika kao i u razlučivanju stabilne i pogoršane bolesti. Za razliku od biokemijskih pokazatelja spirometrijski pokazatelji u svim mjerenjima pokazali su se vrlo vrijednima u razlučivanju kontrolnih ispitanika i bolesnika, osobito tijekom pogoršanja bolesti. Pri tom je specifičnost u razlučivanju često 100%, dok je osjetljivost obično niža. Najveću osjetljivost u razlučivanju pokazao je osnovni FEV₁ i FEV₁ nakon indukcije iskašljaja (0,913) u skupini kontrolnih ispitanika i bolesnika tijekom pogoršanja bolesti. Vrijednost spirometrijskih pokazatelja u razlučivanju bolesnika tijekom stabilne i pogoršane bolesti pokazala se mnogo manjom i ograničenom samo na osnovni PEF i FEF₅₀.
- Metoda indukcije iskašljaja ocijenjena je sigurnom metodom u ispitanih bolesnika s astmom, kako tijekom stabilne tako i tijekom pogoršane bolesti. U bolesnika je s astmom uspješnost indukcije iskašljaja bila 89%, a u kontrolnih zdravih ispitanika 67,7%. Nije nađena statistički bitna razlika u trajanju indukcije iskašljaja između stabilne i pogoršane bolesti ($p = 0.586$). Spirometrijski nalazi nakon indukcije iskašljaja očekivano su se statistički bitno razlikovali između kontrolnih ispitanika i bolesnika, i tijekom stabilne i tijekom pogoršane bolesti ($p < 0,001$). Nakon indukcije iskašljaja, razlika između stabilne i pogoršane bolesti nije bila statistički bitna ni za jedan spirometrijski pokazatelj: FEV₁ ($p = 0,115$), PEF ($p = 0,808$) i FEF₅₀ ($p = 0,088$). Spirometrijski nalazi nakon indukcije iskašljaja u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti nisu se statistički bitno razlikovali od osnovnih za FEV₁ ($p = 0,622$), PEF ($p = 0,899$) i

FEF₅₀ (p= 0,160). Razlika u pogoršanju simptoma bolesnika tijekom indukcije iskašljaja između stabilne i pogoršane bolesti također nije bila statistički bitna (p= 0.261). Pogoršanje subjektivnih tegoba tijekom indukcije iskašljaja koreliralo je bitno s pogoršanjem svih triju poslijeindukcijskih spirometrijskih pokazatelja kako tijekom stabilne bolesti za FEV₁ (ρ= -0.665, p= 0.001), PEF (ρ= -0.772, p< 0.001), FEF₅₀ (ρ= - 0.578, p= 0.004), tako i tijekom pogoršane bolesti za FEV₁ (ρ= -0.434, p= 0.039), PEF (ρ= -0.529, p= 0.009), FEF₅₀ (ρ= - 0.444, p= 0.034).

8. SAŽETAK

Cilj

Slijedeći eksperimentalne dokaze o pojačanom stvaranju i patofiziološkoj ulozi ET-1 u astmi, cilj je ovog rada bio istražiti koncentraciju ET-1 u induciranom iskašljaju (IS) i plazmi te procijeniti njegovu vrijednost u razlučivanju zdravih ispitanika i astmatičnih bolesnika te bolesnika tijekom stabilne i pogoršane bolesti. Također, cilj je bio procijeniti sigurnost upotrijebljene metode indukcije iskašljaja u astmatičnih bolesnika tijekom pogoršanja bolesti s obzirom na njezin poznati neizravni bronhoprovokacijski učinak.

Ispitanici i metode

Istraživanje je provedeno u 26 bolesnika sa stabilnom astmom koji su u ispitivanom razdoblju imali pogoršanje – egzacerbaciju – bolesti i u 21 zdravog kontrolnog ispitanika. Najvažniji kriterij za isključivanje bolesnika iz istraživanja bio je izostanak pogoršanja bolesti u ispitivanom razdoblju, a za sve ispitanike neuspješnost indukcije iskašljaja. Sigurnost metode indukcije iskašljaja u bolesnika s astmom procijenjena je na temelju spirometrijskih nalaza i subjektivnih tegoba. U uzorcima IS i venske krvi imunokemijski je izmjerena koncentracija ET-1 i ECP-a, a u IS također i koncentracija ukupnih bjelančevina i albumina.

Rezultati

Izmjerene koncentracije ET-1 i ECP u IS bile su višestruko više nego u venskoj krvi. U IS i venskoj krvi nije se ET-1 statistički bitno razlikovao između zdravih ispitanika i bolesnika, a ni između stabilne i pogoršane bolesti. Nasuprot tome ECP u IS bitno se razlikovao između bolesnika i zdravih ispitanika ($p < 0.001$), te između stabilne i pogoršane bolesti ($p = 0.024$). ECP u venskoj krvi statistički se bitno razlikovao samo između stabilne i pogoršane bolesti ($p = 0,048$). U bolesnika tijekom stabilne bolesti nađena je bitna negativna korelacija između ET-1 i ECP u IS ($\rho = -0.473$, $p = 0.026$), te između ET-1 i albumina u IS ($\rho = -0.508$, $p = 0.016$). Kada je ET-1 u IS izražen u odnosu na albumine u IS, nađena je neočekivano statistički bitno niža koncentracija u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti nego u kontrolnih ispitanika ($p = 0.009$). ET-1 izražen u odnosu na albumine korelirao je bitno s koncentracijom ET-1 u venskoj krvi u bolesnika tijekom stabilne bolesti ($\rho = 0.436$, $p = 0.030$)

i s ECP-om u IS u svim ispitivanim skupinama. Nije nađena statistički bitna povezanost između koncentracije ET-1 u IS i venskoj krvi sa spirometrijskim pokazateljima ni za jednu ispitivanu skupinu. Nasuprot tome, ECP u IS korelirao je bitno s osnovnim FEV₁ ($\rho = -0.429$, $p = 0.041$) i PEF ($\rho = -0.430$, $p = 0.041$) u bolesnika tijekom pogoršanja bolesti. Nije nađena bitna povezanost ET-1 i ECP-a sa simptomima bolesti ni u stabilnoj niti u pogoršanoj bolesti.

Metoda indukcije iskašljaja procijenjena je jednako sigurnom u pogoršanju bolesti kao i tijekom stabilne bolesti. Spirometrijski nalazi nakon postupka indukcije iskašljaja nisu se bitno razlikovali između stabilne i pogoršane bolesti za FEV₁ ($p = 0,115$), PEF ($p = 0,808$) i FEF₅₀ ($p = 0,088$). Također, nalazi nakon indukcije iskašljaja, tijekom stabilne bolesti nisu se bitno razlikovali od osnovnih nalaza za FEV₁ ($p = 0,105$), i FEF₅₀ ($p = 0,580$), a tijekom pogoršanja bolesti za FEV₁ ($p = 0,622$), PEF ($p = 0,899$) i FEF₅₀ ($p = 0,160$). Pogoršanje simptoma tijekom indukcije iskašljaja bitno je koreliralo s pogoršanjem plućne funkcije i to za sva tri pokazatelja, i tijekom stabilne bolesti: FEV₁ ($\rho = -0.665$; $p = 0.001$), PEF ($\rho = -0.772$; $p < 0.001$) i FEF₅₀ ($\rho = -0.578$; $p = 0.004$) i tijekom pogoršane bolesti: FEV₁ ($\rho = -0.434$; $p = 0.039$), PEF ($\rho = -0.529$; $p = 0.009$) i FEF₅₀ ($\rho = -0.444$; $p = 0.034$).

Zaključak

Koncentracija ET-1 u IS i venskoj krvi nije se pokazala vrijednom metodom u razlučivanju ispitivanih astmatičnih bolesnika od kontroliranih ispitanika, kao i razlučivanju stanja stabilne i pogoršane bolesti. Nađena je velika varijabilnost nalaza u IS bolesnika koja ukazuje na složene i neujednačene promjene u pogledu stvaranja tog medijatora u astmi.

Neočekivano niska koncentracija ET-1 u IS bolesnika tijekom pogoršanja bolesti kao i bitna negativna povezanost s albuminima u IS upućuje na mogućnost da albumini ili pridruženi čimbenici u pogoršanju bolesti i/ili postupku indukcije iskašljaja utječu na niske izmjerene vrijednosti. Metoda indukcije iskašljaja, uz pridržavanje mjera sigurnosti, u bolesnika s astmom pokazala se jednako sigurnom tijekom pogoršanja kao i tijekom stabilne bolesti.

9. SUMMARY

Aim:

Following the experimental proofs of the increased formation and pathophysiological role of ET-1 in asthma, the aim of this study was to examine the concentration of ET-1 in the induced sputum (IS) and in plasma, and to evaluate its level in differentiation between healthy examinees and patients with asthma, as well as between the patients during stable and exacerbated disease. The other aim was to evaluate the security of the applied method of induced sputum in patients with asthma during exacerbation of a disease in regard of its known indirect bronchoprovocational effect.

