

# Polimorfizmi gena RAD50, STARD3, ORMDL3 i IL6R u bolesnika s astmom

---

Štajduhar, Anamarija

Doctoral thesis / Disertacija

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:238532>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Anamarija Štajduhar**

**Polimorfizmi gena RAD50, STARD3,  
ORMDL3 i IL6R u bolesnika s astmom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2024.**



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Anamarija Štajduhar**

**Polimorfizmi gena RAD50, STARD3,  
ORMDL3 i IL6R u bolesnika s astmom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Klinici za plućne bolesti Jordanovac Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Sveučilištu u Manchesteru

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Sanja Popović-Grle

## ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Sanji Popović-Grle na odabiru zanimljive i izazovne teme doktorskog rada te usmjeravanju i savjetima prilikom njegove izrade. Također zahvala prof.dr.sc. Adnanu Čustoviću, dr.sc. Matei Deliu, dr. sc. Jurici Baranašiću i dr. sc. Jeleni Knežević na svoj ukazanoj pomoći u pripremi rada i razumijevanju genetike.

Velike zahvale i mojoj obitelji na svoj ukazanoj podršci, motivaciji i ohrabrirvanju.

# SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	OPĆENITO O ASTMI	1
1.2.	EPIDEMIOLOGIJA ASTME	1
1.3.	KVALITETA ŽIVOTA BOLESNIKA S ASTMOM I ODABRANI RIZIČNI ČIMBENICI ZA RAZVOJ ASTME	3
1.4.	ENDOTIPOVI, FENOTIPOVI, TERAPIJA I BIOMARKERI U PRAĆENJU ASTME	5
1.5.	GENETIKA-TUMAČENJE POJMOVA	16
1.5.1.	GENI, LOKUSI, HAPLOTIPOVI, KROMOSOMI I GENOM	18
1.5.2.	POLIMORFIZMI JEDNOG NUKLEOTIDA I DISEKVILIBRIJ VEZANJA	20
1.5.3.	ODABIR POPULACIJE, GENSKÉ STUDIJE I HARDY-WEINBERG EKVILIBRIJ	22
1.5.5.	MALDI TOF	25
1.6.	ANALIZA GENA KANDIDATA ODRASLIH BOLESNIKA S ASTMOM U HRVATSKOJ POPULACIJI (CAAS)	26
1.6.1.	RAD 50	26
1.6.2.	STARD3	27
1.6.3.	IL6R	28
1.6.4.	ORMDL3	29
2.	HIPOTEZA	31
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
3.1.	OPĆI CILJ	32
3.2.	SPECIFIČNI CILJEVI	32
4.	METODE	33
4.1.	ISPITANICI	33
4.2.	MJERENJA	33
4.3.	EKSTRAKCIJA DNA I GENOTIPIZACIJA	37
4.4.	STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA	38
5.	REZULTATI	40
5.1.	OPĆI PODACI	40
5.2.	ODNOSI MEĐU VARIJABLAMA	43
5.3.	GENSKA ANALIZA	51
6.	RASPRAVA	65

7. ZAKLJUČAK	77
8. SAŽETAK	79
9. SUMMARY	80
10. POPIS LITERATURE	81
11. KRATKA BIOGRAFIJA	96

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ACQ - *Asthma Control Questionnaire*

ACT - *Astma Control Test*

BMI - *body mass indeks* (indeks tjelesne mase)

CAAS – *The Croatian Asthma and Allergy Study* (Asocijacijska studija astme u Hrvatskoj)

CCI - *Charlson Comorbidity Indeks*

CIGMR - *Centre for Integrated Genomic Medical Research*

D - dijagnostički

DALY - *Disability-Adjusted Life Years*

Di - dinamički

DLCO - *Diffusing Capacity Of The Lungs For Carbon Monoxide* (difuzijski kapacitet pluća za ugljični monoksid)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

ECP – *eosinophil cationic protein* (eozinofilni kationski protein)

ECRHS - *European Community Respiratory Health Survey*

EGEA - *epidemiological study on the genetic and environment of asthma*

Eo – eozinofili

FeNO - *Fractional Exhaled Nitric Oxide* (frakcija izdahnutog dušikovog oksida)

FEV1 - forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi

FVC – forsirani vitalni kapacitet

GINA - Globalna Inicijativa za Astmu

GLM – generalizirani linearni model

GVS - *Genome Variation Server*

GWAS - *genome-wide association study* (asocijacijska studija cijelog genoma)

HWE - Hardy Weinberg ekvilibrij

HZZO - Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje

ICS - *inhaled corticosteroids* (inhalacijski kortikosteroid)

IgE - imunoglobulin E

IL – interleukin

IL6R – receptor za interleukin 6

ISAAC - *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*

iv – intravenski



K3EDTA - trikalij etilen diamin tetraoctena kiselina

KCO - *carbon monoxide transfer coefficient* (koficijent za prijenos ugljičnog monoksida)

KOPB - kronična opstruktivna plućna bolest

LD - *linkage disequilibrium* (neravnoteža/disekvilibrij vezanja)

LIMS - *laboratory information management system*

MAAS - *The Manchester Asthma and Allergy Study*

MAF - *minor allele frequency* (frekvencija minornog alela)

MALDI- TOF - *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*

mikro-RNA - mikro-ribonukleinska kiselina

mMRC - *Modified Medical Research Council*

mRNA - glasnička RNA

NF- $\kappa$ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

ns - *not significant* (nije značajno)

OCS – *oral corticosteroids* (oralni kortikosteroid - OKS)

ORMDL 3 - regulator biosinteze sfingolipida 3

P - prediktivni

PET - tereftalat glikolom modificirane plastika

PLS - *Partial Least Squares*

$r^2$  - koeficijent korelacije

RNA – ribonukleinska kiselina

rRNA - ribosomska RNA

S - stabilni

SAD - Sjedinjene Američke Države

SARP - *Severe Asthma Research Program*

sc – supkutano

SNP – *single nucleotide polymorphisms* (polimorfizmi jednog nukleotida)

STARD3 - *StAR-related lipid transfer protein 3*

tagSNP – obilježavajući SNP

TEA - *transcriptomic endotypes of asthma*

tRNA - transportna RNA

TSLP - timusni stromalni limfopoetin

U-BIOPRED - *Unbiased Biomarkers in Prediction of Respiratory Disease Outcome*

UPR - *unfolded-protein response* (odgovor nesmotanog proteina)

UTR- *untranslated region*

VIP - *Variable Importance for Projection*

## **1. UVOD**

### **1.1. OPĆENITO O ASTMI**

Definicija astme je bila podložna promjenama u skladu s novim spoznajama te je trenutačni dogovor, prema Globalnoj inicijativi za astmu (GINA), da je astma kronična bolest dišnih puteva koju karakterizira varijabilnost simptoma, bilo po pojavnosti ili intenzitetu.(1) Uobičajeni simptomi astme su pritisak u prsima, zaduha, piskanje u prsima s ili bez kašlja i ograničenje protoka zraka u ekspiriju, često potaknuto i nekim vanjskim čimbenicima zbog pojačane osjetljivosti dišnih puteva, ponekad i na neke inače bezopasne stimuluse.(1) Varijabilnost bolesti se očituje i u povremenim pogoršanjima, odnosno egzacerbacijama bolesti, koja variraju po jačini i učestalosti, a koja mogu biti i životno ugrožavajuća. Nadalje, varijabilnost astme je vidljiva ne samo u manifestaciji, nego i u podležecim patofiziološkim procesima koji rezultiraju brojnim astmatskim endotipovima i fenotipovima. Astma je dakle kompleksna multifaktorska bolest i njezin nastanak uvelike ovisi o međudjelovanju genetskih i okolišnih čimbenika u što se primjerice ubrajaju zagađenje zraka, koncentracija različitih alergena, ali i nutritivni status bolesnika, pretilost ili drugi komorbiditeti.(2)

### **1.2. EPIDEMIOLOGIJA ASTME**

Istraživanje epidemiologije astme provodi se uobičajeno na više razina, uključujući svjetsku, regionalnu i državnu. Također, prate se i razni ishodi i posljedice utjecaja astme na život pojedinca, ali i društva: prevalencija, incidencija, financijske posljedice bolovanja ili izostanka iz škole, troškovi dijagnostike, hospitalizacije i kronične terapije i u konačnici smrti.(3) Tijekom 1990.-ih provedene su dvije velike multinacionalne studije (International Study of Asthma and Allergies in Childhood-ISAAC i European Community Respiratory Health Survey-ECRHS) koje su potvrdile da se astma ubraja među najčešće kronične bolesti bez obzira na dob te da je prevalencija dosegla vrhunac u najrazvijenijim zemljama svijeta dok je ona u porastu u slabije razvijenim, vjerojatno posljedično ekonomskom napretku u posljednje vrijeme.(2) Jedna od značajki astme je što pogađa ljude svih dobi, već od rođenja, a onda i radno stanovništvo te je samim time, osim što ima negativni utjecaj na kvalitetu života, i veliki ekonomski teret za društvo. Astma je također učestalija i u populacijama slabijeg imovinskog statusa, primjerice u populaciji crnaca i onih podrijetlom iz Portorika, osobito u djece koja imaju velik godišnji broj izostanaka iz škole.(3-5) U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD),

oko 24.8 milijuna ljudi (oko 8% populacije) je imalo postavljenu dijagnozu astme 2018. godine, uz gotovo podudarnu raspodjelu po dobi (8.1% djece i 7.9% odraslih).(3) Na svjetskoj je razini 2019. godine 262 milijuna ljudi bolovalo od astme te je od nje umrlo čak 461 000 bolesnika.(6) Raspodjela po spolu pokazuje da je udio žena koje boluju od astme nešto veća od udjela muškaraca (10% nasuprot 5.7%) s time da je situacija obrnuta u dječjoj dobi kada dječaci imaju veću šansu imati astmu od djevojčica.(3) Najmanju šansu za ovu bolest imaju djeca do 4. godine, dok se vrhunac zamjećuje od 12. do 17. godine.(3) Valja naglasiti i neke otegotne okolnosti kod dijagnostike astme koje mogu značajno utjecati na konačnu sliku. Tako je primjerice epidemiološka studija iz Indije pokazala da velika većina bolesnika s piskanjem u prsima i simptomima teške astme (>70%) nije imala postavljenu dijagnozu od strane liječnika, a nešto više od trećine ih koristi neku drugu dijagnozu ili termin kod opisa vlastite bolesti (primjerice „viroza“ ili kronična opstruktivna plućna bolest-KOPB).(7, 8) Također, pripadnici starije populacije su u drugom istraživanju imali poteškoća s prisjećanjem prisutnosti astme u najranijoj životnoj dobi ukoliko nisu imali teške egzacerbacije astme, a postoji i neusuglašenost u prikupljanju, vođenju i dostupnosti demografskih podataka među zemljama.(8) S druge strane, razne druge bolesti mogu dati simptome slične astmi tako da bi ispravno prepoznavanje endotipa astme dovelo do najtočnije klasifikacije, što je međutim za sada još nemoguće van kliničkih ispitivanja.(9, 10) Sve to na kraju itekako utječe na statističku analizu podataka i valjanost studija, osobito na svjetskoj razini, a značaj ove bolesti je prepoznat u tolikoj mjeri da se svake godine obilježava i svjetski dan astme.

U Hrvatskoj je u sklopu projekta EUROSTAT određivana incidencija i prevalencija astme – incidencija je iznosila 3 na 1000 stanovnika, odnosno 12 000 novooboljelih osoba od astme godišnje.(6) Prevalencija je u Hrvatskoj bila 5 048.1 na 100 000 stanovnika, odnosno 5.0% ukupnog broja stanovništva ili otprilike 200 000 osoba.(6) Raspodjela incidencije i prevalencije u svijetu i na razini Europe nije jednolika te je ova bolest učestalija u sjevernoj i zapadnoj Europi iako je generalno raspodjela po dobnim skupinama u Hrvatskoj u granicama uobičajenih za europsku populaciju.(6) Zanimljivo je da u SAD-u postoje značajne razlike u ishodima pa je tako više smrtnih slučajeva u seoskim područjima u odnosu na urbane sredine.(11) Takvi ishodi se povezuju s brojnim demografskim i socioekonomskim čimbenicima, primjerice etničkom pripadnošću, stupnjem obrazovanja, dostupnošću zdravstvene skrbi, stupnjem siromaštva, itd. te je tako u SAD-u nađeno da ljudi koji žive na selu imaju lošiji pristup bolnicama, moraju prijeći veće udaljenosti da bi uopće i mogli doći do bilo kakve zdravstvene skrbi, osobito u slučaju kad je ona hitno potrebna, imaju slabiju dostupnost preventivnim mjerama

zdravstvene zaštite i manje je vjerojatno da će biti zdravstveno osigurani.(11-16) Ipak, vidljiv je i pozitivni pomak u broju egzacerbacija astme koji ima padajući trend u periodu od 2006.-2018. i najzamjetniji je u odrasloj populaciji, ali je i dalje ostao najviši u najmlađoj populaciji.(3) Pad u prevalenciji pogoršanja astme se pripisuje sve većoj osviještenosti o značaju ove bolesti, boljoj prevenciji (primjerice smanjenju pušenja među trudnicama i dojiljama) i uspješnijem liječenju.(2) Suprotno tome, prevalencija pojavnosti astme je i dalje u porastu što se povezuje s većom izloženošću ljudi zagađenom zraku, alergenima, modernizaciji stambenih uvjeta i smanjenoj izloženosti „nehigijenskom“ načinu života i manjoj raznolikosti crijevnog mikrobioma, tzv. „higijenska hipoteza“.(2, 9, 17)

### **1.3. KVALITETA ŽIVOTA BOLESNIKA S ASTMOM I ODABRANI RIZIČNI ČIMBENICI ZA RAZVOJ ASTME**

Ono što se najčešće prati u svakodnevnoj kliničkoj praksi su simptomi bolesti i fiziološke varijable što je često nedovoljno za procjenu blagostanja pacijenata i svakako nije dostatno za procjenu kvalitete života bolesnika s astmom. Kvaliteta života je ipak važan ishod u procjeni težine bolesti budući da predstavlja dojam bolesnika o njegovom općem stanju, a pokazalo se i da je bolja kvaliteta života povezana i s manjom stopom mortaliteta i boljom kontrolom bolesti.(18, 19) Heterogenost kliničke slike astme može biti uzrokom nepravilnog liječenja bolesnika što onda ima značajan utjecaj na kvalitetu života i njegove različite aspekte, uključujući fizičke, emocionalne, profesionalne i socijalne posljedice.(19-21) Kvaliteta života se u epidemiološkim studijama može definirati kao pacijentova procjena trenutnog statusa u odnosu na njegove ciljeve, standarde, očekivanja i brige te se pokazalo da u čak polovine bolesnika, astma ima negativan utjecaj na generalno blagostanje oboljelih.(21) To je nadalje povezano s pojavom neželjenih komplikacija, osobito poremećajem psihičkog stanja, što uključuje slabiji napredak u školi, depresiju i poremećaje ponašanja.(22) U dosadašnjim istraživanjima, više je faktora bilo povezano s lošijom kvalitetom života bolesnika s astmom, lošijom kontrolom bolesti i češćim egzacerbacijama: umjerena i teška astma, niski stupanj obrazovanja, pušenje, starija životna dob, ženski spol, pretilost, prisutnost kućnog ljubimca, pozitivna obiteljska anamneza.(23-25) Od svega navedenog, u Hrvatskoj su pretilost (2/3 stanovništva) i pušenje (1/3 stanovništva) vjerojatno najveći javnozdravstveni problemi što je još izraženije u grupi niskoobrazovane populacije. (26, 27) Prema istraživanju Svjetske zdravstvene organizacije, u svijetu je oko 1.25 milijardi pušača i to dominantno u zemljama u razvoju, iako niti u razvijenim zemljama taj broj

nije zanemariv.(28) Pušenje je u svijetu drugi po važnosti rizični čimbenik za smrt i treći za visoki *Disability-Adjusted Life Years* (DALY) posljedično razvoju kroničnih bolesti, ali i akutnih komplikacija pušenja.(29) Povezanost nastanka astme i pušenja još uvijek nije jednoznačno dokazana, ali je nađeno da je u prethodno asimptomatskih tinejdžera, pušenje bilo povezano s pojavnošću simptoma sličnih astmi nakon perioda od 6 godina uz pojavu bronhalne hiperreaktivnosti.(28, 30) Negativni utjecaji pušenja na astmu su brojni te ću u nastavku izdvojiti samo neke. Pušenje modelira fenotip astme, stvara proinflamatorni milje u bronhima, omogućuje razvoj značajnih komorbiditeta (npr. emfizem, KOPB, aterosklerotska bolest srca...), osobit je rizični faktor za razvoj astme u starijoj populaciji, povezano je s nižim forsiranim ekspiracijskim volumenom u prvoj sekundi (FEV1) u odnosu na bolesnike s astmom koji su nepušači, brži je i veći pad plućne funkcije uz slabiju kontrolu bolesti, predstavlja rizik od većeg mortaliteta i morbiditeta, veće su potrebe za lijekovima koji olakšavaju simptome uz slabiji odgovor na inhalacijsku terapiju, uključujući beta agoniste i kortikosteroide i lijekove koji ublažavaju simptome alergije, astma je teža i češći su posjeti hitnoj službi uz učestalije hospitalizacije i dulji boravak u bolnici.(31-41) Osim toga, elektronske cigarete i inačice čije je korištenje u zadnje vrijeme sve popularnije, nikako nisu terapija prilikom odvikavanja od pušenja, već i same predstavljaju nezavisni rizični čimbenik za pojavu astme, KOPB-a i sindroma preklapanja čak i s većom učestalošću u odnosu na „konvencionalne“ nikotinske cigarete.(42) Iz svega navedenog proizlazi da bi imperativ svakog liječnika uključenog u skrb za bolesnike s astmom trebala biti prevencija pušenja i poticanje na nepušenje.

Drugi navedeni javnozdravstveni problem je debljina, čija se prevalencija u svijetu povećala 3 puta u posljednjih 40 godina.(43) Osim poznatih kardiovaskularnih komplikacija vezanih uz debljinu, debljina koja se javlja u bolesnika s već prisutnom astmom je vezana uz fenotip bolesti s ranijom pojavnošću astme (primjerice u djece je šansa za astmu 50% veća u pretilih), atopijom, značajnijim opstruktivnim smetnjama ventilacije i slabijim odgovorom na uobičajenu terapiju inhalacijskim steroidima i bronhodilatatorima, a smanjenje tjelesne mase vodi boljoj kontroli bolesti, blažem obliku astme i boljoj kvaliteti života.(25, 43-46) S druge strane, pojavnost astme u bolesnika koji od ranije boluju od debljine je vezana uz kasniji nastanak bolesti, predominantno u žena, i blaži oblik astme u odnosu na prethodno opisani fenotip.(43) Jedno od objašnjenja za opisane probleme je to što je debljina uzrokom i brojnih komorbiditeta (npr. metabolički sindrom, gatroezofagealni refluks, arterijska hipertenzija...), a nađeno je da je u slučaju 3 ili više komorbiditeta u bolesnika s astmom, kvaliteta života značajno narušena i prisutna je ozbiljnija slika bolesti.(47, 48) Astma u pretilih je dakle prepoznata

kao samostalni fenotip i kompleksni sindrom, ali i bitna komplikacija teške astme te je posljedično gotovo 40% oboljelih od teške astme debelo.(49) Promjene koje se događaju u ovoj skupini bolesnika su kompleksne i mogu se pratiti od genske razine, molekularne i stanične, s povećanom količinom proinflammatoryh citokina u bronhalnoj sluznici (primjerice IL6, IL8, IL13, IL17, IL23, IFN- $\gamma$ ) i serumu, promjenu crijevnog i plućnog mikrobioma, povećanje krvne neutrofilije uz promjenu funkcije neutrofila i regrutaciju makrofaga i ostalih inflamatornih stanica, sklonost infekcijama, remodelaciju dišnih puteva i varijabilni odgovor na biološku terapiju teške astme što sve ukazuje na lokalne, ali i sistemske komplikacije.(43, 50-52)

#### **1.4. ENDOTIPOVI, FENOTIPOVI, TERAPIJA I BIOMARKERI U PRAĆENJU ASTME**

Cilj liječenja svake bolesti, pa tako i astme, je naravno individualizirani pristup. Međutim, radi potreba kreiranja terapija, smjernica, učenja i znanstvenih istraživanja, grupiranje određenih značajki bolesti pod zajednički nazivnik čini te procese jednostavnijima i efikasnijima. Zbog toga je u zadnje vrijeme nastupio procvat raznih vrsta tipiziranja astme, istražuju se genotipovi, endotipovi, fenotipovi, teratipovi itd. Cilj je proniknuti u samu srž astme, odgonetnuti način na koji nastaje i na koji dovodi do najteže kliničke slike te onda u konačnici otkriti najefikasniju terapiju. Osim toga, dio procesa je i otkrivanje najrelevantnijih biomarkera koji će poslužiti ne samo u dijagnostici bolesti, nego i u pronalasku najboljih kandidata za visokospecifičnu terapiju kao što je biološka te praćenju odgovora na nju.

Pojam fenotipova predstavlja grupiranje određenih značajki bolesti (primjerice dobi, okidača, vrste inflamatornih stanica, ...).(53) Negativna strana fenotipa je što mogu biti rezultat različitih patofizioloških mehanizama i dosta su podložni promjenama u vremenu, a osim toga, jedan bolesnik može pripadati različitim fenotipskim grupama.(53-55) U kliničkoj praksi se vjerojatno najčešće oslanjamo na fenotipove kod pristupa bolesniku te se ugrubo astma dijeli na T2 i ne-T2 fenotip. U te 2 velike fenotipske grupe se ubrajaju brojne podskupine koje su izniknule iz nekoliko velikih multicentričnih istraživanja koja su se bavila stvaranjem tzv. klastera astme.(56-62) U Tablici 1 i 2 pobrojane su navedene studije i izdvojene najbitnije značajke.

Tablica 1.

<b>Astma rane pojavnosti</b>  ▪ prisutna alergija ▪ T2 imunološki odgovor	<b>PLUĆNA FUNKCIJA OČUVANA (↑FEV1)</b>  ▪ SARP klaster 1 i 2, U-BIOPRED klaster 1, Leicester studija klaster 3, TEA klaster 3, EGEA klaster 3
	<b>PLUĆNA FUNKCIJA NARUŠENA (↓FEV1)</b>  ▪ SARP klaster 4, U-BIOPRED klaster 4, Leicester studija klaster 1, Miješani granulocitni klaster

Prema radu Kaur i sur., 2019. SARP-Severe Asthma Research Program, U-BIOPRED-Unbiased Biomarkers in Prediction of Respiratory Disease Outcome, TEA- transcriptomic endotypes of asthma, EGEA-epidemiological study on the genetic and environment of asthma



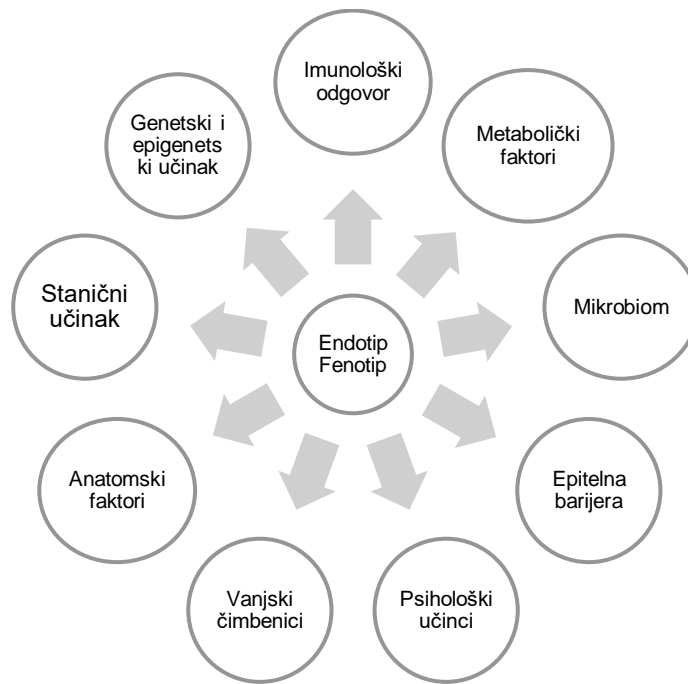
Tablica 2.

<b>Astma kasne pojavnosti</b>  •nije prisutna alergija	<b>PLUĆNA FUNKCIJA OČUVANA (↑FEV1, T2)</b>  ▪ SARP klaster 3+pretili, U-BIOPRED klaster 2+pretili, Leicester studija klaster 4, TEA klaster 1, EGEA klaster 2, Eozinofilni klaster
	<b>PLUĆNA FUNKCIJA NARUŠENA (↓FEV1, ne-T2)</b>  ▪ SARP klaster 5, U-BIOPRED klaster 4, Leicester studija klaster 2, TEA klaster 2, EGEA klaster 1+pretili, Neutrofilni klaster

Prema radu Kaur i sur., 2019. SARP-Severe Asthma Research Program, U-BIOPRED-Unbiased Biomarkers in Prediction of Respiratory Disease Outcome, TEA- transcriptomic endotypes of asthma, EGEA-epidemiological study on the genetic and environment of asthma

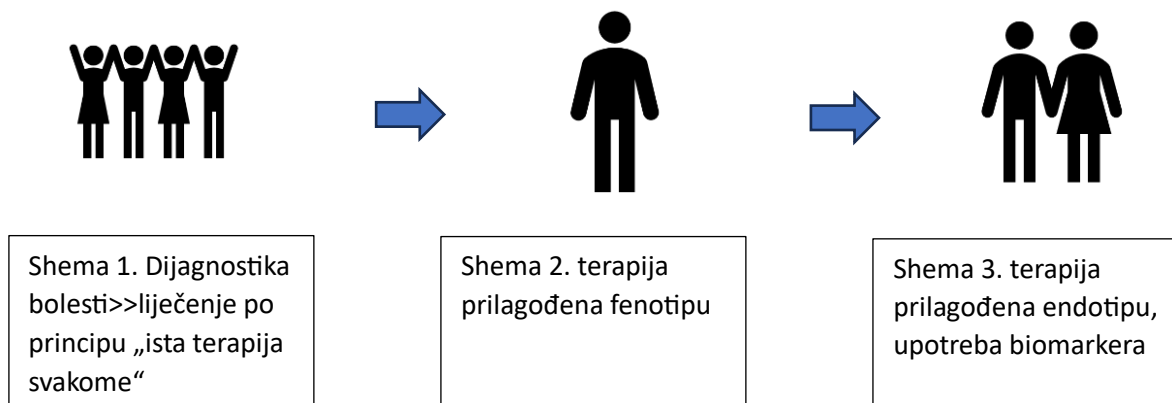
Provedene su studije obuhvatile veoma heterogene populacije iz više zemalja i dosta se međusobno razlikuju prema faktorima koji su uključeni u postupak stvaranja grupa (primjerice dob, spol, rasa, prisutnost opstrukcije ...), ali se svedeno mogu izdvojiti 4 glavna fenotipa astme kako je ranije navedeno.(56)

Iz potrebe za što većom dijagnostičkom preciznošću su se izdvojili endotipovi, kompleksne grupe, a koje omogućavaju razumijevanje astme na molekularnoj i staničnoj razini i otvaraju put prema što točnijoj primjeni biološke terapije uz napomenu da se različiti endotipovi mogu prezentirati na sličan način. (53) Također, kao i fenotipovi, niti endotipovi nisu statični te su podložni promjenama pod utjecajem raznih vanjskih i unutarnjih čimbenika (Slika 1) te je stoga bitna konstantna reevaluacija kliničkog stanja bolesnika.



Slika 1. Prilagođeno prema Agache i Akdis, 2019.

Smisao svih ovih postupaka grupiranja je pronaći pogodne biomarkere koji će biti upotrebljivi ne samo u kliničkim ispitivanjima, nego i u svakodnevnoj dijagnostici i liječenju bolesnika (Slika 2).



Slika 2. Prilagođeno prema Bagnasco i sur. 2020.

Biomarkeri također nisu jednakovrijedni za kliničku praksu. Razlikuju se po dostupnosti, ponovljivosti i cijeni izvođenja. Jedna od praktičnih podjela je na one koji su dijagnostički (za procjenu je li bolest uopće prisutna), prediktivne (za procjenu hoće li određeni terapijski postupak imati pozitivnog učinka), dinamičke (mijenjaju se kako se bolest mijenja npr. pod utjecajem specifične terapije) i stabilne (kao primjerice polimorfizmi jednog nukleotida, SNP, iako je i to samo u slučaju da ne dođe do mutacije ili epigenetske promjene).(63) Uz to, kombinacija biomarkera ima veću dijagnostičku težinu od bilo kojeg pojedinačnog.(63)

Na žalost, trenutačno na raspolaganju imamo pretežno biomarkere relevantne za T2 imunološki odgovor pa se u tom smjeru uspješno razvijala i biološka terapija astme. Udio ovog fenotipa, obilježenog eozinofilijom, u populaciji bolesnika s astmom je varijabilan i ovisno o studiji, kreće se od 20-60%.<sup>(64)</sup> Patofiziološki i upalni procesi u T2 fenotipu astme obilježavaju visoke razine citokina tipa 2: IL-5, IL-4, IL-13, IL-9, IL-25, IL-33 i timusnog stromalnog limfopoetina (TSLP). Ovi citokini djeluju kao stimulatori eozinofilne proizvodnje i sazrijevanja, ekstruzije iz koštane srži, regrutacije u tkiva (bronhe i plućni parenhim) proliferacije i čimbenika diferencijacije što u konačnici vodi hiperreaktivnosti bronha, hiperplaziji vrčastih i glatkih mišićnih stanica, angiogenezi, subepitelnoj fibrozi i razvoju astme.<sup>(65-67)</sup> Najvažnije stanice u ovoj vrsti astme su epitelne stanice i Th2 pomoćne CD4+ stanice koje izlučuju ove citokine i aktiviraju druge prirodene i adaptivne imunološke stanice - bazofile, mastocite, eozinofile, B limfocite.<sup>(65, 66)</sup>

U Tablici 3 su pobrojani odabrani značajni biomarkeri astme, a u Tablici 4 dostupna biološka terapija teške astme u Hrvatskoj.

Tablica 3 Biomarkeri u astmi

Naziv biomarkera	Uzorak	Relevantna funkcija	Značajke i uloga
Eozinofili	Krv, sputum	D, P, Di	Razina ovisi o terapiji, ukazuju na nekontroliranu astmu i težu kliničku sliku, dijagnostički >150-300 st/μl krvi (>2-3% u sputumu), u odabiru biološke terapije
Neutrofili	Krv, sputum	D	Marker ne-T2 upale (>40-64% u sputumu), nema pouzdanih referentnih vrijednosti u krvi za astmu, podložan utjecaju vanjskih faktora, npr.

---

			atipične infekcije i kortikosteroida, češće u astmi pojavnosti u odrasloj dobi
Eozinofilni kationski protein	Krv, sputum	D, P, Di	Ukazuje na tešku astmu, pada po uvođenju uspješne terapije
IgE (ukupni i specifični)	Krv (iz B limfocita)	D, P, Di	Ukazuje na atopiju, viši u nekontroliranoj astmi, prediktor remodelacije, u odabiru biološke terapije
Periostin	Krv (iz epitelnih stanica i fibroblasta)	P, Di	Promotor subepitelne fibroze, vezan uz eozinofiliju, u odabiru biološke terapije, ali nije prediktor težine astme
FeNO	Izdahnuti zrak	P, Di	U odabiru biološke terapije, indikator eozinofilne upale (>50 ppb), nekontrolirane astme i dobrog odgovora na ICS
Bromotirozin	Urin (oksidacijski produkt, iz eozinofila)	P, Di	Induciran alergijom, više vrijednosti u nekontroliranoj astmi, prediktor odgovora na ICS
Eozinofilna peroksidaza	Krv (iz eozinofila)	D	Ukazuje na aktivaciju eozinofila i alergiju

---

Eozinofil-derivirani neurotoksin	Krv (iz eozinofila)	D, P, Di	Ukazuje na aktivaciju eozinofila i astmu sklonu egzacerbacijama i remodelaciji, pada kod uspješne terapije
Leukotrijen E4	Urin	D, P, Di	Dobar prediktor fenotipa aspirinske astme, težeg oblika i čestih egzacerbacija

Prilagođeno prema (63, 67-70). Dijagnostički-D, Prediktivni-P, Dinamički-Di, Stabilni-S-jedino vrijedi za SNP, inhalacijski kortikosteroid-ICS, *Fractional Exhaled Nitric Oxide*-FeNO, IgE-imunoglobulin E

Tablica 4 Biološka terapija astme u Hrvatskoj

<b>Naziv biološke terapije (humanizirano monoklonsko protutijelo)</b>	<b>Mehanizam djelovanja i način primjene</b>	<b>Indikacije prema HZZO</b>	<b>Učinak</b>
Omalizumab	Anti-IgE, 75-375 mg sc svaka 2 ili 4 tjedna, doza ovisno o tjelesnoj masi i ukupnom IgE	pozitivan kožni ili laboratorijski test na bar jedan od inhalacijskih alergena, povišena razina IgE (>30 IU/ml), FEV1 <60%, dnevni simptomi unatoč optimalnoj standardnoj terapiji	Poboljšana kontrola astme, smanjen broj egzacerbacija
Mepolizumab	Anti-IL5, sc, 100 mg mjesečno	Eo u krvi >150 stanica/μl na početku terapije, >300 stanica/μl u zadnjih 12 mj., FEV1<60%, ≥4 egzacerbacije koje su zahtijevale primjenu sistemskih	Poboljšana kvaliteta života, smanjen broj egzacerbacija za 39-52%

Reslizumab	Anti-IL5, iv, 3 mg/kg mjesečno	kortikosteroida ili u 6 mj. kontinuirano liječeni OCS-om u dozi $\geq 5$ mg prednizolona Eo u krvi $>150$ stanica/ $\mu$ l na početku terapije, $>300$ stanica/ $\mu$ l u zadnjih 12 mj., FEV1 $<60\%$ , $\geq 4$ egzacerbacije koje su zahtijevale primjenu sistemskih kortikosteroida ili u 6 mj. kontinuirano liječeni OCS-om u dozi $\geq 5$ mg prednizolona	Smanjen broj egzacerbacija za 50-59%
Benralizumab	Anti-IL5 receptor, sc, 30 mg mjesečno prve 3 doze, zatim 30 mg svakih 8 tjedana	Eo u krvi $>150$ stanica/ $\mu$ l na početku terapije, $>300$ stanica/ $\mu$ l u zadnjih 12 mj., FEV1 $<60\%$ , $\geq 4$ egzacerbacije koje su zahtijevale primjenu sistemskih kortikosteroida ili u 6 mj. kontinuirano liječeni OCS-om u dozi $\geq 5$ mg prednizolona	Povećanje prebronhodilatacijskog FEV1 za 106-159 mL, smanjen broj egzacerbacija za 45-51%
Dupilumab	Anti-IL4 receptor $\alpha$ (anti-IL4, anti IL-13), sc, prva doza 400 mg, zatim 200 mg svaka 2 tjedna	Eo u krvi $>150$ stanica/ $\mu$ l na početku terapije, FeNO $>25$ ppb, FEV1 $<60\%$ , $\geq 4$ egzacerbacije koje su zahtijevale primjenu sistemskih kortikosteroida ili u 6 mj. kontinuirano liječeni OCS-om u dozi $\geq 5$ mg prednizolona	Povećanje prebronhodilatacijskog FEV1 za 130-140 mL, smanjen broj egzacerbacija za 46-48%, poboljšana kontrola astme

Tezepelumab	Anti-TSLP, sc, 210 mg mjesečno	FEV1 <math>\leq 60\geq 4</math> egzacerbacije koje su zahtijevale primjenu sistemskih kortikosteroida ili u 6 mj. kontinuirano liječeni OCS-om u dozi $\geq 5$ mg prednizolona	Smanjen broj egzacerbacija za 62-71%, krvne eozinofilije, serumskog IgE i FeNO
-------------	--------------------------------------	--	---

Prilagođeno prema smjernicama HZZO-a, uputama proizvođača o primjeni lijeka, (56, 66). Interleukin-IL, imunoglobulin E-IgE, Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje-HZZO, forsirani ekspiracijski volumen u 1. sekundi-FEV1, supkutano-sc, intravenski-iv, timusni stromalni limfopoetin-TSLP, eozinofili-Eo, oralni kortikosteroid-OCS, frakcijska koncentracija izdahnutog dušikovog oksida-FeNO

Nasuprot tome, za ne-T2 astmu (tip 1 i tip 3 imunološki odgovor koji je zajednički astmi, infekcijama, autoimunskim bolestima i neoplazmama) još ne postoji specifična terapija niti biomarkeri koji bi bili komercijalno dostupni i upotrebljivi u svakodnevnoj kliničkoj praksi (u zadnje vrijeme postoje pokušaji upotrebljavanja mikro-RNA (mikro -ribonukleinska kiselina) molekula i različitih citokina i alarmina). (67, 68, 71) Ne-T2 astma je obilježena često težom kliničkom slikom, slabim odgovorom na postojeće terapijske opcije, neutrofilijom, izostankom alergijske diateze i trajnom remodelacijom dišnih puteva. (67, 68) Ono što je specifično za ovaj endotip je značajna ovisnost o „vanjskim“ utjecajima, kao primjerice infekcije, pušenje, uvjeti života, zagađenost zraka ili debljina na koje se može intervenirati i nefarmakološkim mjerama, a s druge strane još ukazuje da je endotip astme ne samo prirodno stanje, već i uvelike rezultat okolišnih čimbenika. (53, 67)

Smisao svih nastojanja da se pronikne u patofiziologiju astme je naravno kontrolirana bolest, efikasna terapija i dobra kvaliteta života bolesnika. Na kraju ovog poglavlja navedeni su kriteriji za definiranje dobro kontrolirane astme, dobrog odgovora na liječenje biološkom terapijom, odnosno remisije bolesti (Slika 3, Tablica 5).

## SUPER ODGOVOR NA BIOLOŠKU TERAPIJU ASTME: VELIKI KRITERIJI

- eliminacija egzacerbacija
- veliki napredak u kontroli astme ( $\geq 2x$  minimalno klinički značajna razlika)
- ukidanje terapije oralnim steroidima (ili smanjenje doze ovisno o adrenalnoj insuficijenciji)

## SUPER ODGOVOR NA BIOLOŠKU TERAPIJU ASTME: MALI KRITERIJI

- 75% smanjenje egzacerbacija
- dobra kontrola astme (ACT > 19, ACQ < 1.0)
- $\geq 500$  ml porast FEV1

Slika 3. Prema (72). Za potvrdu su potrebna barem 3 kriterija, od čega 2 trebaju biti veliki; procjena kroz 12 mjeseci

(*Astma Control Test*-ACT, *Asthma Control Questionnaire*-ACQ, forsirani ekspiracijski volumen u 1. sekundi-FEV1)



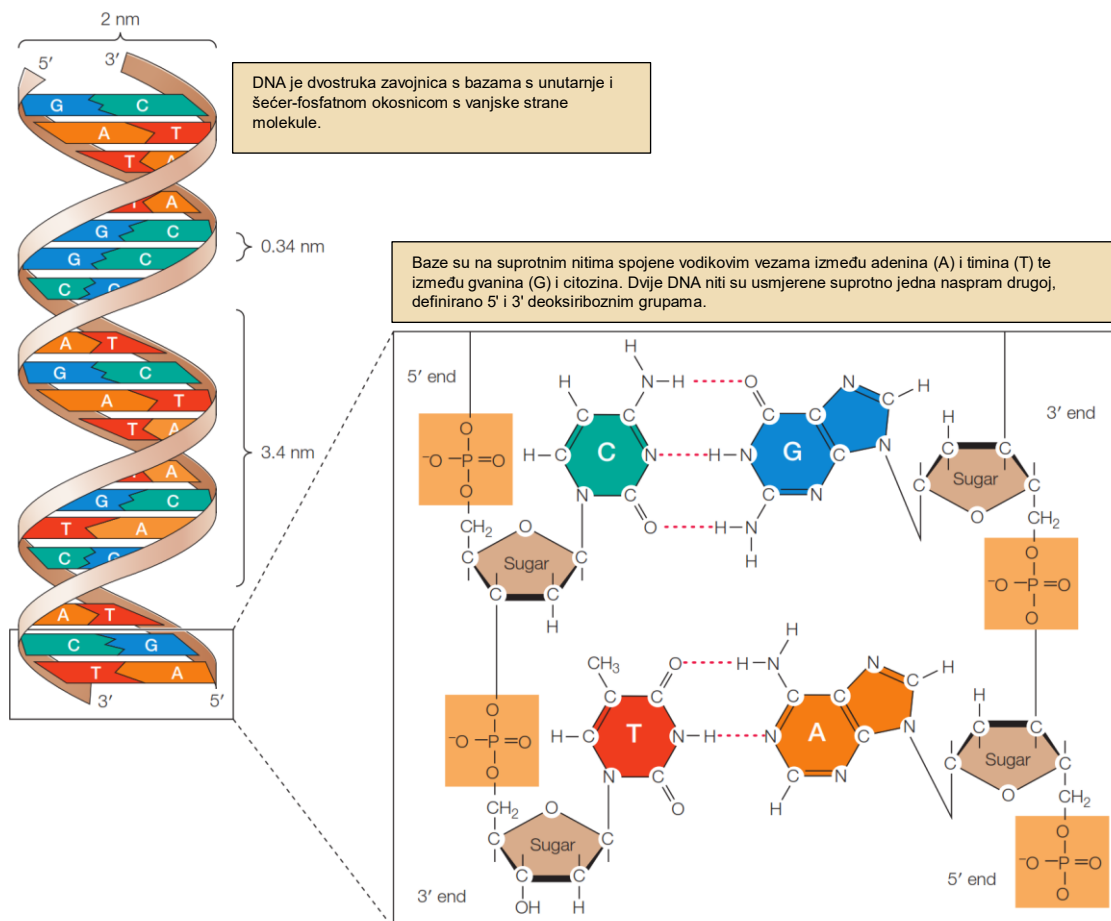
Tablica 5. Kriteriji za kliničku remisiju u astmi. Prema (73).