Examinees and methods:

The study included 26 patients with stable asthma who had deterioration i.e. exacerbation of a disease during the study period and 21 healthy examinees. The most important criterion for excluding the examinees from the study was the absence of disease deterioration during the study period in patients and failure of sputum induction in healthy subjects. Reliability of sputum induction method in patients with asthma was evaluated according to spirometry findings and individual disorders during the procedure. Concentration of ET-1 and ECP were measured immunochemically in IS samples and venous blood. Concentration of total proteins and albumins was also measured in IS samples.

Results:

Measured concentrations of ET-1 and ECP in IS were manifold higher than in venous blood. ET-1 in IS and venous blood were not significantly different between healthy examinees and patients, nor between stable and exacerbated disease. Conversely, ECP in IS was significantly different between patients and healthy examinees ($p < 0.001$), and between stable and exacerbated disease ($p = 0.024$). The level of ECP in venous blood was significantly different between stable and exacerbated disease ($p = 0.048$). In patients with stable disease significant negative correlation between ET-1 and ECP in IS was found ($r = -0.473$, $p = 0.026$), and between ET-1 and albumins in IS ($r = -0.508$, $p = 0.016$). When ET-1 in IS is expressed compared to albumins in IS, unexpected statistically significant lower concentration was

found in patients during disease exacerbation than in the control group of examinees ($p=0.009$). ET-1 expressed in comparison to albumins correlated significantly with ET-1 concentration in venous blood in patients during stable disease ($r = 0.436, p = 0.030$) and with ECP in IS in all groups of examinees. No statistically significant correlation between concentrations of ET-1 in IS and venous blood, and spirometric indicators has been found in any of the investigated groups. Conversely, ECP in IS correlated significantly with basic FEV₁ ($r = - 0.429, p = 0.041$) and PEF ($r= -0.430, p=0.041$) in patients during exacerbation of a disease. No significant correlation of ET-1 and ECP and disease symptoms has been found in stable or in exacerbated disease. Method of induced sputum has been evaluated equally reliable in disease exacerbation and during stable disease. Spirometric findings after induced sputum did not differ significantly between stable and exacerbated disease for FEV₁ ($p= 0.115$), PEF ($p=0.808$) and FEF₅₀ ($p= 0.088$). Findings after sputum induction during stable disease didn't differ significantly from basic findings for FEV₁ ($p=0.105$) and FEF₅₀ ($p=0.580$), and during exacerbation for FEV₁ ($p=0.622$), PEF (0.899) and FEF₅₀ ($p=0.160$). Exacerbation of symptoms during sputum induction significantly correlated to deterioration of pulmonary function for all three indicators, both during stable disease: FEV₁ ($r=-0.665$; $p=0.001$), PEF ($r=-0.772$; $p<0.001$) and FEF₅₀ ($r=-0.578$; $p=0.004$) and during disease exacerbation: FEV₁ ($r=-0.434$; $p=0.039$), PEF ($r=-0.529$; $p=0.009$) and FEF₅₀ ($r=-0.444$; $p=0.034$).

Conclusion:

Concentration of ET-1 in IS and in venous blood has not been found a worthy method in distinguishing patients with asthma from control group of examinees, nor in distinguishing stable condition and exacerbated disease. A great variability of findings in IS patients suggesting complex and uneven changes concerning creation of this mediator in asthma has been found. Unexpectedly low concentration in IS patients during disease exacerbation and significant negative correlation to albumins in IS, suggest the possibility that albumins or associated factors in disease deterioration and/or procedure of sputum induction influence low values. Method of sputum induction, considering security measures requirements, in patients with asthma was equally safe during disease deterioration and during stable disease.

10. POPIS LITERATURE

1. NIH/NHLB/WHO. From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA)2006. Available from: <http://www.ginasthma.org>; 2006.
2. Williams AE, Lloyd AC, Watson L, Rabe KF. Cost of scheduled and unscheduled asthma management in seven European Union countries. *Eur Respir Rev.* 2006;15(98):4-9.
3. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From Bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1720-45.
4. Clarke JR, Jenkins MA, Hopper JL, Carlin JB, Mayne C, Clayton DG, i sur. Evidence for Genetic Associations between Asthma, Atopy, and Bronchial Hyperresponsiveness. A Study of 8- to 18-Yr-Old Twins. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(6):2188-93.
5. Warner JA, Jones CA, Williams TJ, Warner JO. Maternal programming in asthma and allergy. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(supl 5):35-8.
6. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, i sur. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ.* 2000;320(7232):412-7.
7. Droste JHJ, Wieringa MH, Weyler JJ, Nelen VJ, Vermeire PA, Van Bever HP. Does the use of antibiotics in early childhood increase the risk of asthma and allergic disease? *Clin Exp Allergy.* 2000;30(11):1548-53.
8. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2001;357(9262):1076-9.
9. Maynard RL. Asthma and urban air pollution. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(4):518-20.
10. Kon OM, Kay AB. T Cells and Chronic Asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;118:133-5.
11. Umibe T, Kita Y, Nakao A, Nakajima H, Fukuda T, Yoshida S, i sur. Clonal expansion of T cells infiltrating in the airways of non-atopic asthmatics. *Clin Exp Immunol.* 2000;119(3):390-7.
12. Holgate ST. The cellular and mediator basis of asthma in relation to natural history. *Lancet.* 1997;350(supl 2):S5-9.
13. Schwartz RS. A New Element in the Mechanism of Asthma. *N Engl J Med.* 2002;346(11):857-8.
14. Tang MLK, Kemp AS, Hill DJ, Thorburn J. Reduced interferon-[gamma] secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet.* 1994;344(8928):983-5.

15. Tsitoura DC, Kim S, Dabbagh K, Berry G, Lewis DB, Umetsu DT. Respiratory Infection with Influenza A Virus Interferes with the Induction of Tolerance to Aeroallergens. *J Immunol.* 2000;165(6):3484-91.
16. Henderson WR, Jr., Chi EY, Maliszewski CR. Soluble IL-4 Receptor Inhibits Airway Inflammation Following Allergen Challenge in a Mouse Model of Asthma. *J Immunol.* 2000;164(2):1086-95.
17. Corry DB. IL-13 in allergy: home at last. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(6):610-4.
18. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(2):193-204.
19. McKenzie ANJ. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. *PharmacolTher.* 2000;88(2):143.
20. Montefort S, Roche WR, Howarth PH, Djukanovic R, Gratziau C, Carroll M, i sur. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in the bronchial mucosa of normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J.* 1992;5(7):815-23.
21. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, i sur. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(4):563.
22. Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(6):1277-84.
23. Bates ME, Green VL, Bertics PJ. ERK1 and ERK2 Activation by Chemotactic Factors in Human Eosinophils Is Interleukin 5-dependent and Contributes to Leukotriene C4 Biosynthesis. *J Biol Chem.* 2000;275(15):10968-75.
24. Kamath AV, Pavord ID, Ruparelia PR, Chilvers ER. Is the neutrophil the key effector cell in severe asthma? *Thorax.* 2005;60(7):529-30.
25. Linden A, Hoshino H, Laan M. Airway neutrophils and interleukin-17. *Eur Respir J.* 2000;15(5):973-7.
26. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Zinnanti E, Bousquet J, i sur. Release of transforming growth factor-beta (TGF- β) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(1):114-9.
27. Barnes PJ. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev.* 1992;72(3):699-729.
28. Ward JK, Belvisi MG, Fox AJ, Miura M, Tadjkarimi S, Yacoub MH, i sur. Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J Clin Invest.* 1993;92(2):736-42.

29. Ollerenshaw S, Jarvis D, Woolcock A, Sullivan C, Scheibner T. Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lungs of patients with asthma. *N Engl J Med.* 1989;320(19):1244-8.
30. Lilly CM, Bai TR, Shore SA, Hall AE, Drazen JM. Neuropeptide content of lungs from asthmatic and nonasthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151(2):548-53.
31. Ollerenshaw SL, Jarvis D, Sullivan CE, Woolcock AJ. Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and nonasthmatics. *Eur Respir J.* 1991;4(6):673-82.
32. Tomaki M, Ichinose M, Miura M, Hirayama Y, Yamauchi H, Nakajima N, i sur. Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151(3):613-7.
33. Beasley R, Page C, Lichtenstein L. Airway remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy Rev.* 2002;2(4):109-16.
34. Kips JC, Pauwels RA. Airway wall remodelling: does it occur and what does it mean? *Clin Exp Allergy.* 1999;29(11):1457-66.
35. Bumbacea D, Campbell D, Nguyen L, Carr D, Barnes PJ, Robinson D, i sur. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *Eur Respir J.* 2004;24(1):122-8.
36. James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11(1):1-6.
37. Vignola AM, Gagliardo R, Guerrera D, Chiappara G, Chanez P, Bousquet J, i sur. New evidence of inflammation in asthma. *Thorax.* 2000;55(90002):59S-60S.
38. Teder P, Noble PW. A Cytokine Reborn? Endothelin-1 in Pulmonary Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(1):7-10.
39. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, i sur. Sputum Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Ratio Correlates with Airflow Obstruction in Asthma and Chronic Bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(6):1945-50.
40. Schmidt D, Rabe KF. Immune mechanisms of smooth muscle hyperreactivity in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(4):673.
41. Hirst SJ. Airway smooth muscle as a target in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2000;30 (supl 1):54-9.
42. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology.* 2003;8(4):432-46.
43. Mazzarella G, Bianco A, Catena E, De Palma R, Abbate GF. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy.* 2000;55(supl 61):6-9.