<b>Djelomična klinička remisija</b>	<b>Potpuna klinička remisija</b>
<p>Postiže se kad nema potreba za korištenjem oralnih steroida uz barem 2 od sljedeća 3 kriterija:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. nema simptoma astme</li><li>2. nema egzacerbacije astme</li><li>3. stabilna plućna funkcija</li></ol> <p>U periodu praćenja od &gt;12 mj. uz ACT 20-25, ACQ&lt;1.5</p>	<p>Postiže se kad nema potreba za korištenjem oralnih steroida uz sva 3 kriterija:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. nema simptoma astme</li><li>2. nema egzacerbacije astme</li><li>3. stabilna plućna funkcija</li></ol> <p>U periodu praćenja od &gt;12 mj. uz ACT 20-25, ACQ&lt;1.5</p>

*Astma Control Test-ACT, Asthma Control Questionnaire-ACQ*

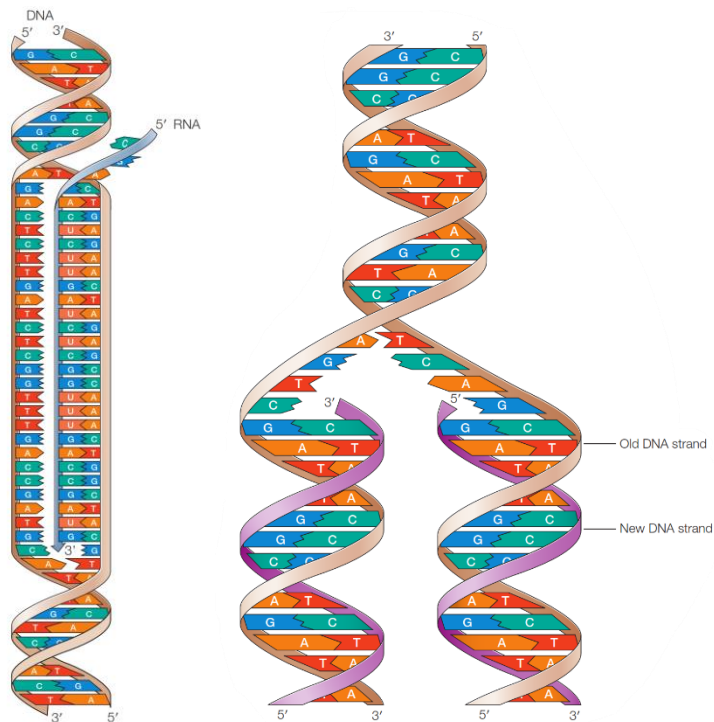
## 1.5. GENETIKA-TUMAČENJE POJMOVA

Molekularna biologija i genetska istraživanja astme, stvorila su preduvjet za napredne metode liječenja kakve danas posjedujemo. Osnovni cilj tih studija je proniknuti u gensku informaciju i što temeljitije razumjeti principe zdravlja i bolesti. Glavni smisao eukariotskih stanica je prijenos navedenih informacija na potomstvo sa što manje grešaka što je riskantan proces. Da bi to bilo moguće potrebno je informacije na neki način sažeti i očuvati od negativnih utjecaja koji bi ih mogli promijeniti. U ljudskim stanicama, kao glavni nositelji informacija su molekule nukleinske kiseline-deoksiribonukleinska kiselina (DNA) koja je smještena u jezgri i ribonukleinska kiselina (RNA) (Slika 4).



Slika 4. Struktura DNA. Preuzeto iz (74).

Dok je uloga DNA pohrana informacija, RNA ima brojne stanične zadaće, a sve kako bi se informacija pretvorila u proteine, glavne efektorske molekule: glasnička RNA (mRNA) prenosi informacije od DNA do ribosoma, ribosomska RNA (rRNA) i transportna RNA (tRNA) omogućavaju sintezu bjelančevina, razne druge vrste RNA koje mogu djelovati u doradi i prijenosu proteina i kao katalizatori kemijskih reakcija.(74-76) Po sastavu su DNA i RNA nukleotidni polimeri građeni od purinske i pirimidinske baze spojene na fosforilirani šećer. U DNA ulaze adenin i gvanin (purini) i citozin i timin (pirimidini). RNA se razlikuje od DNA po tome što, umjesto timina, sadrži uracil. Baza nukleinske kiseline vezana na šećer (2'-deoksiribozu u DNA, odnosno ribozu u RNA) se naziva nukleozid, a na 5'-ugljik nukleozidnog šećera je još spojena jedna ili više fosfatnih skupina.(74) DNA je dvostruka zavojnica u kojoj se adenin spaja s timinom, a citozin s gvaninom te svaka zavojnica DNA, djeluje kao model za sintezu komplementarnog lanca (mogućnost samoreplikacije).(74) Oblikovanje nukleinskih kiselina, velikih polinukleotida, se naziva polimerizacija i omogućava ju kreacija fosfodieterskih veza između 5'-fosfata jednog nukleotida i 3'-hidroksila drugog nukleotida. Odmotani lanac DNA također se može koristiti kao kalup za formiranje komplementarnog lanca RNA u procesu koji se naziva transkripcija nakon čega slijede posttranskripcijski procesi i formiranje mRNA iz pre-RNA. Potom slijedi translacija, u kojoj se mRNA pretvara u definirani niz aminokiselina, tj. u bjelančevinu.(74) Sintaza nukleinskih kiselina uvijek teče od 5' prema 3' kraju, a u tom smjeru se po dogovoru ispisuju i slijed baza što je u suštini informacija sadržana u DNA i RNA.(74)

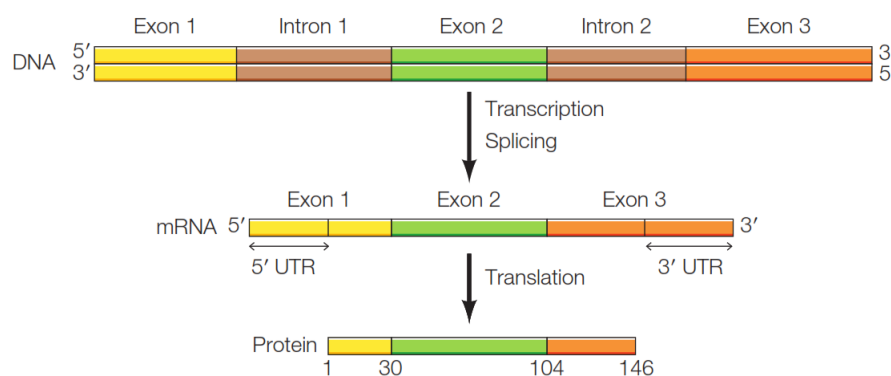


Slika 5. Stvaranje nove RNA i DNA iz kalupa DNA zavojnice [74]

### 1.5.1. GENI, LOKUSI, HAPLOTIPOVI, KROMOSOMI I GENOM

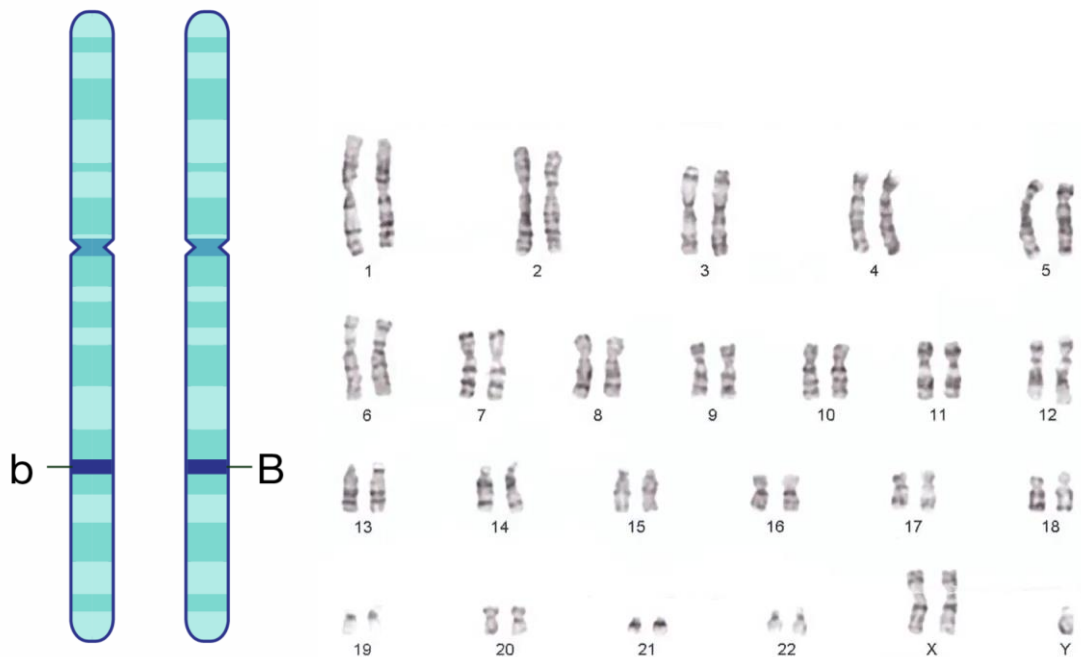
Gen je dio DNA koji se nasljeđuje i čiji je funkcionalni produkt protein koji u konačnici definira neku osobinu stanice, odnosno organizma. Jedna genska kopija koja se nasljeđuje naziva se alel, a dobivaju se ukupno 2, po jedan od majke i oca. Kombinacija alela na jednom kromosomu koji se nasljeđuju zajedno zovu se haplotip te često služe za pronalazak rizičnog gena ili lokusa za neku bolest (asocijacijske studije).(77) Aleli se mogu naslijediti u 3 oblika: homozigot (2 ista alela, najčešće divljeg tipa), heterozigot (aleli se razlikuju) i homozigot, ali za rijetki oblik alela (polimorfizam, minor alel) s varijabilnom pojavnošću u populaciji.(77) Upravo su istraživanja frekvencija tih varijanti alela (minor allele frequency-MAF) česti predmet genomskih studija budući da kao rezultat mutacija, budu razlog nastupu bolesti (u jednom istraživanju je čak >50% rizičnih alela bilo minor alel).(74, 78) Osobine koje se tako nasljeđuju mogu biti dominantne ili recesivne, a kompletna genska kompozicija se naziva genotip koji u suradnji s okolišem daje fenotip.(74) U DNA, međutim, nije svaki dio kodirajući, tj. ne daje svaki dio informaciju za protein. Takvi prostori između gena nazivaju se razdvojeni sljedovi, a unutar gena su to introni. Udio introna u ljudskom genu je veći od 90% i imaju bitnu ulogu u kontroliranju ekspresije gena te povijesno u evoluciji. Dio

pak gena koji je kodirajući je egzon i gen prosječno sadrži njih oko 9. Sami introni nisu direktno nužni za funkcioniranje gena te se oni u konačnici uklanjaju na kraju prepisivanja prekrajanjem te samo egzoni ulaze u konačnu verziju mRNA.(74) Ipak, postoje i segmenti egzona koji su nekodirajući, iako su polimorfizmi gena u tim segmentima s većom vjerojatnošću funkcionalni, nego nekodirajući segmenti u intergenskim dijelovima DNA ili intronima.(79) Ljudski genom ima oko 30 000 do 40 000 gena, prosječne duljine oko 14 kb, drugim riječima, samo oko 1-1.5% ljudskog genoma kodira bjelančevine dok ostatak povećanja genoma u viših eukariota nastaje zbog ponovljenih sljedova i introna.(74-76) Iako se taj postotak doima malen, pogotovo u usporedbi s nekim drugim organizmima, procesi prekrajanja su u konačnici zaslužni za veliku varijabilnost u prirodi. Uz to, iako je svačiji genom jedinstven (izuzev jednojajčanih blizanaca), ljudi ipak međusobno dijele 99.6% sekvence DNA.(80, 81)



Slika 6. Pojednostavljeni proces prepisivanja i prevođenja. Preuzeto iz (74).

Sav genetski materijal je pohranjen u jezgri te je uklopljen s proteinima nazvanim histoni u kompleks koji se zove nukleosom, a koji je dio veće strukture kromatina. Na taj je način moguće DNA ukupne duljine od gotovo 2 m smjestiti u 5-10  $\mu\text{m}$  veliku jezgru stanice.(74) Tijekom metafaze, dolazi do kondenzacije kromatina što omogućava dijeljenje kromosoma. Ljudi posjeduju u normalnom slučaju 23 para kromosoma (kariotip) naslijeđena od oca i majke, 22 para autosoma i 1 par spolnih kromosoma, X i Y. Mjesto na kromosomu (fizička lokacija) na kojem se nalazi određeni gen naziva se lokus.(82)



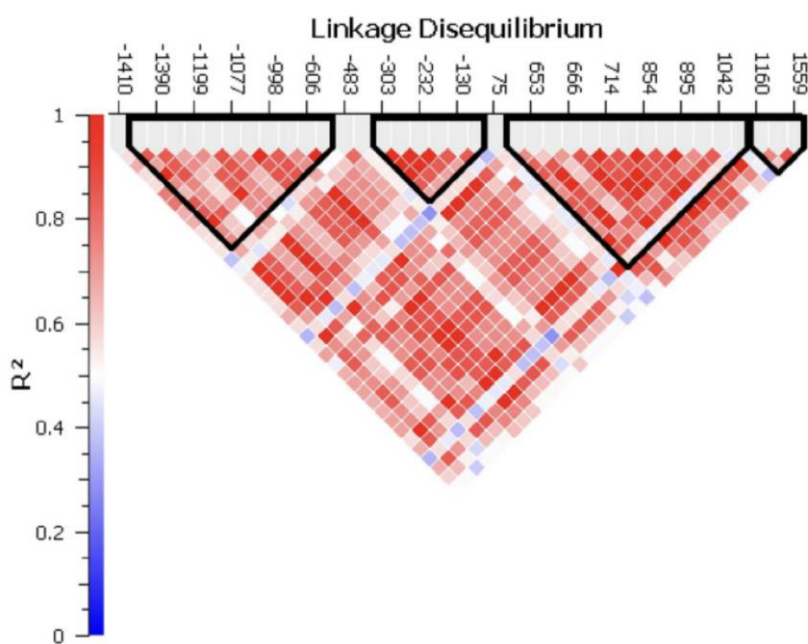
Slika 7. Aleli na kromosomima i ljudski kariotip

Preuzeto s <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Allele> i <https://study.com/academy/lesson/karyotype-definition-disorders-analysis.html>

### 1.5.2. POLIMORFIZMI JEDNOG NUKLEOTIDA I DISEKVILIBRIJ VEZANJA

Budući da je DNA molekula koja je dio kemijskih reakcija, na njoj se događaju brojne promjene procesima insercije, delecije, inverzije, amplifikacije koje imaju različite ishode, ponekad i nepoželjne, a kada nastupa popravak DNA izravnim obratom, izrezivanjem oštećenja, rekombinacijom ili popravkom koji je sklon pogreškama.(74) Najbazičnije mutacije događaju se na razini jednog nukleotida (polimorfizmi jednog nukleotida, *single nucleotide polymorphisms*-SNP) i najčešći su tip varijacije ljudskog genoma (u oko 90% slučajeva) te se događaju na svakih 100-200 parova baza.(83) Ipak neki SNP se javljaju i puno nižom frekvencijom (<5%; 1-singlet, 2-dublet).(77) Ti polimorfizmi ne vode nužno nekoj promjeni, ali jednako tako mogu biti zaslužni za razvoj patološkog stanja pa čak i onda kad se nalaze u dijelu introna koji je inače nekodirajuća regija, vjerojatno indirektno putem utjecaja na prekrajanje glasničke RNA.(84) Ovisno o frekvenciji u populaciji, SNP mogu biti major ili minor aleli, a ovisno o rezultatu, tj. kodiraju li protein ili ne, sinonimni ili nesinonimni.(77) U ljudskom genomu se može pronaći otprilike 10 milijuna SNP-ova što je zaslužno za 90% varijabilnosti u populaciji. (85) Upravo je njihova brojnost, varijabilnost i relativna jednostavnost, uz smanjenje troškova i pojednostavljivanje postupaka obrade bioloških uzoraka, razlog da su SNP česta meta asocijacijskih genskih studija.(86) Ono što je problem je povezati otkriveni SNP s određenom osobinom od interesa, tj. dati statističku

težinu pronađenom. U analizi navedenog, koriste se u današnje vrijeme velike baze podataka kao što su primjerice dbSNP, UCSC Genome Browser, Ensembl, GWAS Catalog, Swiss-Prot, HaploReg.(87) Rezultati analize prema tome mogu biti sljedeći: 1. SNP je doista uzročnik nekog fenotipa po principu Mendelovog ili kompleksnog nasljeđivanja, 2. SNP koji je pronađen je u biti u blizini stvarnog uzročnog lokusa, češće se pojavljuje i nasljeđuje zajedno s njim posljedično evolucijskim procesima (u visokom je deisekvilibrju vezanja, *linkage disequilibrium*-LD, što je često u ljudskom genomu) i sam nije pravi uzročnik fenotipa, 3. veza SNP i fenotipa je posljedica populacijskog miješanja, 4. lažno pozitivan nalaz (trebalo bi se rijetko događati uz pravilnu kontrolu kvalitete višestrukim testiranjima).(85, 88-94)



Slika 8. Prikaz LD-a s blokovima haplotipova. Preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/LD-plot-for-Pun1-showing-defined-haplotype-blocks-doi101371-journalpone0086393g003\\_fig3\\_268119868](https://www.researchgate.net/figure/LD-plot-for-Pun1-showing-defined-haplotype-blocks-doi101371-journalpone0086393g003_fig3_268119868)

Iako je scenarij iz prvog slučaja moguć, u većini sindroma, kao što je i astma, ipak je situacija oko uzročno-posljedične veze kompleksnija i potreban je cijeli haplotip, a ne pojedinačni SNP da bi došlo do promjene fenotipa. Tako se u istraživanjima, ljudski genom može podijeliti u blokove haplotipa (Slika 8), očuvane regije različite duljine, a između kojih se najčešće događaju mutacije.(95) Prednost istraživanja haplotipa leži u tome da se proučavaju uzroci promjena u više aminokiselina, a ne samo jednoj, što daje potpuniju sliku nekog fenotipa te se povećava statistička snaga asocijacijske studije.(96, 97) S praktične strane, haplotipovi znače i uštedu novca i vremena budući da nije potrebno genotipizirati svaki pojedinačni SNP, nego se odabere obilježavajući SNP (tagSNP; iz dostupne baze podataka prema LD-istražuje se obično po 100 kb uzvodno i nizvodno od interesantnog

gena, rezultatima ranijih genomskih studija, informacijama o populaciji od interesa i informaciji o pretpostavljenoj funkciji SNP, tj. istraživač odabire SNP koji će biti najinformativniji za istraživanu grupu SNP-ova) koji će pokriti što veću genotipsku regiju, a istovremeno bez značajnog negativnog utjecaja na varijabilnost koju bi inače dao puni set SNP-a.(89, 98) Ovo je moguće samo u slučaju da je istraživana regija barem djelomično poznata, inače se mora analizirati svaki pojedinačni SNP. U ovom radu će LD biti prikazan kao koeficijent korelacije ( $r^2$ ) između alela na nekom lokusu kao na Slici 8, a služi za procjenu približne potrebne veličine uzorka u studiji i odražava statističku snagu studije.(89)

### 1.5.3. ODABIR POPULACIJE, GENSKJE STUDIJE I HARDY-WEINBERG EKVILIBRIJ

Za istraživanje genske podloge kompleksnih bolesti kao što je astma, potreban je dobar odabir uzoraka i kontrola, ukoliko je moguće gena od interesa i u konačnici adekvatnog oblika studije. U određenom dijelu, situacija u studiji nikad nije savršeni odraz stvarnog stanja jer primjerice većinom bolesnici s nekom bolešću, recimo astmom, dolaze iz neke zdravstvene ustanove s već postavljenom dijagnozom (pitanje je reprezentativnosti, klinike u bolnicama obično imaju teže oblike bolesti u praćenju nego primarna zdravstvena zaštita), kontrolna skupina se ne smije previše razlikovati od ispitivane grupe (uparivanje s druge strane prilično pojednostavljuje i idealizira „prirodno“ stanje populacije osobito kada se istražuju geni), u istraživanje se ponekad uzimaju već istraživane populacije iz ranijih studija tj. baza podataka čime se dobije na brojčanom stanju ispitanika, ali je pitanje odgovaraju li takvi uzorci trenutnim potrebama ispitivanja.(99) U Tablici 6 pobrojani su neki uobičajeni modeli ispitivanja genoma.

Tablica 6.

Vrsta studije	Osnovne značajke
<b>Analiza povezanosti (<i>Linkage analysis</i>)</b>	Pri tumačnju nasljeđivanja određenog fenotipa i genotipa, rezultati neovisni od hipoteze, identificira haplotip koji se nepromijenjen proteže kroz više generacija, interesne regije obuhvaćaju velik broj gena te se mora odabrati markere radi finog



---

mapiranja i  
pronaska  
najznačajnijih gena,  
gen uzročnik neke  
bolesti se pronalazi  
temeljem njegove  
pozicije u genomu,  
obično otkriva gene  
koji imaju jaki utjecaj  
na fenotip, uobičajeno  
studije koje se  
provode na obiteljima

### **Analiza gena kandidata (*Candidate gene studies*)**

\*korištena pri izradi ovog rada

Slučaj-kontrola  
studija, sudionici  
obično nisu u rodu,  
najčešće se  
prethodno odaberu  
geni od interesa iako  
se može istraživati  
bilo koji polimorfizam,  
imaju veću snagu za  
otkrivanje manjih  
efekata gena uz isti  
broj ispitanika kao  
analize povezanosti,  
kompleksne bolesti  
ograničavaju snagu  
ove studije, pozitivne  
asocijacije mogu  
nastati ne samo zbog  
stvarne uzročno-  
posljedične veze, već  
i zbog greške tipa I,  
artefakata uslijed  
stratifikacije, LD-a

### **Asocijacijske studije čitavog genoma (*Genome-wide association studies-GWAS*)**

Analiza milijuna SNP-  
ova unutar genoma,  
spoj snage studija  
povezanosti i  
asocijacijskih studija,  
odlične za istraživanje  
etničkih razlika među  
osobinama, osobito  
pogodne za  
kompleksne bolesti  
kao što je astma

---

Sastavljeno prema (100-108).

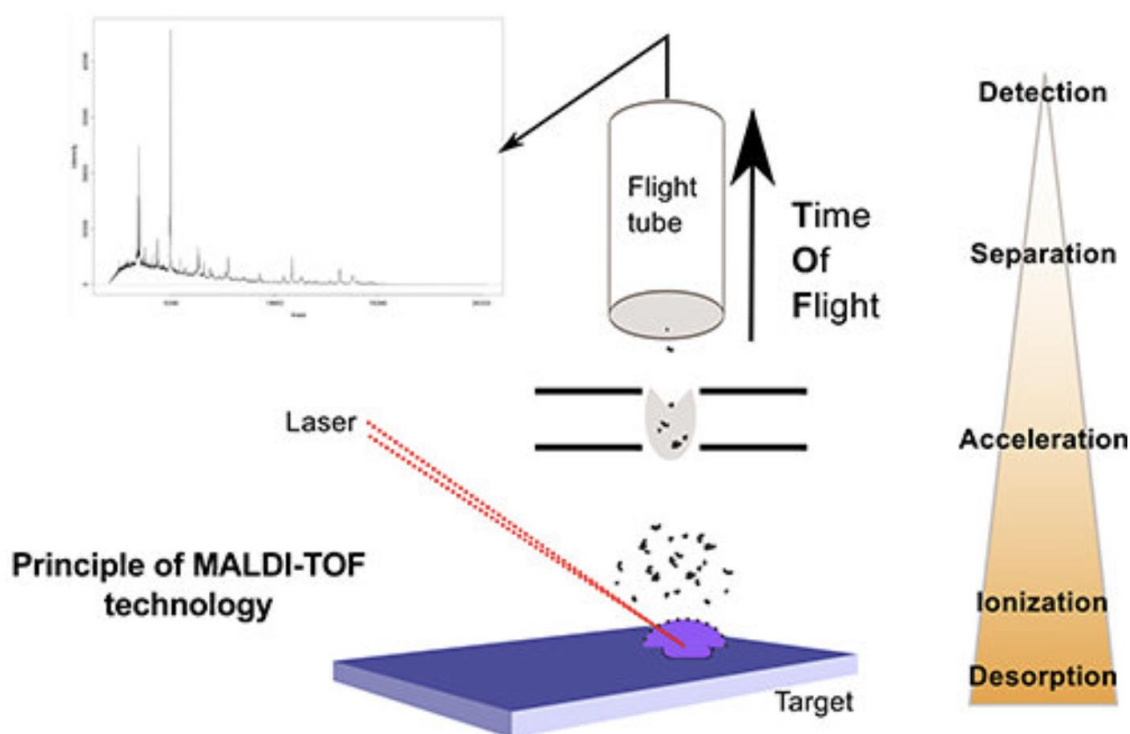
---

Odabir gena kandidata za asocijacijsku studiju temelji se na hipotezi da je određeni gen uzročnik fenotipa (u ovom slučaju bolesti) te se unutar njega pretražuju lokusi i traže sve moguće varijante, tj. SNP-ovi. Samim time je poželjno imati što više informacija o tom genu (kako odabir gena ne bi bio previše ograničen).(109) Odabrani geni kandidati mogu biti: funkcionalni (njihovi produkti uobičajeno uzrokuju određeni fenotip), pozicijski (njihova funkcija se predmnijeva temeljem poznate pozicije u genomu), geni odabrani temeljem usporedive funkcije u nekoj drugoj vrsti (primjerice mišu), a za kojeg se smatra da je evolucijski ostao konzerviran i u ljudskom genomu.(110, 111) Također, u finalnoj analizi događa se da genotipiziranje ne bude uspješno kod svakog ispitanika i takvi se uzorci onda moraju ukloniti iz finalne analize. Naravno, konačni je cilj da broj takvih slučajeva bude što manji zbog ispravnosti istraživanja, ali se u krajnjoj liniji mogu primijeniti statistički postupci koji mogu nadomjestiti podatke koji nedostaju.(112) Osim problema uzorkovanja, postoji zapravo i inflacija različitih statističkih testova koji se na kraju koriste za obradu podataka te je potrebno postaviti jasne razine značajnosti da bi se izbjegli neželjeni i prekobrojni rezultati i odabrati dobre markere koji će se koristiti u ispitivanju. Uobičajeno se onda u studijama primjenjuje Bonferronijeva korekcija kako bi se prilagodila p vrijednost i izbjegla statistička pogreška tipa I iako je i ovaj postupak dosta podložan kritikama.(113) U genomskim studijama se također vodi računa i o Hardy-Weinberg ekvilibriju (ravnoteži) koji se odnosi na raspodjelu nasljednih osobina u populaciji-u svakoj sljedećoj generaciji, proporcija određenih alela (frekvencija nekog genotipa) je konstantna.(114) Pomoću tog postulata, moguć je izračun frekvencije nekog alela u populaciji ukoliko je poznata učestalost genotipa i obrnuto, a također se koristi i u kontroli kvalitete provedene studije i detekciji greške u genotipiziranju.(98, 115-117)

#### **1.5.4. KONTROLA KVALITETE**

Neki segmenti kontrole kvalitete su već ranije navedeni. U to još ulazi i određivanje broja ispitanika u kojih se SNP može uspješno identificirati (stopa poziva, *call rate*) uz izračun učestalosti alela i stope podudarnosti specifičnih genotipova u slučaju višestruke tipizacije, koja bi po mogućnosti trebala biti barem iznad 95%, a idealno viša od 99.5% (ima smisla za studije s malim brojem ispitanika). Drugim riječima, u istraživanje ulaze samo SNP-ovi u kojim je dostupno barem 95% informacija.(118) Cilj je iz istraživanja izuzeti SNP-ove i ispitanike s genotipovima niske kvalitete kao i kontaminiranu DNA.

### 1.5.5. MALDI TOF



Slika 9. Shematski prikaz rada MALDI TOF

Preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-MALDI-TOF-MS-technology-This-drawing-describes-the-principle-of-the\\_fig4\\_259766659](https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-MALDI-TOF-MS-technology-This-drawing-describes-the-principle-of-the_fig4_259766659)

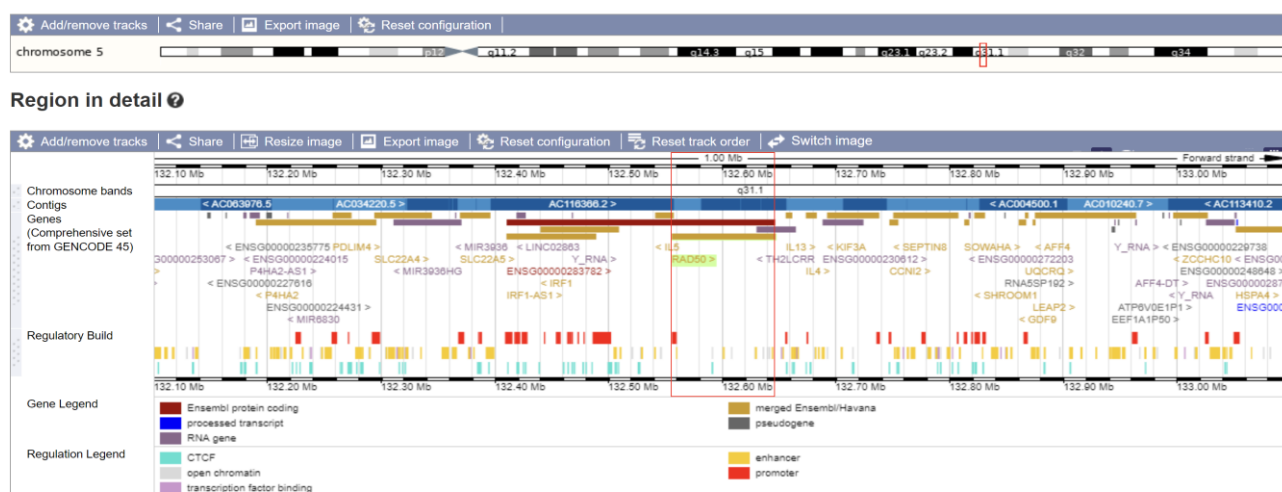
*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) odnosno masena spektrometrija s jednim fokusom ubraja se u genotipizacijske uređaje koji je u komercijalnu upotrebu ušao još 1942., a u obliku kakav je danas koristi 1980-tih.(119) MALDI-TOF-MS je analitička metoda visoke osjetljivosti koja omogućava analizu jednostrukih oligonukleotida koji se stave na matriks na pločici (MALDI dio). Potom se laserom specifične valne duljine obasja komplet matriksa/oligonukleotida i kokristala kroz nekoliko nanosekundi čime dolazi do desorpcije i ionizacije oligonukleotida koji se zatim ubrzava u električnom polju i rastavlja na ione ovisno o masi i naboju o čemu onda u konačnici ovisi vrijeme leta u vakumskoj cijevi (TOF dio).(119, 120) Upotreba MALDI-TOF-MS je široka i osim detekcije SNP-ova (i njihovih alelnih varijacija), omogućava i analizu mikrosatelitskih nestabilnosti, DNA metilacije i kvantifikacije molekula.(119)

## 1.6. ANALIZA GENA KANDIDATA ODRASLIH BOLESNIKA S ASTMOM U HRVATSKOJ POPULACIJI (CAAS)

Tsuo i sur. su 2022. objavili veliku meta-analizu GWAS u koju su uključene ukupno 22 biobanke diljem svijeta (153 763 slučaja i 1 647 022 kontrola) što je rezultiralo sa 179 lokusa povezanih s astmom. U obradi i tumačenju genetike astme se pokazala bitnom što veća raznolikost populacija (diversifikacija studija) radi što potpunije slike gena uzročnika astme.(121) U Hrvatskoj su sve dosadašnje slične studije uključivale dječju populaciju bolesnika s astmom, stoga je ovo prva studija gena kandidata za astmu u kojoj je analizirana odrasla populacija.

### 1.6.1. RAD 50

Chromosome 5: 132,556,019-132,646,349



Slika 10. Lokacija gena RAD 50 na kromosomu 5. Preuzeto s (122).

Gen RAD50 lociran je na kromosomu 5: 132,556,019-132,646,349, uzvodno (5q31.1), prilično je velik (>50 kb), ima 16 poznatih transkripata, odnosno varijanti i povezan je s brojnim fenotipovima: nasljednim varijantama karcinoma dojke i jajnika, poremećajem sličnom Nijmegenovom sindromu loma okarakteriziranom rijetkim kongenitalnim anomalijama, astmom i pridruženim alergijskim bolestima, osobito pojavnosti u dječjoj dobi, alergijskim rinitisom i atopijskim dermatitisom uz razne hematološke i razvojne poremećaje kao što je trombocitopenija, povećanje broja pro-B limfocita, smanjen broj T limfocita, abnormalna gametogeneza i smanjena plodnost.(122-124) Svestranost ovog gena u uzrokovanju naizgled nepovezanih stanja leži u činjenici da je proteinski produkt gena RAD 50 uključen u popravak dvostruke zavojnice DNA, s time da je njegova ekspresija u tkivima uobičajeno niska.(125) Direktna povezanost ovog gena i astme nije još dokazana, međutim,

kompleks MER11-RAD50-NBS1 ima ulogu u somatskim hipermutacijama i genskoj pretvorbi imunoglobulinskih regija što u konačnici ima ulogu u stvaranju brojnih imunoglobulina.(126) Iako je ova njegova uloga u stabilnosti DNA bitna, osobito kad se govori o prirođenim genskim bolestima i tumorigenezi, možda je u kontekstu astme još značajnije da je ovaj gen pozicioniran u kromosomskoj regiji zaslužnoj za produkciju IL-5, IL-13 i IL-4 čija je uloga u astmi već naveliko poznata, posebno od nedavno kao meta djelovanja biološke terapije teške astme.(127) Naime, gen za RAD50 se nalazi u snažnom LD-u s promotorskom regijom gena za IL-13, koji zajedno s IL-4 i drugim proinflamatornim citokinima, kao što je IL-5, čini okosnicu Th2 imunološkog odgovora, odnosno T2 astmatskog fenotipa.(125, 127, 128) Također se našla veza između RAD50 i povećanih razina IgE, iako se ponovno njegova samostalna uloga nije mogla dokazati zbog bliske veze s genom za IL-13 i regulatorne funkcije RAD50 gena na ekspresiju ovog interleukina.(124, 129) Regulacija samog gena RAD50 je pod utjecajem mnogih čimbenika što uključuje i epigenetske mehanizme kao što je utjecaj okoliša u kojem odrastaju djeca što iznova dovodi u fokus higijensku hipotezu o razvoju astme i atopije.(130)

### 1.6.2. STARD3

Chromosome 17: 39,637,090-39,664,201



Slika 11. Lokacija gena STARD3 na kromosomu 17. Preuzeto s (122).

Lokacija gena STARD3 (*StAR-related lipid transfer protein 3*) je 17:39657827, citogenska regija 17q12.(122) Zanimljivo je da su varijante ovog gena vjerojatno podrijetla neandertalaca i da su ušle u euroazijsku populaciju miješanjem genoma modernih ljudi s neandertalcima prije oko 60 000 godina.(131) Gen STARD3 kodira obitelj proteina koji prenose lipide te koji na C-terminalnom kraju imaju regulatornu steroidogensku regiju, tj. dio koji se veže na lipid (START domena).(132, 133) Do sada je istraženo oko 4 000 funkcijskih asocijacija koje se ugrubo mogu podijeliti u one vezane uz apolipoprotein A

vrijednosti, vrijednosti HDL kolesterola, hemoglobina te astme i alergije.(134) STARD je kratica za *steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain*, obitelj proteina koja se sastoji od 15 članova, odnosno 6 grupa ovisno o funkciji u prenošenju lipida.(133) STARD3 protein se sastoji od 445 aminokiselina i transmembranskom je domenom vezan uz kasni endosom s kojega prenosi kolesterol u mitohondrij.(133, 135) Gen je eksprimiran na različitim tkivima, među ostalim i plućima, ali je njegova uloga ipak najbolje istražena u području onkogeneze te je povezan s lošim ishodom kod liječenja karcinoma dojke i sklonošću malignim bolestima gušterače, vjerojatno putem uloge u regulaciji inflamatornih faktora preko NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) signalnog puta, oksidativnom stresu i lipidnom metabolizmu.(133, 136, 137) U genetskim studijama astme, alergijskog rinitisa i alergije, uloga ovog gena u patofiziologiji ovih stanja je još uvijek nedovoljno istražena i pripisuje se zbirnom učinku regije 17q12-q21 i LD-u s nekim drugim bolje proučenim genima kao što su PERLD1, ORMDL3, GSDMA, GSDMB, IKZF3, PGAP3 i drugi.(138-141)

### 1.6.3. IL6R

Chromosome 1: 154,377,669-154,441,926



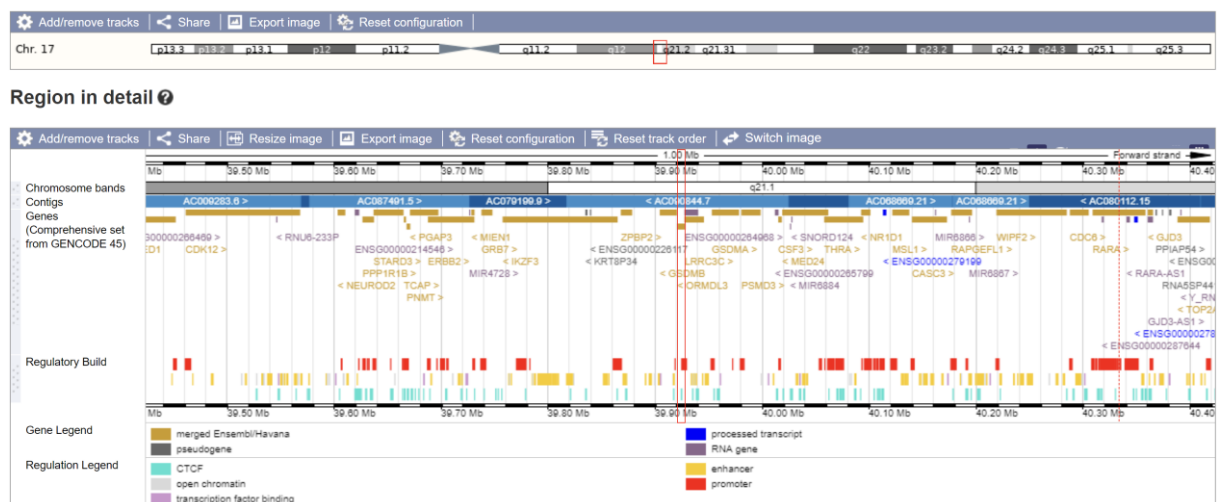
Slika 12. Lokacija gena IL6R na kromosomu 1. Preuzeto sa (122).

Gen za receptor IL-6, tj. IL6R, smješten je na kromosomu 1:154405193-154469450, i citogensoj regiji 1q21.3 te je istražena njegova veza s mnogim proinflamatornim stanjima, primjerice astmom, atopijskim dermatitisom, alergijom, reumatoidnim artritisom, ankilozantnim spondilitisom, sistemskim eritematoznim lupusom, koronarnom bolesti srca, srčanim udarom, atrijskom fibrilacijom, anginom pektorisa, ekcemom, generalno duljinom trajanja života i dr.(134) IL6R omogućava učinak IL-6, citokina čije je djelovanje poznato u

alergijskoj astmi i koji se na ciljne stanice veže putem transmembranskog ligand vezujućeg glikoproteina od 80 kD (IL6R) i glikoproteina veličine 130 kD koji prenosi signal (gp130).(142-144) IL6R je za razliku od gp130 koji je prisutan na gotovo svim stanicama, eksprimiran na samo nekim imunološkim stanicama (B limfociti, CD4+ T limfociti, neutrofil, monociti) koje su posljedično pod direktnom kontrolom IL-6 te je značajan regulator prirodne, no i adaptivne imunosti, ali isti receptor postoji i u solubilnom obliku (sIL6R) koji nastaje alternativnim izrezivanjem mRNA i koji u paru s IL-6 aktivira stanice koje inače ne bi bile pod njegovim direktnim utjecajem.(145-150) Polimorfizmi gena za IL6R, transmembransku i solubilnu formu receptora, su višekратно dovedeni u vezu s povećanim rizikom za razvoj astme, osobito fenotipa teške alergijske astme, što dodatno otvara mogućnosti za nove terapijske opcije, kao što je tocilizumab, inače već etabliran u liječenju reumatskih bolesti.(144, 151-153)

### 1.6.4. ORMDL3

Chromosome 17: 39,921,041-39,927,601



Slika 13. Lokacija gena ORMDL3 na kromosomu 17. Preuzeto s (122).

Gen ORMDL 3 (regulator biosinteze sfingolipida 3) smješten je na kromosomu 17: 39,921,041-39,927,601, pozicija 17q21.1 i jedna od prvih i najistraživanijih kromosomskih regija u kontekstu astme.(107, 122, 154) Ovaj je gen dio genske porodice koja obuhvaća ORMDL1 na kromosomu 2 i ORMDL2 na kromosomu 12, eksprimiran je u fetalnim i tkivima odraslih (protein je među ljudima konzerviran 80%) i ima brojne homologe i u drugim organizmima kao što su kvasci, biljke, kralježnjaci i vinska mušica.(155, 156) ORMDL geni kodiraju transmembranske proteine endoplazmatskog retikuluma s brojnim funkcijama (regulatori sfingolipidnog metabolizma negativnom povratnom spregom, omogućuju održavanje homeostaze ceramida, unutarstanični metabolizam kalcija, odgovor stanice na

stresni podražaj, aktivaciju limfocita i regrutaciju eozinofila u tkiva).(157-160) Proces savijanja bjelančevina se odvija u endoplazmatskom retikulumu, a u slučaju da dođe do nakupljanja nesmotanih proteina, aktivira se specifični stanični odgovor (*unfolded-protein response*-UPR) koji omogućava održavanje homeostaze proteina mehanizmom smanjenja potreba za njima, povećanjem efikasnosti endoplazmatskog retikuluma u savijanju ili izlučivanjem viška proteina.(161) U slučaju da navedeni obrambeni mehanizam zakaže, nastupa stanična smrt. S druge strane, ORMDL3 uzrokuje pretjerani UPR povećanjem razine kalcijevih iona u citosolu i blokiranjem signalizacije endoplazmatskog retikuluma posredovanog kalcijem što je jedan od mehanizama koji posljedično uzrokuje remodelaciju dišnih puteva i bronhalnu hiperreaktivnost utjecajem na metabolizam glatkih mišićnih stanica, karakteristične pojave u astmi.(158, 162, 163) Svi geni iz ORMDL obitelji imaju pojačanu ekspresiju u bolesnika s astmom i sudjeluju u njezinoj patofiziologiji i to ORMDL 1 i 2 vjerojatno preko utjecaja na limfocite i makrofage, a ORMDL 3 i na druge stanične frakcije u krvi, kao što su eozinofili, neutrofilni i bazofili.(155) Osim toga, nađeno je da je ekspresija ovog gena pod snažnim pozitivnim utjecajem okolišnih čimbenika, kao što su alergeni, ali i endogenih faktora, npr. proinflammatory citokina IL-4 i IL-13, koji stimuliraju njegovu aktivaciju i epigenetske promjene u epitelu bronha, makrofagima i eozinofilima smještenim u plućima.(164, 165) U konačnici, ORDL3 je gen čiji su polimorfizmi opetovano istraživani i dovedeni u vezu s astmom (T1 i T2 fenotipom), ali i čestim pridruženim komorbiditetima, kao što su alergija, rinitis i razne reumatske i gastrointestinalne upalne bolesti.(166-171) Ipak, uloga ovog gena nije nedvosmislena među populacijama, što može biti posljedica različite genske konstelacije, ali i razlika u veličini istraživanih populacija što ima utjecaja na statističku snagu studija i sposobnost pronalaženja relevantnih genotipova.(167, 172)



## **2. HIPOTEZA**

Polimorfizmi gena IL6R, RAD50, STARD3, ORMDL3 povezani su s ranijom pojavom bolesti i težom astmom, većim brojem egzacerbacija te atopijskim oblikom astme.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Opći cilj**

ispitati kako polimorfizmi gena IL6R , RAD50, STARD3, ORMDL3 utječu na astmu u hrvatskoj populaciji

#### **3.2. Specifični ciljevi**

1. istražiti zastupljenost odabranih SNP-ova u hrvatskoj populaciji
2. naći povezanost odabranih polimorfizama s plućnom funkcijom, eozinofilima, ECP-om (eozinofilnim kationskim proteinom), ukupnim IgE-om te alergijskim statusom
3. utvrditi jesu li ti SNP-ovi u kombinaciji s određenim rizičnim čimbenicima iz okoliša (kao što su pušenje, život u gradu/selu, ...) povezani s težim oblikom astme i ranijom pojavom bolesti
4. utvrditi njihovu povezanost s atopijskim oblikom astme

## 4. METODE

### 4.1. Ispitanici

Ova studija slučaja s kontrolom (*case-control study*) provedena je u Klinici za plućne bolesti Jordanovac, Kliničkog bolničkog centra (KBC-a) Zagreb, Hrvatska, u suradnji (genotipizacija) sa Sveučilištem u Manchesteru, Velika Britanija, kao dio kliničkog istraživanja iz područja astme i alergije - Manchesterska studija o astmi i alergijama (*The Manchester Asthma and Allergy Study – MAAS*, odnosno *Croatian Asthma and Allergy Study – CAAS*).