44. Lozewicz S, Wells C, Gomez E, Ferguson H, Richman P, Devalia J, i sur. Morphological integrity of the bronchial epithelium in mild asthma. *Thorax*. 1990;45(1):12-5.
45. Woltmann G, Ward RJ, Symon FA, Rew DA, Pavord ID, Wardlaw AJ. Objective quantitative analysis of eosinophils and bronchial epithelial cells in induced sputum by laser scanning cytometry. *Thorax*. 1999;54(2):124-30.
46. Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. Bronchial Epithelium as a Key Regulator of Airway Allergen Sensitization and Remodeling in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3):113S-7.
47. Dosanjh A, Zuraw B. Endothelin-1 (ET-1) Decreases Human Bronchial Epithelial Cell Migration and Proliferation: Implications for Airway Remodeling in Asthma. *J Asthma*. 2003;40(8):883-6.
48. Barnes PJ. Control of airway caliber. U: Fishman AP, ur. Update: Pulmonary Diseases and Dysorders. New-York: McGraw-Hill; 1992.
49. Dicpinigaitis PV. Chronic Cough Due to Asthma: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2006;129(supl 1):75S-9.
50. in't Veen JCCM, Smits HH, Ravensberg AJJ, Hiemstra PS, Sterk PJ, Bel EH. Impaired Perception of Dyspnea in Patients with Severe Asthma. Relation to Sputum Eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(4):1134-41.
51. Xu J, Zhong NS. Mechanisms of bronchial hyperresponsiveness: The interaction of endothelin-1 and other cytokines. *Respirology*. 1999;4(4):413-7.
52. Fredberg J. Bronchospasm and its biophysical basis in airway smooth muscle. *Respir Res*. 2004;5(1):2.
53. Thomson RJ, Bramley AM, Schellenberg RR. Airway muscle stereology: implications for increased shortening in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(3):749-57.
54. Johnson PR, Ammit AJ, Carlin SM, Armour CL, Caughey GH, Black JL. Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus. *Eur Respir J*. 1997;10(1):38-43.
55. Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J*. 2000;15(3):600-16.
56. Henderson AC, Ingenito EP, Atileh H, Israel E, Suki B, Lutchen KR. Selected Contribution: How does airway inflammation modulate asthmatic airway constriction? An antigen challenge study. *J Appl Physiol*. 2003;95(2):873-82.
57. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft D, W., O Byrne PM, Andeson SD, i sur. Airway responsiveness: standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adlts. *Eur Respir J*. 1993;6 (supl 16):53-83.
58. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL. Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):309-29.

59. Melton L. Does mucus hypersecretion matter in airway disease? *Lancet*. 2002;359(9321):1924.
60. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(3):241.
61. Grunberg K, Timmers MC, de Klerk EPA, Dick EC, Sterk PJ. Experimental Rhinovirus 16 Infection Causes Variable Airway Obstruction in Subjects with Atopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(4):1375-80.
62. Irvin CG, Pak J, Martin RJ. Airway-Parenchyma Uncoupling in Nocturnal Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):50-6.
63. Parameswaran K, Pizzichini E, Pizzichini MM, Hussack P, Efthimiadis A, Hargreave FE. Clinical judgement of airway inflammation versus sputum cell counts in patients with asthma. *Eur Respir J*. 2000;15(3):486.
64. NIH/NHLB/WHO. Global Initiative for Asthma: Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda: NIH/NHLBI; 1995.
65. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V. Dissociation between Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Allergic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):4-9.
66. Kay A. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;87:893-910.
67. Griffin E, Hakansson L, Formgren H, Jorgensen K, Peterson C, P V. Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;87(2):548-57.
68. Pizzichini E, Pizzichini MM, Dolovich J, Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and ECP in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:539-44.
69. Kips JC, O'Connor BJ, Inman MD, Svensson K, Pauwels RA, O'Byrne PM. A Long-term Study of the Antiinflammatory Effect of Low-dose Budesonide Plus Formoterol versus High-dose Budesonide in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(3):996-1001.
70. Kharitonov SA, Barnes PJ. Does Exhaled Nitric Oxide Reflect Asthma Control? Yes, It Does! *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):727-8.
71. Erin EM, Barnes PJ, Hansel TT. Optimizing sputum methodology. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(5):653.
72. Horvath I. Exhaled breath condensate contains more than only volatiles. *Eur Respir J*. 2003;22(1):187-8.
73. Simpson JL, Wood LG, Gibson PG. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(9):1180-5.

74. Colice GL. Categorizing Asthma Severity: An Overview of National Guidelines. *Clin Med Res.* 2004;2(3):155-63.
75. Theodoropoulos DS. The Need for a Meaningful and Practical Classification of Asthma Severity. *Clin Med Res.* 2004;2(3):143-4.
76. Boulet L-P, Boulet V, Milot J. How Should We Quantify Asthma Control? A Proposal. *Chest.* 2002;122(6):2217-23.
77. Campbell JA. The Evolving Guideline. *Clin Med Res.* 2004;2(3):145-6.
78. Venge P, Bystrom J, Carlson M, Hakansson L, Karawacjzyk M, Peterson C, i sur. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy.* 1999;29(9):1172-86.
79. Bystrom J, Garcia RC, Hakansson L, Karawajczyk M, Moberg L, Soukka J, i sur. Eosinophil cationic protein is stored in, but not produced by, peripheral blood neutrophils. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(7):1082-91.
80. Krug N, Napp U, Enander I, Eklund E, Rieger CH, Schauer U. Intracellular expression and serum levels of eosinophil peroxidase (EPO) and eosinophil cationic protein in asthmatic children. *Clin Exp Allergy.* 1999;29(11):1507-15.
81. Olszewska-Pazdrak B, Pazdrak K, Ogra PL, Garofalo RP. Respiratory Syncytial Virus-Infected Pulmonary Epithelial Cells Induce Eosinophil Degranulation by a CD18-Mediated Mechanism. *J Immunol.* 1998;160(10):4889-95.
82. Takafuji S, Miyakuni Y, Nakagawa T, Shoji S, Murata S, Yamamoto K, i sur. Effects of human lung fibroblasts on eosinophil degranulation. *Allergy.* 2000;55(12):1170-8.
83. Amin K, Ludviksdottir D, Janson C, Nettelbladt O, Bjornsson E, Roomans GM, i sur. Inflammation and Structural Changes in the Airways of Patients with Atopic and Nonatopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(6):2295-301.
84. Bjork A, Venge P, Peterson CGB. Measurements of ECP in serum and the impact of plasma coagulation. *Allergy.* 2000;55(5):442-8.
85. Gibson PG, Woolley KL, Carty K, Murree-Allen K, Saltos N. Induced sputum eosinophil cationic protein (ECP) measurement in asthma and chronic obstructive airway disease (COAD). *Clin Exp Allergy.* 1998;28(9):1081-8.
86. Kelly MM, Group: LotW, Group: MotW, Keatings V, Leigh R, Peterson C, i sur. Analysis of fluid phase mediators. *Eur Respir J.* 2002;20(supl 37):24S-39S.
87. Hargreave FE. The investigation of airway inflammation in asthma: sputum examination. *Clin Exp Allergy.* 1997;27(supl 1):36-40.
88. Wooten OJ, Dulfano MJ. Improved homogenization techniques for sputum cytology counts. *Ann Allergy.* 1978;41(3):150-4.

89. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, i sur. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992;47(1):25-9.
90. Hansel TT, Braunstein JB, Walker C, Blaser K, Bruijnzeel PL, Virchow JC, i sur. Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR. *Clin Exp Immunol*. 1991;86(2):271-7.
91. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatics and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:1126-31.
92. Cataldo D, Foidart JM, Lau L, Bartsch P, Djukanovic R, Louis R. Induced sputum: comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. *Chest*. 2001;120(6):1815-21.
93. Belda J, Hussack P, Dolovich M, Efthimiadis A, Hargreave FE. Sputum induction: effect of nebulizer output and inhalation time on cell counts and fluid-phase measures. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(11):1740.
94. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*. 1996;9(6):1174-80.
95. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, i sur. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(2):308-17.
96. Pin I, Freitag AP, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Watson RM, Dolovich J, i sur. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(6):1265-9.
97. Louis RE, Cataldo D, Buckley MG, Sele J, Henket M, Lau LC, i sur. Evidence of mast-cell activation in a subset of patients with eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2002;20(2):325-31.
98. Metso T, Ryttila P, Peterson C, Haahtela T. Granulocyte markers in induced sputum in patients with respiratory disorders and healthy persons obtained by two sputum-processing methods. *Respir Med*. 2001;95(1):48-55.
99. Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, i sur. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(4):866-9.
100. Fahy JV, Wong H, Liu J, Boushey HA. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(1):53-8.
101. Nocker RE, Out TA, Weller FR, de Riemer MJ, Jansen HM, van der Zee JS. Induced sputum and bronchoalveolar lavage as tools for evaluating the effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *J Lab Clin Med*. 2000;136(1):39-49.

102. Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, i sur. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(6):1926-31.
103. in 't Veen JCCM, de Gouw HW, Smits HH, Sont JK, Hiemstra PS, Sterk PJ, i sur. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J.* 1996;9(12):2441-7.
104. Gauvreau GM, Doctor J, Watson RM, Jordana M, O'Byrne PM. Effects of inhaled budesonide on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(5):1267-71.
105. Holz O, Jorres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(3):284-92.
106. De meer G, Marks GB, Postma DS. Direct or indirect stimuli for bronchial challenge testing: what is the relevance for asthma epidemiology? *Clin Exp Allergy.* 2004;34(1):9-16.
107. Joos GF, O'Connor B. Indirect airway challenges. *Eur Respir J.* 2003;21(6):1050-68.
108. de la Fuente PT, Romagnoli M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Safety of Inducing Sputum in Patients with Asthma of Varying Severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(4):1127-30.
109. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1985;248(5):C550-6.
110. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, i sur. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332(6163):411-5.
111. Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science.* 1988;242(4876):268-70.
112. Hunley TE, Kon V. Update on endothelins - biology and clinical implications. *Pediatr Nephrol.* 2001;16(9):752-62.
113. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, i sur. The Human Endothelin Family: Three Structurally and Pharmacologically Distinct Isopeptides Predicted by Three Separate Genes. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86(8):2863-7.
114. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci.* 1989;10(9):374-8.
115. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995;333(6):356-63.

116. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem.* 1989;264(25):14954-9.
117. Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R, Vane JR. Identification of Endothelin 1 and Big Endothelin 1 in Secretory Vesicles Isolated from Bovine Aortic Endothelial Cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(14):6344-8.
118. Battistini B, Dussault P. Biosynthesis, Distribution and Metabolism of Endothelins in the Pulmonary System. *Pulm Pharmacol Ther.* 1998;11(2-3):79-88.
119. Barnes PJ. Endothelins and pulmonary diseases. *J Appl Physiol.* 1994;77(3):1051-9.
120. Rozengurt N, Springall D, Polak J. Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J Pathol.* 1990;160(1):5-8.
121. Filep JG. Endothelin peptides: Biological actions and pathophysiological significance in the lung. *Life Sci.* 1993;52(2):119-33.
122. Barnes K, Brown C, Turner AJ. Endothelin-Converting Enzyme: Ultrastructural Localization and Its Recycling From the Cell Surface. *Hypertension.* 1998;31(1):3-9.
123. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, i sur. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267(23):16066-8.
124. Wei C-M, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CGA, Brandt RR, Wright S, i sur. Unstable Angina/Myocardial Infarction: Endothelin in Human Congestive Heart Failure. *Circulation.* 1994;89(4):1580-6.
125. Henry PJ. Endothelin receptor distribution and function in the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(2):162-7.
126. Lipton HL, Hauth TA, Cohen GA, Hyman AL. Functional evidence for different endothelin receptors in the lung. *J Appl Physiol.* 1993;75(1):38-48.
127. Maemura K, Kurihara H, Kurihara Y, Oda H, Ishikawa T, Copeland NG, i sur. Sequence Analysis, Chromosomal Location, and Developmental Expression of the Mouse Preproendothelin-1 Gene. *Genomics.* 1996;31(2):177-84.
128. Fagan K, McMurtry I, Rodman D. Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res.* 2001;2(2):90-101.
129. Hay DWP. Putative mediator role of endothelin-1 in asthma and other lung disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(2):168-71.
130. Nomura A, Ninomiya H, Saotome M, Ohse H, Ishii Y, Uchida Y, i sur. Multiple mechanisms of bronchoconstrictive responses to endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17 (supl 7):S213-5.
131. Chalmers GW, Little SA, Patel KR, Thomson NC. Endothelin-1-induced Bronchoconstriction in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(2):382-8.

132. Candenas ML, Naline E, Sarria B, Advenier C. Effect of epithelium removal and of enkephalin inhibition on the bronchoconstrictor response to three endothelins of the human isolated bronchus. *Eur J Pharmacol.* 1992;210(3):291-7.
133. Hay DWP, Hubbard WC, Udem BJ. Endothelin-induced contraction and mediator release in human bronchus. *Br J Pharmacol.* 1993;110(1):392-8.
134. Oonuma H, Nakajima T, Nagata T, Iwasawa K, Wang Y, Hazama H, i sur. Endothelin-1 is a potent activator of nonselective cation currents in human bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(2):213-21.
135. Moller S, Uddman R, Granstrom B, Edvinsson L. Altered ratio of endothelin ETA- and ETB receptor mRNA in bronchial biopsies from patients with asthma and chronic airway obstruction. *Eur J Pharmacol.* 1999;365(1):R1-R3.
136. Glassberg MK, Ergul A, Wanner A, Puett D. Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;10(3):316-21.
137. Finsnes F, Skjonsberg OH, Tonnessen T, Naess O, Lyberg T, Christensen G. Endothelin production and effects of endothelin antagonism during experimental airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(4):1404-12.
138. Finsnes F, Christensen G, Lyberg T, Sejersted OM, Skjonsberg OH. Increased Synthesis and Release of Endothelin-1 during the Initial Phase of Airway Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(5):1600-6.
139. Sirois MG, Filep JG, Rousseau A, Fournier A, Plante GE, Sirois P. Endothelin-1 enhances vascular permeability in conscious rats: role of thromboxane A2. *Eur J Pharmacol.* 1992;214(2-3):119-25.
140. Finsnes F, Skjonsberg OH, Lyberg T, Christensen G. Endothelin 1 production is associated with eosinophilic rather than neutrophilic airway inflammation. *Eur Respir J.* 2000;15(4):743-50.
141. Fernandes LB, Henry PJ, Goldie RG. Endothelin-1 potentiates cholinergic nerve-mediated contraction in human isolated bronchus. *Eur Respir J.* 1999;14(2):439-42.
142. Noguchi K, Ishikawa K, Yano M, Ahmed A, Cortes A, Abraham WM. Endothelin-1 contributes to antigen-induced airway hyperresponsiveness. *J Appl Physiol.* 1995;79(3):700-5.
143. Faisy C, Pinto F, Danel C, Naline E, Risse P-A, Leroy I, i sur. beta2-Adrenoceptor Agonist Modulates Endothelin-1 Receptors in Human Isolated Bronchi. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34(4):410-6.
144. Juniper EF, Bousquet J, Abetz L, Bateman ED, Committee G. Identifying 'well-controlled' and 'not well-controlled' asthma using the Asthma Control Questionnaire. *Respir Med.* 2006;100(4):616-21.
145. Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJH, Pauwels RA, i sur. Can Guideline-defined Asthma Control Be Achieved? The Gaining Optimal Asthma Control Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(8):836-44.

146. Rennard SI, Farmer SG. Exacerbations and Progression of Disease in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(2):88-92.
147. Bateman ED, Bousquet J, Braunstein GL. Is overall asthma control being achieved? A hypothesis-generating study. *Eur Respir J.* 2001;17(4):589-95.
148. Juniper EF, O'Byrne PM, Ferrie PJ, King DR, Roberts JN. Measuring Asthma Control. Clinic Questionnaire or Daily Diary? *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(4):1330-4.
149. Bijl-Hofland ID, Cloosterman SG, Folgering HT, Akkermans RP, van den Hoogen H, van Schayck CP. Measuring breathlessness during histamine challenge: a simple standardized procedure in asthmatic patients. *Eur Respir J.* 1999;13(5):955-60.
150. Killian KJ, Watson R, Otis J, St. Amand TA, O'Byrne PM. Symptom Perception during Acute Bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(2):490-6.
151. Quanjer PhH TG, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault J-C. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party "Standardization of lung function tests". European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J.* 1993;6 (supl 16):5-40.
152. Agresti A. *Categorical Data Analysis.* 2 izd. New York: John Wiley and sons, Inc; 2002.
153. Goldman L. *Quatitative aspects of clinical reasoning.* U: Braunwald, E., ur. *Harrison s Principles of Internal Medicine.* 11 izd. New York: McGraw-Hill; 1987.
154. McNeil BJ, Hanley JA. Statistical approaches to the analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves. *Med Dec Making.* 1984;4(2):137-50.
155. Langleben D, DeMarchie M, Laporta D, Spanier AH, Schlesinger RD, Stewart DJ. Endothelin-1 in acute lung injury and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(6):1646-50.
156. Aoki T, Kojima T, Ono A, Unishi G, Yoshijima S, Kameda-Hayashi N, i sur. Circulating endothelin-1 levels in patients with bronchial asthma. *Ann Allergy.* 1994;73(4):365-9.
157. El-Gamal Y, Hossny E, Awwad K, Mabrouk R, Boseila N. Plasma endothelin-1 immunoreactivity in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002;88(4):370-3.
158. Trakada G, Tsourapis S, Marangos M, Spiropoulos K. Arterial and bronchoalveolar lavage fluid endothelin-1 concentration in asthma. *Respir Med.* 2000;94(10):992-6.
159. Koller DY, Herouy Y, Gotz M, Hagel E, Urbanek R, Eichler I. Clinical value of monitoring eosinophil activity in asthma. *Arch Dis Child.* 1995;73(5):413-7.
160. Vanto T, Koskinen P. Serum eosinophil cationic protein in the evaluation of asthma severity in children. *Allergy.* 1998;53(4):415-9.

161. Badar A, Saeed W, Hussain MM, Aslam M. Correlation of eosinophil cationic protein with severity of asthma. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2004;16(3):66 (sažetak).
162. Fujisawa T, Terada A, Atsuta J, Iguchi K, Kamiya H, Sakurai M. Clinical utility of serum levels of eosinophil cationic protein (ECP) for monitoring and predicting clinical course in childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(1):19-25.
163. Carlsen KH. Markers of airway inflammation in preschool wheezers. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1997;52(5):455-60.
164. Grebski E, Wu J, Wuthrich B, Medici TC. Does eosinophil cationic protein in sputum and blood reflect bronchial inflammation and obstruction in allergic asthmatics? *J Investigat Allergol Clin Immunol*. 1999;9(2):82 (sažetak).
165. Romagnoli M, Vachier I, Tarodo de la Fuente P, Meziane H, Chavis C, Bousquet J, i sur. Eosinophilic inflammation in sputum of poorly controlled asthmatics. *Eur Respir J*. 2002;20(6):1370-7.
166. Clark K, Simson L, Newcombe N, Koskinen AML, Mattes J, Lee NA, i sur. Eosinophil degranulation in the allergic lung of mice primarily occurs in the airway lumen. *J Leukoc Biol*. 2004;75(6):1001-9.
167. Nahm DH, Park HS. Correlation between IgA antibody and eosinophil cationic protein levels in induced sputum from asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(6):676-81.
168. Vittori E, Marini M, Fasoli A, De Franchis R, Mattoli S. Increased expression of endothelin in bronchial epithelial cells of asthmatic patients and effect of corticosteroids. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(5):1320-5.
169. Marciniak SJ, Plumpton C, Berker PJ, Huskisson NS, A.P. D. Localization of immunoreactive endothelin and proendothelin in the human lung. *Pulm Pharmacol*. 1992;5(3):175 (sažetak).
170. Springall DR, Howarth PH, Counihan H, Djukanovic R, Holgate ST, Polak JM. Endothelin immunoreactivity of airway epithelium in asthmatic patients. *Lancet*. 1991;337(8743):697-701.
171. Chalmers GW, Millar EA, Little SA, Shepherd MC, Thomson NC. Effect of Infused Angiotensin II on the Bronchoconstrictor Activity of Inhaled Endothelin-1 in Asthma. *Chest*. 1999;115(2):352-6.
172. Nomura A, Uchida Y, Kameyama M, Saotome M, Oki K, S. H. Endothelin and bronchial asthma. *Lancet*. 1989;2:747-8.
173. Ackerman V, Carpi S, Bellini A, Vassalli G, Marini M, Matoli S. Constitutive expresion of endothelin in bronchial epithelial cells of patients with symptomatic and asymptomatic asthma and modulation by histamine and interleukin-1. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96:618-27.

174. Kurokawa M, Konno S, Gonokami Y, Kouno Y, Kawazu K, Okamoto M, i sur. Endothelin-1 levels in sputum and plasma of asthmatic patient after allergen provocation. *Arerugi*. 1996;45(4):386 (sažetak).
175. Chalmers GW, Thomson L, Macleod KJ, Dagg KD, McGinn BJ, McSharry C, i sur. Endothelin-1 levels in induced sputum samples from asthmatic and normal subjects. *Thorax*. 1997;52(7):625-7.
176. Roland M, Bhowmik A, Sapsford RJ, Seemungal TAR, Jeffries DJ, Warner TD, i sur. Sputum and plasma endothelin-1 levels in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001;56(1):30-5.
177. Redington AE, Springall DR, Ghatei MA, Lau LC, Bloom SR, Holgate ST, i sur. Endothelin in bronchoalveolar lavage fluid and its relation to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(4):1034-9.
178. Kraft M, Beam WR, Wenzel SE, Zamora MR, O'Brien RF, Martin RJ. Blood and bronchoalveolar lavage endothelin-1 levels in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(4):946-52.
179. Redington AE, Springall DR, Ghatei MA, Madden J, Bloom SR, Frew AJ, i sur. Airway endothelin levels in asthma: influence of endobronchial allergen challenge and maintenance corticosteroid therapy. *Eur Respir J*. 1997;10(5):1026-32.
180. de la Fuente TP, Romagnoli M, Carlsson L, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Eosinophilic inflammation assessed by induced sputum in corticosteroid-dependent asthma. *Respir Med*. 1999;93(3):183-9.
181. Pizzichini MM, Pizzichini E, Efthimiadis A, Evans S, Dolovich J, Hargreave FE. Eosinophils (Eo) and ECP of induced sputum compared with peripheral blood (B). *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(1):311 (sažetak).
182. Fujimoto K, Kubo K, Matsuzawa Y, Sekiguchi M. Eosinophil cationic protein levels in induced sputum correlate with the severity of bronchial asthma. *Chest*. 1997;112(5):1241-7.
183. Sorva R, Metso T, Turpeinen M, Juntunen-Backman K, Bjorksten F, Haahtela T. Eosinophil cationic protein in induced sputum as a marker of inflammation in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 1997;8(1):45 (sažetak).
184. Barck C, Lundahl J, Hallden G, Bylin G. Total eosinophil cationic protein levels in induced sputum as a marker of changes in eosinophilic inflammation in a patient with allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;95(1):86 (sažetak).
185. Tohda Y, Muraki M, Iwanaga T, Kubo H, Fukuoka M, Nakajima S. The effect of theophylline on blood and sputum eosinophils and ECP in patients with bronchial asthma. *Int J Immunopharmacol*. 1998;20(4-5):173-81.
186. Strauch E, Moske O, Thoma S, Storm Van's Gravesande K, Ihorst G, Brandis M, i sur. A randomized controlled trial on the effect of montelukast on sputum eosinophil cationic protein in children with corticosteroid-dependent asthma. *Pediatr Res*. 2003;54(2):198-203.

187. Dal Negro R, Micheletto C, Tognella S, Turco P, Rossetti A, Cantini L. Assessment of inhaled BDP-dose dependency of exhaled nitric oxide and local and serum eosinophilic markers in steroids-naive nonatopic asthmatics. *Allergy*. 2003;58(10):1018-22.
188. Basyigit I, Yildiz F, Kacar Ozkara S, Boyaci H, Ilgazli A, Ozkarakas O. Effects of different anti-asthmatic agents on induced sputum and eosinophil cationic protein in mild asthmatics. *Respirology*. 2004;9(4):514-20.
189. Demoly P, Maly FE, Mautino G, Grad S, Gougat C, Sahla H, i sur. VEGF levels in asthmatic airways do not correlate with plasma extravasation. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(10):1390-4.
190. Shi HZ, Chen YQ, Qin SM. Inhaled IL-5 increases concentrations of soluble intracellular adhesion molecule-1 in sputum from atopic asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(3):463-7.
191. Van Rensen EL, Hiemstra PS, Rabe KF, Sterk PJ. Assessment of microvascular leakage via sputum induction: the role of substance P and neurokinin A in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(9):1275-9.
192. in't Veen JCCM, Smits HH, Hiemstra PS, Zwinderman AE, Sterk PJ, Bel EH. Lung Function and Sputum Characteristics of Patients with Severe Asthma During an Induced Exacerbation by Double-Blind Steroid Withdrawal. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):93-9.
193. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(5):1126-31.
194. Pohl D, Beier J, Buhl R, Beeh KM. Effect of histamine and adenosine 5'-monophosphate provocation on sputum neutrophils and related mediators in atopic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;95(2):197(sažetak).
195. Belda J, Margarit G, Martinez C, Casan P, Rodriguez-Jerez F, Brufal M. Bronchial exudate of serum proteins during asthma attack. *Arch Bronconeumol*. 2005;41(6):328-33.
196. Belda J, Casan P, Martinez C, Margarit G, Giner J, Homs R. Bronchial plasma exudation after adenosine monophosphate or methacholine challenge. *J Asthma*. 2005;42(10):885 (sažetak).
197. Charokopos N, Leotsinidis M, Tsiamita M, Kalofonos HP, Vasillakos P, Christofidou M, i sur. Increased levels of albumin in bronchial washing fluid from patients with bronchial carcinoma: Should albumin be considered as a tumor marker? *Int J Biol Markers*. 2004;19:316 (sažetak).
198. Mattoli S, Soloperto M, Marini M, Fasoli A. Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(3):376 (sažetak).