Kohortu su činile ukupno 534 odrasle osobe oba spola, 235 ispitanika s astmom liječenih u Klinici za plućne bolesti Jordanovac i 299 zdravih osoba, koje su regrutirane iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i koji su zadovoljili ključne kriterije.

Selekcija ispitanika s astmom je bila nasumična te je uključivala bolesnike u praćenju u Zavodu za alergijske i opstruktivne bolesti pluća Klinike Jordanovac. Preduvjet je bio imati postavljenu dijagnozu astme u trajanju od minimalno godinu dana i koja je u stabilnoj fazi bolesti od najmanje 4 tjedna (tj. da u tom periodu nije bilo egzacerbacija astme i potrebe za hitnim intervencijama).

Svim je sudionicima studije objašnjen plan istraživanja i praćenja, postupci i mjerenja koja se planiraju obaviti te su potpisali informirani pristanak prije uključivanja u studiju. Svaki sudionik studije je u bilo kojem trenutku mogao povući informirani pristanak i napustiti istraživanje. Prilikom regrutiranja ispitanika s astmom i zdravih kontrola, cilj je bio formirati reprezentativnu kohortu iz populacije bolesnika s astmom bez obzira na težinu bolesti te zdrave populacije u Hrvatskoj. Istraživački projekt odobrilo je Etičko povjerenstvo Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske te Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb. Slučajevi i kontrole su bili upareni po dobi i spolu, svi su bili bijelci iz Hrvatske i živjeli su u mješovitoj urbano-ruralnoj sredini. Iz istraživanja su isključene osobe koje boluju od bilo koje druge pridružene bolesti dišnog sustava primjerice kronične opstruktivne plućne bolesti.

### 4.2. Mjerenja

Svim je ispitanicima astma dijagnosticirana na temelju povijesti bolesti, procjene kliničkog statusa, specifičnih testova funkcije pluća provedenih u skladu s tehničkim standardima ERS-a/ATS-a u stabilnoj fazi astme (spirometrija s bronhodilatatorskim testom, difuzijski kapacitet pluća, udio dušikovog oksida u izdahnutom zraku (FeNO)) (173), laboratorijskih nalaza u suradnji s Kliničkim zavodom za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb

(kompletna krvna slika, eozinofilni kationski protein (*eosinophil cationic protein*-ECP), ukupni i specifični imunoglobulin E (IgE)) ili dijagnoze astme koju je liječnik prethodno naveo u medicinskoj dokumentaciji ispitanika (najmanje 12 mjeseci prije uključivanja u ispitivanje). Kad god je to bilo moguće, podaci su dobivani iz zadnjeg pregleda u klinici, a ukoliko je bilo potrebno, dopunjavani podacima iz ranijih nalaza, ali ne starijim od 6 mjeseci. Sve dostupne informacije su u konačnici iskorištene za fenotipizaciju astme u bolesnika. U zdravih kontrola, astma je isključena temeljem strukturiranog intervjua s ispitivačem i prethodno validiranog upitnika, tzv. *European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS II) (pristup engleskoj verziji putem <https://www.ecrhs.org/questionnaires-and-protocols>, prijevod na hrvatski u Prilozima). Ispitanici s astmom su također ispunili ECRHS II upitnik kako bi dobili podatke o pušačkim navikama, profesionalnoj izloženosti i životnim uvjetima. Sudionici istraživanja ispunjavali su upitnik sami ili u suradnji s istraživačem. Upitnici su prikupljeni isti dan kad je održan i pregled ili naknadno slani poštom na adresu ispitivača.

Anamnestički su podaci dobiveni iz razgovora s ispitanicima i iz dostupne medicinske dokumentacije, od kojih najstarija datira od 1. siječnja 2003., zaključno s 31. kolovozom 2023. Dijagnoza astme, težina bolesti i fenotip astme validirani su prema najnovijoj objavljenj Globalnoj inicijativi za astmu (*Global Initiative for Asthma* - GINA) iz 2023. i dostupnoj literaturi. Kategorija T2 fenotipa astme (potkategorije: 1. eozinofilna, 2. alergijska, 3. eozinofilna i alergijska) definirana je kao najmanje 150 eozinofila/ $\mu$ L krvi, eozinofili u sputumu (prema nalazu citologa – opisno kao značajno broj ili  $\geq 3\%$ ), eozinofili u brisu nosa (prema nalazu citologa – opisno kao značajno broj), FeNO $>25$  ppb, dokaz alergije (karakteristični simptomi, pozitivan kožni test na inhalacijske i/ili nutritivne alergene, povišene vrijednosti ukupnog i/ili specifičnog IgE).(1, 174-177) Nedostatak svih ovih kriterija klasificirao je ispitanika u skupinu ne-T2 fenotipa astme. Pušači su definirani kao netko tko je popužio 100 cigareta u životu i/ili tko trenutno puši cigarete, prema pojmovniku Nacionalnog centra za zdravstvenu statistiku (može se pristupiti putem [www.cdc.gov/nchs/nhis/tobacco/tobacco\\_glossary](http://www.cdc.gov/nchs/nhis/tobacco/tobacco_glossary)).

Astma u odraslih definirana je kao ona koja je dijagnosticirana u dobi od 18 i više godina.

Nekontrolirana astma definirana je kao prisutnost simptoma astme, osobito noćnih simptoma, česta upotreba lijekova za ublažavanje simptoma (kao što su salbutamol, beklometazon/formoterol ili budezonid/formoterol, više od 2 puta tjedno), 1 ili više hospitalizacija zbog astme do trenutka uključivanja u istraživanje i za vrijeme trajanja istraživanja, 2 ili više egzacerbacija astme godišnje, potreba za oralnim kortikosteroidima (OCS), slabljenje funkcije pluća tijekom prethodne godine, rezultat testa kontrole astme

(*Asthma Control Test* - ACT) <20 ili rezultat upitnika kontrole astme (*Asthma Control Questionnaire* - ACQ) <1.5.(1, 73, 178)

U dijagnostici astme, za procjenu plućne funkcije korištena je spirometrija s bronhodilatacijskim testom salbutamolom (Ventolin aerosol za inhalaciju, proizvođača Pliva Hrvatska), uz određivanje FeNO-a i difuzijskog kapaciteta pluća, što je provedeno na uređajima tvrtke Eco Medics (Analyzer CLD i Denox 88) s opcijom FeNO za odrasle, korištenjem dušikovog oksida tvrtke Messer Group i uređajem za mjerenje difuzijskog kapaciteta pluća tvrtke CareFusion (ranije poznat kao VIASYS Healthcare i Cardinal Health). U slučaju negativnog bronhodilatacijskog testa, za dijagnosticiranje astme korišten je podatak o pozitivnom bronhoprovokacijskom testu metakolinom u povijesti bolesti.

Prije izvođenja testova plućne funkcije, provodila se kalibracija pumpom od 3 L. Potom su od svakog ispitanika uzeti osnovni podaci za identifikaciju i izračun traženih varijabli - dob, spol, rasa i tjelesna masa. Ukoliko bolesnik nije bio u mogućnosti stajati, visina je mjerena indirektno prema promjeru raširenih ruku. Sudionici s astmom su također ispitani o postojanju neke od kontraindikacija za izvođenje spirometrije i ostalih testova kao što je hemoptiza, pneumotoraks, srčani udar, plućna embolija, postojanje aneurizme, osobito u nestabilnoj fazi, nedavna operacija ili postojanje kojeg drugog akutnog stanja koje bi priječilo adekvatnu izvedbu. Postupak spirometrije se izvodio tako da je ispitanik bio u sjedećem položaju, uspravnog držanja, s nogama na podu, na nepomičnom stolcu i s kvačicom na nosu čvrsto obuhvaćajući ustima usnik spirometra. Spirometrijski je manevar započinjao mirnim disanjem, zatim dubokim udahom do ukupnog kapaciteta pluća te naglim i snažnim ispuhivanjem zraka na usta u trajanju od minimalno 6 sekundi odnosno do postizanja ekspiracijskog platoa. Maksimalna prihvatljiva razlika FEV1 i FVC među manevrima je morala biti manja od 150 ml, a u konačnu je interpretaciju uziman najbolji i tehnički najispravnije izveden pokušaj. Maksimalni broj pokušaja izvođenja spirometrije je bio 7. Bronhodilatacijski test salbutamolom je uključivao još jednu spirometriju prema ranije navedenim kriterijima, a koja se izvodila 30 min. po aplikaciji 400 µg salbutamola. Pozitivan nalaz je odgovarao porastu FEV1 za 10% prediktivne vrijednosti.

Postupak određivanja FeNO-a se izvodio tako da je ispitanik bio u istom položaju kao za izvođenje spirometrije. Od ispitanika se tražilo da izdahne do rezidualnog volumena nakon čega je slijedilo udisanje do ukupnog kapaciteta pluća te potom polagano i ravnomjerno izdisanje kroz aparat. Kao pomoć za pravilno izdisanje brzinom oko 0.05 L/s u trajanju od 10 s, ispitanik prati strelicu na aparatu. Vrijednosti FeNO-a su izražene kao *parts per billion* (ppb), a prihvaćao se tehnički najispravniji od 3 pokušaja s time da nije smjelo biti više od 10% razlike među njima.

Određivanje difuzijskog kapaciteta se također izvodi u istom položaju kao i spirometrija. Postupak započinje mirnim disanjem kroz usnik aparata nakon čega slijedi izdisaj do rezidualnog volumena u trajanju do 12 s. Nakon toga slijedi brzi udah mješavine testnih plinova u sastavu 21% kisika, 0.3% ugljičnog dioksida, helija i dušika do ukupnog kapaciteta pluća te potom ispitanik treba zadržati dah  $10 \pm 2$  s. Zatim slijedi izdisaj koji ne smije prelaziti 4 s, a aparat izračunava DLCO. U slučaju neadekvatnog manevra, novi se ponavlja nakon pauze od 4 minute.

Izraz trajna opstrukcija korišten u ovoj studiji temeljio se na spirometrijskim vrijednostima: postbronhodilatacijski forsirani ekspiracijski volumen u 1. sekundi/forsirani vitalni kapacitet (FEV1/FVC) z-rezultat  $< 1.64$  u trajanju od najmanje 12 mjeseci.(173)

Svim ispitanicima određen je indeks tjelesne mase (*body mass index* - BMI), a stupanj dispneje procijenjen je prema "*Modified Medical Research Council*" (mMRC) skali dispneje. Među ostalim podacima, istražena je dob početka astme, ukupno trajanje astme do trenutka uključivanja u studiju, broj i težina egzacerbacija do trenutka uključivanja u studiju te broj i trajanje hospitalizacija zbog egzacerbacije. Utvrđen je i alergijski status za koji je korišten kožni alergološki test te vrijednosti ukupnog IgE (pozitivnim se smatrala vrijednost ukupnog IgE  $> 100$  kIU/L) i alergen-specifičnog IgE (pozitivnim se smatrala vrijednost specifičnog IgE  $> 0.35$  kIU /L) u krvi, uz anamnestičke podatke o pojavi karakterističnih simptoma, potrebi prekomjernog uzimanja lijekova za ublažavanje simptoma (npr. salbutamol) te podatke o komorbiditetima (npr. atopijski status, alergijski rinitis, alergijski konjuktivitis ili dermatitis, nosna polipoza, prisutnost vaskulitisa ili aspergiloze). Alergološko testiranje provedeno je standardiziranim otopinama alergena za kožni alergološki test (Alyostal Prick skin solution) koji je uključivao reagense za europsku i američku grinju, mješavinu plijesni, čemprese, mješavinu trava, ambroziju, divlji pelin, pseću i mačju dlaku, lijesku, brezu, johu i maslinu. Postupak je uključivao nanošenje pozitivne i negativnu kontrole te odabranih otopina alergena na čistu kožu podlaktice, tumačio se 20 minuta nakon aplikacije reagensa, a pozitivnim rezultatom se smatrala urtika promjera  $\geq 3$  mm (179).

Osim ranije navedenog, iz raspoložive medicinske dokumentacije, prikupljeni su podaci o citološkom sastavu iskašljaja, brisa nosa i otorinolaringološkom pregledu (uključujući postojanje alergijskog rinosinuitisa i nosne polipoze).

Svi su ispitanici podvrgnuti standardnoj venepunkciji te je uzeto 5 ml krvi u epruvetu s inertnim separatorskim gelom za određivanje ukupnog i specifičnog IgE i eozinofilnog kationskog proteina iz svježe krvi te je određena kompletna krvna slika od 3 ml svježe krvi uzete u epruvetu s antikoagulansom trikalijem etilen diamin tetraoctenom kiselinom (K3EDTA). Epruvete su izrađene od polietilen tereftalat glikolom modificirane plastike

(PET) koju proizvodi Greiner Bio-One International. Potpuna krvna slika određena je na hematološkom analizatoru DxH 800 tvrtke Beckman Coulter Inc. USA koristeći metodu temeljenu na promjeni otpora ili impedancije. Određivanje koncentracije ECP i IgE u serumu provedeno je na analitičkom sustavu Siemens Immulite 2000xpi, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Njemačka, prema uputama proizvođača. Ova tehnologija djeluje po kemiluminiscentnom imunokemijskom konceptu. Predanalitički postupak za ECP je specifičan i standardiziran: nakon uzimanja uzorka krvi u epruvetu bez antikoagulansa za ECP probir, bilježi se vrijeme uzorkovanja, uzorak se ostavlja 90 minuta na sobnoj temperaturi, zatim se centrifugira 10 minuta na 1000 g na sobnoj temperaturi nakon čega se serum odvaja i zamrzava na -20°C do konačne analize (najviše unutar mjesec dana od pohrane uzorka). Za IgE test predanalitičko rukovanje uzorkom je isto kao i za ostale biokemijske testove (serum izdvojen u epruvetu bez antikoagulansa).

#### **4.3. Ekstrakcija DNA i genotipizacija**

Svim ispitanicima koji su zadovoljili kriterije uključivanja u studiju uzeto je 10 ml krvi standardnom venepunkcijom, uzorci su zatim centrifugirani, a rezidualni stanični koncentrat korišten za ekstrakciju genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNA) odmah je zamrznut na -80°C i kasnije poslan u Manchester na genetsku analizu. Genomska DNA ekstrahirana je iz leukocita metodom fenol-kloroforma. Uzorci su kvantificirani korištenjem Epoch™ spektrofotometrijskog sustava. Zatim su razrijeđeni ispod 400 ng/μL i ponovno izmjereni kombinacijom Epoch™ i NanoDrop™ spektrofotometrijskih sustava u skladu s uputama proizvođača. Uzorci su doneseni u Centar za integrirana genomska medicinska istraživanja (*Centre for Integrated Genomic Medical Research - CIGMR*) Sveučilišta u Manchesteru kako bi bili prijavljeni u sustavu upravljanja laboratorijskim informacijama (*laboratory information management system - LIMS*). Uzorci su zatim normalizirani i stavljeni na 6 radnih pločica (200 μL pri 25 ng/μL) za genotipizaciju.

Cijeli proces genotipizacije prethodno su detaljno opisali Marinho i sur. i Simpson i sur. u *online* suplementu.(180-183) Implementiran je Sequenom® MassARRAY® iPLEX™ Gold sustav, koji uključuje kemijsku reakciju ekstenzije početnica s MALDI-TOF masenom spektrometrijom.(181, 184) Za svakog sudionika, tzv. pozivanje SNP-a učinjeno je pomoću Sequenom Matrix-Assisted Laser Desorpcije/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) platforme za prikupljanje podataka i iPLEX testa, pojedinačni genotipovi su identificirani pomoću MassARRAY® Typer Analyzer softvera u stvarnom vremenu dok je konstrukcija PCR primera i sonde napravljena pomoću Sequenom iPLEX softvera.

Budući da slična genomska asocijacijska studija (*genome-wide association study* - GWAS) ili studija gena kandidata (*candidate gene study*) u odrasloj populaciji Hrvatske nikada nije provedena, a usporedive studije u pedijatrijskoj populaciji s astmom proveli su Blekić i sur. i Bukvić i sur. za regije 17q12-21, odnosno 20p13-p12 (182, 183), odlučilo se istražiti signifikantne gene s kromosoma 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17 i 22, a koji su prethodno prijavljeni u drugim GWAS-ovima. Odabir gena i SNP-a temeljio se na pretraživanju dostupne literature i prethodnim genomskim povezanostima s osobinama opisanim u astmi, kao i na molekularnim putovima zabilježenim kod astme i alergije. Genotipizirano je u konačnici ukupno 77 SNP-ova, a među njima je 20 SNP-ova isključeno iz konačne analize ili zbog neuspjelog genotipiziranja ili nakon kontrole kvalitete prema sljedećim kriterijima: stopa poziva <95%, učestalost manjih alela (*minor allele frequency* - MAF) <5% , Hardy Weinbergova ravnoteža (*Hardy Weinberg Equilibrium* - HWE)  $p < 0,05$  (potpune informacije o odabranim SNP-ovima, genima i regijama mogu se vidjeti u Tablici 11). U svrhu odabira tagSNP-ova temeljenog na LD-u haplotipu (pomoću praga  $r^2 = 0,8$ ) korišten je parni algoritam LDSelect (185) dostupan na Genome Variation Serveru (GVS) i Haploview (Tagger) (186, 187), GVS (<http://gvs.gs.washington.edu/GVS/>), popraćen podacima dostupnim na internetskim stranicama National Library of Medicine dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). (180, 182, 183)

#### 4.4. Statistička analiza podataka

U sklopu istraživanja provedena je sveobuhvatna statistička analiza kako bi se istražila veza između astme i potencijalno povezanih faktora. Budući da je Shapiro–Wilk test pokazao da podaci ne slijede normalnu distribuciju, u daljnjim su analizama korišteni neparametrijski testovi. Korelacije i razlike između ispitivanih podskupina ispitanika testirane su korištenjem Kruskal-Wallis, hi-kvadrat ili Spearman rang-korelacijskih testova, ovisno o tipu varijabli (kontinuirane ili kategoričke).

Dodatno je provedena analiza generaliziranog linearnog modela (GLM) s binomijalnom funkcijom uzimajući u obzir pušenje, spol, dob, BMI i FVC (forsirani vitalni kapacitet) kao kovarijate. Ovaj pristup omogućio je razlučivanje veza između dviju kategorija uzimajući u obzir više utjecajnih varijabli.

Logistički regresijski modeli provedeni su kako bi se utvrdila značajna povezanost između određenih SNP-ova i ispitivanih varijabli. Za procjenu utjecaja genotipova na različite varijable, korištena je procedura važnost varijable za projekciju (*Variable Importance for Projection* - VIP) kao dio analize parcijalnih najmanjih kvadrata (*Partial Least Squares* -



PLS). Genotipovi s VIP vrijednošću većom od 1 smatrani su važnima u utjecaju na promatranu varijablu (kategoriju) i značajno su doprinijeli modelu, dok genotipovi s VIP vrijednošću  $<0.8$  imaju minimalan utjecaj.

U statističkoj analizi primijenili smo Bonferronijevu korekciju za testiranje više hipoteza pomoću funkcije *p adjust*.

Sve statističke analize provedene su pomoću programa R verzije 3.6.2 (R Core Team, 2020), pri čemu je razina značajnosti postavljena na  $p = 0,05$ .

Vizualizacija podataka provedena u R-u uključivala je osnovne funkcije boxplot i mosaicplot, uključujući ggplot2 paket radi poboljšane interpretacije. Heatmap je generiran u Pythonu (verzija 3.11.0) korištenjem nekoliko ključnih biblioteka, uključujući pandas, matplotlib, scikit-allel, ld\_estimator i scipy.

## 5. REZULTATI

### 5.1. OPĆI PODACI

U ovo istraživanje je uključeno 235 bolesnika s astmom (44%) i 299 zdravih kontrola (56%) koji su bili upareni po dobi i spolu. Prosječna životna dob ispitanika s astmom je bila 44.6 god. Raspodjela po spolu nije bila ravnomjerna; ukupno je sudjelovalo 177 (33%) muškaraca, od toga broja je 90 (38.3%) bilo u grupi s astmom, uz 356 (67%) žena, od čega je 145 (61.7%) bolovalo od astme. Prosječna dob pojavnosti astme u ovoj populaciji je bila 37.7 god uz trajanje bolesti do uključivanja u ispitivanje od 12.5 god te se u većine (77%) ispitanika astma pojavila u odrasloj dobi. Oko četvrtine bolesnika je imalo znakove nekontrolirane bolesti, otprilike je isti broj (30%) u terapiji trajno bio na oralnim kortikosteroidima (OKS) i imao više od 1 egzacerbacije do trenutka uključivanja u istraživanje (32%) te je samo mali broj ispitanika morao biti i hospitaliziran zbog egzacerbacije bolesti (4% od ukupnog broja bolesnika s astmom). Trajnu opstrukciju (prema dostupnoj medicinskoj dokumentaciji u protekle barem 3 godine prije uključivanja u istraživanje) imala su 82 (42%) bolesnika. Ipak, prosječne vrijednosti plućne funkcije populacije bolesnika s astmom su bile u granicama normale (FEV1 2.6 L; 80.54%) uz normalne vrijednosti difuzijskog kapaciteta pluća, ali prosječno povišene vrijednosti FeNO-a (48.25 ppb). Najteži oblik bolesti (GINA 4 i 5) je bio prisutan u 31 (15%) bolesnika.

Većina naših bolesnika s astmom je bilo pušača (58%, prosječni p.y. 5.2 god.) dok je 36% od ukupnog broja astmatičara navelo profesionalnu izloženost štetnim tvarima. Prosječni indeks tjelesne mase je bio 25.9 kg/m<sup>2</sup>.

Većina bolesnika je imala dokazanu pozitivnu alergijsku dijatezu (155; 75.6%) te je uzevši u obzir i druge biomarkere i komorbiditete (kao što su eozinofili u krvi, brisu nazofarinksa i sputumu, ECP, FeNO, nosna polipoza s eozinofilijom, alergijski rinitis) u konačnici većina ispitanika s astmom ubrojana u T2 fenotip (178; 84%).

Većina ispitanika s astmom (87.3%) nije bila značajnije opterećena komorbiditetima za koje se očekuje negativan utjecaj na duljinu trajanja života (*Charlson Comorbidity Index-CCI-0-2*).

Također, ispitivana populacija je većinom imala prebivalište u gradskoj sredini (68.5%) što je očekivano zbog smještaja bolničkog centra iz kojeg su regrutirani ispitanici u ovom istraživanju.

Detaljno izvješće s općim i demografskim podacima ispitanika se nalazi u Tablicama 7-10.

Tablica 7.

<b>VARIJABLE</b>	<b>N</b>	<b>UDIO</b>
Pacijenti s astmom	235	44%
Zdravi pacijenti	299	56%
Spol (ukupno) - ženski	356	67%
Spol (ukupno) - muški	177	33%
Spol (astma) - ženski	145	61.70%
Spol (astma) - muški	90	38.30%
Egzacerbacija > 1 do uključivanja u studiju	67	32%
Hospitalizacija	7	4%
Korištenje oralnog kortikosteroida	62	30%
Nekontrolirana astma	52	25%
Pušači (astma)	75	58%
Profesionalno izloženi	46	36%
Prisutnost alergije	155	75.60%
Nosna polipoza	28	13.60%
Eozinofilni fenotip (1)	79	68%
Neeozinofilni fenotip (0)	37	32%
T2 fenotip astme	178	84%
T1 fenotip astme	34	16%
Nema trajnu opstrukciju	113	58%
Ima trajnu opstrukciju	82	42%

Tablica 8.

VARIJABLE	MIN	LCL	MEDIAN	MEAN	UCL	MAX
dob (ukupno: astma+zdravi)	18	41.5	43	42.76	44	86
dob (astma)	18	42.4	45	44.6	46.9	86
Indeks tjelesne mase (BMI, kg/m <sup>2</sup> )	16.9	25.3	25.4	25.9	26.6	40.54
Doba pojavnosti astme (god.)	0.5	29.1	30	31.7	34.4	77
Trajanje astme (god.)	0.5	11.1	11	12.5	13.98	45
ACT	7	19.8	22	20.6	21.4	25
Broj egzacerbacija do uključivanja	0	1.2	1	1.5	1.8	20
Hospitalizacija-trajanje u danima	0.5	NA	6	6.85	NA	18
Pack-Years (p.y.)	0	3.5	0	5.2	6.8	60
FEV1 (L)	0.7	2.47	2.57	2.6	2.73	4.98
FEV1%	24	77.82	81.55	80.54	83.25	124
FVC (L)	1.26	3.45	3.52	3.61	3.77	6.88
FVC%	51	91.97	96.8	94.28	96.58	138.3
DLCO%	33	83	89	88.2	93.4	155
KCO%	41	89.44	98	94.14	98.8	122.7
VA%	58	84.3	89	90.2	96.1	135
IgE (kU/L)	0	330.93	159.5	479.66	628.4	4603
FeNO (ppb)	5.1	5.1	33.4	48.25	262.20	262.30
ECP (µg/L)	4.3	25.34	24.5	34.8	44.25	148
Eozinofili u krvi (10e9/L)	0	0.21	0.19	0.26	0.3	1.24

Tablica 9.

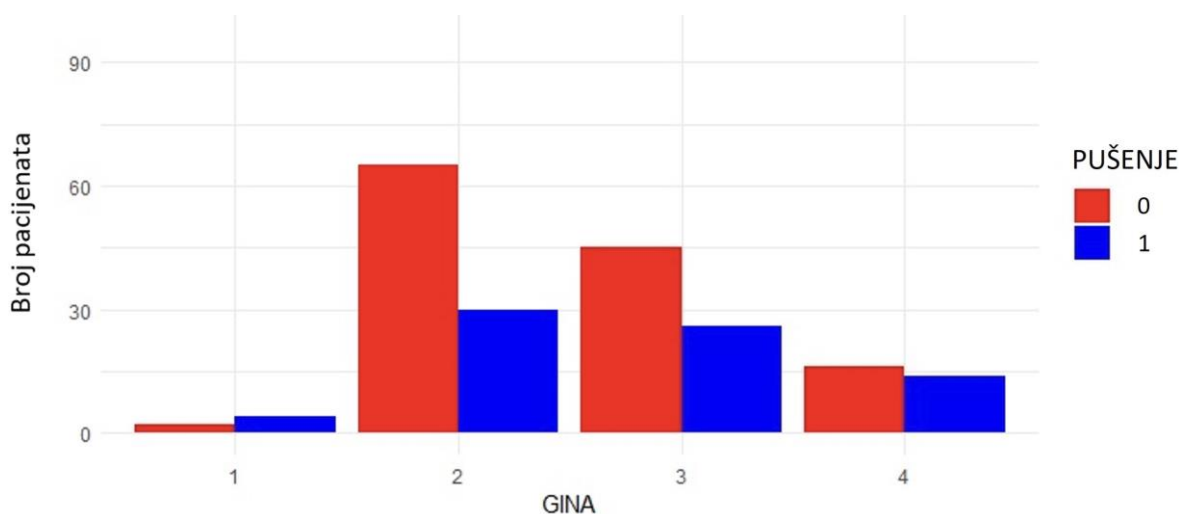
Charlson Comorbidity Index	0-2	3	4	5	>6
n	179	13	7	4	2
%	87.30%	6.30%	3.40%	2%	1%

Tablica 10.

ASTMA	U DJETINJSTVU N(UDIO)	U ODRASLOJ DOBI N(UDIO)2	GRAD	SELO	GINA 1	GINA 2	GINA 3	GINA 4 i 5
	47 (23%)	156 (77%)	96 (68.5%)	44 (31.5%)	6 (3%)	100 (48%)	71 (43%)	31 (15%)

## 5.2. ODNOSI MEĐU VARIJABLAMA

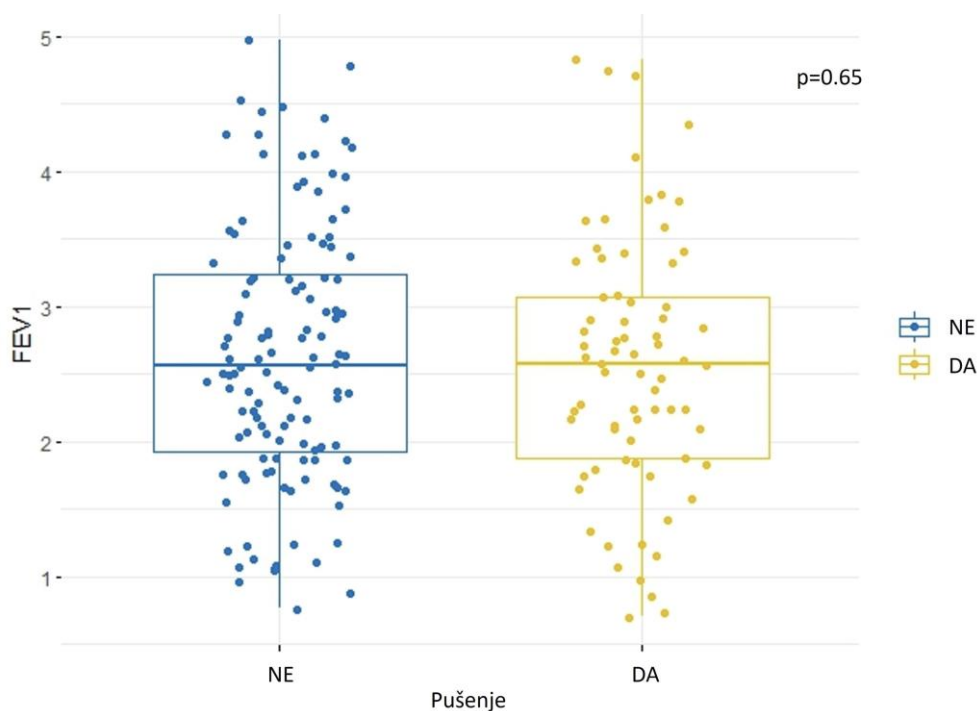
U daljnjem tijeku rada, istražilo se ima li koji od proučavanih vanjskih čimbenika utjecaj na pojavu astme u dječjoj, odnosno odrasloj dobi. Mjesto života (grad/selo) i pušenje nisu imali utjecaja na dob pojavnosti astme ( $z$  -0.222,  $\Pr(>|z|)$  0.8243;  $t$  -0.205,  $\Pr(>|t|)$  0.838). Osim toga, pušenje nije imalo utjecaja na težinu astme procijenjenu prema GINA stupnju uz prilagodbu prema dobi, spolu, BMI i prisutnosti restrikcije ( $t$  0.732,  $\Pr(>|t|)$  0.465). Iz Slike 14 vidljivo je da je većina bolesnika s astmom u slučaju umjerene i teške astme ipak bila nepušač ( $p$  0.196).



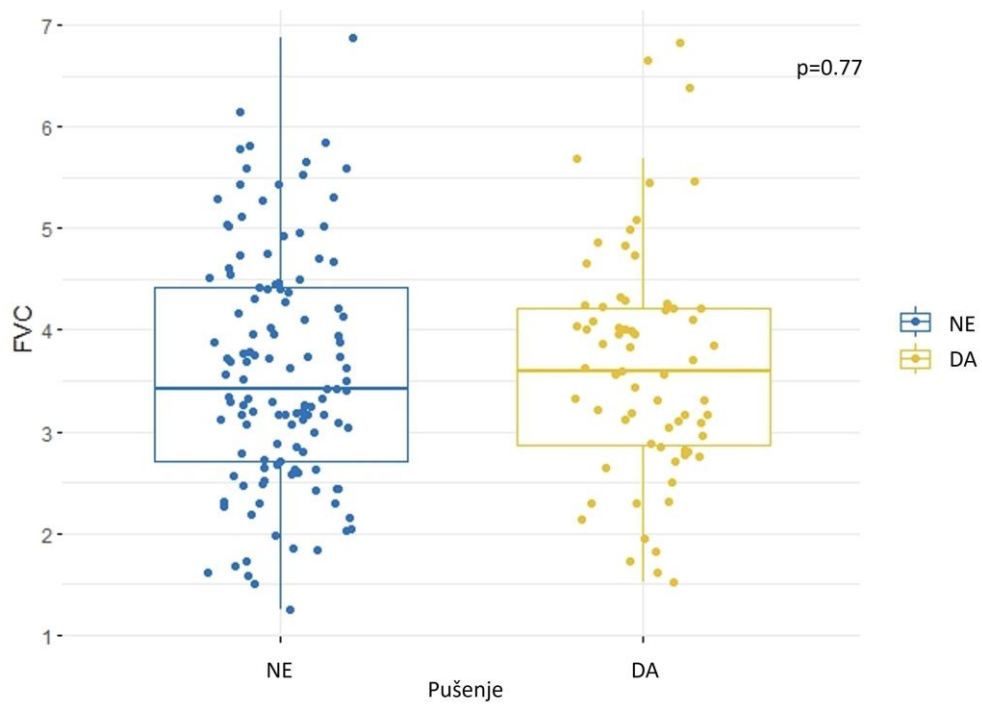
Slika 14. Raspodjela pacijenata s astmom prema GINA klasifikaciji ovisno o pušačkom statusu

Analiza utjecaja vanjskih čimbenika na plućnu funkciju u bolesnika s astmom je pokazala da pušenje u ovoj populaciji nije imao utjecaja na prisutnost trajne opstrukcije ( $\chi^2$  3.06,  $df = 1$ ,  $p$  0.08) kao niti život u gradu ( $\chi^2$  1.19,  $df = 1$ ,  $p$  0.27) ili profesionalna izloženost štetnim tvarima ( $\chi^2$  0.31,  $df = 1$ ,  $p$  0.58). Osim toga, profesionalna izloženost ( $\chi^2$  3.41  $df = 1$ ,  $p$  0.06) kao niti život u gradu ( $\chi^2$  0.33,  $df = 1$ ,  $p$  0.57) nisu imali utjecaj na pojavu nekontrolirane astme. U ovoj skupini ispitanika s astmom život u gradu također nije bio povezan s prisutnošću alergije ( $z$  0.91,  $\Pr(>|z|)$  0.36) ili povišenim vrijednostima ukupnog IgE ( $z$  0.19,  $\Pr(>|z|)$  0.85). Nadalje, pušenje nije imao statistički bitnog utjecaja na težinu astme ( $t$  0.73,  $\Pr(>|t|)$  0.47), kontrolu bolesti ( $t$  1.51,  $\Pr(>|t|)$  0.13), hospitalizaciju u anamnezi ( $t$  1.35,  $\Pr(>|t|)$  0.18) ili duljinu trajanja hospitalizacije ( $t$  -0.33,  $\Pr(>|t|)$  0.17) u slučaju teške egzacerbacije astme. Pušenje nije bilo povezano niti s češćom potrebom za liječenjem oralnim kortikosteroidima ( $t$  0.83,  $\Pr(>|t|)$  0.41). Proučio se i intenzitet pušenja i njegov utjecaj na prethodno ispitivane varijable, ali nije nađena statistička značajnost kod

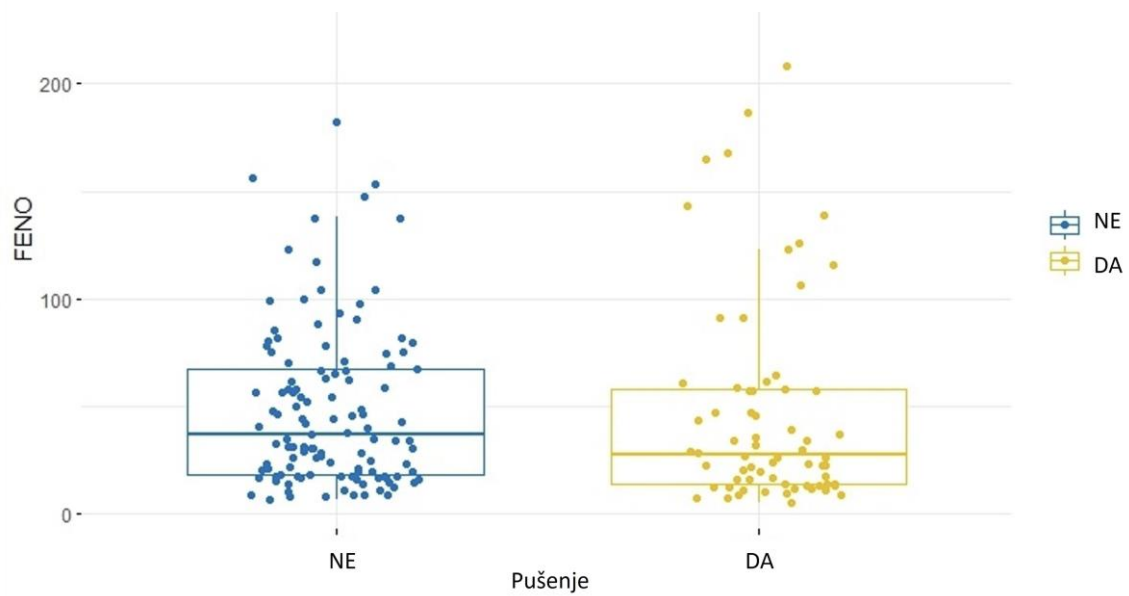
međudjelovanja *pack-years* i težine astme (t 1.17, Pr(>|t|) 0.24), njezine kontrole (t 0.95, Pr(>|t|) 0.34), potrebe za oralnim kortikosteroidima (t 0.12, Pr(>|t|) 0.90), potrebom za hospitalizacijom (t -0.22, Pr(>|t|) 0.82) i duljinom trajanja hospitalizacije (p 0.057) zbog pogoršanja astme. Pušenje nije bilo povezano s vrijednostima FeNO-a ( $\chi^2$  1.87, df = 1, p 0.17), pojavom restriktivnog obrasca u spirometriji što bi bilo vidljivo u smanjenju vrijednosti FVC-a ( $\chi^2$  0.08, df = 1, p 0.77), opstrukcijom ( $\chi^2$  3.06, df = 1, p 0.08) ili značajnim smanjenjem FEV1 ( $\chi^2$  0.20, df = 1, p 0.65). U ovoj kohorti, poremećaj na nivou alveokapilarne membrane, vidljiv vrijednostima KCO<80% nije doveden u vezu s pušenjem ( $\chi^2$  0.26, df = 1, p 0.61). Na kraju, analiza utjecaja pušenja i profesionalne ekspozicije na oblikovanje T1 tj. T2 fenotipa nije dosegla statističku značajnost (t 0.95, Pr(>|t|) 0.34; t -1.35, Pr(>|t|) 0.18).