199. Papadopouli E, Tzanakis N, Tsoumakidou M, Kyriakoy D, Plataki M, Mantzouranis EC, i sur. Comparison of induced sputum inflammatory profiles between childhood and adult-onset asthma. *Respir Med.* 2006;100(8):1442-50.
200. Gutierrez V, Prieto L, Torres V, Trenor R, Perez C, Berto JM, i sur. Relationship between induced sputum cell counts and fluid-phase eosinophil cationic protein and clinical or physiologic profiles in mild asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999;82(6):559 (sažetak).
201. Rosi E, Scano G. Association of sputum parameters with clinical and functional measurements in asthma. *Thorax.* 2000;55(3):235-8.
202. Cui P, Tani K, Kitamura H, Okumura Y, Yano M, Inui D, i sur. A novel bioactive 31-amino acid endothelin-1 is a potent chemotactic peptide for human neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol.* 2001;70(2):306-12.
203. Cunningham MEMD, Huribal MMD, Bala RJM, McMillen MAMD. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. *Crit Care Med.* 1997;25(6):958-64.
204. Xu J, Zhong NS. The interaction of tumour necrosis factor alpha and endothelin-1 in pathogenetic models of asthma. *Clin Exp Allergy.* 1997;27(5):568-73.
205. Endo T, Uchida Y, Nomura A, Ninomiya H, Ohse H, Saotome M, i sur. Activated Eosinophils Stimulate Endothelin-1 Release from Airway Epithelial Cells by Direct Adherence via Adhesion Molecules. *Pulm Pharmacol Ther.* 1997;10(2):81-7.
206. Finsnes F, Lyberg T, Christensen G, Skjonsberg OH. Effect of endothelin antagonism on the production of cytokines in eosinophilic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(4):L659-65.
207. Wenzel SE. The significance of the neutrophil in asthma. *Clin Exp Allergy Rev.* 2001;1(2):89-92.
208. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, i sur. Evidence That Severe Asthma Can Be Divided Pathologically into Two Inflammatory Subtypes with Distinct Physiologic and Clinical Characteristics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(3):1001-8.
209. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest.* 2001;119(5):1329-36.
210. Zheng L, Tipoe G, Lam WK, Ho JC, Shum I, Ooi GC, i sur. Endothelin-1 in stable bronchiectasis. *Eur Respir J.* 2000;16(1):146-9.
211. Chalmers GW, Macleod KJ, Sriram S, Thomson LJ, McSharry C, Stack BH, i sur. Sputum endothelin-1 is increased in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1999;13(6):1288-92.

212. Chanez P, Vignola A, Albat B, Springall D, Polak J, Godard P, i sur. Involvement of endothelin in mononuclear phagocyte inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(2):412-20.
213. Redington AE, Meng QH, Springall DR, Evans TJ, Creminon C, Maclouf J, i sur. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax.* 2001;56(5):351-7.
214. Truog W, Pallotto E, Clark P, Banks B, Kaftan H, Ekekezie I, i sur. Interaction of endogenous endothelin-1 and inhaled nitric oxide in term and preterm infants. *Clin Sci.* 2002;103(supl 48):294S-7S.
215. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, III, Panza JA. Interactions Between Nitric Oxide and Endothelin in the Regulation of Vascular Tone of Human Resistance Vessels In Vivo. *Hypertension.* 2000;35(6):1237-41.
216. Ahlborg G, Lundberg JM. Nitric oxide-endothelin-1 interaction in humans. *J Appl Physiol.* 1997;82(5):1593-600.
217. Chalmers GW, Macleod KJ, Thomson LJ, Little, Patel, McSharry, i sur. Sputum cellular and cytokine responses to inhaled endothelin-1 in asthma. *Clin Exp Allergy.* 1999;29(11):1526-31.
218. Odoux C, Crestani B, Lebrun G, Rolland C, Aubin P, Seta N, i sur. Endothelin-1 Secretion by Alveolar Macrophages in Systemic Sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(5):1429-35.
219. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovi R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(1):9-16.
220. Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, i sur. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(2):505-11.
221. Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Differential Proteolytic Enzyme Activity in Eosinophilic and Neutrophilic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(5):559-65.
222. Andersson SE, Zackrisson C, Hemsén A, Lundberg JM. Regulation of lung endothelin content by the glucocorticosteroid budesonide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188(3):1116-21.
223. Redington AE, Springall DR, Meng QH, Tuck AB, Holgate ST, Polak JM, i sur. Immunoreactive endothelin in bronchial biopsy specimens: increased expression in asthma and modulation by corticosteroid therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(4):544-52.
224. Chen WJ, Yu J, Wang JY. Decreased production of endothelin in asthmatic children after immunotherapy. *J Asthma.* 1995;32:29-35.

225. Kopriva F, Janostakova A, Jarmila S, Zapalka M, Hajduch M. Montelukast decreases plasma endothelin-1 and serum eosinophil cationic protein levels in paediatric atopic asthma. *Clin Drug Invest.* 2006;26(6):351-6.
226. Finsnes F, Lyberg T, Christensen G, Skjonsberg OH. Leukotriene antagonism reduces the generation of endothelin-1 and interferon-gama and inhibts eosinophilic airway. *Respir Med.* 2002;96(11):901-6.
227. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, i sur. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med.* 1990;172:1741-8.
228. Chung HL, Kim SG, Shin IH. The relationship between serum endothelin (ET)-1 and wheezing status in the children with *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006;17(4):285-90.
229. Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR. The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;174(2):613 (sažetak).
230. Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(1):74 (sažetak).
231. Nikolaou E, Trakada G, Prodromakis E, Efremidis G, Pouli A, Koniavitou A, i sur. Evaluation of arterial endothelin-1 levels, before and during a sleep study, in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration.* 2003;70(6):606-10.
232. Spiropoulos K, Trakada G, Nikolaou E, Prodromakis E, Efremidis G, Pouli A, i sur. Endothelin-1 levels in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Respir Med.* 2003;97(8):983-9.
233. Crestani B, Odoux C, Rolland C, Moldovan F, Cornillet P, Fiet J, i sur. Hypoxia reduces endothelin production by rat alveolar type 2 cell in primary culture. *Eur Respir J.* 1998;11(2):392-9.
234. Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, i sur. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J.* 1998;11(4):828-34.
235. Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L, Bartoli L, Carnevali S, Dente FL, i sur. Salbutamol pretreatment does not change eosinophil percentage and eosinophilic cationic protein concentration in hypertonic saline-induced sputum in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy.* 1999;29(5):712-8.
236. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, i sur. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J.* 1995;8(4):559-65.

237. Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L, Bartoli ML, Ricci M, Pavia T, i sur. Granulocyte markers in hypertonic and isotonic saline-induced sputum of asthmatic subjects. *Eur Respir J.* 2004;24(6):1018-24.
238. Makker HK, Springall DR, Redington AE, Ghatei MA, Bloom SR, Polak JM, i sur. Airway endothelin levels in asthma: influence of endobronchial hypertonic saline challenge. *Clin Exp Allergy.* 1999;29(2):241-7.
239. Simpson JL, Timmins NL, Fakes K, Talbot PI, Gibson PG. Effect of saliva contamination on induced sputum cell counts, IL-8 and eosinophil cationic protein levels. *Eur Respir J.* 2004;23(5):759-62.
240. Hadjicharalambous C, Dent G, May RD, Handy RLC, Anderson IK, Davies DE, i sur. Measurement of eotaxin (CCL11) in induced sputum supernatants: Validation and detection in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(4):657-62.
241. Efthimiadis A, Pizzichini MM, Pizzichini E, Dolovich J, Hargreave FE. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *Eur Respir J.* 1997;10(6):1336-40.
242. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced Sputum Cell Counts in Healthy Adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(2):475-8.
243. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, i sur. Induced Sputum Cellularity. Reference Values and Distribution in Normal Volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(3):1172-4.
244. Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, Silverman M. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax.* 2000;55(9):768-74.
245. Ryttilä P. Induced sputum for assessment of airway inflammation of patients with COPD, asthma and asthma-like symptoms [doktorska disertacija]. Helsinki; 2002.
246. Rodwell LT, Anderson SD, Seale JP. Inhaled steroids modify bronchial responses to hyperosmolar saline. *Eur Respir J.* 1992;5(8):953-62.
247. Boulet L-P, Turcotte H, Tennina S. Comparative efficacy of salbutamol, ipratropium, and cromoglycate in the prevention of bronchospasm induced by exercise and hyperosmolar challenges. *J Allergy Clin Immunol.* 1989;83(5):882-7.
248. Castagnaro A, Chetta A, Foresi A, D'Ippolito R, Malorgio R, Olivieri D. Effect of Sputum Induction on Spirometric Measurements and Arterial Oxygen Saturation in Asthmatic patients, Smokers, and Healthy Subjects. *Chest.* 1999;116(4):941-5.
249. Boulet L-P, Turcotte H, Laviolette M, Naud F, Bernier M-C, Martel S, i sur. Airway Hyperresponsiveness, Inflammation, and Subepithelial Collagen Deposition in Recently Diagnosed versus Long-standing Mild Asthma. Influence of Inhaled Corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(4):1308-13.

250. Wong HH, Fahy JV. Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(1):299-303.
251. Hunter CJ, Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. The safety and success rate of sputum induction using a low output ultrasonic nebuliser. *Respir Med.* 1999;93(5):345-8.
252. Graziani E, Petroianni A, Terzano C. Brittle asthma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004;8(4):135-8.

11. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Sanda Škrinjarić-Cincar

USTANOVA ZAPOSLENJA: Klinička bolnica Osijek, Odjel za plućne bolesti
Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u
Osijeku

ADRESA: posao: Osijek, Huttlerova 4
kuća: Sv. Ane 15b, Osijek

TELEFON: posao: +385 31 511 681
kuća: +385 31 374 107; mob. +385 91 1525 525

ELEKTRONIČKA POŠTA: sanda.cincar@gmail.com

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

DATUM ROĐENJA: 03. 12. 1959.

MATIČNI BROJ ZNANSTVENIKA: 129630

NAZIV RADNOG MJESTA: Voditelj Odsjeka opće pulmologije na Odjelu za plućne
bolesti KB Osijek
Asistent na katedri Interne medicine medicinskog
fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku

OBRAZOVANJE:

1978-1984.: Studij medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

1985-1988. : Poslijediplomski studij iz kliničke farmakologije

1991. g. Magistarski rad *Diltiazem i Penutolol u liječenju stabilne angine pectoris s posebnim osvrtom na nijeme miokardne ishemije*

1989-1993. : Specijalizacija iz pneumoftziologije

2007 Subspecijalizacija interne medicine (pulmologije)

AKADEMSKI NASLOVI:

1984. g. Doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

1991. g. Magistar biomedicinskih znanosti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

ZAPOSLENJA:

1985. g. Pripravnik postdiplomand u Znanstvenoj jedinici za medicinska istraživanja
1989. g. Liječnik specijalizant na Odjelu za plućne bolesti KB Osijek
1993. g. Liječnik specijalist na Odjelu za plućne bolesti KB Osijek
1997. g. Asistent na katedri Interne medicine Studija medicine u Osijeku Sveučilišta u Zagrebu, kasnije Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku
2005. g. Voditelj Odsjeka opće pulmologije na Odjelu za plućne bolesti KB Osijek

ČLANSTVA U UDRUGAMA:

- Hrvatski liječnički zbor
Hrvatsko pulmološko društvo
Europsko respiratorno društvo

RADOVI OBJAVLJENI U INDEKSIRANIM ČASOPISIMA:

1. Ivezić Z, Kurbel S, Škrinjarić-Cincar S, Radić R. Resorption of gas trapped in body cavities: comparison of alveolar and pleural space with inner ear and paranasal sinuses. *Adv Physiol Educ.* 2006 Mar;30(1):30-2.
2. Čatipović-Veselica K, Burić D, Škrinjarić-Cincar S, Čatipović B. Arterial hypertension in workers: prevalence, awareness, treatment, control and heart changes. *Arh Hig Rada Toksikol.* 1995;46(3):313-21.
3. Čatipović-Veselica K, Amidžić V, Burić D, Ilakovac V, Kozmar D, Durijanček J, Škrinjarić-Cincar S, Čatipović B, Mujić N, Lauc A. Type A/B behavior and eight basic emotions in 1084 employees. *Psychol Rep.* 1995;76(3):1019-24.
4. Čatipović-Veselica K, Burić D, Merčep A, Škrinjarić-Cincar S, Čatipović B. Relationship of eight basic emotions, life needs satisfaction and Type A behavior with body mass index and some biochemical characteristics in healthy blue-collar workers. *Acta Med Croatica.* 1995;49(4-5):169-72.

5. Čatipovic-Veselica K, Škrinjaric-Cincar S, Čatipovic B. Ventricular arrhythmias during exercise testing and daily activities in patients with stable angina pectoris before and during Aldisem and penbutolol treatment. *Acta Med Croatica*. 1993;47(3):129-33.

6. Čatipović-Veselica K, Burić D, Ilakovac V, Amidžić V, Kozmar D, Durjanček J, Škrinjarić S, Čatipovic B. Association of scores for Type A behavior with age, sex, occupation, education, life needs satisfaction, smoking, and religion in 1084 employees. *Psychol Rep*. 1995;77(1):131-8.

7. Čatipovic-Veselica K, Škrinjarić S, Mrđenovic S, Mujić N, Čatipović B, Andrcić M, Vizner-Lovrić I, Lauc A. Emotion profiles and quality-of-life of paced patients. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1990;13(4):399-404.

8. Čatipović-Veselica K, Škrinjarić S, Margetić N, Milašinović G, Mujić N, Vuković A, Čatipovic B. The mean values and correlation between blood pressure, body weight, height, heart rate, the PQ, QT and QTc intervals, the QRS-complex and the echocardiographic dimensions of the left atrium and ventricle in 515 14-year-old students. *Lijec Vjesn*. 1989;111(11):377-81.

12. POPIS PRILOGA

1. Originalni upitnik za procjenu kontrole astme (ACQ)
2. Sustav bodovanja dnevnih i noćnih simptoma
3. Prikaz metode indukcije iskašljaja
4. Prikaz obrade IS
4. Obrazac za laboratorijsku obradu IS

ASTHMA CONTROL QUESTIONNAIRE ©

Please answer questions 1–6.

Circle the number of the response that best describes how you have been during the past week

- | | |
|---|--|
| 1. On average, during the past week, how often were you woken by your asthma during the night? | 0 Never
1 Hardly ever
2 A few minutes
3 Several times
4 Many times
5 A great many times
6 Unable to sleep because of asthma |
| 2. On average, during the past week, how bad were your asthma symptoms when you woke up in the morning? | 0 No symptoms
1 Very mild symptoms
2 Mild symptoms
3 Moderate symptoms
4 Quite severe symptoms
5 Severe symptoms
6 Very severe symptoms |
| 3. In general, during the past week, how limited were you in your activities because of your asthma? | 0 Not limited at all
1 Very slightly limited
2 Slightly limited
3 Moderately limited
4 Very limited
5 Extremely limited
6 Totally limited |
| 4. In general, during the past week, how much shortness of breath did you experience because of your asthma? | 0 None
1 A very little
2 A little
3 A moderate amount
4 Quite a lot
5 A great deal
6 A very great deal |
| 5. In general, during the past week, how much of the time did you wheeze? | 0 Not at all
1 Hardly any of the time
2 A little of the time
3 A moderate amount of the time
4 A lot of the time
5 Most of the time
6 All the time |
| 6. On average, during the past week, how many puffs of short-acting bronchodilator (eg. Ventolin) have you used each day? | 0 None
1 1–2 puffs most days
2 3–4 puffs most days
3 5–8 puffs most days
4 9–12 puffs most days
5 13–16 puffs most days
6 More than 16 puffs most days |

To be completed by a member of the clinic staff

- | | |
|--|------------------|
| 7. FEV1 pre-bronchodilator: | 0 >95% predicted |
| FEV1 predicted | 1 95–90% |
| FEV1 % predicted | 2 89–80% |
| (Record actual values on the dotted lines | 3 79–70% |
| and score the FEV1 % predicted in the next | 4 69–60% |
| column) | 5 59–50% |
| | 6 <50% predicted |

©The Asthma Control Questionnaire is copyrighted. It may not be changed, translated or sold (paper or software) without the permission of Elizabeth Juniper.