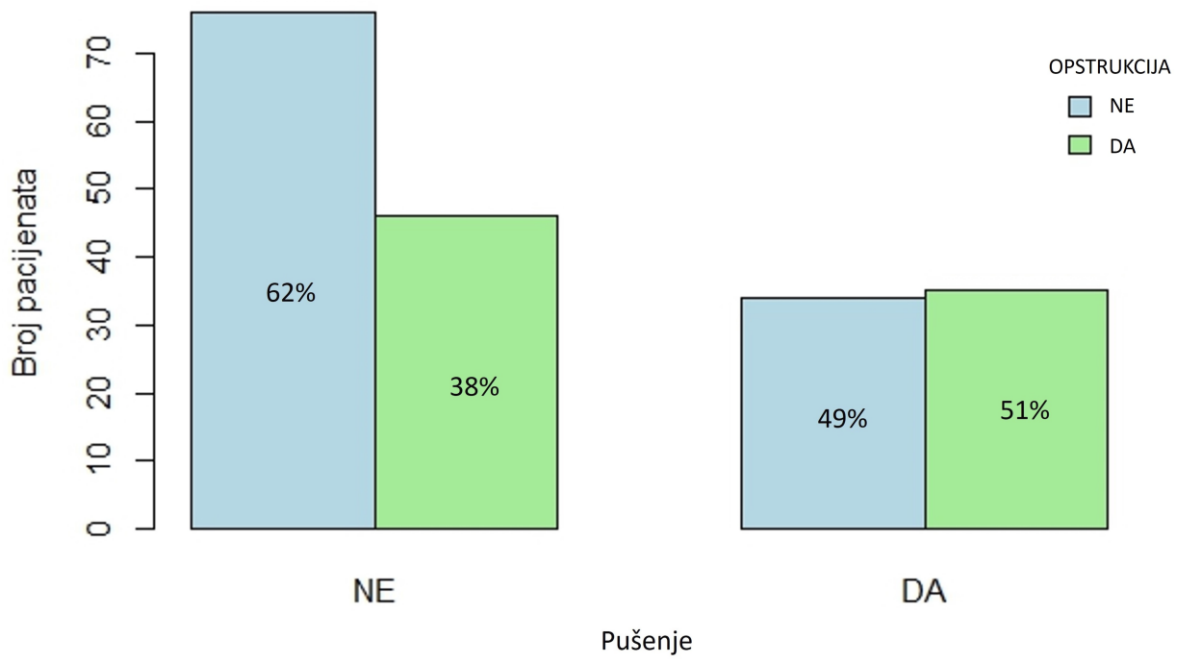
Slika 15. Odnos vrijednosti FEV1 ovisno o pušačkom statusu



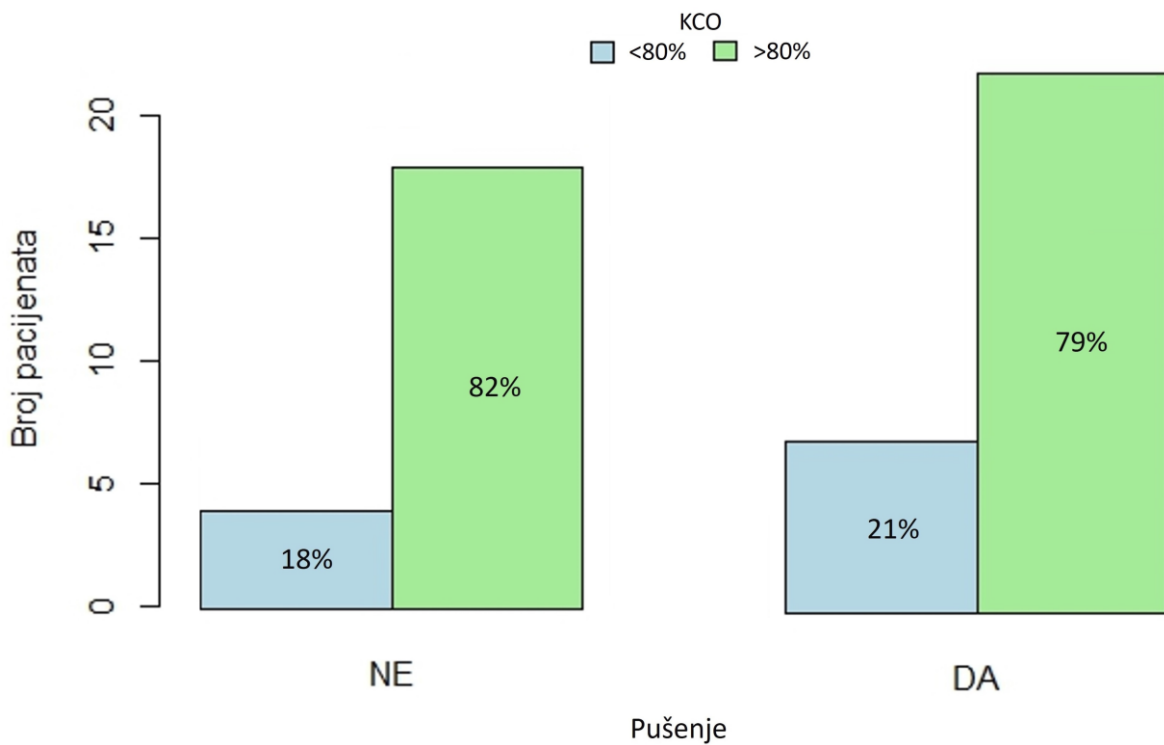
Slika 16. Odnos vrijednosti FVC ovisno o pušačkom statusu



Slika 17. Odnos vrijednosti FeNO ovisno o pušačkom statusu



Slika 18. Prisutnost opstrukcije ovisno o pušačkom statusu

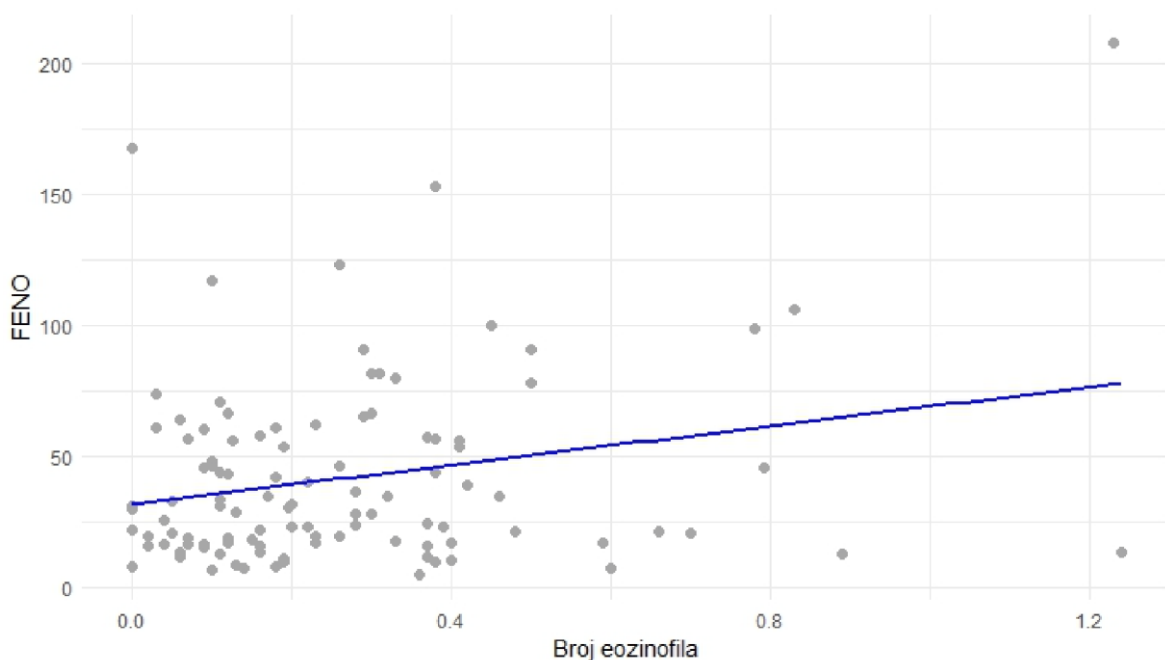


Slika 19. Odnos vrijednosti KCO ovisno o pušačkom statusu

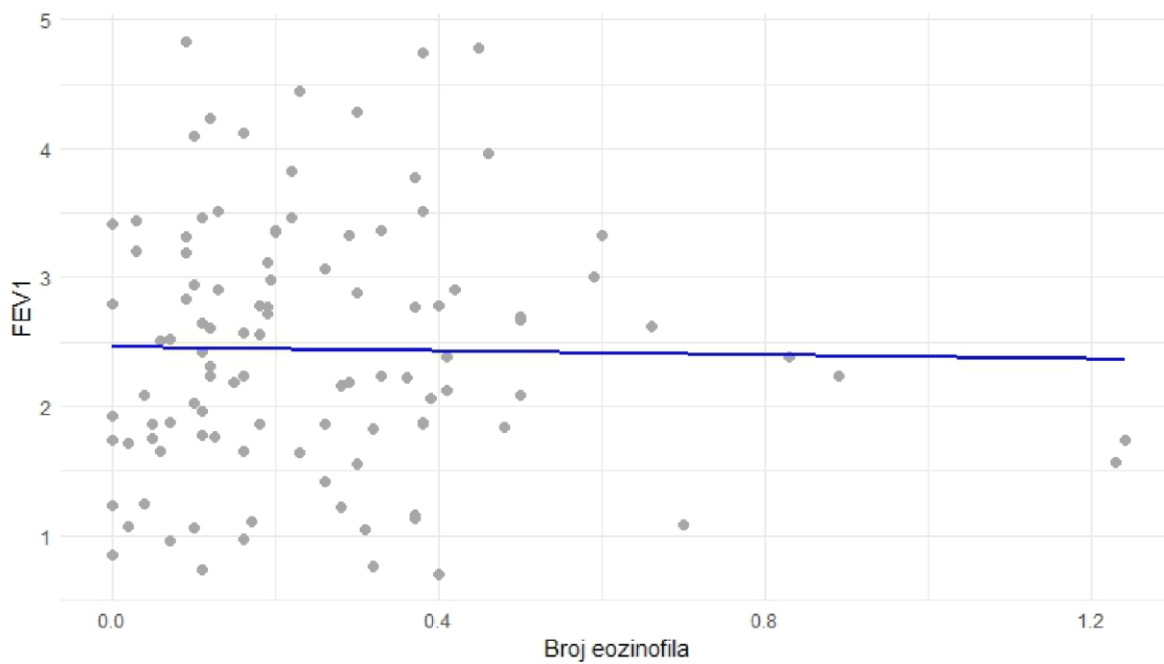
Od istraživanih komorbiditeta koji se često pojavljuju uz T2 fenotip astme, jedino je nosna polipoza bila statistički značajan uzrok težeg oblika astme izraženo GINA stupnjem (t -



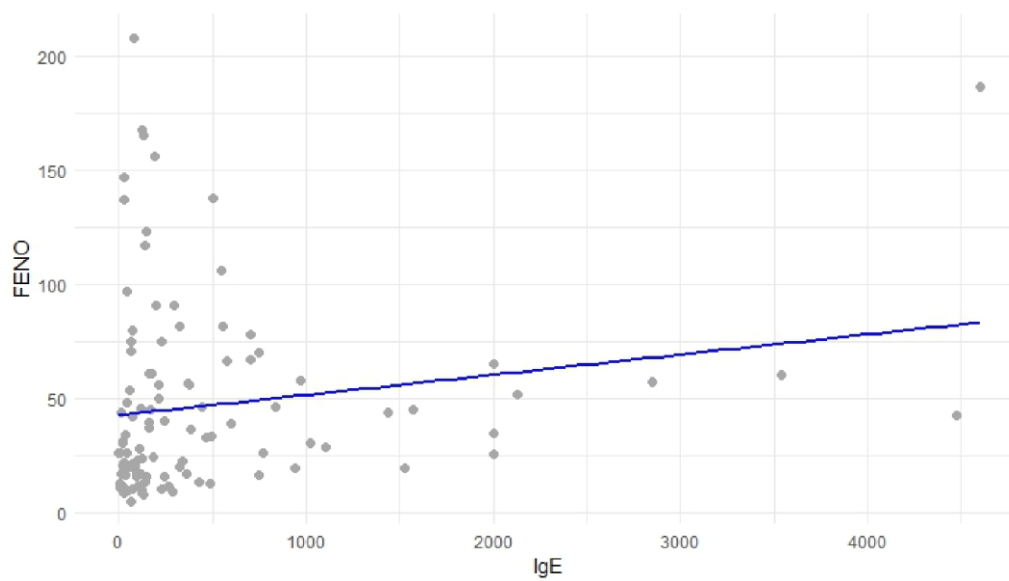
2.022,  $\text{Pr}( > |t| )$  0.0446), dok prisutnost alergije ( $t$  0.33,  $\text{Pr}( > |t| )$  0.74) i CCI ( $t$  -0.32,  $\text{Pr}( > |t| )$  0.75) nisu imali statistički značajan utjecaj na težinu astme. S druge strane, nosna polipoza ( $t$  1.56,  $\text{Pr}( > |t| )$  0.12) kao niti prisutnost alergije ( $t$  1.21,  $\text{Pr}( > |t| )$  0.23) ili CCI ( $t$  -1.04,  $\text{Pr}( > |t| )$  0.30) nisu dosegli statističku značajnost prilikom istraživanja njihovog utjecaja na kontrolu astme. Također, nosna polipoza nije imala utjecaja na broj egzacerbacija astme ( $t$  1.82,  $\text{Pr}( > |t| )$  0.07) ili potrebu za oralnim kortikosteroidima ( $t$  2.01,  $\text{Pr}( > |t| )$  0.05). Dodatna analiza korelacije odabranih biomarkera i nosne polipoze je pokazala da oni nisu bili statistički značajno povezani s njezinom prisutnošću u bolesnika s astmom (za eozinofile  $> 100/\mu\text{L}$  krvi- $z$  1.38,  $\text{Pr}( > |z| )$  0.17; eozinofile  $> 300/\mu\text{L}$  krvi- $z$  1.13,  $\text{Pr}( > |z| )$  0.26; ukupni IgE- $z$  -1.79,  $\text{Pr}( > |z| )$  0.07). Ispitivanje međuovisnosti biomarkera astme je pokazalo da vrijednosti FeNO rastu s brojem eozinofila u krvi ( $p$  0.22) dok se vrijednosti FEV1 blago smanjuju ( $p$  0.48) što međutim nije bilo statistički signifikantno. S druge strane porast vrijednosti FeNO-a s porastom ukupnog IgE je dosegao statističku značajnost ( $p$  0.004), ali vrijednosti ukupnog IgE u krvi nisu statistički značajno utjecali na FEV1 ( $p$  0.21).



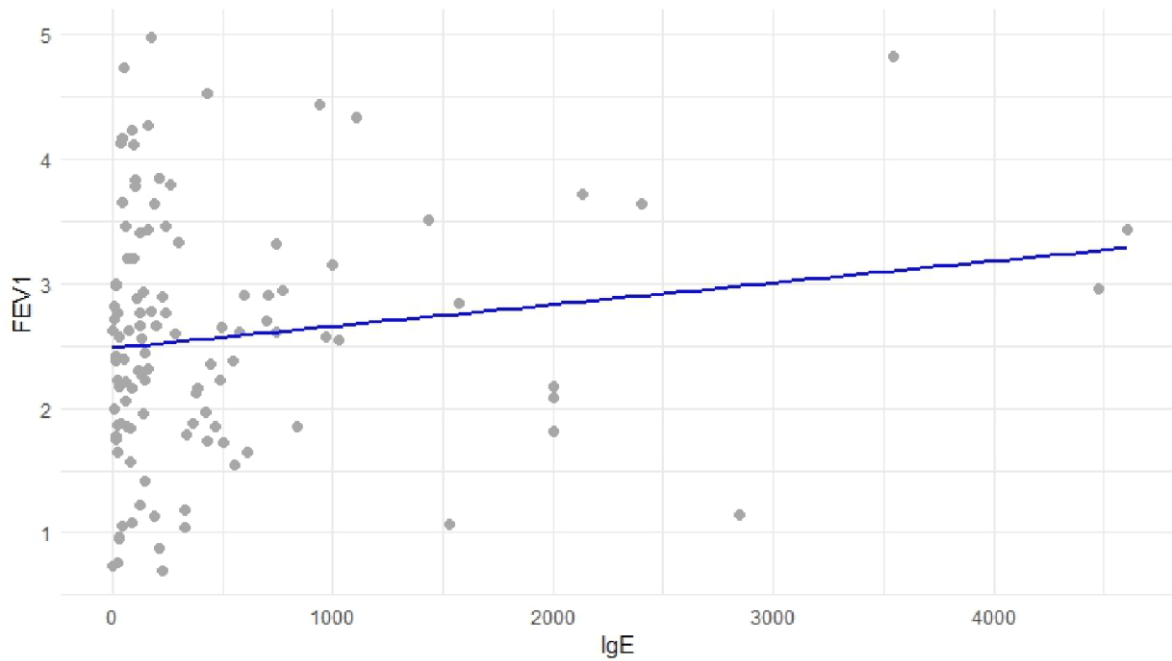
Slika 20. Korelacija vrijednosti FeNO i krvne eozinofilije



Slika 21. Korelacija vrijednosti FEV1 i krvne eozinofilije

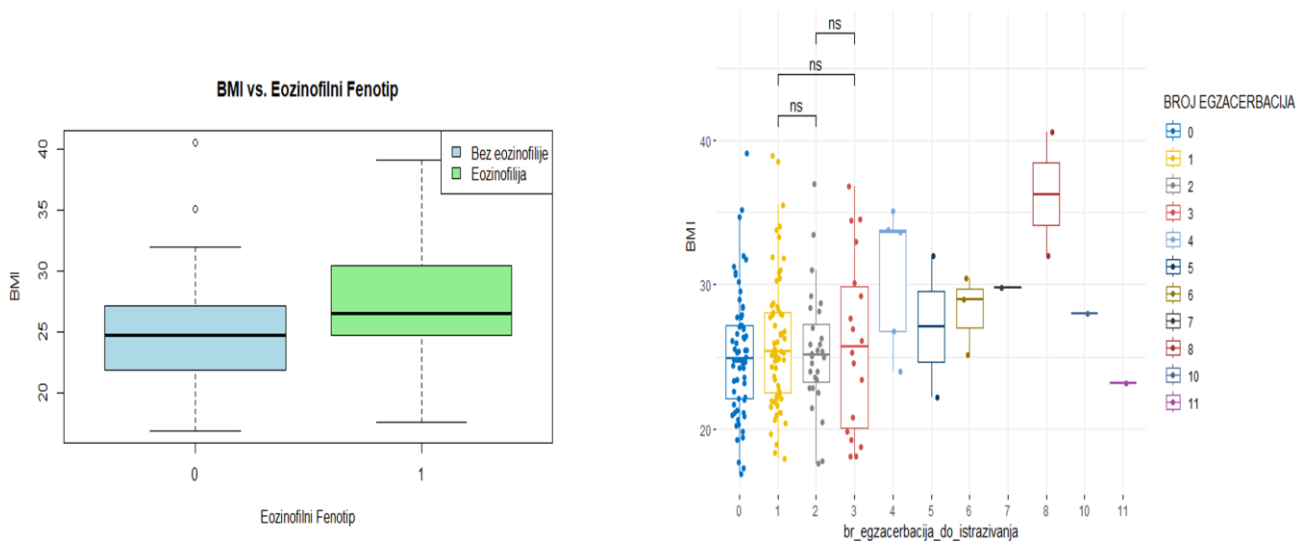


Slika 22. Korelacija vrijednosti FeNO i ukupnog IgE



Slika 23. Korelacija vrijednosti FEV1 i ukupnog IgE

Tjelesna masa izražena kao indeks tjelesne mase (BMI) nije imala utjecaja na težinu astme ( $t -0.01$ ,  $Pr(>|t|) 0.99$ ) ili pojavnost T2 fenotipa ( $t 1.32$ ,  $Pr(>|t|) 0.19$ ). Međutim, dodatnom analizom bolesnika s astmom prema biomarkerima, pokazalo se da je porast BMI u ovoj populaciji ispitanika s astmom dovodio do porasta razine eozinofila u krvi ( $t 2.90$ ,  $Pr(>|t|) 0.004$ ) te je veći BMI bio povezan s većim brojem egzacerbacija astme ( $t 2.55$ ,  $Pr(>|t|) 0.01$ ) kao što je grafički prikazano na Slici 24.



Slika 24. Odnos BMI i eozinofilije te BMI i broja egzacerbacija; ns-not significant (nije značajno)

Daljnja analiza stupnja kontrole astme je pokazala da nema statistički značajne razlike među fenotipovima te nije bilo razlike u korištenju oralnih kortikosteroida između T1 i T2 fenotipa astme ( $z$  -0.29,  $Pr(>|z|)$  0.77;  $z$  -0.71,  $Pr(>|z|)$  0.48). Uz to, fenotip astme nije imao utjecaj na težinu astme prema GINA stadiju kao niti na prisutnost trajne opstrukcije ( $t$  -0.19,  $Pr(>|t|)$  0.23;  $t$  -0.13,  $Pr(>|t|)$  0.89). Spol također nije imao ulogu u težini astme po GINA stupnju ( $t$  1.33,  $Pr(>|t|)$  0.19). S druge pak strane, analizom pojedinačnih biomarkera se došlo do rezultata da povišene vrijednosti FeNO dovode do slabije kontrole astme što je osobito izraženo kod vrijednosti FeNO iznad 50 ppb ( $z$  2.55,  $Pr(>|z|)$  0.01;  $z$  2.92,  $Pr(>|z|)$  0.003). Analizom utjecaja fenotipa na difuzijski kapacitet pluća se nije našlo statistički značajne povezanosti između T2 fenotipa i sniženih vrijednosti DLCO (*Diffusing Capacity Of The Lungs For Carbon Monoxide*) ( $t$  1.55,  $Pr(>|t|)$  0.13), a niti teža astma (bez obzira na fenotip) prema GINA stupnju nije imala statistički značajno veću šansu za snižene vrijednosti difuzijskog kapaciteta ( $t$  -1.86,  $Pr(>|t|)$  -0.07). Međutim T2 fenotip astme je imao veću šansu za prisutnost poremećaja na nivou alveokapilarne membrane izražen smanjenim vrijednostima KCO ( $t$  2.12,  $Pr(>|t|)$  0.04) iako težina astme po GINA stupnju nije bila značajno povezana sa sniženim vrijednostima KCO ( $t$  0.33,  $Pr(>|t|)$  0.74).

### 5.3. GENSKA ANALIZA

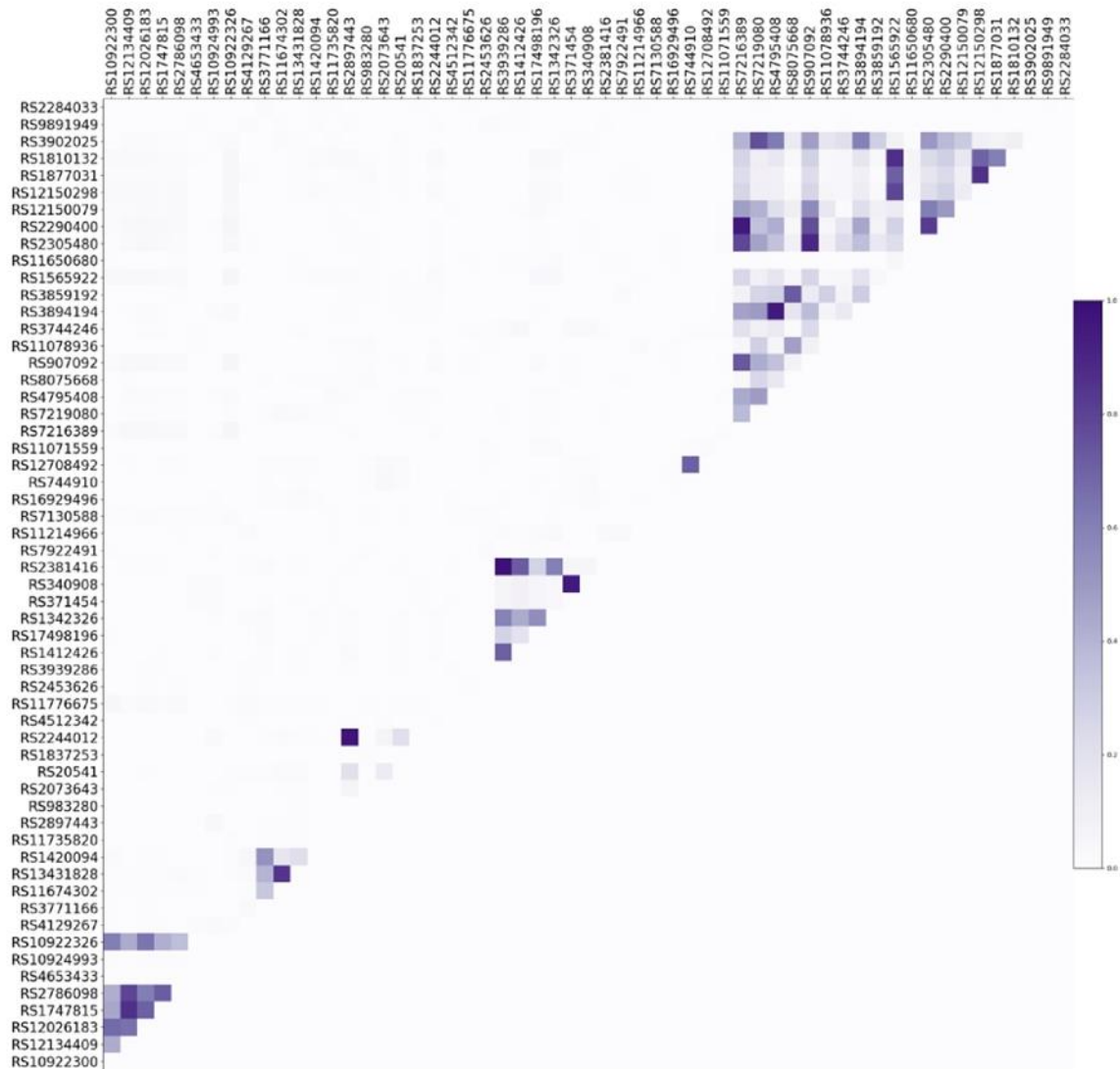
U Tablici 11 navedeni su podaci o uspješno genotipiziranim polimorfizmima.

Odabir polimorfizama od interesa temeljio se na optimalnoj količini informacija o genetskoj varijabilnosti i povezanosti s astmom, uzimajući u obzir prethodne genske studije. Polimorfizmi koji su pokazali povezanost s astmom i koji su preživjeli višestruka testiranja i dosegli značaj za čitav genom, mapirani su na kromosomima 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 17 i 22 i formirali su 5 blokova (Slika 25). Analizirani SNP-ovi s kromosoma 16 isključeni su iz konačne analize jer nisu prošli kontrolu kvalitete.

Tablica 11. SNP-*single nucleotide polymorphism*, MAF-frekvencija minornog alela, HWE- Hardy-Weinberg ekvilibrij, UTR- *untranslated region*

Gen	SNP identifikacija	Kromosomska regija	Fizička pozicija	Alel	SNP: tip i funkcija	Stopa poziva	MAF	HWE p
/	RS10922300	1q31.3	197845555	T/C	regulatorna regija	0,977654	0,15	1
/	RS10922326	1q31.3	197898532	G/T	intergenski	0,994413	0,14	1
/	RS10924993	1q31.3	236296485	G/T	intergenski	0,996276	0,45	0,54
/	RS12026183	1q31.3	197843902	T/C	regulatorna regija	0,996276	0,17	0,76
CRB1	RS2786098	1q31.3	197356778	A/C	intron	0,990689	0,19	1
CRB1	RS12134409	1q31.3	197422937	T/C	intron	0,98324	0,19	0,89
DENND1B	RS1747815	1q31.3	197728973	A/G	intron	0,990689	0,18	0,77
IL6R	RS4129267	1q21.3	154453788	T/C	intron	0,996276	0,38	0,31
SRP9	RS4653433	1q42.12	225786829	A/G	intron	0,998138	0,44	0,79
/	RS11674302	2q12.1	102270668	C/T	intergenski	0,998138	0,18	0,08
IL1RL1	RS13431828	2q12.1	102338193	T/C	5 prim UTR	0,996276	0,19	0,02
IL18R1	RS1420094	2q12.1	102399227	G/A	3 prim	0,998138	0,495	0,67
IL18R1	RS3771166	2q12.1	102369762	T/C	intron	0,998138	0,39	0,93
EPHA5	RS11735820	4q13.1	65632898	G/T	intron	0,98324	0,35	0,008
/	RS1837253	5q22.1	111066174	T/C	intergenski	0,981378	0,24	1
IL13	RS20541	5q31.1	132660272	T/C	<i>missense</i>	0,98324	0,23	0,80
PDE4D	RS983280	5q12.1	60149310	G/A	intron	0,998138	0,31	0,84
RAD50	RS2897443	5q31.1	132593902	A/C	intron	0,998138	0,28	0,91
RAD50	RS2244012	5q31.1	132565533	C/T	intron	0,979516	0,28	0,67
SLC22A5	RS2073643	5q31.1	132387596	T/C	intron	0,977654	0,499	0,54
CDH17	RS11776675	8q22.1	94163787	C/T	intron	0,996276	0,30	0,08
NRG1	RS4512342	8p12	32750356	G/T	intron	0,979516	0,09	0,795
RGS22	RS2453626	8q22.2	100125669	T/C	intron	0,998138	0,47	0,60
/	RS1342326	9p24.1	6190076	A/C	intergenski	0,994413	0,14	0,72
/	RS1412426	9p24.1	6188652	T/G	intergenski	1	0,29	0,35
/	RS2381416	9p24.1	6193455	C/A	intergenski	0,994413	0,23	0,39
/	RS340908	9p24.1	6128897	T/C	intergenski	0,981378	0,24	0,72
/	RS371454	9p24.1	6078614	C/T	intergenski	0,998138	0,23	1
/	RS3939286	9p24.1	6210099	A/G	intergenski	0,998138	0,23	0,18
IL33	RS17498196	9p24.1	6237547	C/A	intron	0,98324	0,197	0,68
PRKG1	RS7922491	10q21.1	51733713	A/G	intron	0,998138	0,08	0,397
LOC101928940	RS11214966	11q23.2	114360533	C/T	intron (najbliži gen je C11orf71)	0,981378	0,07	0,73
/	RS16929496	12p12.1	25840870	C/T	regulatorna regija (najbliži gen je RASSF8)	0,981378	0,18	0,24
RORA	RS11071559	15q22.2	60777789	T/C	intron	0,996276	0,16	0,63
SMAD3	RS12708492	15q22.33	67175203	T/C	intron	0,981378	0,496	0,86
SMAD3	RS744910	15q22.33	67154447	A/G	intron	0,998138	0,49	0,10
/	RS11650680	17q21.2	40422984	T/C	intergenski	0,998138	0,24	0,12
/	RS4795408	17q21.1	39951374	A/G	intergenski	0,996276	0,46	1

/	RS9891949	17p13.1	8195865	G/A	regulatorna regija	0,996276	0,31	0,68
ERBB2	RS1810132	17q12	39709752	C/T	intron	0,996276	0,29	0,12
GSDMA	RS7219080	17q21.1	39958263	A/C	intron	0,992551	0,37	0,71
GSDMA	RS3859192	17q21.1	39972395	T/C	intron	0,98324	0,395	0,93
GSDMA	RS3894194	17q21.1	39965740	T/C	missense	0,996276	0,46	1
GSDMA	RS3902025	17q21.1	39963001	C/A	intron	0,992551	0,43	0,66
GSDMB	RS7216389	17q21.1	39913696	C/T	intron	0,98324	0,46	0,22
GSDMB	RS2290400	17q21.1	39909987	G/A	intron	1	0,46	0,26
GSDMB	RS2305480	17q21.1	39905943	T/C	missense	0,998138	0,42	0,29
IKZF3	RS907092	17q12	39766006	A/G	sinonimna varijanta	0,994413	0,42	0,25
MED24	RS11078936	17q21.1	40041661	C/T	intron	0,98324	0,42	0,66
ORMDL3	RS3744246	17q21.1	39928097	T/C	intron	0,998138	0,16	0,87
PGAP3	RS12150298	17q12	39678288	T/C	intron	0,98324	0,33	0,28
PGAP3	RS1565922	17q12	39674782	T/C	intron	0,921788	0,27	0,0008
PSMD3	RS8075668	17q21.1	39981370	C/T	intron	0,98324	0,46	0,73
STARD3	RS1877031	17q12	39657827	C/T	missense	0,98324	0,33	0,69
ZBP2	RS12150079	17q21.1	39869164	A/G	intron	0,98324	0,29	0,21
IL2RB	RS2284033	22q12.3	37137994	A/G	intron	0,98324	0,41	0,06



Slika 25. Prikaz LD-a s blokovima haplotipova analiziranih gena.



Tablica 13.

KROMOSOM		17																			
SNP		RS11650680	RS4795408	RS9891949	RS1810132	RS7219080	RS3859192	RS3894194	RS3902025	RS7216389	RS2290400	RS2305480	RS907092	RS11078936	RS3744246	RS12150298	RS1565922	RS8075668	RS1877031	RS12150079	
POZITIVNA ASOCIJACIJA	Prisutnost astme u odraslih																				
	Pojava astme u djetinjstvu																				
	Pojava astme u odrasloj dobi																				
	T2 fenotip astme (alergijski+eozinofilni)																				
	Prisutnost nosne polipoze																				
	Fenotip čestog egzacerbatora																				
	Prisutnost trajne opstrukcije																				
	Kontrolirana astma																				
NEGATIVNA ASOCIJACIJA	Prisutnost astme u odraslih																				
	Pojava astme u djetinjstvu																				
	Pojava astme u odrasloj dobi																				
	T2 fenotip astme (alergijski+eozinofilni)																				
	Prisutnost nosne polipoze																				
	Fenotip čestog egzacerbatora																				
	Prisutnost trajne opstrukcije																				
	Kontrolirana astma																				

Zatamnjena polja označavaju povezanost ispitivane osobine i polimorfizma. Nije nađena relevantna asocijacija između T2 eozinofilnog fenotipa astme, T2 alergijskog fenotipa astme i T1 fenotipa astme i ispitivanih polimorfizama. SNP- *single nucleotide polymorphism*

Istraživanje povezanosti prisutnosti aktivne astme u odraslih neovisno o dobi pojave bolesti (dakle prisutan je neki od simptoma bolesti ili poremećena plućna funkcija, bolesnik troši neki od lijekova koji su odobreni za liječenje astme u Hrvatskoj i/ili nisu zadovoljeni kriteriji za remisiju bolesti) s polimorfizmima jednog gena je pokazalo da su SNP na kromosomu 1 (RS10922300, z 2.48 Pr(>|z|) 0.012), kromosomu 2 (RS11674302, z 2.88 Pr(>|z|) 0.004), kromosomu 9 (RS1342326, z 2.04 Pr(>|z|) 0.041) i kromosomu 17 (RS3744246, z 2.62 Pr(>|z|) 0.008) bili rizični za prisutnost astme u odraslih.

S druge pak strane, protektivni učinak na prisutnost astme u odrasloj dobi su imali sljedeći polimorfizmi: na kromosomu 1 RS12026183 (z -2.388 Pr(>|z|) 0.016), kromosomu 2 RS1420094 (z -2.213 Pr(>|z|) 0.026), kromosomu 9 RS1412426 (z -2.854 Pr(>|z|) 0.004) i kromosomu 17 RS1412426 (z -2.335 Pr(>|z|) 0.019) i RS1877031 (z -2.987 Pr(>|z|) 0.002). U slučaju da su se istraživani pojedinačni genotipovi, onda je na primjeru RS10922300 (koji



je dio regulatorne regije) vidljivo da je TT genotip nije bio povezan niti s jednom istraživanom osobinom, za razliku od genotipa TC i CC koji su bili u vezi s prisutnošću astme u odraslih, T2 fenotipom astme (uključujući pojedinačni eozinofilni, alergijski i miješani alergijski i eozinofilni fenotip), ali i ne-T2 fenotipom.

U slučaju da se nije našla statistički značajna asocijacija određenog SNP-a s testiranom osobinom astme, istraživanje pojedinačnih genotipova je ipak moglo dati pozitivan signal, ali se tada nije određivalo je li ta veza rizična za pojavu određene osobine ili ima protektivni učinak. Primjer toga je na kromosomu 1, polimorfizam za IL6R, RS 4129267 čiji je genotip TT bio u vezi s prisutnošću astme u odraslih, T2 alergijskim fenotipom i ne-T2 fenotipom astme, a genotip TC samo s prisutnošću astme u odraslih i T2 alergijskim fenotipom dok CC genotip nije imao statistički značajnu povezanost niti s jednom istraživanom osobinom astme. Kod gena RAD50, u konačnici su uspješno genotipizirana 2 polimorfizma RS983280 i RS2897443. Za RS983280, genotip CC nije bio u vezi niti s jednom testiranom značajkom fenotipa astme ili komorbiditetom, dok je AA genska varijanta bila povezana s prisutnošću astme u odraslih i ne-T2 fenotipom, a CA genska varijanta samo s prisutnošću astme u odraslih, ali ne i s nekim određenim fenotipom. Genotipovi CC, TC i TT polimorfizma RS2897443 imali su samo asocijaciju s prisutnošću astme u odraslih. Za ORMDL3 gen na kromosomu 17, uspješno je genotipiziran samo RS3744246 čiji je TT genotip doveden u vezu s prisutnošću astme u odraslih i ne-T2 fenotipom, a CC genotip samo s prisutnošću astme u odraslih. Na kromosomu 17 se nalazi i STARD3 gen čiji su genotipovi *missense* SNP-a RS1877031: CC, TC i TT bili u vezi s astmom u odraslih, a CC i s pojavom astme u dječjoj dobi.

Kod istraživanja povezanosti pojavnosti astme u dječjoj dobi s relevantnim polimorfizmima, našlo se da su SNP na kromosomu 4 (RS11735820, z 2.117, Pr(>|z|) 0.0342) i 17 (RS9891949, z 2.902, Pr(>|z|) 0.0037; RS2305480, z 2.822, Pr(>|z|) 0.0047; RS1565922, z 2.905, Pr(>|z|) 0.0036; RS1877031, z 2.589, Pr(>|z|) 0.0096) bili rizični, dok su SNP samo na kromosomu 17 imali zaštitni učinak na pojavu astme u djece (RS4795408, z -2.093, Pr(>|z|) 0.0363; RS2290400, z -1.965, Pr(>|z|) 0.0493; RS12150298, z -3.322, Pr(>|z|) 0.0008). Obrnuto je vrijedilo za pojavu astme u odrasloj dobi.

Pojedinačni učinak navedenih polimorfizama za ovo i ostale ispitivane osobine astme i komorbiditeta nije bilo moguće istražiti jer su navedeni SNP-ovi s istog kromosoma bili u značajnom LD-u ( $r^2 > 0.4$ , Slika 25).

Valja također istaknuti da su u ovoj studiji sudionici bili stariji od 18 god. te da su podaci o pojavnosti astme u dječjoj dobi preuzeti retrospektivno, dakle iz dostupne medicinske dokumentacije ili iz intervjua s ispitanicima te je stoga moguće da su podložni greški ukoliko

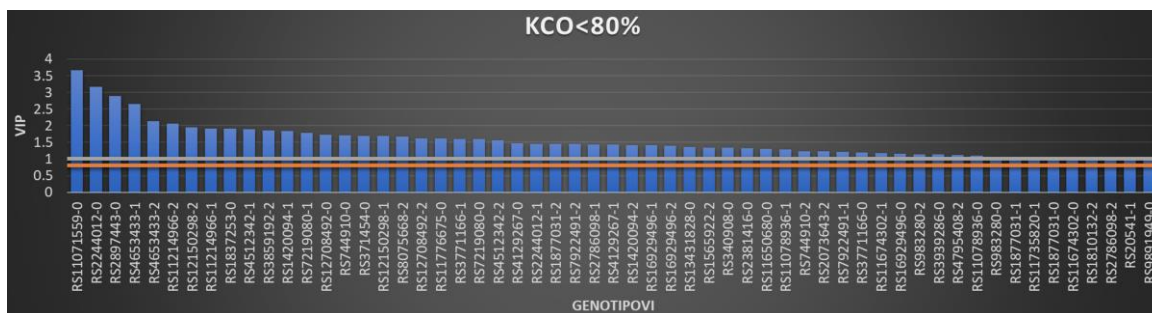
se ispitanik nije mogao sjetiti točnog vremena nastupa bolesti ili je moguće bila prisutna greška u vođenju povijesti bolesti.

Nadalje su bile analizirane povezanosti polimorfizama i fenotipa čestog egzacerbatora, prisutnosti trajne opstrukcije i kontrolirane astme.

Rizičnima za učestale egzacerbacije astme su se pokazali polimorfizmi gena na kromosomima 1 za gen DENND1B RS1747815 (z 3.274, Pr(>|z|) 0.0012) i 2 za IL18R1 RS1420094 (z 2.239, Pr(>|z|) 0.0263), a zaštitnu ulogu je imao polimorfizam gena CRB1 na kromosomu 1 RS2786098 (z -3.296, Pr(>|z|) 0.0011) i 2 polimorfizma na kromosomu 17, za gen ERBB2 RS1810132 (z -2.139 Pr(>|z|) 0.0337) i za gen MED24 RS11078936 (z -2.892 Pr(>|z|) 0.0003). Trajna opstrukcija je bila vjerojatnija u ispitanika koji su nositelji polimorfizma RS2381416 na kromosomu 9 (z 2.497 Pr(>|z|) 0.0125) i RS1810132 gena ERBB2 (z 2.546 Pr(>|z|) 0.0108) i RS12150079 gena ZPBP2 (z 3.342 Pr(>|z|) 0.0008) na kromosomu 17. Manju vjerojatnost za trajnu opstrukciju su imali odrasli ispitanici nositelji polimorfizama gena na kromosomima 1 (RS12026183, z -1.981 Pr(>|z|) 0.0476), 9 (RS1412426, z -2.998 Pr(>|z|) 0.0027), 11 (RS11214966, z -2.091 Pr(>|z|) 0.0365) i na kromosomu 17 (RS11650680, z -3.030 Pr(>|z|) 0.0024; RS7216389, z -3.093 Pr(>|z|) 0.0019; RS12150298, z -2.887 Pr(>|z|) 0.0038). S kontroliranom astmom su pozitivnu asocijaciju imale varijante gena na kromosomu 5 za IL13 (RS20541, z 2.110 Pr(>|z|) 0.034), 8 za CDH 17 (RS11776675, z 2.118 Pr(>|z|) 0.034), 9 (RS371454, z 2.467 Pr(>|z|) 0.013) i na kromosomu 17 za GSDMA (RS7219080, z 2.448 Pr(>|z|) 0.014), ORMDL3 (RS3744246, z 2.731 Pr(>|z|) 0.006) i PSDM3 (RS8075668, z 2.019 Pr(>|z|) 0.043). Negativnu asocijaciju s kontrolom astme u odraslih su imali SNP za gene na kromosomima 1 za DENND1B (RS1747815, z -2.731 Pr(>|z|) 0.006), 9 (RS340908, z -2.642 Pr(>|z|) 0.008), 12 u blizini gena RASSF8 (RS16929496, z -2.191 Pr(>|z|) 0.028) i 17 (RS3859192 gena GSDMA, z -2.539 Pr(>|z|) 0.011; RS3902025 gena GSDMA, z -2.667 Pr(>|z|) 0.007; RS907092 gena IKZF3, z -2.622 Pr(>|z|) 0.008).

U analizi odnosa smanjenog difuzijskog kapaciteta pluća i polimorfizama odabranih gena, nije nađeno statistički značajne povezanosti.

Odnosi među pojedinim genotipovima vidljivi su na Slici 26.



Slika 26. Vrijednosti VIP>1 za određeni genotip smatraju se značajnima.

*variable importance for projection-VIP, carbon monoxide transfer coefficient-KCO*

Nije nađeno relevantnih asocijacija između T2 eozinofilnog fenotipa astme, T2 alergijskog fenotipa astme i T1 fenotipa astme i ispitivanih polimorfizama.

Veću vjerojatnost za T2 kombinirani alergijski i eozinofilni fenotip astme su imali nositelji polimorfizama gena na kromosomima 1 (RS10924993, z 2.120 Pr(>|z|) 0.034; RS1747815, z 2.306 Pr(>|z|) 0.021), 8 za RGS 22 (RS2453626, z 2.088 Pr(>|z|) 0.037) i 17 za GSDMB (RS7216389, z 2.411 Pr(>|z|) 0.0159). Zaštitnu ulogu od alergijskog i eozinofilnog adultnog fenotipa astme su imali polimorfizmi na kromosomima 1 (RS12026183, z -2.781 Pr(>|z|) 0.0054), 2 za gen IL18R1 (RS3771166, z -2.847 Pr(>|z|) 0.0044), 4 za gen EPHA5 (RS11735820, z -2.359 Pr(>|z|) 0.018), 5 za gen SLC22A5 (RS2073643, z -2.084 Pr(>|z|) 0.037), 15 za gen SMAD3 (RS12708492, z -2.318 Pr(>|z|) 0.020) i 17 (RS1810132 gena za ERBB2, z -2.353 Pr(>|z|) 0.019; RS1877031 za SMAD3, z -2.349 Pr(>|z|) 0.019).

U ovoj je studiji analizirana i genska podloga nosne polipoze u odraslih bolesnika s astmom te je nađena pozitivna asocijacija SNP-a RS10924993 (z 2.767 Pr(>|z|) 0.005) i RS2786098 (z 2.663 Pr(>|z|) 0.007) gena za CRB1 na kromosomu 1, RS2897443 (z 2.284 Pr(>|z|) 0.022) gena RAD50 na kromosomu 5, RS3894194 (z 2.121 Pr(>|z|) 0.033) gena GSDMA i RS1877031 (z 2.662 Pr(>|z|) 0.007) STARD3 na kromosomu 17 s ovim čestim komorbiditetom. Zaštitnu ulogu protiv razvoja nosne polipoze z odraslih bolesnika s astmom su imali SNP RS2284033 (z -2.663 Pr(>|z|) 0.007) gena IL2RB na kromosomu 22 i RS11650680 (z -2.324 Pr(>|z|) 0.020), RS1810132 (z -2.670 Pr(>|z|) 0.007) gena ERBB2, RS3859192 (z -2.153 Pr(>|z|) 0.031) gena GSDMA i RS907092 (z -2.032 Pr(>|z|) 0.042) gena IKZF3 na kromosomu 17.

Tablica 14.

Gen	SNP identifikacija	KROMOSOM	GENOTIP (KOD)	RELEVANTNI FENOTIP (VIP)	STANDARDNA DEVIJACIJA (gornja i donja granica)	
regulatorna regija	RS10922300	1	TT - 0			
			TC - 1	Prisutnost astme u odraslih (1,61)	0.95 (-0.54-3.77)	
				T2-niski fenotip astme (1,01)	0.72 (-0.63-2.65)	
				T2-visoka (eozinofilna) astma (1,10)	0.83 (-0.78-2.98)	
				T2-visoka (alergijska) astma (1,09)	0.68 (-0.44-2.64)	
			CC - 2	T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,04)	0.76 (-0.69-2.76)	
intergenski	RS10922326	1	GG - 0	Prisutnost astme u odraslih (1,35)	1.03 (-0.99-3.69)	
			GT - 1	T2-niski fenotip astme (1,41)	0.84 (-0.49-3.31)	
				T2-visoka (eozinofilna) astma (1,48)	0.83 (-0.39-3.36)	
				T2-visoka (alergijska) astma (1,52)	0.78 (-0.25-3.29)	
				T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma	0.82 (-0.42-3.29)	
			TT - 2	T2-visoka (eozinofilna) astma (1,06)	0.84 (-0.85-2.97)	
T2-niski fenotip astme (1,24)	0.67 (-0.27-2.75)					
T2-visoka (eozinofilna) astma (1,08)	0.61 (-0.31-2.46)					
intergenski	RS10924993	1	GG - 0	T2-visoka (alergijska) astma (1,43)	0.67 (-0.09-2.95)	
				T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,18)	0.64 (-0.28-2.64)	
				T2-niski fenotip astme (1,34)	0.64 (-0.10-2.79)	
				T2-visoka (eozinofilna) astma (1,32)	0.65 (-0.16-2.79)	
			GT - 1	T2-visoka (alergijska) astma (1,37)	0.62 (-0.03-2.77)	
				T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,29)	0.59 (-0.03-2.62)	
regulatorna regija	RS12026183	1	GG - 0	Prisutnost astme u odraslih (2,01)	1.03 (-0.33-4.34)	
			GT - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,20)	0.89 (-0.81-3.21)	
				T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,06)	0.86 (-0.90-3.01)	
				Prisutnost astme u odraslih (1,05)	1.04 (-1.30-3.39)	
				T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,26)	0.78 (-0.49-3.02)	
			TT - 2	T2-niski fenotip astme (1,07)	1.27 (-1.79-3.94)	
T2-niski fenotip astme (1,75)	0.82 (-0.11-3.60)					
CRB1	RS2786098	1	CA - 1	T2-visoka (eozinofilna) astma (1,88)	0.87 (-0.08-3.84)	
				T2-visoka (alergijska) astma (1,94)	0.75 (0.24-3.64)	
				T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,95)	0.91 (-0.12-4.01)	
				Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,21)	1.12 (-1.31-3.74)	
			CC - 2	T2-niski fenotip astme (1,49)	0.79 (-0.28-3.27)	
				T2-visoka (eozinofilna) astma (1,62)	0.76 (-0.10-3.33)	
CRB1	RS12134409	1	CC - 2	T2-visoka (alergijska) astma (1,69)	0.76 (-0.03-3.39)	
				T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,69)	0.83 (-0.19-3.57)	
				Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,27)	0.96 (-0.91-3.44)	
				Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,47)	1.29 (-1.47-4.40)	
			AA - 0	T2-niski fenotip astme (1,10)	0.69 (-0.45-2.66)	
				T2-visoka (eozinofilna) astma (1,09)	0.78 (-0.66-2.85)	
DENND1B	RS1747815	1	CA - 1	T2-visoka (alergijska) astma (1,03)	0.72 (-0.59-2.65)	
				Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,07)	1.03 (-1.26-3.39)	
				AA - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,27)	0.98 (-0.95-3.48)
				AG - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,57)	1.19 (-1.12-4.26)
			GG - 2	T2-niski fenotip astme (1,22)	0.82 (-0.63-3.06)	
				T2-visoka (eozinofilna) astma (1,51)	0.90 (-0.53-3.56)	
IL6R	RS4129267	1	GG - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,17)	1.11 (-1.35-3.68)	
				T2-visoka (eozinofilna) astma (1,22)	0.86 (-0.73-3.16)	
				TT - 0	Prisutnost astme u odraslih (3,25)	0.68 (1.72-4.79)
				T2-niski fenotip astme (1,36)	0.92 (-0.72-3.44)	
			TC - 1	T2-visoka (alergijska) astma (1,09)	0.87 (-0.89-3.07)	
				Prisutnost astme u odraslih (1,45)	0.54 (0.22-2.67)	
SRP9	RS4653433	1	CC - 2	T2-visoka (alergijska) astma (1,05)	0.88 (-0.94-3.04)	
			AA - 0	2-visoka (eozinofilna) astma (1,04)	0.76 (-0.68-2.77)	
				T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,01)	0.79 (-0.77-2.79)	
AG - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,04)	1.23 (-1.74-3.81)				
GG - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,15)	0.85 (-0.78-3.08)				

intergenski	RS11674302	2	CC - 0	Prisutnost astme u odraslih (1,17) T2-niski fenotip astme (1,06)	0.9 (-0.88-3.21) 0.78 (-0.69-2.81)
			CT - 1	Prisutnost astme u odraslih (1,87) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,52) T2-visoka (alergijska) astma (1,05) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,00)	0.99 (-0.38-4.13) 0.73 (-0.13-3.17) 0.67 (-0.46-2.56) 0.63 (-0.41-2.41)
			TT - 2	Prisutnost astme u odraslih (2.19) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,48) T2-visoka (alergijska) astma (1,39) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma	1.09 (-0.27-4.66) 0.53 (0.27-2.68) 0.60 (-0.03-2.76) 0.48 (0.15-2.32)
IL1RL1	RS13431828	2	TT - 0	T2-niski fenotip astme (1,13)	0.73 (-0.51-2.77)
			TC - 1	Prisutnost astme u odraslih (2.14) T2-visoka (alergijska) astma (1,05)	0.96 (-0.02-4.30) 0.79 (-0.74-2.84)
			CC - 2	Prisutnost astme u odraslih (2,36) T2-niski fenotip astme (1,08) T2-visoka (alergijska) astma (1,42) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,08)	1.21 (-0.38-5.09) 0.68 (-0.45-2.62) 0.76 (-0.30-3.15) 0.68 (-0.46-2.63)
IL18R1	RS1420094	2	GG - 0		
			AG - 1	T2-niski fenotip astme (1,69) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,34) T2-visoka (alergijska) astma (1.2) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,26)	1.61 (-0.93-4.32) 0.87 (-0.62-3.32) 1.37 (-1.89-4.29) 1.35 (-1.79-4.29)
			AA - 2		
IL18R1	RS3771166	2	TT - 0	T2-niski fenotip astme (1,75) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,01) T2-visoka (alergijska) astma (1,41)	1.05 (-0.62-4.11) 1.15 (-0.60-3.61) 1.22 (-1.34-4.16)
			TC - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,73) T2-niski fenotip astme (2,30) T2-visoka (eozinofilna) astma (2,32) T2-visoka (alergijska) astma (1,47) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,72)	1.15 (-0.88-4.34) 1.02 (-0.00-4.61) 0.92 (0.23-4.41) 1.39 (-1.68-4.63) 1.29 (-1.19-4.63)
			CC - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,30) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,55)	1.33 (-1.71-4.32) 0.75 (-0.14-3.24)
EPHA5	RS11735820	4	GG - 0	Prisutnost astme u odraslih (1.11) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,01)	0.97 (-1.07-3.30) 0.63 (-0.42-2.43)
			GT - 1	T2-niski fenotip astme (1,05)	0.81 (-0.79-2.88)
			TT - 2		
intergenski	RS1837253	5	TT - 0	T2-niski fenotip astme (1,02)	0.33 (0.27-1.78)
			TC - 1	Prisutnost astme u odraslih (2.01)	0.79 (0.21-3.81)
			CC - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,87)	0.94 (-0.26-3.99)
IL13	RS20541	5	TT - 0		
			TC - 1		
			CC - 2		
PDE4D	RS983280	5	GG - 0		
			GA - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,51)	0.98 (-0.71-3.73)
			AA - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,19) T2-visoka (alergijska) astma (1,08)	0.89 (-0.80-3.19) 0.88 (-0.91-3.07)
RAD50	RS2897443	5	AA - 0	Prisutnost astme u odraslih (2,28) T2-niski fenotip astme (1,17)	1.14 (-0.31-4.86) 0.86 (-0.77-3.11)
			CA - 1	Prisutnost astme u odraslih (1,87)	1.19 (-0.83-4.57)
			CC - 2		
RAD50	RS2244012	5	CC - 0	Prisutnost astme u odraslih (2.37)	1.19 (-0.33-5.07)
			TC - 1	Prisutnost astme u odraslih (2.21)	0.98 (-0.02-4.45)
			TT - 2	Prisutnost astme u odraslih (1.15 )	1.21 (-1.59-3.89)
SLC22A5	RS2073643	5	TT - 0		
			CT - 1		
			CC - 2		
CDH17	RS11776675	8	CC - 0	T2-niski fenotip astme (1,04) T2-visoka (alergijska) astma (1,49) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,23)	0.74 (-0.64-2.72) 0.66 (-0.00-2.99) 0.47 (0.15-2.30)
			TC - 1	Prisutnost astme u odraslih (1,23)	0.72 (-0.38-2.86)
			TT - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,41)	0.75 (-0.29-3.12)
NRG1	RS4512342	8	GG - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,83) T2-niski fenotip astme (1,33) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,13) T2-visoka (alergijska) astma (1,17) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,09)	1.35 (-1.21-4.87) 0.90 (-0.70-3.37) 0.82 (-0.73-2.99) 0.91 (-0.87-3.22) 0.93 (-1.01-3.19)
			GT - 1		
			TT - 2		

RGS22	RS2453626	8	TT - 0		
			TC - 1	Prisutnost astme u odraslih (1,78) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,21)	1.03 (-0.55-4.11) 0.91 (-0.84-3.26)
			CC - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,21)	0.95 (-0.93-3.34)
intergenski	RS1342326	9	GG - 0	Prisutnost astme u odraslih (1,44) T2-niski fenotip astme (1,09)	0.66 (-0.06-2.93) 0.69 (-0.47-2.65)
			GT - 1		
			TT - 2		
intergenski	RS1412426	9	TT - 0	Prisutnost astme u odraslih (1,79) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,49)	1.61 (-1.85-5.42) 0.73 (-0.15-3.14)
			GT - 1		
			GG - 2		
intergenski	RS2381416	9	CC - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,25) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,07)	0.69 (-0.30-2.79) 0.54 (-0.15-2.29)
			CA - 1		
			AA - 2		
intergenski	RS340908	9	TT - 0	T2-niski fenotip astme (1,52) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,67) T2-visoka (alergijska) astma (1,49) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,84)	0.75 (-0.18-3.21) 0.72 (0.03-3.31) 0.76 (-0.22-3.19) 0.76 (0.12-3.56)
			CT - 1	Prisutnost astme u odraslih (1,84) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,39) T2-niski fenotip astme (1,34) T2-visoka (alergijska) astma (1,23)	1.03 (-0.49-4.18) 0.99 (-0.87-3.64) 0.63 (-0.08-2.77) 0.64 (-0.22-2.69)
			CC - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,38)	0.95 (-0.78-3.54)
			CA - 1		
intergenski	RS371454	9	CC - 0	T2-niski fenotip astme (1,43) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,64) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,87)	0.71 (-0.19-3.04) 0.67 (0.13-3.15) 0.69 (0.29-3.45)
			CT - 1	Prisutnost astme u odraslih (2,26) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,20) T2-niski fenotip astme (1,03)	0.92 (0.18-4.35) 1.15 (-1.39-3.80) 0.66 (-0.45-2.52)
			TT - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,78)	0.96 (-0.40-3.95)
intergenski	RS3939286	9	AA - 0	T2-visoka (eozinofilna) astma (1,21)	0.63 (-0.22-2.63)
			GA - 1		
			GG - 2		
IL33	RS17498196	9	CC - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (2,85) T2-niski fenotip astme (1,8) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,43) T2-visoka (alergijska) astma (1,49) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,29)	1.13 (0.29-5.41) 0.80 (-0.02-3.62) 0.87 (-0.54-3.40) 0.86 (-0.47-3.45) 1.89 (-1.40-3.97)
			CA - 1		
			AA - 2		
PRKG1	RS7922491	10	AA - 0		
			GA - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,09)	0.57 (-0.19-2.37)
			GG - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,12)	0.54 (-0.10-2.34)
LOC101928 940	RS11214966	11	CC - 0	T2-niski fenotip astme (1,09)	0.69 (-0.48-2.66)
			CT - 1		
			TT - 2		
regulatorna regija	RS16929496	12	CC - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,16) T2-niski fenotip astme (1,01)	0.62 (-0.24-2.56) 0.96 (-1.17-3.19)
			TC - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,27)	1.19 (-1.44-3.99)
			TT - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,35)	1.29 (-1.57-4.26)
RORA	RS11071559	15	TT - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,58) T2-niski fenotip astme (1,14)	0.65 (0.10-3.06) 0.58 (-0.16-2.45)
			TC - 1		
			CC - 2		
SMAD3	RS12708492	15	TT - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,55) T2-visoka (alergijska) astma (1,11)	0.77 (-0.20-3.29) 0.85 (-0.82-3.04)
			TC - 1		
			CC - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,50) T2-niski fenotip astme (1,10) T2-visoka (alergijska) astma (1,42) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,32)	0.49 (0.39-2.61) 1.09 (-1.39-3.59) 0.97 (-0.78-3.62) 1.11 (-1.18-3.82)
SMAD3	RS744910	15	AA - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,96) T2-niski fenotip astme (2,02) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,55) T2-visoka (alergijska) astma (2,15) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,93)	0.58 (0.64-3.27) 0.85 (0.10-3.93) 0.77 (-0.19-3.30) 0.75 (0.45-3.85) 0.89 (-0.18-3.95)

			AG - 1		
			GG - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,43) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,14) T2-niski fenotip astme (1,16) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,06) T2-visoka (alergijska) astma (1,28) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,05)	1.03 (-0.89-3.75) 0.79 (-0.65-2.92) 0.89 (-0.84-3.17) 0.73 (-0.59-2.72) 0.66 (-0.22-2.77) 0.59 (-0.30-2.40)
intergenski	RS11650680	17	TT - 0	T2-niski fenotip astme (1,82) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,55) T2-visoka (alergijska) astma (1,32) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,19)	0.70 (0.24-3.40) 0.83 (-0.33-3.43) 0.91 (-0.73-3.37) 1.29 (-1.74-4.12)
			CT - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,84) T2-niski fenotip astme (1,22) T2-visoka (alergijska) astma (1,42) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,12)	1.21 (-0.91-4.58) 0.74 (-0.47-2.89) 0.77 (-0.33-3.17) 0.75 (-0.58-2.81)
			CC - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,69)	1.08 (-0.75-4.15)
intergenski	RS4795408	17	AA - 0		
			AG - 1	T2-visoka (eozinofilna) astma (1,2) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,09)	0.61 (-0.17-2.57) 0.77 (-0.64-2.83)
			GG - 2	T2-niski fenotip astme (1,17) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,28) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,25)	1.32 (-1.82-4.16) 0.95 (-0.84-3.43) 0.89 (-0.76-3.26)
regulatorna regija	RS9891949	17	GG - 0	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,19)	0.93 (-0.89-3.29)
			GA - 1	Prisutnost astme u odraslih (1,02)	1.23 (-1.76-3.79)
			AA - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,01) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,396)	1.42 (-2.19-4.21) 0.87 (-0.56-3.36)
ERBB2	RS1810132	17	CC - 0	Prisutnost astme u odraslih (1,95) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,23)	1.16 (-0.66-4.57) 0.96 (-0.95-3.39)
			CT - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (2,33) T2-niski fenotip astme (1,02) T2-visoka (alergijska) astma (1,02)	1.03 (0.00-4.65) 0.84 (-0.88-2.91) 0.87 (-0.96-2.99)
			TT - 2	Prisutnost astme u odraslih (1,46) Astma koja se javlja u djetinjstvu (2,85) T2-niski fenotip astme (1,21) T2-visoka (alergijska) astma (1,38)	0.81 (-0.38-3.29) 1.21 (0.11-5.58) 1.09 (-1.26-3.68) 1.00 (-0.89-3.65)
GSDMA	RS7219080	17	AA - 0	T2-niski fenotip astme (1,03) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,31)	0.87 (-0.94-2.99) 0.69 (-0.27-2.88)
			CA - 1	Prisutnost astme u odraslih (1,05) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,33) T2-niski fenotip astme (1,553) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,79) T2-visoka (alergijska) astma (1,03) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,31)	0.88 (-0.94-3.04) 0.99 (-0.93-3.59) 0.99 (-0.69-3.79) 1.02 (-0.52-4.09) 1.03 (-1.29-3.35) 1.04 (-1.05-3.67)
			CC - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,51)	1.20 (-1.21-4.23)
GSDMA	RS3859192	17	TT - 0	Prisutnost astme u odraslih (1,55) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,91)	0.88 (-0.43-3.53) 0.93 (-0.19-4.00)
			TC - 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (2,40)	1.08 (-0.03-4.83)
			CC - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,22)	1.11 (-1.28-3.73)
GSDMA	RS3894194	17	TT - 0		
			CT - 1	T2-niski fenotip astme (1,02) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,18) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,25)	0.95 (-1.14-3.17) 0.57 (-0.11-2.46) 0.76 (-0.47-2.97)
			CC - 2		
GSDMA	RS3902025	17	CC - 0		
			CA - 1		
			AA - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,07)	1.32 (-1.92-4.06)
GSDMB	RS7216389	17	CC - 0		
			CT - 1		
			TT - 2		
GSDMB	RS2290400	17	GG - 0		
			GA - 1		
			AA - 2		
GSDMB	RS2305480	17	TT - 0		
			CT - 1		
			CC - 2		
IKZF3	RS907092	17	AA - 0		
			AG - 1		
			GG - 2		

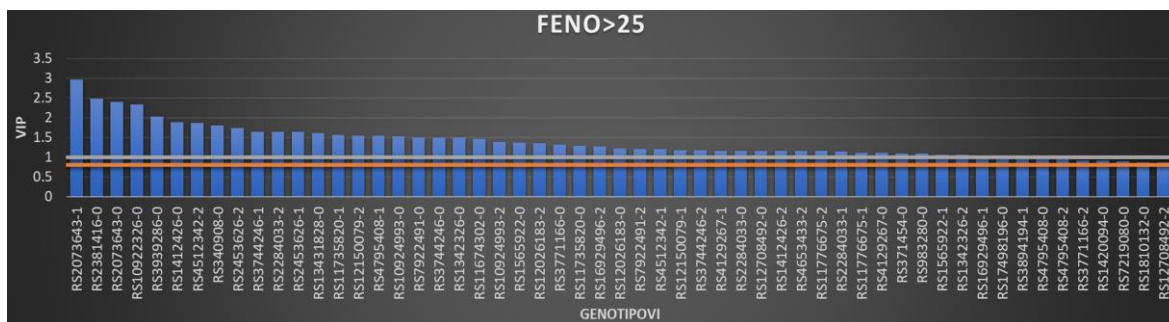
MED24	RS11078936	17	CC – 0		
			TC – 1		
			TT – 2	T2-visoka (alergijska) astma (1,18)	0.81 (-0.65-3.02)
ORMDL3	RS3744246	17	TT – 0	Prisutnost astme u odraslih (2,63) T2-niski fenotip astme (1,09)	0.75 (0.93-4.33) 0.74 (-0.58-2.75)
			TC – 1		
			CC – 2	Prisutnost astme u odraslih (1,21)	0.75 (-0.48-2.89)
PGAP3	RS12150298	17	TT – 0	Prisutnost astme u odraslih (1,99) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,15)	0.76 (0.28-3.69) 0.95 (-1.00-3.30)
			CT – 1		
			CC – 2	Prisutnost astme u odraslih (1,45) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,35)	0.89 (-0.57-3.47) 0.87 (-0.62-3.31)
PGAP3	RS1565922	17	TT – 0	Prisutnost astme u odraslih (2,27) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,45)	1.07 (-0.16-4.69) 0.83 (-0.41-3.32)
			CT -1	Prisutnost astme u odraslih (1,29) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,54)	0.88 (-0.71-3.28) 1.06 (-0.85-3.93)
			CC – 2	Prisutnost astme u odraslih (1,09) Astma koja se javlja u djetinjstvu (2,85) T2-niski fenotip astme (1,29) T2-visoka (alergijska) astma (1.12)	0.69 (-0.48-2.67) 1.06 (0.45-5.24) 1.11 (-1.21-3.80) 1.12 (-1.44-3.67)
PSMD3	RS8075668	17	CC – 0	T2-visoka (alergijska) astma (1,38) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,24)	0.72 (-0.25-3.01) 0.71 (-0.37-2.86)
			CT – 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,48) T2-niski fenotip astme (1,23) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,54) T2-visoka (alergijska) astma (1,03) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma	0.79 (-0.30-3.26) 0.66 (-0.26-2.71) 0.62 (0.13-2.95) 0.81 (-0.81-2.87) 0.68 (-0.04-3.03)
			TT – 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,27) T2-niski fenotip astme (1,29) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,79) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,27)	1.24 (-1.54-4.08) 0.91 (-0.77-3.36) 0.69 (0.22-3.36) 0.79 (-0.52-3.05)
STARD3	RS1877031	17	CC – 0	Prisutnost astme u odraslih (3,33) Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,69)	0.63 (1.89-4.76) 0.97 (-0.49-3.87)
			TC – 1	Prisutnost astme u odraslih (1,24)	0.99 (-1.02-3.49)
			TT – 2	Prisutnost astme u odraslih (1,07)	0.94 (-1.05-3.19)
ZBPB2	RS12150079	17	AA – 0		
			GA – 1	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,03)	0.77 (-0.70-2.76)
			GG - 2	Astma koja se javlja u djetinjstvu (1,40) T2-niski fenotip astme (1,57) T2-visoka (eozinofilna) astma (1,26) T2-visoka (alergijska) astma (1,34)	0.91 (-0.66-3.46) 1.14 (-1.02-4.15) 1.03 (-1.06-3.59) 0.82 (-0.51-3.18)
IL2RB	RS2284033	22	AA – 0		
			AG – 1	T2-visoka (alergijska) astma (1,08) T2-visoka (alergijska+eozinofilna) astma (1,01)	0.48 (-0.01-2.16) 0.53 (-0.19-2.22)
			GG - 2	T2-niski fenotip astme (1,10)	1.15 (-1.49-3.69)

*variable importance for projection-VIP, single nucleotide polymorphism-SNP*

U ovom su radu analizirani i određeni biomarkeri astme koji se često upotrebljavaju u svakodnevnoj kliničkoj praksi radi fenotipiziranja astme ili određivanja težine i stupnja kontrole bolesti.

Tako se našla pozitivna povezanost između povišenih vrijednosti FeNO (>25 ppb) i polimorfizama RS12026183 (z 2.190 Pr(>|z|) 0.029) na kromosomu 1, dok je prisutnost SNP-a RS10922300 (z -2.860 Pr(>|z|) 0.0042) na kromosomu 1, RS12708492 gena SMAD3 (z -2.463 Pr(>|z|) 0.0138) na kromosomu 15, RS1837253 (z -2.215 Pr(>|z|) 0.027) i RS2073643 gena SLC22A5 (z -1.965 Pr(>|z|) 0.049) na kromosomu 5 bila zaštitna u odraslih bolesnika s astmom. Na Slici 27 vidljiva je raspodjela po genotipovima.

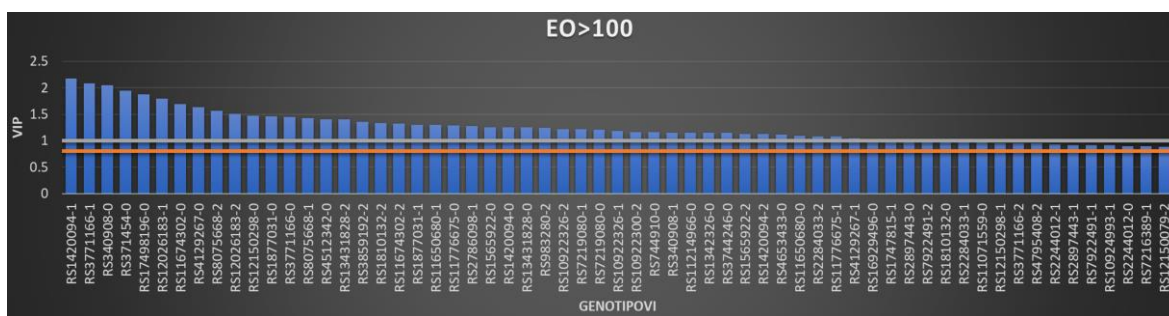




Slika 27. Vrijednosti VIP>1 za određeni genotip smatraju se značajnima.

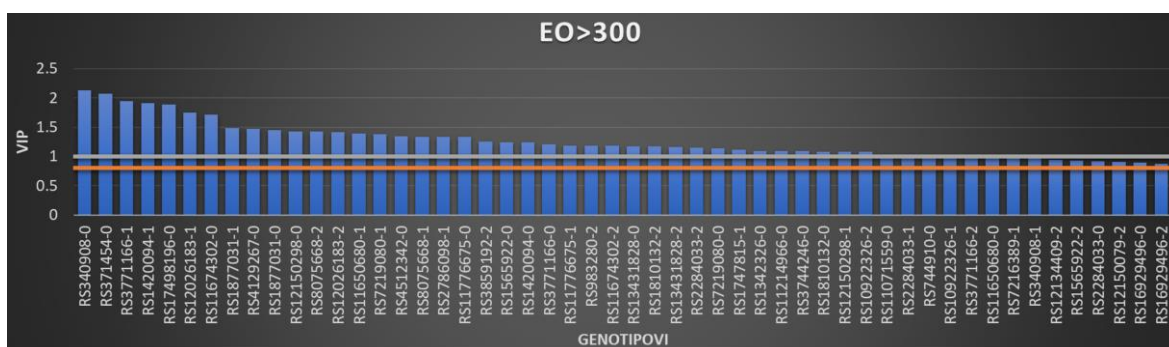
*variable importance for projection-VIP, fractional exhaled nitric oxide-FeNO*

Nije otkriveno statistički značajne povezanosti između krvne eozinofilije (>100 stanica/ $\mu$ L krvi, >300 stanica/ $\mu$ L krvi) i odabranih polimorfizama. Slike 28 i 29 prikazuju pojedine genotipove.



Slika 28. Vrijednosti VIP>1 za određeni genotip smatraju se značajnima.

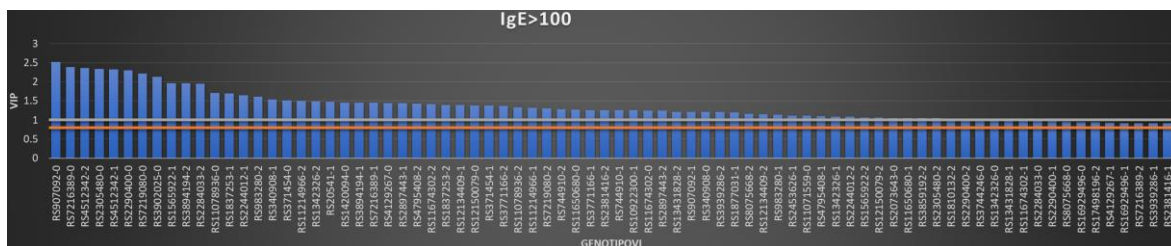
*variable importance for projection-VIP, Eo-eozinofil*



Slika 29. Vrijednosti VIP>1 za određeni genotip smatraju se značajnima.

*variable importance for projection-VIP, Eo-eozinofil*

Ispitanici s astmom u kojih su izmjerene vrijednosti ukupnog IgE>100 IU/mL češće su imali i polimorfizme RS11214966 za LOC101928940 na kromosomu 11 (z 2.310 Pr(>|z|) 0.021), RS1342326 gena IL33 na kromosomu 9 (z 2.750 Pr(>|z|) 0.006), RS2284033 gena IL2RB na kromosomu 22 (z 2.154 Pr(>|z|) 0.031) i RS2290400 gena GSDMB kromosoma 17 (z 2.197 Pr(>|z|) 0.028). Učinci ovih polimorfizama vjerojatno nisu međusobno povezani budući da nisu u značajnom LD-u. Odnosi pojedinačnih genotipova vidljivi su na Slici 30.



Slika 30. Vrijednosti VIP>1 za određeni genotip smatraju se značajnima.

*variable importance for projection-VIP*

Na kraju istražena je i povezanost pušenja i rizika za pojavu astme u odrasloj dobi te je nađeno da veću šansu za to imaju nositelji SNP-a RS1877031 gena STARD3 na kromosomu 17 (z 2.677 Pr(>|z|) 0.007) i RS3902025 gena GSDMA na kromosomu 17 (z 2.940 Pr(>|z|) 0.003) dok su RS11078936 (z -3.800 Pr(>|z|) 0.0001) i RS1565922 gena PGAP3 (z -2.973 Pr(>|z|) 0.0029) također na kromosomu 17 mali zaštitni učinak u pušača.

## 6. RASPRAVA

Unatoč značajnom medicinskom napretku u posljednjih nekoliko desetljeća, astma se još uvijek smatra izazovom upravo zbog svoje kliničke heterogenosti. To je razlog zašto se naziva sindromom ili krovnim pojmom koji obuhvaća više različitih fenotipova i endotipova, a traženje temeljnog uzroka određenog fenotipa postalo je imperativ. (70, 188) Iako koncept različitih kliničkih obilježja grupiranih u klinički primjenjive skupine nije baš novost u astmi, njegova je važnost definitivno u porastu u svjetlu razvoja personalizirane medicine (189). Napredni medicinski tretmani kao što je biološka terapija astme, oslanjaju se na točno određivanje temeljnih mehanizama koji dovode do kronične upale koja rezultira štetnim i potencijalno nepovratnim promjenama u strukturi bronha. Astma može utjecati na osobe svih dobnih skupina, a izravno utječe na živote više od 262 milijuna ljudi diljem svijeta, uzrokujući značajan negativan odjek na kvalitetu života, a predstavlja i ekonomski teret, posebno u zemljama s niskim i srednjim dohotkom. (190, 191) Uobičajene karakteristike bolesnika s astmom uključuju kronični tijek bolesti, često relapsno-remitentni, sa simptomima kao što su kašalj, otežano disanje, piskanje i stezanje u prsima koji ponekad mogu biti vrlo iscrpljujući. (1) Središte patoloških zbivanja u astmi primarno je smješteno u dišnim putovima, točnije, radi se o kaskadi patofizioloških mehanizama koji rezultiraju prodorom upalnih stanica u epitel s hiperprodukcijom sluzi i defektnim odgovorom na vanjske podražaje (kao što su virusne i bakterijske infekcije ili alergeni), uz hipertrofiju i hiperplaziju glatkih mišića, epitelno-mezenhimalnu transformaciju i neželjenu angiogenezu. (192) Uzrok astme nije jednodimenzionalan, to je međuigra genetskih čimbenika i utjecaja okoline. (1) Kako bi se razotkrili genetski uzroci astme i sve veća dostupnost genetskog sekvenciranja, niz istraživanja genoma započeo je početkom 21. stoljeća, u obliku istraživanja gena kandidata u astmi do genomskih asocijacijskih studija (GWAS) i sekvenciranja cijelog genoma (WGS) za otkrivanje varijanti genoma (cijeli geni ili aleli) što je s pojednostavljenjem i pojeftinjenjem postupaka i stvaranjem velikih međunarodnih biobanki s informacijama o genima i njihovim varijantama postalo sve dostupnije. (192) Međutim, istraživanja na blizancima su pokazala da se nastala bolest ne ispoljava na isti način kod svih osoba istog genetskog podrijetla (njezina nasljednost je oko 30-60% kod djece, a oko 10% kod odraslih), odnosno postoje dodatni mehanizmi koji utječu na konačnu kliničku sliku, pri čemu u posljednje vrijeme epigenetika dolazi u fokus (154, 193, 194). Složenost astme nadalje leži u samom broju polimorfizama jednog nukleotida (SNP-ova) povezanih s astmom za koje je utvrđeno da imaju značaj za čitav genom, uključujući odsutnost njihovog nedvosmislenog učinka na osobine astme (jedan SNP može imati važnu ulogu u različitim astmatskim fenotipovima), komplicirajući potragu za uzročno-posljedičnim vezama u astmi. (154, 195) Unatoč dosadašnjim naporima i brojnim GWAS koji

su rezultirali otkrićem stotina značajnih genskih lokusa i asocijacija, naše razumijevanje astme je još uvijek ograničeno, osobito u podzastupljenim populacijama (196).

Pregledom literature, nađeno je da je u Hrvatskoj do sada provedeno nekoliko sličnih istraživanja, no sva su uključivala samo djecu s astmom (i SNP-ove na kromosomima 6, 17 i 20.(181-183) Ovo je prva studija gena kandidata u Hrvatskoj koja ima za cilj razjasniti genomski kontekst pojave astme u odrasloj dobi i povezanih fenotipova (T2-visoka vs. ne-T2/T1 astma uz subfenotipove). Nadalje, istražila se genetska pozadina bolesnika s astmom koja se javlja u djetinjstvu naspram odrasle dobi, genetske čimbenike rizika za trajnu prisutnost simptoma astme u odrasloj populaciji i sklonost čestim egzacerbacijama, remodeliranju dišnih putova s trajnom opstrukcijom i nekontroliranom bolešću. Proučavalo se i posebnu skupinu bolesnika s nosnom polipozom kao jednim od najčešćih pridruženih komorbiditeta te međuodnos između pušenja i genetskih rizičnih lokusa za razvoj astme.

Astma pojavnosti u odrasloj dobi se u fenotipovima ipak razlikuje u odnosu na astmu koja počinje u dječjoj dobi i često je povezana s neželjenim kliničkim tijekom i težom kliničkom slikom.(197) Vrijeme nastupa ovog oblika astme se razlikuje među istraživanjima bilo da se definira jednostavno kao pojava bolesti u odraslih (>18 god. što je korišteno i u ovom istraživanju) ili kao astma kasne pojavnosti što je terminološki još nejasnije jer je granica postavljena u nekim slučajevima već s 12 god. pa sve na više od 65 god.(198, 199) Pristupi stvaranju tzv. klastera astme su raznoliki, ali se ugrubo temelje na matematičkim modelima koji uzimaju u obzir informacije o plućnoj funkciji prije i nakon bronhodilatacije, tj. stupnju opstrukcije, staničnoj predominaciji u krvi ili iskašljaju, vremenu pojave bolesti, tjelesnoj težini i procjeni kontrole bolesti i broja egzacerbacija. Na sličan način se učinilo i u ovom radu te su bolesnici grupirani u T2 i ne-T2 (tj. T1) fenotip s podgrupama eozinofilne, alergijske, miješane (alergijske i eozinofilne) i neeozinofilne/nealergijske astme. Pri tome se našlo da je većina istraživane populacije bolesnika s astmom imala pozitivnu alergijsku dijatezu i ubrojena je u T2 fenotip što je bilo u skladu s nekim ranijim istraživanjima adultne astme.(54, 58, 59) Osim toga, treba istaknuti da su svi materijali iz dišnih puteva uzimani neinvazivno (sputum, inducirani sputum, bris ždrijela ili nazofarinksa) što u konačnici može imati utjecaja na ishod istraživanja jer je moguće da bi invazivniji uzorci (npr. biopsija bronha) eventualno svrstala neke ispitanike s naizgled niskom eozinofilijom u T2 fenotip. Također, za bolesnike koji su na kortikosteroidnoj terapiji, odsutnost eozinofilije može biti iatrogena, a ne posljedica fenotipa astme *per se* što se nastojalo korigirati proučavanjem dostupne medicinske dokumentacije u višegodišnjem periodu iako je ona u nekim slučajevima bila oskudna ili nedostupna te su uzimani podaci o uzetim uzorcima od trenutka uključivanja u studiju. Od Th2 biomarkera, osobito se značajnim pokazao FeNO čije su više vrijednosti bile povezane sa slabijom kontrolom bolesti što je u skladu s recentnim

istraživanjima koja su stavila FeNO u fokus kao važan prediktivni biomarker za relaps astme i pokazatelj odgovora na biološku terapiju.(200) Većina bolesnika s astmom nije bila opterećena značajnim komorbiditetima što je moguće objasniti time da se radilo o pretežno populaciji mlade i srednje životne dobi. Osim što je u populaciji bila predominacija žena što je u skladu s ranijom studijama, bolesnici u ovom istraživanju prosječno ipak nisu imali trajnu opstrukciju, najteži oblik bolesti prema GINA stupnjevanju ili veliki broj egzacerbacija koje bi zahtijevale hospitalizaciju što se razlikuje prema nekim prijašnjim istraživanjima.(201-205) Većina ispitanika je bila iz gradske sredine što je posljedica lokacije centra u kojem se istraživanje provodilo. Uz navedeno, većina je bolesnika s astmom nažalost bila i pušač što se ipak nije odrazilo na prosječnu plućnu funkciju ili difuzijski kapacitet pluća, moguće jer je broj pušačkih godina bio relativno nizak i samim time kumulativni učinak pušenja na pluća, odnosno manja je bila šansa za razvoj kronične opstruktivne bolesti pluća, emfizema ili trajnu remodelaciju dišnih puteva.(206) Ako se pak bolesnika stratificiralo prema fenotipu, onda je T2 grupa bila ipak češće povezana s poremećajem difuzije na nivou alveokapilarne membrane, što se potencijalno može objasniti većim udjelom teške astme u ovom fenotipu koja je inače slabije kontroliran i za koju se pokazalo da ipak može biti udružena i sa smanjenjem vrijednosti DLCO i KCO.(207) U adultnoj astmi je bitna i profesionalna izloženost čiji se utjecaj na razvoj ovog oblika bolesti procjenjuje na 5-18%.(208, 209) U ovom istraživanju profesionalna izloženost i život u gradu nisu bili povezani s težim oblikom bolesti ili njezinom slabijom kontrolom što se može tumačiti i malim brojem ispitanika koji su uopće bili izloženi štetnim okolišnim čimbenicima čime nije postignuta statistička značajnost. U analizi pridruženih komorbiditeta, jedino je nosna polipoza bila povezana s težim stupnjem astme prema GINA klasifikaciji, ali bez utjecaja na kontrolu bolesti, potrebu za oralnim kortikosteroidima ili neki od ispitivanih biomarkera. Prethodna istraživanja su pokazala da je alergijski rinitis inače rizični faktor za razvoj astme u odraslih koja je pak bila češće u vezi s nosnom polipozom (čak do 60%) i preosjetljivošću na acetilsalicilnu kiselinu.(210-212) Za razliku od rezultata u ovom istraživanju, osim povezanosti s višim stupnjem težine bolesti što se među ostalim odražava u većim potrebama za inhalacijskom terapijom i terapijom za olakšavanje, nosna polipoza je i rizični čimbenik za teško lječivu i progresivnu astmu, tj. s bržim propadanjem plućne funkcije.(213, 214) Nosna polipoza je i u odsustvu astme, prediktor za razvoj Th2 upalnog odgovora (vidljivo u izraženijoj krvnoj eozinofiliji i višim izmjerenim vrijednostima ukupnog IgE) i bronhalnu hiperreaktivnost, a nađeno je i da je astma često ostaje nedijagnosticirana u ovoj skupini bolesnika.(215, 216) Suprotno navedenom, u ovoj studiji, nosna polipoza ipak nije bila statistički značajno povezana s krvnom eozinofilijom ili povišenim vrijednostima ukupnog IgE. U ovoj ispitivanoj grupi bolesnika s astmom rizičnijim se pokazala prekomjerna tjelesna masa, budući da je veći BMI bio povezan s češćim egzacerbacijama bolesti i porastom krvne eozinofilije što je

značajno jer je udio pretilih u općoj populaciji u posljednje vrijeme u porastu u Hrvatskoj i svijetu, a nađeno je i da je prekomjerna tjelesna težina znači porast incidencije i prevalencije astme u općoj populaciji uz pogoršanje plućne funkcije.(43, 217-219)

Što se tiče genomske analize u ovom radu, koliko je poznato, ovo je prva studija gena kandidata u Hrvatskoj koja pokazuje genetsku osnovu astme u odraslih s posebnim naglaskom na genetski doprinos relevantnim kliničkim fenotipovima i kliničkim značajkama, kao što je prisutnost trajne opstrukcije protoka zraka ili povezana nosna polipoza. Kao što je već spomenuto u tekstu, prethodne GWAS i studije gena kandidata provedene u hrvatskoj populaciji, uključivale su djecu i pokazale značajne povezanosti za kromosome 17 i 20. U ovom radu, predstavljene su značajne povezanosti pronađene između astme i SNP-ova gena RAD50, STARD3, ORMDL3 i IL6R, a budući da se radi o dijelu veće studije (CAAS), također su ukratko predstavljeni i pronalasci u sklopu genotipizacije i ostalih analiziranih gena na kromosomima 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 17 i 22.

Ono što je zajedničko većini genotipiziranih polimorfizama u ovoj studiji je njihova lokacija u intronskoj regiji ili nekoj drugoj regiji koja nije kodirajuća, tj. ne daje proteinski produkt. Ova činjenica je u skladu s ranijom studijom autora El-Husseini i sur. koji su našli da je oko 88% polimorfizama smješteno u nekodirajućem dijelu DNA.(220) Pitanje je onda načina na koje mutacije u ovakvim regijama uopće mogu utjecati na patofiziologiju astme. Rezultati ovih regija u genomu mogu biti tzv. nekodirajuće RNA kojima pripadaju mikro RNA (miRNA), duge nekodirajuće RNA (lncRNA) i cirkularne RNA (circRNA) koje imaju značajne regulatorne uloge, osobito u fazi prerade nakon procesa prepisivanja gena te u konačnici u proliferaciji stanica, formiranju i pojačavanju nekih patoloških stanja i odgovoru na terapiju.(221, 222) Intronske su regije općenito bile povezivane s brojnim bolestima, osobito onkološkim, što nije neobično s obzirom na njihovu funkciju u diferencijaciji stanica i ekspresiji gena.(223) Uloga ovih vrsta RNA već je dokazana i u patogenezi astme pojavnosti u odrasloj i dječjoj dobi i patofiziološkim procesima koji rezultiraju remodelacijom dišnih puteva mehanizmom regulacije upalnih procesa i proliferacije glatkih mišićnih stanica.(224-226) Zbog njihovog značaja u održavanju ravnoteže između Th1 i Th2 odgovora, citokinskoj i staničnoj konstelaciji u astmi, osobito eozinofila, neutrofila i makrofaga, ove vrste RNA su i bitan kandidat za biomarkere astme i meta nove biološke terapije iako to još nije postalo dio uobičajene kliničke prakse.(220, 221)

U ovoj analizi, uspješno su genotipizirane 2 polimorfizma gena RAD50: RS2897443 (A/C) i RS2244012 (C/T), oba u intronskoj regiji na kromosomu 5q31.1 i u snažnom LD-u te je stoga njihov neovisni učinak na određenu osobinu nemoguće procijeniti. Na razini polimorfizma jedino je RS2897443 pokazao pozitivnu povezanost s nosnom polipozom u

bolesnika s astmom dok su na razini genotipova sve alelne varijante, osim CC (RS2897443) bile povezane s prisutnošću astme u odraslih. Osim toga AA varijanta RS2897443 je bila povezana s ne-T2 fenotipom. Nije se dokazala povezanost s T2 fenotipom ili povišenim vrijednostima FeNO-a dok je za ostale biomarkere RS2897443 varijanta AA bila povezana sa značajnom krvnom eozinofilijom i sniženim vrijednostima difuzijskog kapaciteta pluća, a CA genotip je bio u vezi s povišenim vrijednostima ukupnog IgE kao i TT varijanta RS2244012 čiji je pak TC genotip bio povezan s poremećajem na nivou alveokapilarne membrane. Varijante gena RAD50 su u ranijim GWAS također bile povezane s astmom, osobito s pojavnom u dječjoj dobi i kompliciranog tijeka s učestalim pogoršanjima što međutim nije replicirano u ovoj studiji moguće i zbog razlike u istraživanim polimorfizmima.(125, 227, 228) Ako se promatraju rezultati ove studije s pozicije uloge gena RAD50 u popravku dvostrukih lomova DNA, onda ima smisla da neki polimorfizmi češće dovode do značajnih strukturnih poremećaja u arhitekturi plućnog parenhima što rezultira poremećenom difuzijom. Ipak, analiza strukturalnih poremećaja pluća, kao niti radiološki nalazi nisu analizirani u ovom radu, ali su rezultati bili prilagođeni prema pušačkom stažu tako da su rezultati najvjerojatnije ipak dio zasebne patologije astme, a ne izolirana posljedica utjecaja pušenja na bolesti intersticija. Što se tiče korelacije s biomarkerima, najočitija je povezanost bila s visokim vrijednostima IgE (u ovom radu prisutno u većini bolesnika s dokazanom alergijom) što je ranije nađeno za ovaj gen u Europskoj populaciji, ali tek analizom kombinacije 4 kohorte s više od 11 000 ispitanika unutar GABRIEL konzorcija, a kasnije i na razini etnički diferentnije populacije unutar EVE konzorcija.(124, 229) Ovakve velike metaanalize i proučavanja raznih etničkih grupa su na kraju pokazale da prisutnost određenog polimorfizma ne znači nužno i prisutnost bolesti, tj. ipak postoji heterogenost ne samo na razini prisutnosti nekog SNP, već i na razini njegove funkcije, međudjelovanja s različitim okolišnim uvjetima (npr. Europa vs. Afrika) i LD-a u određenoj populaciji (u nekim je grupama on jači, također kombinacije nekih polimorfizama predstavljaju veći rizik za razvoj bolesti nego svaki SNP zasebno), efekt koji nadilazi posljedicu veličine proučavane populacije i snagu studije što bi objasnilo i neke razlike između rezultata ove studije i ranijih GWAS.(230) Osim toga, treba uzeti u obzir dob proučavane populacije jer prisutnost nekog gena ne znači nužno i njegovu aktivnost, tj. moguće je da postoji razlika u ekspresiji nekog gena u dječjoj i odrasloj populaciji te su stoga studije efekata koje istražuju prisutnost proteinskog produkta osobito bitne i dokazuju stvarnu povezanost određene genske varijante i fenotipa. Jedan od GWAS je također istražio genomsku podlogu astme, ekcema i alergije te je nađeno da je etiologija ovih stanja veoma slična što se odražava u čak 136 genske varijante na 99 lokusa koju dijele ove 3 bolesti.(227) U kontekstu regulatorne funkcije RAD50 na razvoj alergije i eozinofilije, bitno je za naglasiti i epigenetske mehanizme koji itekako utječu na ekspresiju ovog gena. U

ovom istraživanju, većina ispitanika je živjela u gradu ili prigradskim naseljima te je izloženost seoskom načinu života (osobito bitno u prve 4 godine života) izostala što je moglo imati utjecaja na istraživanje povezanosti RAD50 i biomarkera astme (IgE, eozinofili, FeNO) što je značajno jer je nađeno da život na selu rezultira hipermetilacijom RAD50, kao i ORMDL3, još jednog istraživanog gena u ovom radu, već u ranom djetinjstvu i posljedično različitim vrijednostima ukupnog IgE i rizikom za razvoj atopije i astme između gradske i seoske populacije.(130) Kad se govori o komorbiditetima astme, česta je nosna polipoza. Povezanost RAD50 je najčešće replicirana u već navedenom ekcemu, alergiji te atopijskom dermatitisu.(124) Ovo je, međutim, prvo istraživanje koje je dovelo u vezu povećan rizik za nosnu polipozu u bolesnika s astmom i gen RAD50 i stvara podlogu za razumijevanje učestale pojave ovog poremećaja u odraslih astmatičara i činjenice da je postojeća anti-IgE, -IL5 i -IL4/IL13 biološka terapija u ovoj grupi bolesnika djelotvorna i na nosnu patologiju.

Na kromosomu 17 je genotipiziran STARD3 i njegov polimorfizam RS1877031 (C/T), *missense* je mutacija i u značajnom je LD-u s ostalim genotipiziranim polimorfizmima s kromosoma 17 u ovom radu. Prevelika ekspresija STARD3 omogućava preopterećenost mitohondrija kolesterolom i reaktivnim kisikovim radikalima u epitelnim stanicama dišnih puteva uz povećanje količine proinflammatoryh citokina, mehanizam osobito podložan štetnom učinku duhanskog dima.(231) Ovaj SNP predstavlja rizični faktor za pojavnost astme u dječjoj dobi i razvoj nosne polipoze, ali djeluje zaštitno kad je u pitanju pojava i prisutnost astme u odraslih te razvoj T2 alergijskog i eozinofilnog fenotipa. Rizik za razvoj nosne polipoze još nije dokazan u drugim radovima, a mogući patofiziološki mehanizam je vjerojatno zajednički ostalim neoplastičnim zbivanjima budući da je nađeno da prevelika aktivacija STARD3 uzrokuje nezaustavljiv napredak staničnog ciklusa i proliferaciju stanica.(232) Prilikom istraživanja pojedinačnih genotipova, našlo se da je CC varijanta značajno povezana s krvnom eozinofilijom (>300 stanica/ $\mu$ L krvi) kao i TC varijanta koja je još bila u vezi s visokim vrijednostima IgE i poremećenom difuzijom na nivou alveokapilarne membrane kao i TT varijanta. Niti jedna varijanta nije imala utjecaja na vrijednosti FeNO. Za razliku od nekih drugih polimorfizama, ovaj na kromosomu 17, i zapravo STARD3 kao takav, nisu toliko široko istraženi u astmi i predstavljaju jedan od novijih područja interesa potencijalno i kao meta biološke terapije. Lokus STARD3 često se spominje zajedno s PGAP3 lokusom s kojim je u velikom LD-u (ovdje također >0.8) i predstavljaju jednu funkcijsku jedinicu te je u blizini GSDMB/ORMDL3/GSDMA lokusa koji je također proučavan u ovome radu. Upravo je njihova međusobna blizina ono što stvara problem kod pokušaja detektiranja njihovog individualnog učinka na fenotip astme. RS1877031 je također istraživan i u sklopu GABRIEL konzorcija te je njegova uloga u alergiji također već u više navrata dokazana u heterogenim populacijama i neeuropskog podrijetla.(154, 233, 234) U



jednom drugom radu je teoretizirano da je ovaj lokus predilekcijsko mjesto za razvoj atopije u bolesnika s astmom, a ne same astme, na čiji razvoj ipak više utjecaja ima ORMDL3 što se ipak razlikovalo od pronalaska u ovoj studiji gdje je polimorfizam gena za ORMDL3 bio rizičan za razvoj astme u odraslih, tj. kompletno suprotne uloge od RS1877031, moguće posljedično ipak razlici u proučavanim polimorfizmima ili razlici između ove i drugih istraživanih populacija.(233) Howrylak i sur. su proveli analizu jedne grupe bolesnika s astmom i našli da postoji longitudinalna stabilnost fenotipa, čak i 14 godina po nastupu bolesti osobito u onih koji su imali veliku sklonost atopiji.(235) Razlike među bolesnicima s astmom koje su se očitovale u prisutnosti atopije, vrijednostima plućne funkcije i reaktivnosti bronha su dosta postojane, a remisija koja se javljala u odrasloj dobi nije pratila remisiju na razini patofizioloških mehanizama. Iako se u ovom radu nastojalo što preciznije grupirati bolesnike s astmom, činjenica da je uloga STARD3 polimorfizma u astmi odraslih i djece kontradiktorna radu Howrylak i sur., može se objasniti što se ipak nisu uzimali invazivni uzorci iz dišnog sustava, ali i time što je populacija odraslih s astmom u ovom istraživanju ipak bila starija, a time i podložnija raznim epigenetskim mehanizmima koji mogu modificirati tijek bolesti, a što još za ovaj gen u astmi nije istraženo.

Na kromosomu 17 je genotipiziran već spomenuti ORMDL3, tj. RS3744246 (T/C) koji se nalazi u intronskoj regiji i nosi povećan rizik za prisutnost astme u odraslih iako je uz njega bila veća šansa da ona bude kontrolirana. Osim toga TT varijanta ovog SNP-a je povezana s povišenim vrijednostima FeNO-a, ukupnog IgE i krvne eozinofilije dok je CC varijanta bila povezana samo s povišenim vrijednostima FeNO-a. U fiziološkim uvjetima, ORMDL3 djeluje kao supresor serinske palmitoiltransferaze koja je jedan od ključnih enzima sfingolipidnog metabolizma. S druge pak strane, patološka aktivacija ORMDL3 nekim alergenom (moguće putem metilacije njegove promotorske regije) vodi u prekomjerno nakupljanje ceramida u endoplazmatskom retikulumu epitelnih stanica, nakupljanju eozinofila pozitivnom povratnom spregom s eotaksinima i proupalnim interleukinima, agregaciji, hiperdiferencijaciji, patološkom preživljenju i produkciji protutijela limfocita B, Th2 orijentaciji limfocita T te hiperreaktivnosti glatkih mišićnih stanica.(160, 164, 165, 236) Efekt prekomjerne aktivacije ORMDL3 dakle zahvaća veoma raznolike elemente patofizioloških puteva u astmi te stoga nije bilo neobično da se to odrazilo i na njegovu vezu s uobičajeno mjerenim biomarkerima astme u ovom radu. Asocijacija ORMDL3 i astme te drugih autoimunskih bolesti u raznolikim etničkim grupama je dokazana već na samim počecima genomskih studija kada točan patofiziološki mehanizam još niti nije bio poznat, a jedna od najpoznatijih je svakako GABRIEL.(107, 230, 237) Međutim, čini se da ORMDL3 ipak nije univerzalno vezan uz povećan rizik za razvoj astme te je uključivanje različitih populacija u studije od iznimne važnosti (primjerice rezultati asocijacijske studije RS3744246 u ovom

radu su kompatibilni s pronalascima u europskoj populaciji, ali suprotni s onima u kineskoj grupi astmatičara).(238) Također se našlo da se njegov učinak, koji je doduše efektom slab, veže uz ekspresiju drugih gena iz regije 17q21, točnije s GSDMB i GSDMA koji su i u ovom radu u istom bloku s ORMDL3.(138, 154) U ranijim istraživanjima se također uspješno replicirati da je ovaj gen bio povezan s blagom i umjerenom astmom te, iako se na početku mislilo da je 17q21 regija ekskluzivna za razvoj astme u djece, uključivanjem odraslih u studije se pokazala njegova bitna uloga i u toj grupi bolesnika, kao što je to bio slučaj i u ovom istraživanju.(154, 239)

Što se tiče gena za IL6R uspješno je genotipiziran jedan polimorfizam, RS4129267 (T/C) u intronskoj regiji te nije u značajnom LD-u s drugim ispitivanim polimorfizmima tako da njegovi efekti nisu bili pod utjecajem ostalih ispitivanih gena. Za ovaj polimorfizam nije nađen značajan pozitivan ili negativan utjecaj na ispitivane osobine astme ili biomarkere, ali je za genotip TT dokazana asocijacija s prisutnošću astme u odraslih (T2 i ne-T2 fenotip) te značajna krvna eozinofilija i poremećaj KCO. Za TC genotip je također bila vezana prisutnost astme u odraslih i poremećaj KCO, ali i povišene vrijednosti FeNO dok se za CC genotip nije našlo statistički značajnih asocijacija. Budući da su rizične genske varijante IL6R nađene u ovom radu i nakon prilagodbe za pušački status, ali i u bolesnika s KOPB-om, čini se da ovi polimorfizmi mogu ipak utjecati na poremećaje koji dovode do trajne remodelacije u opstruktivnim bolestima pluća mehanizmom i neovisnim od pušenja, još uvijek dominantnim uzročnikom KOPB-a.(153) Veza s astmom je za ovaj lokus već ranije bila ispitivana i u drugim studijama (npr. povišene vrijednosti solubilne komponente receptora su nađene u iskašljaju i bronhoalveolarnom lavatu astmatičara) pa je tako dokazan i značaj za GINA 3 stupanj težine astme, dok je u ovom radu populacija obuhvaćala sve stupnjeve po GINA-i pa tako i taj, ali veza nije dosegla statističku značajnost na razini polimorfizma što je moguće zbog nedovoljne veličine ispitivane grupe.(139, 144, 151, 153, 154, 239) Drugo potencijalno objašnjenje može biti u vrsti IL6R receptora koja je kontrolirana ovim polimorfizmom. Tako je primjerice bio slučaj za RS4129267 (CC) u jednom istraživanju da je on bio protektivan na način što je uz tu varijantu gena, količina solubilnog receptora bila snižena, uz povećanu količinu mRNA cijelog IL6R koja se prevodi u transmembranski receptor preko kojeg se odvija tzv. klasični odnosno antiinflamatorni signalni put. (240, 241) Temeljem takvih ispitivanja su započeta i istraživanja neselektivnog protutijela, tocilizumaba i sarilumaba i otkrivena njihova terapijska funkcija u upalnim reumatskim, ali i alergijskim bolestima te astmi (u RS4129267 CT i TT genotipu) uz smanjenje Th2 i Th17 upalnog odgovora.(139, 242) Ipak, neke teoretski uspješne terapijske opcije su u kliničkim ispitivanjima bile popraćene neprihvatljivim nuspojavama te se od njih odustalo.(243) U konačnici, unatoč tome što je primjerice tocilizumab već naveliko korišten

u liječenju reumatskih bolesti, na odobrenje korištenja za liječenje astme treba još pričekati zbog izostanka rezultata kliničkih studija (za sada se pozitivan efekt navodi većinom na razini prikaza slučaja, a ne velikih randomiziranih studija).

Budući da je ovaj rad dio veće studije (CAAS) ukratko su u nastavku predstavljeni i neki pronalasci vezani uz fenotipove astme i gene na drugim istraživanim kromosomima. Zanimljivo je da učinak SNP-ova, posebice pojedinih genotipova, nije bio jednoznačan, što govori u prilog ranijoj hipotezi o astmi kao multifaktorskoj i poligenoskoj bolesti.(220) Na primjer, otkrilo se da je rs10924993 čimbenik rizika za pojavu astme s visokim T2 u odraslih s prisutnošću nosne polipoze. Također, ispitanici kod kojih je dokazana prisutnost rs1747815 također su bili skloniji T2 astmi (alergijski i eozinofilni fenotip), ali su imali i veću vjerojatnost slabije kontrole bolesti i čestih egzacerbacija. Nasuprot tome, rs12026183 je predstavljao zaštitni lokus za prisutnost astme u odraslih, astme s visokim T2 odgovorom i perzistentne opstrukcije. Međutim, svi ovi relevantni SNP-ovi iz kromosoma 1, osim rs10924993, bili su dio jednog haplotipskog bloka i u značajnoj neravnoteži međusobnog povezivanja ( $r^2 > 0,45$ ), stoga je njihov pojedinačni učinak teško procijeniti.(244) Ranije navedeni nalazi su u skladu s otkrićima u prijašnjim GWAS. Važni SNP-ovi i genotipovi i za gene CRB1, DENND1B i SRP9 pokazali su značajnu povezanost s astmom, kao što je bilo u našem slučaju.(151, 154, 230, 244-246) Isto tako, analizirajući ranija izvješća, primijećene su razlike u učestalosti minornih alela između naše i drugih populacija, kao i drugih istraživača.(230, 247) U kontekstu astme, gen DENND1B je značajan zbog svog proteinskog produkta koji sudjeluje u upalnom odgovoru preko dendritičnih stanica, stanica prirodnih ubojica (NK) i aktiviranih T stanica, potičući aktivnost T limfocit efektorske memorije i omogućavajući T1- i T2-upalni odgovor.(244, 248) U njegovoj neposrednoj blizini nalazi se gen za CRB1, važan transmembranski protein za funkciju retine, a čija uloga u funkcioniranju pluća tek treba biti razjašnjena.(244) U našoj populaciji astmatičara, nositelji gena rs2786098 CRB1 imali su veću vjerojatnost nosne polipoze i čestih egzacerbacija, potencijalno putem pojačanog imunološkog odgovora.(151, 153, 242, 249)

Važni polimorfizmi gena za IL1RL1 i IL18R2 na kromosomu 2, kao i intergenskih regija koje su u jakom LD-u (rs11674302 i 13431828  $r^2 > 0,8$ ; rs1420094 i rs3771166) također su značajno povezani s astmom, pri čemu rs3771166 ima prvenstveno zaštitni učinak na prisutnost astme u odraslih i T2 fenotip. Produkti navedenih gena u bliskoj su interakciji s IL33, čiji se gen nalazi na kromosomu 9, a čiji je polimorfizam (rs1412426, intergenska regija u blizini gena za IL33) također pokazao zaštitni učinak na astmu u odraslih i trajnu opstrukciju. IL1RL1 je receptor za IL33 koji sam djeluje kao transkripcijski represor i povezan je s alergijskom astmom, eozinofilijom u krvi i T2 upalnim odgovorom (192, 250).

Ovo istraživanje je također pronašlo sugestivne informacije o uključenosti polimorfizama gena IL13, PDE4D, SLC 22A5 i rs1837253 smještenih uzvodno od gena TSLP na kromosomu 5 u patofiziologiju astme. Ranija istraživanja također podupiru ove nalaze, ali i povezanost s drugim upalnim bolestima.(154, 230, 251-260) IL33 aktivira proizvodnju proupalnih citokina (IL4, IL5, IL13) te se zajedno s TSLP-om izlučuje kao odgovor epitelne stanice na razne stresore (npr. pušenje ili virusi).(251, 261) S druge strane, IL18 stupa u interakciju s IL12, omogućujući oslobađanje interferona gama i izaziva T1 upalni odgovor.(154) U današnje vrijeme uloga citokina o kojima se govori već je prepoznata i naširoko istražena kao meta biološke terapije teške astme.(262-264) Međutim, uloga polimorfizama nije se ponovila na isti način u svim proučavanim populacijama, što je vjerojatno rezultat različitih utjecaja okoliša i genetskog miljea istraživanih skupina.

Povezanosti genskih polimorfizama na kromosomima 4 (EPHA5), 8 (CDH17, NRG1, RGS22), 10 (PRKG1), 11 (LOC101928940) i kromosomu 12 (rs16929496 u blizini gena RASSF8) s astmom također su ponovljene u prethodnim studijama u različitim populacijama. (151, 196, 249, 259, 265-272) Uloga EPHA receptora na epitelnim stanicama dokazana je ranije u tumorogenezi, a njihova uloga u astmi vjerojatno se ostvaruje preko CD4 i CD8 limfocita, njihovom aktivacijom i migracijom, iako se češće spominje povezanost s EPHB receptorom.(265, 266, 273) U našem slučaju, polimorfizam u EPHA5 genu (rs11735820) imao je zaštitni efekt na razvoj astme u odraslih te alergijske i eozinofilne astme, što bi bilo u skladu s njihovom zaštitnom ulogom kako je opisano u radu Wolfharta i sur.(266) Ipak, čini se da je njegova uloga dvosmislena budući da se pronašla pozitivna povezanost s pojavom astme u djece. Polimorfizam gena RGS22 (genotipovi TC i CC) bio je čimbenik rizika za pojavu T2 astme u odraslih, vjerojatno kroz utjecaj na cilije i ekspresiju proupalnih citokina u sluznici bolesnika s astmom.(274) Sam rs11214966, intronska varijanta LOC101928940, još nema poznatu ulogu u astmi. U našem slučaju imao je negativnu povezanost s trajnom opstrukcijom, a može se nagađati da je veza zapravo neizravna i da se odvija preko gena C11orf71 koji mu je najbliži, iako nije dosegao genomski značaj u drugoj populaciji.(259) Genotipovi GA i GG polimorfizma gena PRKG1 (rs7922491) bili su povezani s astmom u djetinjstvu u ovom radu, slično kao u afroameričkoj populaciji, ali ne i u afričko-karipskim obiteljima.(270) Pozitivna povezanost rs16929496 s nosnom polipozom u ovoj studiji, s većom šansom za nekontroliranu astmu, vjerojatno je neizravna posljedica blizine gena RASSF8, koji je uključen u smrt stanica i često se istražuje u onkologiji.(275, 276)

Na kromosomu 17, osim gena za ORMDL3 i STARD3, genotipizirani su i polimorfizmi u intergenskim i regulatornoj regiji kao i gena za ERBB2 (uloga u metabolizmu MAP kinaze i fosforilaciji ErbB2 proteina na epitelnim stanicama dišnih puteva i razini proinflamatornih

medijatora; nađena veća šansa za prisutnost trajne opstrukcije, ali zaštitna uloga na razvoj nosne polipoze i učestalost egzacerbacija astme), GSDMA (kontrola apoptoze, razine IgE i proupalnih citokina Th2 odgovora; veća šansa za nekontroliranu bolest i nosnu polipozu), GSDMB (kontrola Th2 upalnog odgovora, fibroze i glatkih mišićnih stanica te time hiperreaktivnosti bronha i remodelacije dišnih puteva; veći rizik za pojavnost astme u dječjoj dobi i T2 fenotip, ali manja za razvoj trajne opstrukcije), IKZF3 (transkripcijski faktor, prisutnost u epitelnim stanicama dišnih puteva, NK stanicama, T i B limfocitima; manja šansa za kontroliranu astmu, ali zaštita od pojave nosne polipoze), MED24 (transkripcijski aktivator brojnih gena; zaštita od učestalih egzacerbacija), PGAP3 (kodira fosfolipazu u Golgiovom aparatu uključenu u proteinski promet na staničnoj membrani; rizik za pojavu astme u djece, ali bez trajne opstrukcije), PSMD3 (kompleks proteinaza uključen u regulaciju koncentracije neutrofila; veća šansa za kontroliranu bolest) i ZPBP2 (regulacija membranskih lipida, među ostalim spolnih i epitelnih stanica; pozitivna povezanost s trajnom opstrukcijom) koji su bili dio istog haplotipskog bloka i čije su funkcije u sklopu poznate regije 17q12-21 već naveliko istraživane i u korelaciji s ovim pronalascima.(139, 166, 277-288)

U ovom su radu također pronađene višestruke povezanosti različitih genotipova za RORA i SMAD3 na kromosomu 15 i IL2RB na kromosomu 22 s astmom koja se javlja u djetinjstvu i astmom s visokim T2 te prisutnošću nosne polipoze.(289) Učinak ovih gena temelji se na njihovoj uključenosti u Th1, Th2 i Th17 upalni odgovor kroz aktivaciju upalnih citokina IL4, IL5 i IL13, regulaciju T stanica i odgovor na primjenu kortikosteroida kao i remodeliranje dišnih putova što je neželjena reakcija na oštećenje epitelne barijere.(138, 154, 192, 193, 289-294)

Na kraju treba spomenuti i ograničenja ove studije. Ovo istraživanje nije bilo GWAS, dakle odabrani su samo pojedini geni i njihovi polimorfizmi, oslanjajući se na prethodna istraživanja čime se izostavilo iz analize neke druge potencijalno bitne SNP. Također utjecaj okolišnih faktora je ograničen na pušenje, uvjete života i radnog mjesta, što prilično pojednostavljuje svakodnevnu izloženost bolesnika možebitnim štetnim čimbenicima. Nadalje, ovo i slična istraživanja proučavaju genske varijante koje su uobičajene za neku populaciju, koja je u ovom slučaju bila homogena europskog podrijetla, čime se ograničava prediktivna vrijednost pronalaska i ne mora nužno odražavati gensku podlogu neke druge etničke skupine. Zatim, u ovom radu se pokušao replicirati individualni utjecaj gena na astmu te su ciljano zanemareni međugenski efekti. Sljedeće ograničenje je što se u definiranju fenotipova astme, nisu uzimali invazivni uzorci čime se neke ispitanike naizgled ne-T2 fenotipa moguće krivo klasificiralo. U odnosu na druge GWAS i metaanalize koje su istraživale gene u astmi, broj ispitanika je u ovom istraživanju bio relativno malen što

umanjuje snagu studije. Unatoč tome, ipak se uspješno replicirati rezultate ranijih istraživanja. To može biti rezultat toga što je unatoč malom uzorku, studija dobila na snazi zahvaljujući pažljivijoj fenotipizaciji i grupiranju značajnih osobina ispitanika u studiji, efekt koji je već ranije prikazan.(228) Osim toga, ovo ispitivanje je bilo retrospektivno i nije uključivalo analizu genskih produkata. Međutim, u obzir su uzimani i podaci o astmi iz djetinjstva čime se ipak dobilo određene longitudinalne informacije. Uz to su bili uključeni bolesnici s različitim težinama astme što daje dodatni značaj ovom ispitivanju i stvara bolji odraz stvarne slike bolesti u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

## 7. ZAKLJUČAK

1. U sklopu ovog istraživanja, bolesnici su podijeljeni na temelju kliničke slike i dostupnih biomarkera u T1 i T2 fenotip s podgrupama eozinofilne, alergijske, miješane (alergijske i eozinofilne) i neeozinofilne/nealergijske astme. Većina je istraživane odrasle populacije bolesnika s astmom imala pozitivnu alergijsku dijatezu i ubrojena je u T2 fenotip.
2. Od Th2 biomarkera, osobito se značajnim pokazao FeNO čije su više vrijednosti bile povezane sa slabijom kontrolom bolesti što je u skladu s recentnim istraživanjima koja su stavila FeNO u fokus kao važan prediktivni biomarker za relaps astme i pokazatelj odgovora na biološku terapiju.
3. U ispitivanoj populaciji bolesnika s astmom su prevladavale žene i većina ispitanika su bili pušači što se ipak nije odrazilo na prosječnu plućnu funkciju ili difuzijski kapacitet pluća.
4. U ovom istraživanju profesionalna izloženost i život u gradu nisu bili povezani s težim oblikom bolesti ili slabijom kontrolom astme.
5. Nosna je polipoza bila povezana s težim stupnjem astme prema GINA klasifikaciji, ali bez utjecaja na kontrolu bolesti, potrebu za oralnim kortikosteroidima ili neki od ispitivanih biomarkera.
6. U ovoj ispitivanoj grupi bolesnika s astmom, rizičnom se pokazala prekomjerna tjelesna masa, budući da je veći BMI bio povezan s češćim egzacerbacijama bolesti i porastom krvne eozinofilije.
7. Ovo je prva studija gena kandidata u Hrvatskoj koja pokazuje genetsku osnovu astme u odraslih s posebnim naglaskom na genetski doprinos relevantnim kliničkim fenotipovima i kliničkim značajkama, kao što je prisutnost trajne opstrukcije protoka zraka ili povezana nosna polipoza.
8. U ovoj analizi, uspješno su genotipizirane 2 polimorfizma gena RAD50: RS2897443 (A/C) i RS2244012 (C/T), oba u intronskoj regiji na kromosomu 5q31.1 i rizični su čimbenik za razvoj nosne polipoze u bolesnika s astmom.
9. Na kromosomu 17 je genotipiziran STARD3 i njegov polimorfizam RS1877031 (C/T), missense je mutacija i u značajnom je LD-u s ostalim genotipiziranim polimorfizmima s kromosoma 17 u ovom radu. Ovaj polimorfizam je bio rizični čimbenik za dječju pojavnost

astme i razvoj nosne polipoze, ali je djelovao zaštitno na prisutnost astme i nastanak bolesti u odraslih kao i na pojavu T2 alergijskog i eozinofilnog fenotipa.

10. Na kromosomu 17 je genotipiziran je i ORMDL3, tj. RS3744246 (T/C) koji se nalazi u intronskoj regiji i nosi povećan rizik za prisutnost astme u odraslih iako je uz njega bila veća šansa da ona bude kontrolirana.

11. Za gen IL6R uspješno je genotipiziran jedan polimorfizam, RS4129267 (T/C) u intronskoj regiji te nije u značajnom LD-u s drugim ispitivanim polimorfizmima tako da njegovi efekti nisu bili pod utjecajem ostalih ispitivanih gena. Nađene su samo asocijacije na razini pojedinih genotipova za relevantne osobine astme, ali ne i na razini cijelog polimorfizma.



## 8. SAŽETAK

Unatoč značajnom medicinskom napretku u posljednjih nekoliko desetljeća, astma se još uvijek smatra izazovom. Ovo je prva slučaj-kontrola studija gena kandidata u Hrvatskoj kojoj je cilj razjasniti genomski kontekst pojave astme u odraslih. Hipoteza istraživanja je bila da su polimorfizmi gena IL6R (1q21.3), RAD50 (5q31.1), STARD3 i ORMDL3 (17q12-21.1) povezani s ranijom pojavom bolesti, težom astmom, većim brojem egzacerbacija te alergijskim oblikom astme. U istraživanju je sudjelovalo 235 ispitanika s astmom težine 1-4 (od blage do teške astme) po GINA kriterijima. Našlo se da su polimorfizmi RS2897443 i RS2244012 (RAD50) rizični čimbenik za razvoj nosne polipoze, RS1877031 (STARD3) rizični je čimbenik za pojavu astme u djece i razvoj nosne polipoze, ali djeluje zaštitno na prisutnost astme i pojavu bolesti u odraslih te nastanak T2 alergijskog i eozinofilnog fenotipa. RS3744246 gena ORMDL3 nosi povećan rizik za prisutnost astme u odraslih iako je uz njega ona bolje kontrolirana dok su za SNP gena IL6R, RS4129267, nađene samo asocijacije na razini pojedinih genotipova za prisutnost astme u odraslih i visoke vrijednosti krvne eozinofilije i FeNO-a. Zaključno, astma je kompleksna bolest i ovdje se dokazalo da spoznaje o genetskoj podlozi patofizioloških procesa dobivenih iz dječjih populacija nisu nužno i odraz situacije u populaciji odraslih.

Ključne riječi: astma, fenotip, polimorfizmi jednog gena, IL6R, RAD50, STARD3, ORMDL3

## 9. SUMMARY

### GENE RAD50, STARD3, ORMDL3 AND IL6R POLYMORPHISMS IN ASTHMATIC PATIENTS

Anamarija Štajduhar, 2024.

Despite significant medical advances in recent decades, asthma is still considered a challenge. This is the first candidate genes case-control study in Croatia that aims to clarify the genomic context of asthma in adults. The research hypothesis was that IL6R (1q21.3), RAD50 (5q31.1), STARD3 and ORMDL3 (17q12-21.1) gene polymorphisms were associated with an earlier disease onset, more severe asthma, a greater number of exacerbations and an allergic asthma phenotype. A total of 235 subjects with asthma, stage 1-4 (from mild to severe asthma) according to GINA criteria, took part in this research. It was found that the polymorphisms RS2897443 and RS2244012 (RAD50) are a risk factor for the development of nasal polyposis, RS1877031 (STARD3) is a risk factor for the onset of asthma and the development of nasal polyposis in children, but has a protective effect on the presence of asthma and the onset of the disease in adults and the occurrence of T2 allergic and eosinophilic phenotype. RS3744246 of the ORMDL3 gene carries an increased risk for the presence of asthma in adults, although it confers a better controlled variant, while for the SNP of the IL6R gene, RS4129267, the only associations were found at the level of individual genotypes for the presence of asthma in adults and high values of blood eosinophilia and FeNO. In conclusion, asthma is a complex disease and here it has been proven that the knowledge about the genetic basis of pathophysiological processes in asthma obtained from children's populations is not necessarily a reflection of the situation in adults.

Key words: asthma, phenotype, single gene polymorphisms, IL6R, RAD50, STARD3, ORMDL3

## 10. POPIS LITERATURE

1. Asthma Gf. 2023 GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2023.
2. Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Front Pediatr*. 2019;7:246.
3. CDC's National Asthma Control Program Resources [Internet]. 2023 [citirano 09.03.2024.]. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/asthma/asthmadata.htm>.
4. Hsu J, Qin X, Beavers SF, Mirabelli MC. Asthma-Related School Absenteeism, Morbidity, and Modifiable Factors. *Am J Prev Med*. 2016;51(1):23-32.
5. Zahran HS, Bailey CM, Damon SA, Garbe PL, Breyse PN. Vital Signs: Asthma in Children - United States, 2001-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018;67(5):149-55.
6. Hzzj. Svjetski dan astme 2022. 29.04.2022. Dostupno na: <https://www.hzzj.hr/sluzba-javno-zdravstvo/svjetski-dan-astme-2022-g/>.
7. Singh S, Salvi S, Mangal DK, Singh M, Awasthi S, Mahesh PA, i sur. Prevalence, time trends and treatment practices of asthma in India: the Global Asthma Network study. *ERJ Open Res*. 2022;8(2).
8. Song P, Adeloye D, Salim H, Dos Santos JP, Campbell H, Sheikh A, Rudan I. Global, regional, and national prevalence of asthma in 2019: a systematic analysis and modelling study. *J Glob Health*. 2022;12:04052.
9. Rook GA, Martinelli R, Brunet LR. Innate immune responses to mycobacteria and the downregulation of atopic responses. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3(5):337-42.
10. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008;372(9643):1107-19.
11. Garcia MC, Rossen LM, Bastian B, Faul M, Dowling NF, Thomas CC, i sur. Potentially Excess Deaths from the Five Leading Causes of Death in Metropolitan and Nonmetropolitan Counties - United States, 2010-2017. *MMWR Surveill Summ*. 2019;68(10):1-11.
12. Garcia MC, Faul M, Massetti G, Thomas CC, Hong Y, Bauer UE, Iademarco MF. Reducing Potentially Excess Deaths from the Five Leading Causes of Death in the Rural United States. *MMWR Surveill Summ*. 2017;66(2):1-7.
13. CDC. MMWR rural health series. Atlanta GUDoHaHS, CDC; 2017. [https://www.cdc.gov/mmwr/rural\\_health\\_series.html](https://www.cdc.gov/mmwr/rural_health_series.html).
14. CDC. POLARIS. Atlanta GUDoHaHS, CDC; 2019. <https://www.cdc.gov/policy/polaris/index.html>.
15. US Department of Health and Human Services. Healthy people 2030. Healthcare access and quality. Washington DUDoHaHShhg.
16. CDC. Rural health. Atlanta GUDoHaHS, CDC; 2017. <https://www.cdc.gov/ruralhealth/about.html>.
17. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299(6710):1259-60.
18. Al-kalemji A, Petersen KD, Sorensen J, Sherson D, Thilsing T, Schlunssen V, i sur. Factors influencing quality of life in asthmatics--a case-control study. *Clin Respir J*. 2013;7(3):288-96.
19. Sadatsafavi M, McTaggart-Cowan H, Chen W, Mark FitzGerald J, Economic Burden of Asthma Study G. Quality of Life and Asthma Symptom Control: Room for Improvement in Care and Measurement. *Value Health*. 2015;18(8):1043-9.
20. <https://community.aafa.org/blog/the-significant-negative-impacts-on-life-with-asthma-in-2017> TSNI.
21. Kharaba Z, Feghali E, El Hussein F, Sacre H, Abou Selwan C, Saadeh S, i sur. An Assessment of Quality of Life in Patients With Asthma Through Physical, Emotional, Social, and Occupational Aspects. A Cross-Sectional Study. *Front Public Health*. 2022;10:883784.

22. Al-Khateeb AJ, Al Khateeb JM. Research on psychosocial aspects of asthma in the Arab world: a literature review. *Multidiscip Respir Med.* 2015;10(1):15.
23. Uchmanowicz B, Panaszek B, Uchmanowicz I, Rosinczuk J. Clinical factors affecting quality of life of patients with asthma. *Patient Prefer Adherence.* 2016;10:579-89.
24. Tay TR, Radhakrishna N, Hore-Lacy F, Smith C, Hoy R, Dabscheck E, Hew M. Comorbidities in difficult asthma are independent risk factors for frequent exacerbations, poor control and diminished quality of life. *Respirology.* 2016;21(8):1384-90.
25. Grammer LC, Weiss KB, Pedicano JB, Kimmel LG, Curtis LS, Catrambone CD, i sur. Obesity and asthma morbidity in a community-based adult cohort in a large urban area: the Chicago Initiative to Raise Asthma Health Equity (CHIRAH). *J Asthma.* 2010;47(5):491-5.
26. Verica K. Pušenje je vodeći čimbenik rizika za zdravlje! : Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2021 [Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/pusenje-je-vodeci-cimbenik-rizika-za-zdravlje/>].
27. Gotovo dvije trećine odraslih osoba u Hrvatskoj ima prekomjernu tjelesnu masu ili debljinu! Hrvatski Zavod za javno zdravstvo 2021. Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-promicanje-zdravlja/gotovo-dvije-trecine-odraslih-osoba-u-hrvatskoj-ima-prekomjernu-tjelesnu-masu-ili-debljinu>.
28. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J.* 2004;24(5):822-33.
29. Bellou V, Gogali A, Kostikas K. Asthma and Tobacco Smoking. *J Pers Med.* 2022;12(8).
30. Rasmussen F, Siersted HC, Lambrechtsen J, Hansen HS, Hansen NC. Impact of airway lability, atopy, and tobacco smoking on the development of asthma-like symptoms in asymptomatic teenagers. *Chest.* 2000;117(5):1330-5.
31. Tiotiu A, Ioan I, Wirth N, Romero-Fernandez R, Gonzalez-Barcala FJ. The Impact of Tobacco Smoking on Adult Asthma Outcomes. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(3).
32. Raherison C, Baldi I, Tunon-De-Lara JM, Taytard A, Annesi-Maesano I. Asthma phenotypes according to the timing of smoking onset in young adults. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7(1):84-92.
33. Kim YK, Kim SH, Tak YJ, Jee YK, Lee BJ, Kim SH, i sur. High prevalence of current asthma and active smoking effect among the elderly. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(12):1706-12.
34. Althuis MD, Sexton M, Prybylski D. Cigarette smoking and asthma symptom severity among adult asthmatics. *J Asthma.* 1999;36(3):257-64.
35. Siroux V, Pin I, Oryszczyn MP, Le Moual N, Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma. *Eur Respir J.* 2000;15(3):470-7.
36. Gallefoss F, Bakke PS. Does smoking affect the outcome of patient education and self-management in asthmatics? *Patient Educ Couns.* 2003;49(1):91-7.
37. Cassino C, Ito K, Bader I, Ciotoli C, Thurston G, Reibman J. Cigarette smoking and ozone-associated emergency department use for asthma by adults in New York City. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(6):1773-9.
38. Marquette CH, Saulnier F, Leroy O, Wallaert B, Chopin C, Demarcq JM, i sur. Long-term prognosis of near-fatal asthma. A 6-year follow-up study of 145 asthmatic patients who underwent mechanical ventilation for a near-fatal attack of asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146(1):76-81.
39. Kerstjens HA, Overbeek SE, Schouten JP, Brand PL, Postma DS. Airways hyperresponsiveness, bronchodilator response, allergy and smoking predict improvement in FEV1 during long-term inhaled corticosteroid treatment. Dutch CNSLD Study Group. *Eur Respir J.* 1993;6(6):868-76.
40. Pedersen B, Dahl R, Karlstrom R, Peterson CG, Venge P. Eosinophil and neutrophil activity in asthma in a one-year trial with inhaled budesonide. The impact of smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(5):1519-29.

41. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, i sur. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002;20(3):556-63.
42. Bircan E, Bezirhan U, Porter A, Fagan P, Orloff MS. Electronic cigarette use and its association with asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma-COPD overlap syndrome among never cigarette smokers. *Tob Induc Dis*. 2021;19:23.
43. Ozden S, Tepetam FM, Orcen C, Yakut T. The phenotypic heterogeneity of obese and nonobese patients with severe asthma and comparison of omalizumab-mepolizumab treatment efficiency in these patients. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(43):e35247.
44. Waggoner D, Stokes J, Casale TB. Asthma and obesity. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;101(6):641-3.
45. Malden S, Gillespie J, Hughes A, Gibson AM, Farooq A, Martin A, i sur. Obesity in young children and its relationship with diagnosis of asthma, vitamin D deficiency, iron deficiency, specific allergies and flat-footedness: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2021;22(3):e13129.
46. Pena-Garcia PE, Fastiggi VA, Mank MM, Ather JL, Garrow OJ, Anathy V, i sur. Bariatric surgery decreases the capacity of plasma from obese asthmatic subjects to augment airway epithelial cell proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2024;326(1):L71-L82.
47. Zhu G, Mo Y, Ye L, Cai H, Zeng Y, Zhu M, i sur. Clinical characteristics of obese, fixed airway obstruction, exacerbation-prone phenotype and comorbidities among severe asthma patients: a single-center study. *BMC Pulm Med*. 2024;24(1):76.
48. Shim JS, Kim MH, Cho YJ. Risk of asthma and/or wheezing in obese individuals with or without metabolic syndrome: From the Korea National Health and Nutrition Examination Survey data. *Allergy Asthma Proc*. 2024;45(1):e1-e8.
49. Wang E, Wechsler ME, Tran TN, Heaney LG, Jones RC, Menzies-Gow AN, i sur. Characterization of Severe Asthma Worldwide: Data From the International Severe Asthma Registry. *Chest*. 2020;157(4):790-804.
50. Huang J, Zhou X, Dong B, Tan H, Li Q, Zhang J, i sur. Obesity-related asthma and its relationship with microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1303899.
51. Backman H, Winsa Lindmark S, Hedman L, Kankaanranta H, Warm K, Lindberg A, i sur. The interplay between obesity and blood neutrophils in adult-onset asthma. *Respir Med*. 2024;222:107529.
52. Gutmann D, Dressler M, Eickmeier O, Herrmann E, Kirwil M, Schubert R, i sur. Proinflammatory pattern in the lower airways of non-asthmatic obese adolescents. *Cytokine*. 2024;173:156452.
53. Agache I, Akdis CA. Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *J Clin Invest*. 2019;129(4):1493-503.
54. Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*. 2012;67(7):835-46.
55. Al-Samri MT, Benedetti A, Prefontaine D, Olivenstein R, Lemiere C, Nair P, i sur. Variability of sputum inflammatory cells in asthmatic patients receiving corticosteroid therapy: A prospective study using multiple samples. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1161-3 e4.
56. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(1):1-12.
57. Nadif R, Febrissy M, Andrianjafimasy MV, Le Moual N, Gormand F, Just J, i sur. Endotypes identified by cluster analysis in asthmatics and non-asthmatics and their clinical characteristics at follow-up: the case-control EGEA study. *BMJ Open Respir Res*. 2020;7(1).
58. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, i sur. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):315-23.
59. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, i sur. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(3):218-24.

60. Lefaudeux D, De Meulder B, Loza MJ, Peffer N, Rowe A, Baribaud F, i sur. U-BIOPRED clinical adult asthma clusters linked to a subset of sputum omics. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1797-807.
61. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology.* 2006;11(1):54-61.
62. Yan X, Chu JH, Gomez J, Koenigs M, Holm C, He X, i sur. Noninvasive analysis of the sputum transcriptome discriminates clinical phenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(10):1116-25.
63. Carr TF, Kraft M. Use of biomarkers to identify phenotypes and endotypes of severe asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018;121(4):414-20.
64. Bagnasco D, Passalacqua G, Caminati M, Heffler E, Menzella F, De Ferrari L, i sur. Evolving phenotypes to endotypes: is precision medicine achievable in asthma? *Expert Rev Respir Med.* 2020;14(2):163-72.
65. Pavord ID, Afzalnia S, Menzies-Gow A, Heaney LG. The current and future role of biomarkers in type 2 cytokine-mediated asthma management. *Clin Exp Allergy.* 2017;47(2):148-60.
66. Chupp GL, Kaur R, Mainardi A. New Therapies for Emerging Endotypes of Asthma. *Annu Rev Med.* 2020;71:289-302.
67. Maggi E, Parronchi P, Azzarone BG, Moretta L. A pathogenic integrated view explaining the different endotypes of asthma and allergic disorders. *Allergy.* 2022;77(11):3267-92.
68. Porpodis K, Tsiouprou I, Apostolopoulos A, Ntontsi P, Fouka E, Papakosta D, i sur. Eosinophilic Asthma, Phenotypes-Endotypes and Current Biomarkers of Choice. *J Pers Med.* 2022;12(7).
69. Svenningsen S, Nair P. Asthma Endotypes and an Overview of Targeted Therapy for Asthma. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:158.
70. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019;56(2):219-33.
71. Hur GY, Ye YM, Yang E, Park HS. Serum potential biomarkers according to sputum inflammatory cell profiles in adult asthmatics. *Korean J Intern Med.* 2020;35(4):988-97.
72. Upham JW, Le Lievre C, Jackson DJ, Masoli M, Wechsler ME, Price DB, Delphi P. Defining a Severe Asthma Super-Responder: Findings from a Delphi Process. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(11):3997-4004.
73. Canonica GW, Blasi F, Carpagnano GE, Guida G, Heffler E, Paggiaro P, i sur. Severe Asthma Network Italy Definition of Clinical Remission in Severe Asthma: A Delphi Consensus. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2023;11(12):3629-37.
74. Cooper G. *The Cell: A Molecular Approach 8th Edition: Sinauer Associates; 2018.*
75. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, i sur. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
76. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431(7011):931-45.
77. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med.* 2005;56:303-20.
78. Kido T, Sikora-Wohlfeld W, Kawashima M, Kikuchi S, Kamatani N, Patwardhan A, i sur. Are minor alleles more likely to be risk alleles? *BMC Med Genomics.* 2018;11(1):3.
79. Schaub MA, Boyle AP, Kundaje A, Batzoglou S, Snyder M. Linking disease associations with regulatory information in the human genome. *Genome Res.* 2012;22(9):1748-59.
80. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet.* 2001;27(3):234-6.
81. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Samps N, Graves T, i sur. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature.* 2008;453(7191):56-64.
82. Ellen S. *Talking Glossary of Genomic and Genetic Terms: National Human Genome Research Institute; 2024.* Dostupno na: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Locus>.

83. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928-33.
84. Maquat LE. The power of point mutations. *Nat Genet*. 2001;27(1):5-6.
85. Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet*. 1999;22(2):139-44.
86. Palmer LJ, Cardon LR. Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet*. 2005;366(9492):1223-34.
87. George Priya Doss C, Chakraborty C, Monford Paul Abishek N, Thirumal Kumar D, Narayanan V. Application of evolutionary based in silico methods to predict the impact of single amino acid substitutions in vitelliform macular dystrophy. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2014;94:177-267.
88. Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*. 2001;411(6834):199-204.
89. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics*. 1995;29(2):311-22.
90. Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet*. 2001;29(2):233-7.
91. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet*. 2001;29(2):229-32.
92. Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet*. 2000;67(1):170-81.
93. Jorde LB. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res*. 2000;10(10):1435-44.
94. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296(5576):2225-9.
95. Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet*. 2001;29(2):217-22.
96. Judson R, Stephens JC, Windemuth A. The predictive power of haplotypes in clinical response. *Pharmacogenomics*. 2000;1(1):15-26.
97. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet*. 2002;70(2):425-34.
98. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*. 2006;7(10):781-91.
99. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*. 2008;9(5):356-69.
100. Tam V, Patel N, Turcotte M, Bosse Y, Pare G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2019;20(8):467-84.
101. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994;265(5181):2037-48.
102. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001;2(2):91-9.
103. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006;7(2):95-100.
104. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996;273(5281):1516-7.
105. Weiss ST, Silverman EK, Palmer LJ. Case-control association studies in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics J*. 2001;1(3):157-8.
106. Denham S, Koppelman GH, Blakey J, Wjst M, Ferreira MA, Hall IP, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. *Respir Res*. 2008;9(1):38.

107. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, i sur. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007;448(7152):470-3.
108. MacArthur J BE, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, Junkins H, McMahon A, Milano A, Morales J, Pendlington Z, Welter D, Burdett T, Hindorff L, Flicek P, Cunningham F, and Parkinson H. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Research*, 2017, Vol. 45 (Database issue): D896-D901.
109. Zhu M, Zhao S. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int J Biol Sci*. 2007;3(7):420-7.
110. Cheung VG, Spielman RS. The genetics of variation in gene expression. *Nat Genet*. 2002;32 Suppl:522-5.
111. Duan S, Huang RS, Zhang W, Bleibel WK, Roe CA, Clark TA, i sur. Genetic architecture of transcript-level variation in humans. *Am J Hum Genet*. 2008;82(5):1101-13.
112. Zhao Z, Timofeev N, Hartley SW, Chui DH, Fucharoen S, Perls TT, i sur. Imputation of missing genotypes: an empirical evaluation of IMPUTE. *BMC Genet*. 2008;9:85.
113. Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2014;34(5):502-8.
114. Clark DLHaAG. Principles of population genetics: Sunderland, Massachussets, Sinauer associates, Inc.; 1997.
115. Li M, Li C. Assessing departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the presence of disease association. *Genet Epidemiol*. 2008;32(7):589-99.
116. Ryckman K, Williams SM. Calculation and use of the Hardy-Weinberg model in association studies. *Curr Protoc Hum Genet*. 2008;Chapter 1:Unit 1 18.
117. Mayo O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Res Hum Genet*. 2008;11(3):249-56.
118. Reed E, Nunez S, Kulp D, Qian J, Reilly MP, Foulkes AS. A guide to genome-wide association analysis and post-analytic interrogation. *Stat Med*. 2015;34(28):3769-92.
119. Vogel N, Schiebel K, Humeny A. Technologies in the Whole-Genome Age: MALDI-TOF-Based Genotyping. *Transfus Med Hemother*. 2009;36(4):253-62.
120. Zeng Ying. What is MALDI-TOF: Antiteck Life Sciences; 2022. Dostupno na: <https://antiteck.com/hr/%C5%A1to-je-maldi-tof/>.
121. Tsuo K, Zhou W, Wang Y, Kanai M, Namba S, Gupta R, i sur. Multi-ancestry meta-analysis of asthma identifies novel associations and highlights the value of increased power and diversity. *Cell Genom*. 2022;2(12):100212.
122. Ensembl Ensembl release 111 - January 2024. Dostupno na: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000113522;r=5:132556019-132646349](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000113522;r=5:132556019-132646349).
123. orphanet. Orphanet version 1.0.6 - Last updated:2024. Dostupno na: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/240760>.
124. Weidinger S, Gieger C, Rodriguez E, Baurecht H, Mempel M, Klopp N, i sur. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. *PLoS Genet*. 2008;4(8):e1000166.
125. Li X, Howard TD, Zheng SL, Haselkorn T, Peters SP, Meyers DA, Bleeker ER. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):328-35 e11.
126. Yabuki M, Fujii MM, Maizels N. The MRE11-RAD50-NBS1 complex accelerates somatic hypermutation and gene conversion of immunoglobulin variable regions. *Nat Immunol*. 2005;6(7):730-6.
127. Ricciardolo FLM, Bertolini F, Carriero V. The Role of Dupilumab in Severe Asthma. *Biomedicines*. 2021;9(9).



128. Spilianakis CG, Flavell RA. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol.* 2004;5(10):1017-27.
129. Lee GR, Fields PE, Griffin TJ, Flavell RA. Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region. *Immunity.* 2003;19(1):145-53.
130. Michel S, Busato F, Genuneit J, Pekkanen J, Dalphin JC, Riedler J, i sur. Farm exposure and time trends in early childhood may influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy. *Allergy.* 2013;68(3):355-64.
131. Day ASH, Gaulton K.J. A Neanderthal Origin of Genetic Variants Associated with Asthma bioRxiv2023. Dostupno na: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.10.30.564624v1>.
132. Harmonizome 3.0 Ma'ayan Laboratory of Computational Systems Biology: Database (Oxford); Database (Oxford). 2016. Dostupno na: <https://maayanlab.cloud/Harmonizome/>.
133. Jundi B, Ahmed H, Reece J, Geraghty P. The Relationship of Cholesterol Responses to Mitochondrial Dysfunction and Lung Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Medicina (Kaunas).* 2023;59(2).
134. Catalog G. European Molecular Biology Laboratory2024. Dostupno na: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/home>.
135. Alpy F, Latchumanan VK, Kedingner V, Janoshazi A, Thiele C, Wendling C, i sur. Functional characterization of the MENTAL domain. *J Biol Chem.* 2005;280(18):17945-52.
136. Zhang M, Liu P, Dwyer NK, Christenson LK, Fujimoto T, Martinez F, i sur. MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *J Biol Chem.* 2002;277(36):33300-10.
137. Zhou X, Gao H, Guo Y, Chen Y, Ruan XZ. Knocking down Stard3 decreases adipogenesis with decreased mitochondrial ROS in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(2):387-92.
138. Valette K, Li Z, Bon-Baret V, Chignon A, Berube JC, Eslami A, i sur. Prioritization of candidate causal genes for asthma in susceptibility loci derived from UK Biobank. *Commun Biol.* 2021;4(1):700.
139. Vicente CT, Revez JA, Ferreira MAR. Lessons from ten years of genome-wide association studies of asthma. *Clin Transl Immunology.* 2017;6(12):e165.
140. Sajuthi SP, Everman JL, Jackson ND, Saef B, Rios CL, Moore CM, i sur. Nasal airway transcriptome-wide association study of asthma reveals genetically driven mucus pathobiology. *Nat Commun.* 2022;13(1):1632.
141. Anantharaman R, Andiappan AK, Nilkanth PP, Suri BK, Wang de Y, Chew FT. Genome-wide association study identifies PERLD1 as asthma candidate gene. *BMC Med Genet.* 2011;12:170.
142. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell.* 1990;63(6):1149-57.
143. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, i sur. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* 1989;58(3):573-81.
144. Revez JA, Bain L, Chapman B, Powell JE, Jansen R, Duffy DL, i sur. A new regulatory variant in the interleukin-6 receptor gene associates with asthma risk. *Genes Immun.* 2013;14(7):441-6.
145. Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, i sur. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood.* 2007;110(6):1748-55.
146. Oberg HH, Wesch D, Grussel S, Rose-John S, Kabelitz D. Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells. *Int Immunol.* 2006;18(4):555-63.
147. Horiuchi S, Koyanagi Y, Zhou Y, Miyamoto H, Tanaka Y, Waki M, i sur. Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol.* 1994;24(8):1945-8.
148. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine.* 1992;4(2):96-100.

149. Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, Buse G, i sur. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol.* 1993;23(2):473-80.
150. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J.* 1994;300 ( Pt 2)(Pt 2):281-90.
151. Ferreira MA, Matheson MC, Duffy DL, Marks GB, Hui J, Le Souef P, i sur. Identification of IL6R and chromosome 11q13.5 as risk loci for asthma. *Lancet.* 2011;378(9795):1006-14.
152. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, i sur. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest.* 2005;115(2):313-25.
153. Farahi N, Paige E, Balla J, Prudence E, Ferreira RC, Southwood M, i sur. Neutrophil-mediated IL-6 receptor trans-signaling and the risk of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Hum Mol Genet.* 2017;26(8):1584-96.
154. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, i sur. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 2010;363(13):1211-21.
155. Toncheva AA, Potaczek DP, Schedel M, Gersting SW, Michel S, Krajnov N, i sur. Childhood asthma is associated with mutations and gene expression differences of ORMDL genes that can interact. *Allergy.* 2015;70(10):1288-99.
156. Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, Herrero E, Balcells S, Gonzalez-Duarte R. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol.* 2002;3(6):RESEARCH0027.
157. Siow DL, Wattenberg BW. Mammalian ORMDL proteins mediate the feedback response in ceramide biosynthesis. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40198-204.
158. Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, Valverde MA, Vicente R. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Hum Mol Genet.* 2010;19(1):111-21.
159. Carreras-Sureda A, Cantero-Recasens G, Rubio-Moscardo F, Kiefer K, Peinelt C, Niemeyer BA, i sur. ORMDL3 modulates store-operated calcium entry and lymphocyte activation. *Hum Mol Genet.* 2013;22(3):519-30.
160. Ha SG, Ge XN, Bahaie NS, Kang BN, Rao A, Rao SP, Sriramarao P. ORMDL3 promotes eosinophil trafficking and activation via regulation of integrins and CD48. *Nat Commun.* 2013;4:2479.
161. Read A, Schroder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel).* 2021;10(5).
162. Mahn K, Hirst SJ, Ying S, Holt MR, Lavender P, Ojo OO, i sur. Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(26):10775-80.
163. Worgall TS, Veerappan A, Sung B, Kim BI, Weiner E, Bholah R, i sur. Impaired sphingolipid synthesis in the respiratory tract induces airway hyperreactivity. *Sci Transl Med.* 2013;5(186):186ra67.
164. Miller M, Tam AB, Cho JY, Doherty TA, Pham A, Khorram N, i sur. ORMDL3 is an inducible lung epithelial gene regulating metalloproteases, chemokines, OAS, and ATF6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(41):16648-53.
165. Schedel M, Michel S, Gaertner VD, Toncheva AA, Depner M, Binia A, i sur. Polymorphisms related to ORMDL3 are associated with asthma susceptibility, alterations in transcriptional regulation of ORMDL3, and changes in TH2 cytokine levels. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(4):893-903 e14.
166. Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, i sur. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy.* 2013;68(1):92-100.

167. Li X, Ampleford EJ, Howard TD, Moore WC, Torgerson DG, Li H, i sur. Genome-wide association studies of asthma indicate opposite immunopathogenesis direction from autoimmune diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(4):861-8 e7.
168. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, i sur. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet*. 2010;42(6):508-14.
169. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, i sur. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40(8):955-62.
170. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, i sur. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 2011;43(3):246-52.
171. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, i sur. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med*. 2008;358(9):900-9.
172. Verlaan DJ, Berlivet S, Hunninghake GM, Madore AM, Lariviere M, Moussette S, i sur. Allele-specific chromatin remodeling in the ZBP2/GSDMB/ORMDL3 locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease. *Am J Hum Genet*. 2009;85(3):377-93.
173. Stanojevic S, Kaminsky DA, Miller MR, Thompson B, Aliverti A, Barjaktarevic I, i sur. ERS/ATS technical standard on interpretive strategies for routine lung function tests. *Eur Respir J*. 2022;60(1).
174. Coverstone AM, Seibold MA, Peters MC. Diagnosis and Management of T2-High Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(2):442-50.
175. Maison N, Omony J, Illi S, Thiele D, Skevaki C, Dittrich AM, i sur. T2-high asthma phenotypes across lifespan. *Eur Respir J*. 2022;60(3).
176. Mosbech CH, Godtfredsen NS, Ulrik CS, Westergaard CG. Biomarker-guided withdrawal of inhaled corticosteroids in asthma patients with a non-T2 inflammatory phenotype - a randomized controlled trial study protocol. *BMC Pulm Med*. 2023;23(1):372.
177. Pavlidis S, Takahashi K, Ng Kee Kwong F, Xie J, Hoda U, Sun K, i sur. "T2-high" in severe asthma related to blood eosinophil, exhaled nitric oxide and serum periostin. *Eur Respir J*. 2019;53(1).
178. Thomas D, McDonald VM, Pavord ID, Gibson PG. Asthma remission: what is it and how can it be achieved? *Eur Respir J*. 2022;60(5).
179. Heinzlering L, Mari A, Bergmann KC, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, i sur. The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy*. 2013;3(1):3.
180. Marinho S, Custovic A, Marsden P, Smith JA, Simpson A. 17q12-21 variants are associated with asthma and interact with active smoking in an adult population from the United Kingdom. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012;108(6):402-11 e9.
181. Simpson A, Custovic A, Tepper R, Graves P, Stern DA, Jones M, i sur. Genetic variation in vascular endothelial growth factor-a and lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(11):1197-204.
182. Blekic M, Kljaic Bukvic B, Aberle N, Marinho S, Hankinson J, Custovic A, Simpson A. 17q12-21 and asthma: interactions with early-life environmental exposures. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;110(5):347-53 e2.
183. Bukvic BK, Blekic M, Simpson A, Marinho S, Curtin JA, Hankinson J, i sur. Asthma severity, polymorphisms in 20p13 and their interaction with tobacco smoke exposure. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(1):10-8.
184. Yang H, Wang H, Wang J, Cai Y, Zhou G, He F, Qian X. Multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2003;314(1):54-62.
185. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 2004;74(1):106-20.

186. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5.
187. de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet*. 2005;37(11):1217-23.
188. Erjefalt JS. Anatomical and histopathological approaches to asthma phenotyping. *Respir Med*. 2023;210:107168.
189. Fitzpatrick AM, Chipps BE, Holguin F, Woodruff PG. T2-"Low" Asthma: Overview and Management Strategies. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(2):452-63.
190. Asthma 2023. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>.
191. Diseases GBD, Injuries C. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204-22.
192. Moheimani F, Hsu AC, Reid AT, Williams T, Kicic A, Stick SM, i sur. The genetic and epigenetic landscapes of the epithelium in asthma. *Respir Res*. 2016;17(1):119.
193. Acevedo N, Saaf A, Soderhall C, Melen E, Mandelin J, Pietras CO, i sur. Interaction between retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha (RORA) and neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) in asthma. *PLoS One*. 2013;8(4):e60111.
194. Espuela-Ortiz A, Martin-Gonzalez E, Poza-Guedes P, Gonzalez-Perez R, Herrera-Luis E. Genomics of Treatable Traits in Asthma. *Genes (Basel)*. 2023;14(9).
195. El-Husseini ZW, Vonk JM, van den Berge M, Gosens R, Koppelman GH. Association of asthma genetic variants with asthma-associated traits reveals molecular pathways of eosinophilic asthma. *Clin Transl Allergy*. 2023;13(4):e12239.
196. Bogari NM, Amin AA, Rayes HH, Abdelmotelb A, Taher MM, Al-Allaf FA, i sur. Next Generation Exome Sequencing of Pediatric Asthma Identifies Rare and Novel Variants in Candidate Genes. *Dis Markers*. 2021;2021:8884229.
197. de Nijs SB, Venekamp LN, Bel EH. Adult-onset asthma: is it really different? *Eur Respir Rev*. 2013;22(127):44-52.
198. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1):101-8.
199. Gibson PG, McDonald VM, Marks GB. Asthma in older adults. *Lancet*. 2010;376(9743):803-13.
200. Celis-Preciado CA, Lachapelle P, Couillard S. Exhaled nitric oxide (FeNO): Bridging a knowledge gap in asthma diagnosis and treatment. *Clin Exp Allergy*. 2023;53(8):791-3.
201. De Marco R, Locatelli F, Cerveri I, Bugiani M, Marinoni A, Giammanco G, Italian Study on Asthma in Young Adults study g. Incidence and remission of asthma: a retrospective study on the natural history of asthma in Italy. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(2):228-35.
202. Ulrik CS, Lange P. Decline of lung function in adults with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(3):629-34.
203. Amelink M, de Nijs SB, Berger M, Weersink EJ, ten Brinke A, Sterk PJ, Bel EH. Non-atopic males with adult onset asthma are at risk of persistent airflow limitation. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(5):769-74.
204. ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):744-8.
205. Jenkins HA, Cherniack R, Szeffler SJ, Covar R, Gelfand EW, Spahn JD. A comparison of the clinical characteristics of children and adults with severe asthma. *Chest*. 2003;124(4):1318-24.
206. Bhatt SP, Kim YI, Harrington KF, Hokanson JE, Lutz SM, Cho MH, i sur. Smoking duration alone provides stronger risk estimates of chronic obstructive pulmonary disease than pack-years. *Thorax*. 2018;73(5):414-21.
207. Olga K, Irina L, Elena L, Artem T, Elena K. Air-trapping and decreased diffusion capacity in patients with severe asthma. *European Respiratory Journal*. 2012;40(Suppl 56):P505.

208. Roio LCD, Mizutani RF, Pinto RC, Terra-Filho M, Santos UP. Work-related asthma. *J Bras Pneumol.* 2021;47(4):e20200577.
209. Dykewicz MS. Occupational asthma: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(3):519-28; quiz 29-30.
210. Jarvis D, Newson R, Lotvall J, Hastan D, Tomassen P, Keil T, i sur. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. *Allergy.* 2012;67(1):91-8.
211. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, i sur. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology.* 2012;50(1):1-12.
212. Li F, Wang X, Shen S, Huang K, Wang M, Liu X, i sur. Risk factors associated with comorbid asthma in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med.* 2022;22(1):338.
213. Bilodeau L, Boulay ME, Prince P, Boisvert P, Boulet LP. Comparative clinical and airway inflammatory features of asthmatics with or without polyps. *Rhinology.* 2010;48(4):420-5.
214. Won HK, Kim YC, Kang MG, Park HK, Lee SE, Kim MH, i sur. Age-related prevalence of chronic rhinosinusitis and nasal polyps and their relationships with asthma onset. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018;120(4):389-94.
215. Du K, Zheng M, Zhao Y, Xu W, Hao Y, Wang Y, i sur. Impaired small airway function in non-asthmatic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Allergy.* 2020;50(12):1362-71.
216. Laidlaw TM, Mullol J, Woessner KM, Amin N, Mannent LP. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(3):1133-41.
217. Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(7):661-6.
218. Brumpton B, Langhammer A, Romundstad P, Chen Y, Mai XM. General and abdominal obesity and incident asthma in adults: the HUNT study. *Eur Respir J.* 2013;41(2):323-9.
219. Salome CM, King GG, Berend N. Physiology of obesity and effects on lung function. *J Appl Physiol (1985).* 2010;108(1):206-11.
220. El-Husseini ZW, Gosens R, Dekker F, Koppelman GH. The genetics of asthma and the promise of genomics-guided drug target discovery. *Lancet Respir Med.* 2020;8(10):1045-56.
221. Liang J, Liu XH, Chen XM, Song XL, Li W, Huang Y. Emerging Roles of Non-Coding RNAs in Childhood Asthma. *Front Pharmacol.* 2022;13:856104.
222. Khalili-Tanha G, Moghbeli M. Long non-coding RNAs as the critical regulators of doxorubicin resistance in tumor cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2021;26(1):39.
223. Begum Rokeya MA, Maliha Tabassum Rashid and Shaeri Nawar. The Role of Introns for the Development of Inflammation-Mediated Cancer Cell. Vijay Kumar AASaSSA, editor: Intechopen; 2021.
224. Qiu YY, Wu Y, Lin MJ, Bian T, Xiao YL, Qin C. LncRNA-MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate Treg/Th17 balance in patients with asthma by targeting microRNA-17/RORgammat. *Biomed Pharmacother.* 2019;111:386-94.
225. Jiang Y, Guo X, Qin J. Silencing of circHIPK3 hampers platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration in airway smooth muscle cells through the miR-375/MMP-16 axis. *Cytotechnology.* 2021;73(4):629-42.
226. Wasti B, Liu SK, Xiang XD. Role of Epigenetics in the Pathogenesis, Treatment, Prediction, and Cellular Transformation of Asthma. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:9412929.
227. Bonnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Moller E, Mercader JM, Belgrave D, i sur. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nat Genet.* 2014;46(1):51-5.
228. Kim KW, Ober C. Lessons Learned From GWAS of Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2019;11(2):170-87.

229. Levin AM, Mathias RA, Huang L, Roth LA, Daley D, Myers RA, i sur. A meta-analysis of genome-wide association studies for serum total IgE in diverse study populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1176-84.
230. Galanter JM, Torgerson D, Gignoux CR, Sen S, Roth LA, Via M, i sur. Cosmopolitan and ethnic-specific replication of genetic risk factors for asthma in 2 Latino populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(1):37-43 e12.
231. Li L, Liu Y, Liu X, Zheng N, Gu Y, Song Y, Wang X. Regulatory roles of external cholesterol in human airway epithelial mitochondrial function through STARD3 signalling. *Clin Transl Med*. 2022;12(6):e902.
232. Binh DHN, Cheng TC, Tu SH, Liao YC, Yang YY, Chen LC, Ho YS. StAR-related lipid transfer domain protein 3 (STARD3) regulates HER2 and promotes HER2-positive breast cancer progression through interaction with HSP90 and SRC signaling. *Am J Cancer Res*. 2023;13(11):5151-73.
233. Lavoie-Charland E, Berube JC, Boulet LP, Bosse Y. Asthma susceptibility variants are more strongly associated with clinically similar subgroups. *J Asthma*. 2016;53(9):907-13.
234. Yan Q, Forno E, Herrera-Luis E, Pino-Yanes M, Qi C, Rios R, i sur. A genome-wide association study of severe asthma exacerbations in Latino children and adolescents. *Eur Respir J*. 2021;57(4).
235. Howrylak JA, Moll M, Weiss ST, Raby BA, Wu W, Xing EP. Gene expression profiling of asthma phenotypes demonstrates molecular signatures of atopy and asthma control. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1390-7 e6.
236. James B, Milstien S, Spiegel S. ORMDL3 and allergic asthma: From physiology to pathology. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(3):634-40.
237. Cai X, Huang W, Liu X, Wang L, Jiang Y. Association of novel polymorphisms in TMEM39A gene with systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):43.
238. Zhao CN, Fan Y, Huang JJ, Zhang HX, Gao T, Wang C, i sur. The Association of GSDMB and ORMDL3 Gene Polymorphisms With Asthma: A Meta-Analysis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(2):175-85.
239. Wan YI, Shrine NR, Soler Artigas M, Wain LV, Blakey JD, Moffatt MF, i sur. Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma. *Thorax*. 2012;67(9):762-8.
240. Esparza-Gordillo J, Schaarschmidt H, Liang L, Cookson W, Bauerfeind A, Lee-Kirsch MA, i sur. A functional IL-6 receptor (IL6R) variant is a risk factor for persistent atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(2):371-7.
241. van Dongen J, Jansen R, Smit D, Hottenga JJ, Mbarek H, Willemsen G, i sur. The contribution of the functional IL6R polymorphism rs2228145, eQTLs and other genome-wide SNPs to the heritability of plasma sIL-6R levels. *Behav Genet*. 2014;44(4):368-82.
242. Esty B, Harb H, Bartnikas LM, Charbonnier LM, Massoud AH, Leon-Astudillo C, i sur. Treatment of severe persistent asthma with IL-6 receptor blockade. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(5):1639-42 e4.
243. Thanarajasingam U, Niewold TB. Sirukumab : a novel therapy for lupus nephritis? *Expert Opin Investig Drugs*. 2014;23(10):1449-55.
244. Sleiman PM, Flory J, Imielinski M, Bradfield JP, Annaiah K, Willis-Owen SA, i sur. Variants of DENND1B associated with asthma in children. *N Engl J Med*. 2010;362(1):36-44.
245. Akhbar L, Sandford AJ. Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma. *Respirology*. 2011;16(3):396-406.
246. El-Husseini ZW, Khalenkow D, Lan A, van der Molen T, Brightling C, Papi A, i sur. An epithelial gene signature of trans-IL-6 signaling defines a subgroup of type 2-low asthma. *Respir Res*. 2023;24(1):308.
247. International HapMap C, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, i sur. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851-61.

248. Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol.* 2005;175(8):4839-46.
249. Chen S, Chen Z, Deng Y, Zha S, Yu L, Li D, i sur. Prevention of IL-6 signaling ameliorates toluene diisocyanate-induced steroid-resistant asthma. *Allergol Int.* 2022;71(1):73-82.
250. Dijk FN, Vijverberg SJ, Hernandez-Pacheco N, Repnik K, Karimi L, Mitratza M, i sur. IL1RL1 gene variations are associated with asthma exacerbations in children and adolescents using inhaled corticosteroids. *Allergy.* 2020;75(4):984-9.
251. Ranjbar M, Whetstone CE, Omer H, Power L, Cusack RP, Gauvreau GM. The Genetic Factors of the Airway Epithelium Associated with the Pathology of Asthma. *Genes (Basel).* 2022;13(10).
252. Hafez RA, Hassan ME, Haggag MG, Atef N, Abdallah AL, Gerges MA. Association of Interleukin 13 rs20541 Gene Polymorphism and Serum Periostin with Asthma and Allergic Conjunctivitis Among Egyptian Patients. *J Asthma Allergy.* 2022;15:971-82.
253. Cui L, Jia J, Ma CF, Li SY, Wang YP, Guo XM, i sur. IL-13 polymorphisms contribute to the risk of asthma: a meta-analysis. *Clin Biochem.* 2012;45(4-5):285-8.
254. Himes BE, Hunninghake GM, Baurley JW, Rafaels NM, Sleiman P, Strachan DP, i sur. Genome-wide association analysis identifies PDE4D as an asthma-susceptibility gene. *Am J Hum Genet.* 2009;84(5):581-93.
255. Silva HDS, Teixeira HMP, Gomes L, Cruz AA, Alcantara-Neves NM, Barreto M, i sur. PDE4D gene variants and haplotypes are associated with asthma and atopy in Brazilian children. *Immunobiology.* 2023;228(5):152724.
256. Ramasamy A, Kuokkanen M, Vedantam S, Gajdos ZK, Couto Alves A, Lyon HN, i sur. Genome-wide association studies of asthma in population-based cohorts confirm known and suggested loci and identify an additional association near HLA. *PLoS One.* 2012;7(9):e44008.
257. Hui CC, Yu A, Heroux D, Akhbar L, Sandford AJ, Neighbour H, Denburg JA. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) secretion from human nasal epithelium is a function of TSLP genotype. *Mucosal Immunol.* 2015;8(5):993-9.
258. Moorehead A, Hanna R, Heroux D, Neighbour H, Sandford A, Gauvreau GM, i sur. A thymic stromal lymphopoietin polymorphism may provide protection from asthma by altering gene expression. *Clin Exp Allergy.* 2020;50(4):471-8.
259. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, i sur. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet.* 2011;43(9):887-92.
260. Gudbjartsson DF, Bjornsdottir US, Halapi E, Helgadóttir A, Sulem P, Jonsdóttir GM, i sur. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet.* 2009;41(3):342-7.
261. Demehri S, Morimoto M, Holtzman MJ, Kopan R. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol.* 2009;7(5):e1000067.
262. Jin HJ. Biological treatments for severe asthma. *Yeungnam Univ J Med.* 2020;37(4):262-8.
263. Menzies-Gow A, Corren J, Bourdin A, Chupp G, Israel E, Wechsler ME, i sur. Tezepelumab in Adults and Adolescents with Severe, Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med.* 2021;384(19):1800-9.
264. Wechsler ME, Ruddy MK, Pavord ID, Israel E, Rabe KF, Ford LB, i sur. Efficacy and Safety of Itepekimab in Patients with Moderate-to-Severe Asthma. *N Engl J Med.* 2021;385(18):1656-68.
265. Odimba U, Senthilselvan A, Farrell J, Gao Z. Identification of Sex-Specific Genetic Polymorphisms Associated with Asthma in Middle-Aged and Older Canadian Adults: An Analysis of CLSA Data. *J Asthma Allergy.* 2023;16:553-66.
266. Wohlfahrt JG, Karagiannidis C, Kunzmann S, Epstein MM, Kempf W, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Ephrin-A1 suppresses Th2 cell activation and provides a regulatory link to lung epithelial cells. *J Immunol.* 2004;172(2):843-50.

267. Yucesoy B, Kaufman KM, Lummus ZL, Weirauch MT, Zhang G, Cartier A, i sur. Genome-Wide Association Study Identifies Novel Loci Associated With Diisocyanate-Induced Occupational Asthma. *Toxicol Sci.* 2015;146(1):192-201.
268. Inoue H, Akimoto K, Homma T, Tanaka A, Sagara H. Airway Epithelial Dysfunction in Asthma: Relevant to Epidermal Growth Factor Receptors and Airway Epithelial Cells. *J Clin Med.* 2020;9(11).
269. Siroux V, Gonzalez JR, Bouzigon E, Curjuric I, Boudier A, Imboden M, i sur. Genetic heterogeneity of asthma phenotypes identified by a clustering approach. *Eur Respir J.* 2014;43(2):439-52.
270. Mathias RA, Grant AV, Rafaels N, Hand T, Gao L, Vergara C, i sur. A genome-wide association study on African-ancestry populations for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):336-46 e4.
271. Li L, Kabesch M, Bouzigon E, Demenais F, Farrall M, Moffatt MF, i sur. Using eQTL weights to improve power for genome-wide association studies: a genetic study of childhood asthma. *Front Genet.* 2013;4:103.
272. March ME, Sleiman PM, Hakonarson H. Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma. *Int J Gen Med.* 2013;6:253-65.
273. Chen Z, Chen J, Ren D, Zhang J, Yang Y, Zhang H, i sur. EPHA5 mutations predict survival after immunotherapy in lung adenocarcinoma. *Aging (Albany NY).* 2020;13(1):598-618.
274. Roffel MP, Boudewijn IM, van Nijnatten JLL, Faiz A, Vermeulen CJ, van Oosterhout AJ, i sur. Identification of asthma-associated microRNAs in bronchial biopsies. *Eur Respir J.* 2022;59(3).
275. Karthik IP, Desai P, Sukumar S, Dimitrijevic A, Rajalingam K, Mahalingam S. E4BP4/NFIL3 modulates the epigenetically repressed RAS effector RASSF8 function through histone methyltransferases. *J Biol Chem.* 2018;293(15):5624-35.
276. Hesson LB, Dunwell TL, Cooper WN, Catchpoole D, Brini AT, Chiamonte R, i sur. The novel RASSF6 and RASSF10 candidate tumour suppressor genes are frequently epigenetically inactivated in childhood leukaemias. *Mol Cancer.* 2009;8:42.
277. Sio YY, Gan WL, Ng WS, Matta SA, Say YH, Teh KF, i sur. The ERBB2 Exonic Variant Pro1170Ala Modulates Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Cascades and Associates with Allergic Asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2023;184(10):1010-21.
278. Imraish A, Abu-Thiab T, Alhindi T, Zihlif M. GSDM gene polymorphisms regulate the IgE level in asthmatic patients. *PLoS One.* 2022;17(10):e0274951.
279. Das S, Miller M, Beppu AK, Mueller J, McGeough MD, Vuong C, i sur. GSDMB induces an asthma phenotype characterized by increased airway responsiveness and remodeling without lung inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(46):13132-7.
280. Moussette S, Al Tuwaijri A, Kohan-Ghadr HR, Elzein S, Farias R, Berube J, i sur. Role of DNA methylation in expression control of the IKZF3-GSDMA region in human epithelial cells. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172707.
281. Fan Y, Lu D. The Ikaros family of zinc-finger proteins. *Acta Pharm Sin B.* 2016;6(6):513-21.
282. Ried JS, Baurecht H, Stuckler F, Krumsiek J, Gieger C, Heinrich J, i sur. Integrative genetic and metabolite profiling analysis suggests altered phosphatidylcholine metabolism in asthma. *Allergy.* 2013;68(5):629-36.
283. Demenais F, Margaritte-Jeannin P, Barnes KC, Cookson WOC, Altmuller J, Ang W, i sur. Multiancestry association study identifies new asthma risk loci that colocalize with immune-cell enhancer marks. *Nat Genet.* 2018;50(1):42-53.
284. Soliai MM, Kato A, Helling BA, Stanhope CT, Norton JE, Naughton KA, i sur. Multi-omics colocalization with genome-wide association studies reveals a context-specific genetic mechanism at a childhood onset asthma risk locus. *Genome Med.* 2021;13(1):157.
285. Stein MM, Thompson EE, Schoettler N, Helling BA, Magnaye KM, Stanhope C, i sur. A decade of research on the 17q12-21 asthma locus: Piecing together the puzzle. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(3):749-64 e3.
286. National Library of Medicine 2024. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/93210>.



287. Granel R, Henderson AJ, Timpson N, St Pourcain B, Kemp JP, Ring SM, i sur. Examination of the relationship between variation at 17q21 and childhood wheeze phenotypes. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(3):685-94.
288. Daya M, Rafaels N, Brunetti TM, Chavan S, Levin AM, Shetty A, i sur. Author Correction: Association study in African-admixed populations across the Americas recapitulates asthma risk loci in non-African populations. *Nat Commun.* 2019;10(1):4082.
289. Shrine N, Portelli MA, John C, Soler Artigas M, Bennett N, Hall R, i sur. Moderate-to-severe asthma in individuals of European ancestry: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med.* 2019;7(1):20-34.
290. Lima LC, Queiroz GA, Costa RDS, Alcantara-Neves NM, Marques CR, Costa GNO, i sur. Genetic variants in RORA are associated with asthma and allergy markers in an admixed population. *Cytokine.* 2019;113:177-84.
291. Sordillo JE, Lutz SM, Jorgenson E, Iribarren C, McGeachie M, Dahlin A, i sur. A polygenic risk score for asthma in a large racially diverse population. *Clin Exp Allergy.* 2021;51(11):1410-20.
292. Laulajainen-Hongisto A, Lyly A, Hanif T, Dhaygude K, Kankainen M, Renkonen R, i sur. Genomics of asthma, allergy and chronic rhinosinusitis: novel concepts and relevance in airway mucosa. *Clin Transl Allergy.* 2020;10(1):45.
293. Persson H, Kwon AT, Ramilowski JA, Silberberg G, Soderhall C, Orsmark-Pietras C, i sur. Transcriptome analysis of controlled and therapy-resistant childhood asthma reveals distinct gene expression profiles. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(3):638-48.
294. Tulah AS, Holloway JW, Sayers I. Defining the contribution of SNPs identified in asthma GWAS to clinical variables in asthmatic children. *BMC Med Genet.* 2013;14:100.

## 11. KRATKA BIOGRAFIJA

Rođena je 26. studenog 1989. godine u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je u akademskoj godini 2008./2009. Tijekom 4. i 5. godine studija bila je demonstrator iz predmeta Patologija na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, a tijekom 5. i 6. godine studija demonstrator iz predmeta Klinička propedeutike u Jedinici intenzivne skrbi u KBC-u Sestre milosrdnice. Završila je Intergrirani preddiplomski i diplomski studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u redovnom roku dana 15.07.2014. godine. Pripravnički je staž odradila u KBC-u Sestre milosrdnice. Radila je u ordinacijama obiteljske medicine do 2016. godine kada je postala specijalizantica pulmologije u Klinici za plućne bolesti Jordanovac, KBC-a Zagreb. U 7.2021. je položila specijalistički ispit iz pulmologije te nastavila s radom u Zavodu za alergijske i opstruktivne bolesti pluća Klinike Jordanovac, a tijekom pandemije COVID-a 19 i na ispomoći u Klinici za infektivne bolesti Dr. Fran Mihaljević te KB Dubrava. Uže područje interesa su joj opstruktivne bolesti pluća u odraslih (što ponajprije uključuje astmu i KOPB) te alergijske, eozinofilne i gljivične bolesti dišnog sustava. Članica je Hrvatskog torakalnog društva, Hrvatskog pulmološkog društva, Europskog respiratornog društva, Europskog društva za alergiju i kliničku imunologiju te dio nacionalnog projekta Telecordis i kolaboracije SHARP.

## **PRILOZI**

### **ECRSH II UPITNIK**

KLINIKA ZA PLUĆNE BOLESTI "JORDANOVAC"

ZAGREB – Jordanovac 104 Telefon: 01/238 5100 Telefax: 01/234 8345

THE EUROPEAN COMMUNITY RESPIRATORY HEALTH STUDY II

ECRSH II ASTMA UPITNI

prijevod iz: The European Community Respiratory Health Survey II

(Studija europske zajednice o plućnom zdravlju II)

Željeli bismo Vam postaviti nekoliko pitanja, vezanih

uz vaše disanje. Gdje god je moguće pokušajte

odgovoriti sa «da» ili «ne».

1. Da li Vam se javilo sviranje ili zviždanje u prsima u posljednjih 12 mjeseci?

Ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje 2, ukoliko je odgovor «DA»:

1.1. Da li ste imali osjećaj nedostatka zraka za vrijeme brisanja prašine?

DA NE

1.2. Da li Vam se sviranje ili zviždanje javilo, a da niste bili prehladeni? DA NE

2. Da li ste se probudili sa osjećajem stezanja u prsima u posljednjih 12 mjeseci?

DA NE

3. Da li ste imali napadaje otežanog disanja u mirovanju tijekom zadnjih 12

mjeseci?

DA NE

4. Da li ste imali napadaje otežanog disanja nakon fizičke aktivnosti u zadnjih 12

mjeseci? DA NE

5. Da li ste imali noćna buđenja zbog napadaja otežanog disanja u zadnjih 12 mjeseci?

Ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje broj 6., ukoliko je odgovor «DA»:

5.1. Da li ste imali noćna buđenja zbog napadaja skraćenog daha u zadnja 3 mjeseca?

DA NE

Ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje 6., ako je odgovor «DA»:

5.1.1. Da li ste imali noćna buđenja zbog skraćenog daha u prosjeku barem jedanput tjedno u posljednja 3 mjeseca?

Ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje 6. , ukoliko je odgovor DA:

5.1.1.1. Koliko ste puta tjedno u prosjeku imali noćna buđenja zbog skraćenog daha u posljednja 3 mjeseca? \_\_\_\_\_

6. Da li ste se budili zbog napadaja kašlja u posljednjih 12 mjeseci?

DA NE

7. Da li imate jutarnji kašalj tijekom zime? DA NE

8. Da li obično kašljete tijekom dana ili noći u zimskim mjesecima?

Ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje broj 9, ukoliko je odgovor «DA»:

8.1. Da li imate kašalj tijekom tri mjeseca u godini? DA NE

9. Da li obično imate jutarnji iskašljaj? DA NE

10. Da li tijekom zimskih mjeseci imate produktivan kašalj (iskašljaj)?

Ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje 11, ukoliko je odgovor DA:

10.1 Da li imate produktivan kašalj tijekom 3 mjeseca u godini? DA NE

11. Da li imate problema sa disanjem?

Ukoliko je odgovor NE idite na odgovor 12 ukoliko je odgovor DA:

11.1 Da li imate navedene tegobe s disanjem

a) kontinuirano tako da Vaše disanje nikada nije normalno

b) povremeno, ali se uvijek popravi

c) samo vrlo rijetko

12. Da li imate problema prilikom hoda, a da nisu povezani sa srčanim ili plućnim bolestima?

Ukoliko da, napišite kojim \_\_\_\_\_

---

ili idite na pitanje broj 13, ukoliko je odgovor NE.

3

12.1 Da li imate problema sa disanjem kod bržeg hoda po ravnoj podlozi ili kod lagane uzbrdice?

Ukoliko je odgovor NE, idite na pitanje 13, ako je odgovor DA:

12.1.1.1. Da li imate skraćen dah prilikom hoda sa vršnjacima na ravnoj podlozi?

DA NE

13. Samo za žene, muškarci na pitanje br 14.

Da li ste ikada primjetili da se vaši respiratorni simptomi (kao što je skraćen dah, sviranje u prsima i sl.) javljaju u određenom dijelu menstrualnog ciklusa?

a) da, tjedan prije menstruacije

b) da, tijekom menstruacije

c) da, tjedan iza menstruacije

d) da, u drugo vrijeme tijekom ciklusa

e) ne odnosi se na mene (amenoreja npr. menopauza)

f) ne

14. Da li imate astmu?

ukoliko je odgovor NE idite na pitanje 15, ako je odgovor DA:

14.1. Da li je dijagnoza astme potvrđena od strane liječnika? DA NE

14.2. Koliko ste imali godina kada se javio prvi napadaj astme? \_\_\_\_\_

14.3. Koliko ste imali godina kada Vam se javio posljednji napad astme? \_\_\_\_\_

14.4. U kojem mjesecu tijekom godine obično Vam se javljaju napadi astme?

14.4.1 siječanj/veljača

14.4.2. ožujak/travanj

14.4.3. svibanj/lipanj

14.4.4. srpanj/kolovoz

14.4.5. rujan/listopad

14.4.6. studeni/prosinac

14.5. Da li ste imali napadaje astme u posljednjih 12 mjeseci? DA NE

Ukoliko je odgovor NE idi na 14.8, ukoliko je odgovor DA:

14.6. Koliko ste napadaja astme imali u posljednjih 12 mjeseci? \_\_\_\_\_

14.7. Koliko ste napadaja astme imali u posljednja 3 mjeseca? \_\_\_\_\_

14.8. Koliko puta ste imali noćna buđenja zbog astme u posljednja 3 mjeseca?

a) svaku noć ili gotovo svaku noć

b) više nego 1x tjedno, ali ne svaku noć

c) barem 2x mjesečno, ali ne više od 1x tjedno

4

d) manje od 2x mjesečno

e) bez buđenja

14.9. Koliko često imate smetnje disanja zbog astme u posljednja 3 mjeseca?

a) kontinuirano

- b) 1x dnevno
- c) barem 1xdnevno,ali manje od 1x tjedno
- d) manje od 1x tjedno
- e) bez tegoba

14.10. Da li trenutno uzimate lijekove za astmu, uključujući inhalere, aerosole ili tablete?

DA NE

14.11. Da li imate vlastiti mjerač vršnog protoka (za mjerenje PEF)?

Ukoliko je odgovor NE, idite na pitanje br.14.12 ukoliko je odgovor DA:

14.11.1.Koliko često ste ga koristili u posljednja 3 mjeseca?

- a) nikada
- b) povremeno
- c) gotovo stalno

14.12.Da li imate napisane instrukcije od vašeg liječnika kako postupiti u slučaju napadaja ili pogoršanja astme? DA NE

14.13. Samo za žene-muškarci na pitanje br. 15

Da li ste primjetili da Vam se astma pogoršava tijekom menstruacijskog ciklusa?

- a) da, tjedan prije menstruacije
- b) da, tijekom menstruacije
- c) da, tjedan nakon menstruacije
- d) da, drugi dane tijekom ciklusa
- e) ne odnosi se na mene(npr. amenoreja)
- f) ne

14.14.Da li ste bili trudni od kada imate astmu?

Ukoliko je odgovor NE, idite na pitanje 15 ukoliko je odgovor DA

14.14.1 Kakva je bila astma tijekom trudnoće?

- a) poboljšala se

- b) pogoršala se
- c) ostala ista
- d) nije bilo isto tijekom različitih trudnoća
- e) ne znam

15. Da li imate alergijski rinitis ?

Ukoliko je odgovor «NE», idite na pitanje 16, ukoliko je odgovor «DA»:

15.1. Koliko ste imali godina kada su Vam se prvi puta javili simptomi alergijskog rinitisa? \_\_\_\_\_

5

16. Da li ste imali tegobe sa kihanjem i začepljenim nosom a da niste bili prehladjeni?

Ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje 17, ukoliko je odgovor «DA»

16.1. Da li ste imali začepljen nos ili kihanje u posljednjih 12 mjeseci, a da niste bili prehladjeni?

Ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje 17, ukoliko je odgovor «DA»

16.1.1. Da li su tegobe sa nosom praćene crvenilom i svrbežom očiju? DA NE

16.1.2. U kojim mjesecima tijekom godine Vam se obično javljaju tegobe sa nosom?

siječanj

veljača

ožujak

travanj

svibanj

lipanj

srpanj

kolovoz



rujan

listopad

studen

prosinac

17. Od posljednje kontrole, da li ste koristili lijekove za probleme s nosom?

ukoliko je odgovor «NE» idite na pitanje 18, ukoliko je odgovor «DA»

17.1. Da li ste koristili neki od dolje navedenih nazalnih sprejeva za rješavanje tegoba sa nosom?

- a) Gnadion
- b) Flixonase
- c) Tafen
- d) Nasonex
- e)

Ukoliko je odgovor «ne» idite na 17.2.; ukoliko je odgovor «da»:

17.1.1. Koliko godina uzimate navedene nazalne sprejeve? \_\_\_\_\_

17.1.2 Da li ste koristili neki od navedenih nazalnih sprejeva u posljednjih 12 mjeseci?

DA NE

17.2. Da li ste uzimali neku od dolje navedenih kapsula ili tableta za rješavanje tegoba sa nosom?

- a) Claritine
- b) Telfast
- c) Rinolan
- d) Letizen

e) Belodin

f) Contral

Ukoliko je odgovor «ne» idite na pitanje 18, ukoliko je odgovor «da»:

17.2.1. Koliko godina uzimate nevedene lijekove? \_\_\_\_\_

18. Da li te ikada imali osip ili bilo koju vrstu kožne alergije? DA NE

19. Da li ste ikada imali crvenilo i svrbež kože koje se javljalo i nestajalo u posljednjih 6 mjeseci? DA NE

Ukoliko je odgovor «ne» idi na pitanje 20, ukoliko je odgovor «da»:

19.1.1. Da li se je crvenilo kože javljalo na nekom od navedenih dijelova tijela: u pregibu laktova, iza koljena ili oko vrata ,očiju ili nosa? DA NE

20. Da li ste imali dišnih tegoba nakon uzimanja lijekova? DA NE

Ukoliko je odgovor «ne» idite na pitanje 21, ukoliko je odgovor «da»:

Koji lijek? \_\_\_\_\_

21.Koliko je godina imala vaša majka kada vas je rodila? \_\_\_\_\_

22. U koliko ste navrata mjenjali mjesto stanovanja u prvih 5 godina života?

a) nijednom

b) jednom

c) u više navrata

23.Da li ste bili hospitalizirani zbog bolesti pluća u prve 3 godine života? DA NE

24. Sa koliko godina ste prvi puta krenuli u kolektiv (jaslice, vrtić, škola)? \_\_\_\_\_

25.Koliko je djece spavalo sa Vama u istoj spavaonici u prvih 5 godina života?

\_\_\_\_\_

7

Sada bismo Vam željeli postaviti nekoliko pitanja vezanih uz

poslove koje ste do sada radili. Radi se o poslovima kojim ste se bavili u posljednja 3 mjeseca od našeg zadnjeg kontakta. Ti poslovi mogu biti izvan kuće, poslovi sa punim ili skraćenim radnim vremenom, plaćeni ili neplaćeni, uključujući i poslove u vlastitoj firmi. Molim Vas da spomenete poslove sa skraćenim radnim vremenom samo ukoliko ste radili više od 8 h tjedno.

26. Da li ste

- a) zaposleni
- b) radite u vlastitoj firmi
- c) nezaposleni, tražite posao
- d) nezaposleni zbog zdravstvenog stanja
- e) radite kod kuće
- f) student
- g) u mirovini
- h) ostalo

Ukoliko ste zaposleni idite na pitanje 28

27. Da li ste bili zaposleni u kontinuitetu 3 mjeseca od našeg zadnjeg kontakta?

DA NE

28. Ukoliko ste radili više poslova u isto vrijeme, željeli bi smo ih razdvojiti poimence. Molim Vas počnite sa sadašnjim ili zadnjim poslom.

---

28.1. Što trenutno radite ili što ste posljednje radili? \_\_\_\_\_

28.2. Čime se firma, kompanija ili sl. u kojoj radite bavi? \_\_\_\_\_

28.3. U kojem mjesecu i koje godine ste počeli raditi trenutni posao? \_\_\_\_\_

28.4. U kojem mjesecu i koje godine ste prestali raditi navedeni posao? \_\_\_\_\_

29. Da li ste radeći na nekom od navedenih radnih mjesta imali teškoće sa  
disanjem? \_\_\_\_\_

Ukoliko jeste, označite na kojem od navedenih poslova.

30. Da li ste morali napustiti neki od poslova zbog respiratornih tegoba?

Ukoliko jeste, označite koji od navedenih poslova. \_\_\_\_\_

8

31. Od zadnje kontrole, da li ste kod kuće, na poslu ili dr. bili izloženi  
isparavanjima, prašini, plinovima ili dimu?

Ukoliko da, napišite kojem \_\_\_\_\_

31.1. Da li su vam se respiratorni simptomi javili odmah po izlaganju?

Možete li opisati navedene tegobe? \_\_\_\_\_

32. S koliko godina ste završili obrazovanje? \_\_\_\_\_

33. Koliko vam se često prilikom vježbanja dogodi da ostanete bez daha ili se  
preznojite?

a) svaki dan

b) 4-6 x tjedno

c) 2-3 x tjedno

d) jednom tjedno

e) jednom mjesečno

f) manje od 1x mjesečno

g) nikada

34. Koliko sati obično tjedno vježbate toliko da ostanete bez daha ili se preznojite?

a) niti jednom

b) oko pola sata

c) oko sat vremena

d) 2-3 sata

e) 4-6 sati

f) 7 i više sati

35. Da li izbjegavate teže vježbe zbog sviranja u prsima, odnosno astme? DA NE

36. Kada je vaš trenutni dom izgrađen? \_\_\_\_\_

37. Da li živite u istom stanu/kući kao i prilikom zadnje posjete?

Ukoliko je odgovor DA idite na odgovor broj 38, ukoliko je odgovor NE:

37.1. Koliko ste se puta selili od zadnje posjete? \_\_\_\_\_

37.2 Koliko godina živite u vašem trenutnom domu? \_\_\_\_\_

37.3. Gdje trenutno živite

a) u drugoj kući/stanu ali u istom području kao i na početku studije

b) izvan područja na početku studije ali u istoj zemlji

c) u drugoj zemlji

9

37.3.1. Ukoliko živite u drugoj zemlji, navedite u kojoj? \_\_\_\_\_

37.4. Koji od slijedećih opisa najbolje odgovara opisu vašeg doma?

a) kamp prikolica?

b) obiteljska kuća

- c) obiteljska kuća u nizu
- d) zgrada za 2 obitelji
- e) zgrada za 3 ili 4 obitelji
- f) zgrada za 5 i više obitelji
- g) brod ili slično
- h) ostalo

38. Da li vaš dom ima nešto od navedenog?

38.1. centralno grijanje

38.2. klimatizacija

39. Koji od navedenih izvora energije koristite za grijanje ili zagrijavanje vode?

39.1. kamin, peći na drva

39.2. plinske peći

39.3. električno grijalo

39.4. parafinsko grijalo

39.5. bojler na plin

39.6. bojler na ulje

39.7. prijenosno grijalo na plin

39.8. ostalo

40. Koju vrstu izvora energije najčešće koristite za kuhanje?

a) drvo, ugljen-kruto gorivo

b) plin

c) električnu energiju

d) parafin

e) mikrovalna pećnica

f) plinske boce

g) ostalo

40.1. Ukoliko koristite plin za kuhanje, to je:

40.1.1 zemni plin

40.1.2. gradski plin

10

41. Koja vrsta goriva je korištena za kuhanje u domu u kojem ste živjeli u prvih 5 godina života?

a) kruto gorivo

b) plin

c) električna energija

d) parafin

e) plinske boce

f) ne znam

g) ostalo

42. Koliko ste u prosjeku proveli vremena kuhajući svaki dan tijekom prošla 4 tjedna? \_\_\_\_\_

43. U zadnja 4 tjedna tijekom kuhanja dali ste imali otvoren prozor?

a) većinu vremena

b) dio vremena

c) rijetko

d) nemam prozor koji se može otvoriti van u kuhinji

44. Da li imate napu (filter u kuhinji)?

Ukoliko je odgovor «NE» ili «NE ZNAM» idite na pitanje 45. ukoliko je odgovor «DA»:

44.1. Tijekom kuhanja da li napu (filter u kuhinji) koristite

a) cijelo vrijeme

b) dio vremena

c) uopće je ne koristim

44.2. Da li napa (filter u kuhinji) odonosi plinove van kuće? DA NE

45. Da li soba koju najviše koristite tijekom dana

45.1. ima tepihe po cijelom podu

45.2. sadržava prostirke (mali tepih)

46. Koliko dugo imate najstariji tepih ili prostirku (mali tepih) u prostoriji koju

koristite najviše tijekom dana u kući ili stanu ?

a) manje od godinu dana

b) 1-5 godina

c) više od 5 godina

47. Na kojem katu je prostorija koju u kući ili stanu koristite najviše tijekom dana ?

(najniži kat je prizemlje) \_\_\_\_\_

48. Ima li vaša spavaća soba

a) tepih po cijelom podu

b) prostirke (male tepihe)

11

49. Koliko dugo imate najstariji tepih ili prostirku u vašoj spavaćoj sobi ?

a) manje od godinu dana

b) 1-5 godina

c) više od 5 godina

50. Koliko dugo imate madrac ?

a) manje od godinu dana



b) 1-5 godina

c) više od 5 godina

51. Na kojem je katu vaša spavaća soba ? (najniži kat je prizemlje) \_\_\_\_\_

52. Spavate li s otvorenim prozorom po noći tijekom zime ?

Ako ne pređite na pitanje 53, ako da:

52.1 Spavate li s otvorenim prozorom

a) cijelo vrijeme

b) ponekad

c) samo povremeno

53. Da li se ikada dogodilo kakvo oštećenje vodom na vašoj zgradi npr. puknuće vodovodnih instalacija, poplava...?

Ako da:

53.1 Da li je bilo oštećenja vodom u zadnjih 12 mjeseci ? DA NE

54. Da li ste unatrag 12 mjeseci u stanu / kući imali vlažne ili mokre tragove na površini zidova, tapeta, tepiha, tavana ili drugih prostora isključujući podrum ?

55. Da li ste ikada imali plijesan na nekoj površini u stanu/kući (osim hrane)?

Ako ne ili ne znate pređite na pitanje 56, ako da:

55.1.1-6 U kojim prostorijama

55.1.1 kupaonica

55.1.2 spavaća soba

55.1.3 dnevna soba

55.1.4 kuhinja

55.1.5 podrum ili tavan

55.1.6 drugo \_\_\_\_\_

55.2 Da li ste imali bilo gdje u kući/stanu plijesan u zadnjih 12 mjeseci ? \_\_\_\_\_

Ova skala izgleda poput toplomjera i omogućuje vam stupnjevanje vašeg osobnog dojma o izloženosti onečišćenju zraka. Izloženost možete stupnjevati od 0 do 10.

Nula (0) znači BEZ izlaganja, a deset (10) NEIZDRŽLJIVU izloženost.

0 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 10

56. Koliko ste intenzivno iritirani zagađenošću zraka u vašoj okolini ( promet, tvornice, itd ), ako držite otvoren prozor – skala od 0-10?

0 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 10

Oni koji se nisu selili iz kuće od zadnjeg pregleda (provjeri s odgovorom 37) pređite na pitanje 58, ostali pitanje 57.

57. Koliko ste intenzivno bili iritirani zagađenošću zraka iz okoline (promet, tvornice, itd) vašeg bivšeg stana, ako držite otvoren prozor-?---- skala od 0-10

0 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 10

58. Koliko često automobili prolaze kraj vašeg stana/kuće ?

a) stalno

b) često

c) rijetko

d) nikada

59. Koliko često teretna vozila (kamioni, autobusi) prolaze kraj vašeg stana/kuće ?

- a) stalno
- b) često
- c) rijetko
- d) nikada

13

60. Da li ste poduzeli neke od mjera da smanjite alergen ili izloženost alergenima u vašem stanu/kući od zadnjeg pregleda?

60.1 promijenili tepih u drvenu ili neku drugu glatku površinu na podu sobe koju najviše koristite tijekom dana ?

60.2 promijenili tepih u drvenu ili neku drugu glatku površinu na podu vaše spavaće sobe ?

60.3 kupili novi tepih u sobi koju najviše koristite tijekom dana ?

60.4 kupili novi tepih u vašoj spavaćoj sobi ?

60.5 koristili sprej protiv prašine i grinja?

60.6 stavili anti alergijski prekrivač na vaš madrac ?

60.7 prodali ili poklonili kućnog ljubimca psa ili mačku ?

61. Imate li mačku ?

Ako ne pređite na pitanje 62, ako da:

61.1 smije li ući u kuću ?

61.2 smije li ući u spavaću sobu ?

62. Imate li psa ?

Ako ne pređite na pitanje 63, ako da:

62.1 smije li ući u kuću ?

62.2 smije li ući u spavaću sobu ?

63. Imate li kakve ptice ?

Ako ne pređite na pitanje 64, ako da:

63.1 držite li neke od njih u kući ?

64. Da li ste imali mačku u kući:

64.1 tijekom vaše prve godine života ?

64.2 između vaše 1. i 4. godine života ?

64.3 između vaše 5. i 15. godine života ?

65. Da li ste imali psa u kući:

65.1 tijekom vaše prve godine života ?

65.2 između vaše 1. i 4. godine života ?

65.3 između vaše 5. i 15. godine života ?

66. Da li ste imali neku pticu u kući:

66.1 tijekom vaše prve godine života ?

66.2 između vaše 1. i 4. godine života ?

66.3 između vaše 5. i 15. godine života ?

67. U kojoj ste sredini živjeli do svoje pete godine života ?

a) farma

b) selo

c) manji grad

d) predgrađe većeg grada

e) u većem gradu

68. Kada ste u blizini životinja (mačke, psi, konji), imate li neke od pojava:

68.1 kašalj ?

68.2 piskanje ?

68.3 težinu u prsima ?

68.4 kratkoću daha ?

68.5 začepjenost nosa ili sekreciju iz nosa uz kihanje ?

68.6 pečenje i suzenje očiju ?

69. Kada ste u prašnjavom dijelu kuće ili pored jastuka, da li ikada:

69.1 počnete kašljati?

69.2 počnete svirati?

69.3 dobijete osjećaj težine u prsima?

69.4 osjećate kratkoću daha?

69.5 počinjete kihati li osjećate sekreciju iz nosa?

69.6 osjećate svrbež ili suzenje očiju?

70. Kada ste pored drveća, trave ili cvijeća, ili u okružju polena, da li ikada:

70.1 počnete kašljati?

70.2 počnete svirati?

70.3 dobijete osjećaj težine u prsima?

70.4 osjećate kratkoću daha?

70.5 počinjete kihati li osjećate sekreciju iz nosa?

70.6 osjećate svrbež ili suzenje očiju?

Ako da, za bilo koji od odgovora:

70.7 u kojem dijelu godine se to dešava

70.7.1 zima

70.7.2 proljeće

70.7.3 ljeto

70.7.4 jesen

71. Koliko često jedete gotovu pripremljenu hranu, poput one iz limenki ili smrznute hrane?

- a) svaki dan ili većinu dana
- b) najmanje jednom na tjedan
- c) manje od jednom tjedno

72. Jedete li između obroka?

Ako ne, pređite na pitanje 73 ako da:

72.1.1 slane grickalice

72.1.2 slatko, čokolada ili keksi

72.1.3 voće ili povrće

15

73. Da li ste se ikada razboljeli zbog određene hrane?

Ako ne, prijeđite na pitanje 74, ako da

73.1 da li uvijek ili gotovo uvijek imate iste tegobe nakon uzimanja te hrane?

Ako ne, prijeđite na pitanje 74, ako da:

73.1.1 Koja hrana je to bila? (nabrojite)

---

---

---

73.1.2 Da li su te tegobe uključivale:

73.1.2.1 crvenilo ili svrbež kože

73.1.2.2 proljev ili povraćanje

73.1.2.3 začepljen nos ili curenje iz nosa

73.1.2.4 jake glavobolje

73.1.2.5 otežano disanje

73.1.2.6 drugo \_\_\_\_\_

74. Jeste li ikada pušili stalno kroz godinu dana?

Da, znači najmanje 20 kutija cigareta ili 360 grama duhana u životu ili najmanje jednu cigaretu dnevno ili jednu cigaru tjedno kroz godinu dana

Ako ne, prijedite na pitanje 75, ako da:

74.1 S koliko godina ste počeli pušiti? \_\_\_\_\_

74.2 Da li sada pušite isto kao prije mjesec dana? \_\_\_\_\_

Ako ne prijedite na pitanje 74.3, ako da:

74.2 Koliko sada pušite u prosjeku?

74.2.1 broj cigareta dnevno \_\_\_\_\_

74.2.2 broj cigarila dnevno \_\_\_\_\_

74.2.3 broj cigara tjedno \_\_\_\_\_

74.2.4 duhana-lula grama/tjedan \_\_\_\_\_

74.3 Da li ste prestali ili smanjili pušenje? \_\_\_\_\_

Ako ne, prijedite na pitanje 74.4, ako da:

74.3.1 koliko ste imali godina kada ste prestali ili smanjili pušenje? \_\_\_\_\_

74.3.2.1-4 koliko ste u prosjeku pušili do tada? \_\_\_\_\_

74.3.2.1 broj cigareta dnevno \_\_\_\_\_

74.3.2.2 broj cigarilosa dnevno \_\_\_\_\_

74.3.2.3 broj cigara tjedno \_\_\_\_\_

74.3.2.4 duhana u gramima tjedno \_\_\_\_\_

74.4 Da li ste ranije ili sada bili pasivni pušač? \_\_\_\_\_

16

75. Da li ste redovito (većinu dana ili noći) bili izloženi duhanskom dimu u posljednjih 12 mjeseci?

Ako ne, prijeđi na pitanje 76, ako da:

75.1 ne uključujući sebe koliko ljudi u vašoj kućnoj sredini puši redovito? \_\_\_\_\_

75.2 da li ljudi puše redovito u sobi u kojoj radite? \_\_\_\_\_

75.3 koliko sati dnevno ste izloženi pasivno duhanskom dimu? \_\_\_\_\_

75.4 Koliko sati dnevno ste pasivno izloženi duhanskom dimu:

Kod kuće \_\_\_\_\_

Na poslu \_\_\_\_\_

U kafićima, restoranima, kinima ili slično \_\_\_\_\_

Negdje drugdje \_\_\_\_\_

76. Da li ste u zadnjih godinu dana koristili neke od inhalirajućih lijekova kako bi si olakšali disanje?

Ako ne, prijeđi na pitanje 77, ako da:

Koje od lijekova ste koristili u zadnjih 12 mjeseci?

76.1 kratkodjelujuće beta2 agoniste (npr. Ventolin, Berotec)?

76.1.1. ako da koji? \_\_\_\_\_

76.1.2 koji tip inhalera koristite (MDI, DPI,...)? \_\_\_\_\_

76.1.3 koju dozu upuha uzimate ( u mikrogramima) \_\_\_\_\_

76.1.4 u posljednja tri mjesca kako ste ih uzimali:

a) po potrebi



b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 76.1.4 po potrebi:

76.1.5 Koliko ste uzimali upuha mjesečno \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.1.4 u kratkim intervalima:

76.1.6 broj intervala \_\_\_\_\_

76.1.7 broj upuha dnevno

\_\_\_\_\_

76.1.8 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.1.4 kontinuirano

76.1.9 broj upuha dnevno

\_\_\_\_\_

76.2 dugodjelujući beta 2 agonisti-inhaler (npr. Serevent, Foradil, Axis)?

76.2.1 Ako da, koji? \_\_\_\_\_

76.2.2 Koji tip inhalera uzimate (MDI, DPI, turbuhaler)? \_\_\_\_\_

76.2.3 Koja je doza po upuhu (u mikrogramima) \_\_\_\_\_

17

76.2.4 U posljednja tri mjesca kako ste ih uzimali:

a) Po potrebi

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 76.2.4 po potrebi:

76.2.5 Koliko ste uzimali upuha mjesečno? \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.2.4 u kratkim intervalima:

76.2.6 broj intervala \_\_\_\_\_

76.2.7 broj upuha dnevno \_\_\_\_\_

76.2.8 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.2.4 kontinuirano

76.2.9 broj upuha dnevno  
\_\_\_\_\_

76.3 nespecifični agonisti adrenergičnih receptora – inhaleri (npr. Alupent)?

76.3.1. ako da, koji? \_\_\_\_\_

76.4 antimuskarinski inhaleri (npr. Atrovent)

76.4.1 ako da, koji? \_\_\_\_\_

76.4.2 koji tip inhalera koristite (npr. MDI, DPI,...)? \_\_\_\_\_

76.4.3 koja je doza jednog upuha (u mikrogramima)? \_\_\_\_\_

76.4.4 U posljednja tri mjeseca kako ste ih uzimali:

a) Po potrebi

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 76.4.4 po potrebi:

76.4.5 Koliko ste uzimali upuha mjesečno? \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.4.4 u kratkim intervalima:

76.4.6 broj intervala \_\_\_\_\_

76.4.7 broj upuha dnevno

\_\_\_\_\_

76.4.8 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.4.4 kontinuirano

76.4.9 broj upuha dnevno

\_\_\_\_\_

76.5 inhalirajuće kortikosteroide (npr. Becotide, Flixotide, Tafen)?

76.5.1 ako da, koji? \_\_\_\_\_

76.5.2 koji tip inhalera koristite (npr. MDI, DPI, turbuhaler,...)? \_\_\_\_\_

76.5.3 koja je doza jednog upuha (u mikrogramima)? \_\_\_\_\_

76.5.4 U posljednja tri mjesca kako ste ih uzimali:

a) po potrebi

18

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 76.5.4 po potrebi:

76.5.5 Koliko ste uzimali upuha mjesečno \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.5.4 u kratkim intervalima:

76.5.6 broj intervala \_\_\_\_\_

76.5.7 broj upuha dnevno \_\_\_\_\_

76.5.8 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.5.4 kontinuirano

76.5.9 broj upuha dnevno

---

76.6 inhalirajući kromoglikan (npr. Intal, Tilade)?

76.6.1 ako da, koji? \_\_\_\_\_

76.6.2 koja je doza jednog upuha (u mikrogramima)? \_\_\_\_\_

76.6.3 U posljednja tri mjesca kako ste ih uzimali:

a) po potrebi

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 76.6.3 po potrebi:

76.6.4 Koliko ste uzimali upuha mjesečno \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.6.3 u kratkim intervalima:

76.6.5 broj intervala \_\_\_\_\_

76.6.6 broj upuha dnevno \_\_\_\_\_

76.6.7 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 76.6.3 kontinuirano

76.6.8 broj upuha dnevno \_\_\_\_\_

76.7 inhalacijske kombinirane pripravke (npr. Seretide, Symbicort)?

76.7.1 ako da, koji? \_\_\_\_\_

76.7.2 koju vrstu inhalera koristite (npr. MDI, DPI, Turbuhaler)? \_\_\_\_\_

76.7.3 koja je doza jednog upuha (u mikrogramima)?

---

77. Jeste li u posljednjih 12 mjeseci koristili ikakve tablete, kapsule ili druge oblike lijekova, isključujući inhalirajuće oblike, kako bi poboljšali disanje?

Ako ne, prijedite na pitanje 78, ako da:

Koji ste od sljedećih pripravaka koristili u posljednjih 12 mjeseci?

77.1 oralne beta 2 agoniste (npr. Lontermin, Ventolin tablete)?

77.1.2 koju dozu tablete \_\_\_\_\_

77.1.3 kako ste ih koristili u posljednja 3 mjeseca:

a) po potrebi

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 77.1.3 po potrebi:

77.1.4 Koliko ste uzimali tableta mjesečno \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.1.3 u kratkim intervalima:

77.1.5 broj intervala \_\_\_\_\_

77.1.6 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

77.1.7 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.1.3 kontinuirano

77.1.8 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

77.2 oralni metilksantini (npr. Aminofilin, Teolin, Teotard)?

77.2.1 ako da, koji? \_\_\_\_\_

77.2.2 koju dozu tablete? \_\_\_\_\_

77.2.3 kako ste ih koristili u posljednja 3 mjeseca:

a) po potrebi

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 77.2.3 po potrebi:

77.2.4 Koliko ste uzimali tableta mjesečno \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.2.3 u kratkim intervalima:

77.2.5 broj intervala \_\_\_\_\_

77.2.6 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

77.2.7 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.2.3 kontinuirano

77.2.8 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

20

77.3 oralni steroidi (npr. Medrol, Decortin)?

77.3.1 ako da, koji? \_\_\_\_\_

77.3.2 koju dozu tablete \_\_\_\_\_

77.3.3 kako ste ih koristili u posljednjih 12 mjeseci: \_\_\_\_\_

a) po potrebi

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

Ako je odgovor na 77.3.3 po potrebi:

77.3.4 Koliko ste uzimali tableta mjesečno \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.3.3 u kratkim intervalima:

77.3.5 broj intervala \_\_\_\_\_

77.3.6 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

77.3.7 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.3.3 kontinuirano

77.3.8 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

77.3.9 Jeste li ih koristili u posljednja 3 mjeseca? \_\_\_\_\_

77.4 oralni antileukotrijeni (npr. Singulair)?

77.4.1 ako da, koji? \_\_\_\_\_

77.4.2 koju dozu tablete? \_\_\_\_\_

77.4.3 kako ste ih koristili u posljednja 3 mjeseca:

a) po potrebi

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 77.4.3 po potrebi:

77.4.4 Koliko ste uzimali tableta mjesečno

Ako je odgovor na 77.4.3 u kratkim intervalima:

77.4.5 broj intervala \_\_\_\_\_

77.4.6 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

77.4.7 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.4.3 kontinuirano

77.4.8 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

77.5 ketotifen (npr. Dihalar)?

77.5.1 ako da, koji? \_\_\_\_\_

77.5.2 koju dozu tablete \_\_\_\_\_

77.5.3 kako ste ih koristili u posljednja 3 mjeseca:

a) po potrebi

21

b) u kratkim intervalima

c) kontinuirano

d) uopće ne

Ako je odgovor na 77.5.3 po potrebi:

77.5.4 Koliko ste uzimali tableta mjesečno? \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.5.3 u kratkim intervalima:

77.5.5 broj intervala \_\_\_\_\_

77.5.6 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

77.5.7 prosječan broj dana u mjesecu \_\_\_\_\_

Ako je odgovor na 77.5.3 kontinuirano

77.5.8 broj tableta dnevno \_\_\_\_\_

78. Jeste li od zadnjeg pregleda uzimali inhalirajuće steroide?

Ako ne, prijeđite na pitanje 79, ako da:

78.1 S koliko godina ste prvi puta uzimali inhalirajuće steroide? \_\_\_\_\_

78.2 Jeste li uzimali svake godine inhalirajuće steroide nakon posljednjeg pregleda? \_\_\_\_\_

Ako ne pređite na pitanje 78.3, ako da:

78.2.1 koliko mjeseci godišnje, u prosjeku, uzimate inhalirajuće kortikosteroide

78.3 koliko ste godina ukupno od posljednjeg pregleda uzimali inhalirajuće

kortikosteroide? \_\_\_\_\_

78.4 koliko mjeseci, prosječno godišnje, ste ih uzimali? \_\_\_\_\_

79. Jeste li provodili hiposenzibilizaciju (specifičnu imunoterapiju-SIT ili alergijsku



vakcinaciju) nakon posljednjeg pregleda? \_\_\_\_\_

Ako ne ili ne znate pređite na pitanje 80, ako da:

79.1 Jeste li provodili hiposenzibilizaciju (specifičnu imunoterapiju-SIT ili alergijsku vakcinaciju) zadnjih 12 mjeseci? \_\_\_\_\_

80. Jeste li u zadnjih 12 mjeseci dobivali ikakve injekcije za lakše disanje?

Ako ne pređi na pitanje 81, ako da:

80.1 Koje injekcije? \_\_\_\_\_

81. Jeste li u zadnjih 12 mjeseci uzimali bilo kakve čepiće za lakše disanje?

Ako ne pređi na pitanje 82, ako da:

81.1 Koje? \_\_\_\_\_

82.2 Jeste li u zadnjih 12 mjeseci uzimali ikakve lijekove za lakše disanje?

Ako ne pređi na pitanje 83, ako da:

82.1 Koje? \_\_\_\_\_

22

83. Da li vam je liječnik ikada propisao lijekove, uključujući inhalere, za disanje?

Ako ne pređite na pitanje 84, ako da:

83.1 Od propisanih lijekova redovito ste uzimali:

- a) sve
- b) većinu
- c) samo neke
- d) niti jedan

83.2 Kada vam se pogorša disanje od propisanih lijekova uzimali ste?

- a) sve
- b) većinu

c) samo neke

d) niti jedan

83.3 Mislite li da je štetno trajno uzimanje lijekova za lakše disanje?

\_\_\_\_\_

83.4 Mislite li da je potrebno uzimati sve propisane lijekove kako bi se riješili tegoba sa disanjem?

\_\_\_\_\_

84. Jeste li od posljednjeg pregleda morali tražiti hitnu intervenciju zbog tegoba sa disanjem? \_\_\_\_\_

Ako ne pređite na pitanje 85, ako da:

84.1 Jeste li tražili pomoć u zadnjih 12 mjeseci? \_\_\_\_\_

Ako ne pređite na pitanje 85, ako da:

84.1.1 da li je to bilo zbog astme, kratkoće daha ili sviranja u prsima?

\_\_\_\_\_

84.1.2 Koliko puta u posljednjih 12 mjeseci ste tražili pomoć? \_\_\_\_\_

85. Jeste li od posljednjeg pregleda morali provesti noć u bolnici zbog problema sa disanjem? \_\_\_\_\_

Ako ne pređite na pitanje 86, ako da:

85.1 Da li se to dogodilo u posljednjih 12 mjeseci? \_\_\_\_\_

Ako ne pređite na pitanje 86, ako da:

85.1.1 Da li je to bilo zbog astme, kratkoće daha ili sviranja u prsima? \_\_\_\_\_

85.1.2 Koliko ste noći proveli na svakom od sljedećih odjela u posljednjih mjeseci:

- Opća medicina \_\_\_\_\_

- Pulmologija \_\_\_\_\_

- Rehabilitacija \_\_\_\_\_

- Intenzivna jedinica \_\_\_\_\_

- Drugo \_\_\_\_\_

23

86. Da li ste od prošlog pregleda trebali liječničku pomoć zbog tegoba sa disanjem?

Ako ne, prijeđite na pitanje 87, ako da:

86.1 Da li je to bilo unutar zadnjih 12 mjeseci? \_\_\_\_\_

Ako ne, prijeđite na pitanje 87, ako da:

86.2. Da li je to bilo zbog astme, kratkoće daha ili sviranja u prsima? \_\_\_\_\_

86.3 Koliko puta u prošlih 12 mjeseci ste tražili pomoć u liječnika opće medicine

- Kod kuće \_\_\_\_\_

- u ordinaciji \_\_\_\_\_

- kod kuće kao hitna intervencija \_\_\_\_\_

- negdje drugdje \_\_\_\_\_

86.4. Jeste li u zadnjih 12 mjeseci bili kod specijaliste ( pulmolog, alergolog,

internist) zbog problema sa disanjem? \_\_\_\_\_

Ako ne, prijeđite na pitanje 87, ako da:

86.4.1 Koliko puta? \_\_\_\_\_

87. Da li ste zbog teškoća sa disanjem dobivali redovite termine kontrola? \_\_\_\_\_

Ako ne, prijeđite na pitanje 88, ako da:

87.1 od specijaliste

87.2 od liječnika opće medicine

87.3 od medicinske sestre

88. Koliko ste puta u posljednjih 12 mjeseci posjetili nekog od sljedećih zbog tegoba sa disanjem?

88.1 medicinsku sestru \_\_\_\_\_

88.2 fizioterapeuta \_\_\_\_\_

88.3 djelatnika alternativne medicine \_\_\_\_\_

89. Jeste li u posljednjih 12 mjeseci obavljali laboratorijske pretrage ili kliničke testove zbog tegoba sa disanjem?

Ako ne, prijeđite na pitanje 90, ako da:

89.1 koliko puta ste u posljednjih 12 mjeseci imali sljedeće pretrage:

- testove disanja u laboratoriju za funkciju pluća \_\_\_\_\_

- alergološki kožnitest \_\_\_\_\_

- testove krvi na alergiju \_\_\_\_\_

- rtg pregled \_\_\_\_\_

24

90. Da li sada radite?

Ako ne, prijeđite na pitanje 90.2, ako da:

90.1 koliko ste dana u posljednjih 12 mjeseci bili odsutni s posla zbog problema s disanjem? \_\_\_\_\_

90.2 da li ste bili prisiljeni odustati od posla u posljednjih 12 mjeseci? \_\_\_\_\_

Ako ne pređite na pitanje 91, ako da:

91.2.1 Kada (datum i godina) \_\_\_\_\_

91. Da li je u posljednjih 12 mjeseci bilo dana kada ste u svojim aktivnostima (čuvanje djece, pospremanje stana, studiranje) bili ograničeni zbog tegoba sa disanjem?

Ako ne završili ste s upitnikom, ako da:

91.1 Koliko dana mjesečno u prosjeku? \_\_\_\_\_

Spol ispitanika M Ž

Datum rođenja ispitanika

---

Upitnik je ispunjen:

- a) u centru lice u lice
- b) kod kuće lice u lice
- c) telefonom
- d) kod kuće samostalno

KRAJ

## **ECRSII UPITNIK VARIJANTA ZA ZDRAVE KONTROLE**

KLINIKA ZA PLUĆNE BOLESTI "JORDANOVAC"

ZAGREB – Jordanovac 104 Telefon: 01/238 5100 Telefax: 01/234 8345

THE EUROPEAN COMMUNITY RESPIRATORY HEALTH STUDY II

### **ECRSII ASTMA UPITNIK**

prijevod iz: The European Community Respiratory Health Survey II

(Studija europske zajednice o plućnom zdravlju II)

Željeli bismo Vam postaviti nekoliko pitanja, vezanih

uz vaše disanje. Gdje god je moguće pokušajte

odgovoriti sa «da» ili «ne».

Kod odgovora na pitanja izaberite odgovarajuću kućicu; ukoliko niste sigurni da znate točan odgovor, izaberite «ne».

1. Da li Vam se javilo sviranje ili zviždanje u prsima u posljednjih 12 mjeseci?

Ukoliko je odgovor «ne» idite na pitanje br. 2, ukoliko je odgovor «da»:

1.1 Da li ste imali osjećaj nedostatka zraka kada je bilo prisutno sviranje u prsima? DA NE

1.2 Da li ste imali sviranje ili zviždanje u prsima, a da niste bili prehladeni?

DA NE

2. Da li ste se probudili s osjećajem da Vam je prsni koš preuzak (ili da imate težinu u prsima) u posljednjih 12 mjeseci? DA NE

3. Da li Vas je probudio napad otežanog disanja u posljednjih 12 mjeseci?

DA NE

4. Da li Vas je probudio napad suhog kašlja u posljednjih 12 mjeseci?

DA NE

5. Da li ste imali napad astme u zadnjih 12 mjeseci?

DA NE

6. Da li trenutno uzimate lijek za astmu (uključujući inhalatore, aerosole ili tablete) DA NE

7. Da li imate alergijski rinitis? DA NE

8. Koji je datum Vašeg rođenja? \_\_\_\_\_

9. Koji je danas datum? \_\_\_\_\_

10. Da li ste muškog ili ženskog spola? M Ž

## **ACQ UPITNIK**

Upitnik o kontroli astme (ACQ - Asthma Control Questionnaire) - kratka verzija

Zaokružite broj koji najbolje opisuje stanje Vaše astme tijekom proteklih tjedan dana.

1. Koliko često vas je astma probudila noću (prosječno dnevno tijekom proteklog tjedna)?

0 uopće me nije probudila

1 jednom

2 pokoji put

3 nekoliko puta

4 mnogo puta

5 vrlo mnogo puta

6 zbog astme sam bio/bila budan/budna cijelu noć

2. Koliko su vam bili teški simptomi astme kad ste se ujutro probudili (prosječno dnevno tijekom proteklog tjedna)?

0 bez simptoma

1 vrlo blagi simptomi

2 blagi simptomi

3 umjereni simptomi

4 prilično teški simptomi

5 teški simptomi

6 vrlo teški simptomi

3. Koliko ste tijekom dana bili ograničeni u svojim aktivnostima zbog astme (prosječno dnevno

tijekom proteklog tjedna)?

0 nisam uopće bio/bila ograničen/a

1 vrlo malo ograničen/a

2 malo ograničen/a

3 umjereno ograničen/a

4 vrlo ograničen/a

5 izuzetno ograničen/a

6 potpuno ograničen/a

4. Koliko ste tijekom dana osjećali nedostatak zraka (prosječno dnevno tijekom proteklog tjedna)?

0 uopće ne

1 vrlo malo

2 malo

3 umjereno

4 podosta

5 mnogo

6 vrlo mnogo

5. Koliko Vam je vremena tijekom dana bilo prisutno sviranje u prsima (prosječno dnevno tijekom proteklog tjedna)?

0 uopće nije bilo prisutno

1 gotovo nije bilo prisutno

2 malo vremena

3 umjerena količina vremena

4 mnogo vremena

5 većinu vremena

6 cijelo vrijeme

6. Koliko udaha kratkodjelujućeg bronhodilatatora (salbutamol odnosno Ventolin sprej) ste



koristili (prosječno dnevno tijekom proteklog tjedna)?

0 niti jedan udah Ventolina

1 1-2 udaha Ventolina

2 3-4 udaha Ventolina

3 5-8 udaha Ventolina

4 9-12 udaha Ventolina

5 13-16 udaha Ventolina

6 više od 16 udaha Ventolina

## **ACT UPITNIK**

1. U protekla 4 tjedna, koliko često Vas je astma ometala na poslu, na nastavi ili kod kuće?

Stalno (1 bod) Vrlo često (2 boda) Ponekad (3 boda) Ponekad (4 boda) Nikada (5 bodova)

2. U protekla 4 tjedna, koliko često ste se osjećali da nemate zraka?

Više od jednom dnevno (1 bod) Jednom dnevno (2 boda) 3 do 6 puta tjedno (3 boda)

Jednom ili dvaput tjedno (4 boda) Nikada (5 bodova)

3. U protekla 4 tjedna, koliko često ste se zbog simptoma astme (hripanje, kašljanje, osjećaj da nemate zraka, stezanje ili bol u prsima) budili noću ili ujutro ranije nego obično?

4 ili više noći tjedno (1 bod) 2-3 noći tjedno (2 boda) Jednom tjedno (3 boda)

Jednom ili dvaput (4 boda) Nikada (5 bodova)

4. U protekla 4 tjedna, koliko često ste kao lijek koristili inhalator brzog djelovanja (npr. salbutamol)?

3 ili više puta dnevno (1 bod) 1 ili 2 puta dnevno (2 boda) 2 ili 3 puta tjedno (3 boda)  
Jednom tjedno ili rjeđe (4 boda) Nikada (5 bodova)

5. Kako biste ocijenili kontrolu nad svojom astmom u protekla 4 tjedna?

Izvan kontrole (1 bod) Pod slabom kontrolom (2 boda) Donekle pod kontrolom (3 boda)  
Pod dobrom kontrolom (4 boda) Potpuno pod kontrolom (5 bodova)