BODOVNA SKALA ZA SIMPTOME ASTME

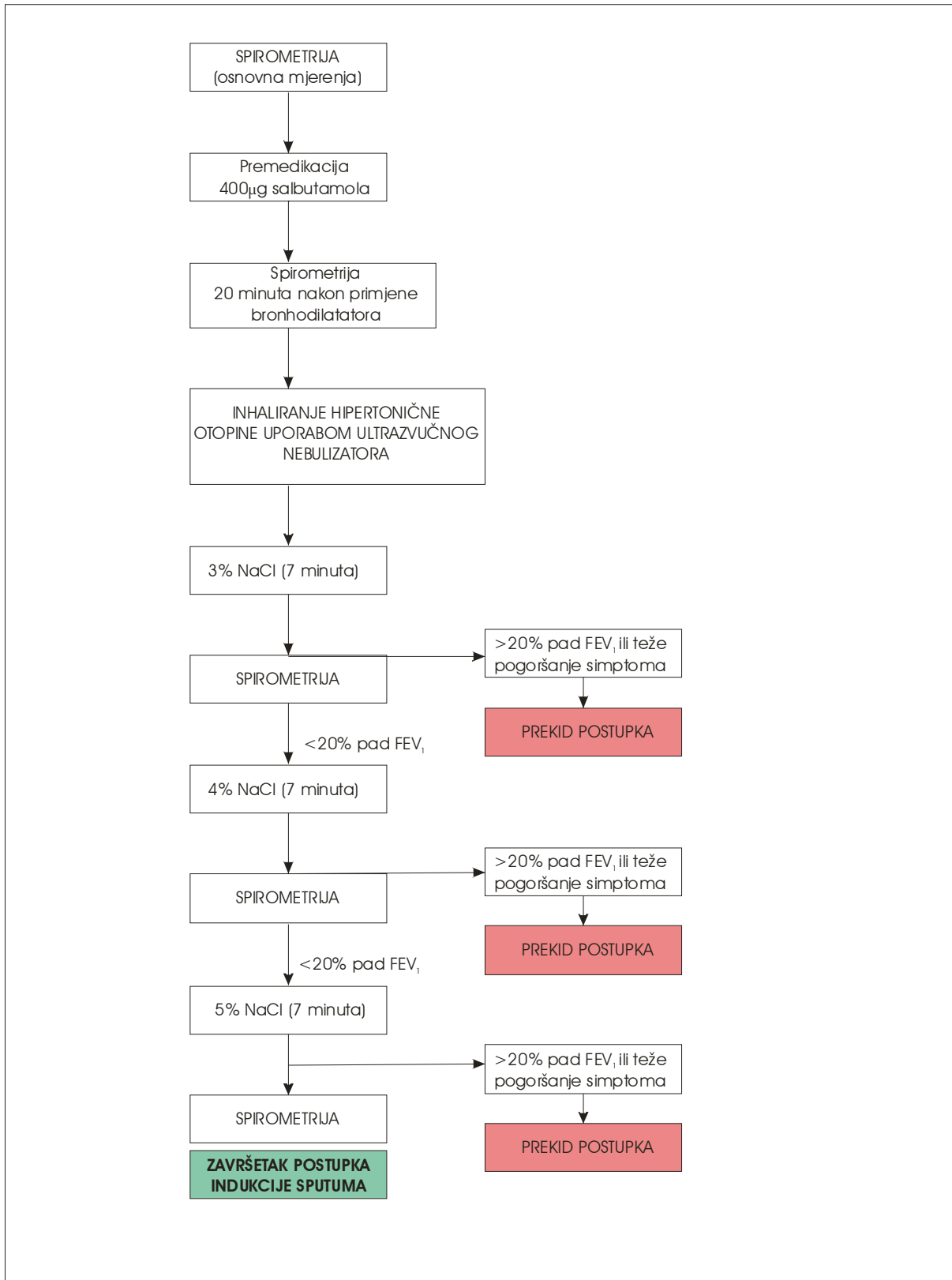
Dnevni simptomi

- 0 = odsutnost simptoma tijekom dana
- 1 = simptomi u jednom kratkom razdoblju tijekom dana
- 2 = simptomi tijekom dva ili više kratkih razdoblja tijekom dana
- 3 = simptomi tijekom većeg dijela dana koji nisu utjecali na uobičajene dnevne aktivnosti
- 4 = simptomi tijekom većeg dijela dana koji su utjecali na uobičajene dnevne aktivnosti
- 5 = teški simptomi koji su onemogućavali uobičajene dnevne aktivnosti, te odlazak na posao

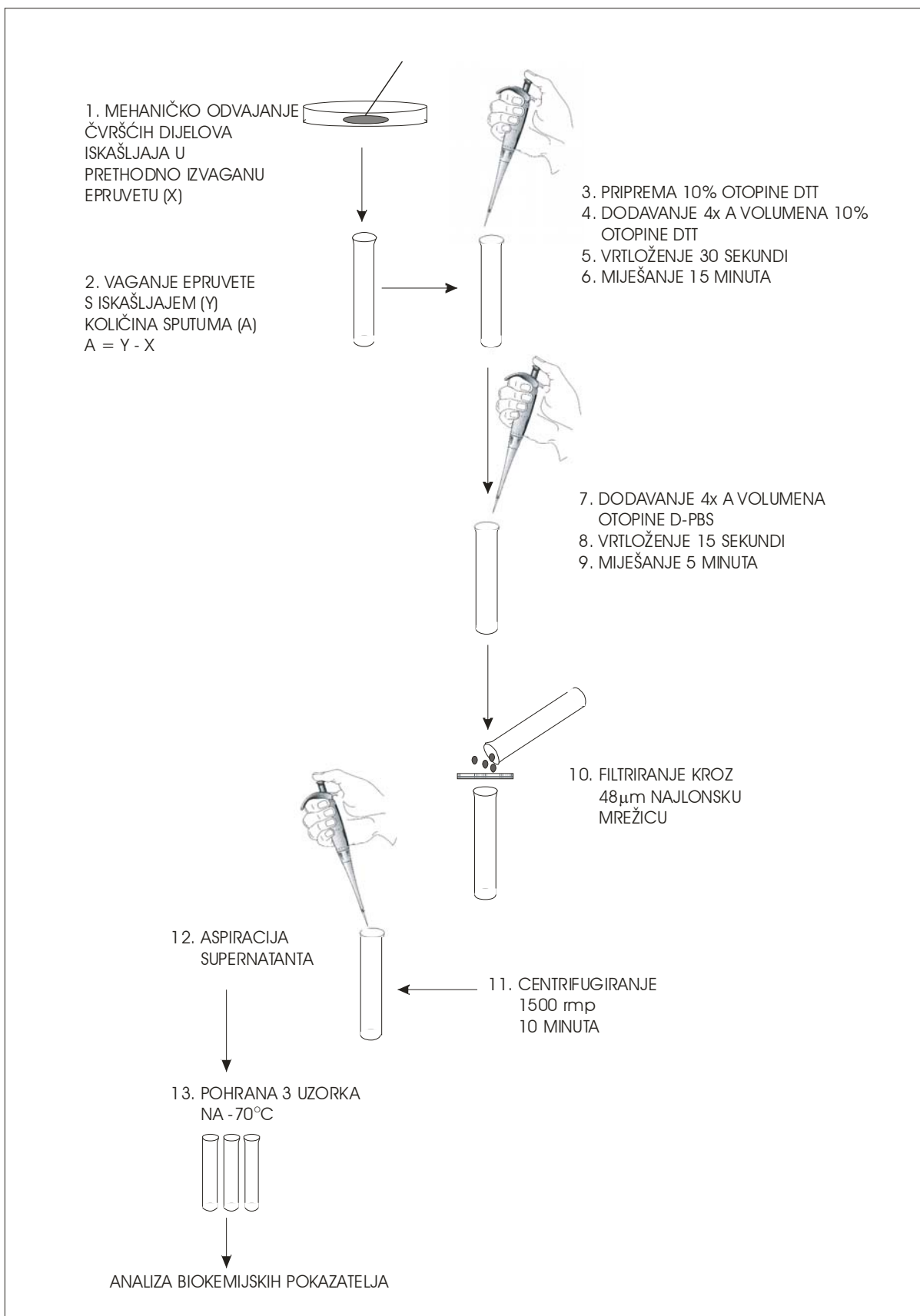
Noćni simptomi

- 0 = odsutnost simptoma tijekom noći
- 1 = simptomi koji su bili razlog jednom buđenju tijekom noći ili rano ujutro
- 2 = simptomi koji su bili razlog buđenju dva ili više puta tijekom noći ili rano ujutro
- 3 = simptomi koji su bili razlogom nespavanja tijekom cijele noći

METODA INDUKCIJE SPUTUMA



OBRADA INDUCIRANOG SPUTUMA



Obrazac za laboratorijsku obradu inducirano^g iskašljaja

Ime i prezime:

Broj:

Datum:

Vrijeme indukcije:

Vrijeme obrade:

Plastična kušalica (x): mg

Kušalica + iskašljaj (y): mg

Iskašljaj (A) = y-x : mg

DTT (A x 4): mg

DPBS (Ax4): mg

Broj uzoraka supernatanta:

