

# Utjecaj genotipova krvnih grupa ABO i inhibitora aktivatora plazminogena na ventilacijsku funkciju u astmi

---

Lampalo, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:675392>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Marina Lampalo

**UTJECAJ GENOTIPOVA KRVNIH GRUPA  
ABO I INHIBITORA AKTIVATORA  
PLAZMINOGENA NA VENTILACIJSKU  
FUNKCIJU U ASTMI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



UNIVERSITY OF ZAGREB

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Marina Lampalo

**THE EFFECT OF ABO BLOOD  
GENOTYPES AND TISSUE PLASMINOGEN  
ACTIVATOR INHIBITOR ON LUNG  
VENTILATION IN ASTHMA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017

Ovaj doktorski rad izrađen je na Klinici za plućne bolesti Jordanovac, KBC Zagreb, Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Odjelu za molekularnu dijagnostiku i Institutu Ruđer Bošković, Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju, pod vodstvom doc. dr. sc. Irene Jukić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Zahvala**

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici **doc. dr. sc. Ireni Jukić** iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, koja mi je svojim primjerom pokazala što znači biti veliki znanstvenik i čovjek, koja me stručno i mudro vodila tijekom izrade ovog rada.*

*Djelatnicima Poliklinike na Klinici za plućne bolesti Jordanovac, na uloženom trudu prilikom prikupljanja uzoraka krvi, djelatnicima Odjela za molekularnu dijagnostiku, Zavoda za transfuziju, za pomoć pri izvođenju testiranja.*

*Članovima Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada, prof. dr. sc. Nadi Oršolić, prof. dr. sc. Sanji Popović Grle i dr. sc. Jasni Bingulac- Popović veliko hvala na uloženom trudu i savjetima kako bi ovaj doktorski rad dobio svoj završni oblik.*

*Mojem Draganu, hvala na ljubavi i strpljenju tijekom svih ovih godina.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem ocu, majci i bratu Luki, na bezuvjetnoj ljubavi, ponosu i uvijek neupitno pruženoj potpori, bez kojih sve ovo što sam postigla ne bi bilo moguće.*

*I na kraju, veliko hvala onoj koja svemu daje smisao, onoj koja je moja java i moj san-Mare; moj anđeo-čija ljubav i zagrljaj mi daje neizmjernu snagu, bez koje sve ovo ništa ne bi vrijedilo....*

*Marina*

***Mari....***

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Doktorski rad

## UTJECAJ GENOTIPOVA KRVNIH GRUPA ABO I INHIBITORA AKTIVATORA PLAZMINOGENA NA VENTILACIJSKU FUNKCIJU U ASTMI

MARINA LAMPALO

Prirodoslovno - matematički fakultet  
Sveučilišta u Zagrebu

### SAŽETAK

Inhibitor plazminogen aktivatora-1(PAI-1) je glikoprotein koji regulira fibrinolitički sustav. U plazmi osoba nositelja genotipa 4G/4G nalazi se 25% viša koncentracija PAI-1 u odnosu na osobe s genotipom 5G/5G. U provedenoj studiji utvrdili smo povezanost između PAI-1 -675 4G/5G polimorfizma i razvoja alergijskog rinitisa kod asmaticara u hrvatskoj populaciji. U studiji je sudjelovalo 149 pacijenata s dijagnozom astme i 153 zdrava subjekta kao kontrolne skupine. Utvrdili smo značajno višu učestalost 4G/4G genotipa kod asmaticara s alergijskim rinitisom u usporedbi s onim pacijentima bez alergijskog rinitisa. Pokazalo se kako je prisutnost 4G/4G genotipa rizični faktor za alergijski rinitis kod pacijenata s astmom. Ovo pokazuje da je prisutnost barem jednog 4G alela važni rizični faktor za alergijski rinitis kod asmaticara. Usporedba frekvencija ABO genotipova između skupine pacijenata i kontrole nije pokazala statistički značajnu povezanost određenih ABO genotipova s razvojem astme.

(110 stranica, 14 slika, 23 tablice, 173 literaturnih navoda, jezik izvornika Hrvatski)

**Ključne riječi:** Inhibitor plazminogen aktivator-1(PAI-1), astma, alergijski rinitis, ABO genotip, plućna funkcija

**Mentor:** Doc. dr. sc. Irena Jukić, Hrvatski zavod za transfuzisku medicinu, Medicinski fakultet, Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

**Ocjenjivači:** Prof. dr. sc. Nada Oršolić, PMF;  
Prof. dr. sc. Sanja Popović-Grle, Medicinski fakultet;  
Viši znanstveni suradnik, Dr. sc. Jasna Bingulac Popović, Hrvatski zavod za transfuzisku medicinu.

Rad prihvaćen: 5. svibnja 2015.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral thesis

**THE EFFECT OF ABO BLOOD GENOTYPES AND TISSUE PLASMINOGEN  
ACTIVATOR INHIBITOR ON LUNG VENTILATION IN ASTHMA**

MARINA LAMPALO

Faculty of Science  
University of Zagreb

**ABSTRACT**

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is a glycoprotein which regulates fibrinolytic system. In plasma of 4G/4G genotype carriers there is 25% higher level of PAI-1, when compared to 5G/5G genotype carriers. In conducted study we confirmed connection between PAI-1-675 4G/5G polymorphism and development of allergic rhinitis in patients with asthma in Croatian population. Study included 149 adult patients with diagnosis of asthma and 153 healthy individuals of the control group. We confirmed significantly higher frequency of 4G/4G genotype in patients with asthma and allergic rhinitis when compared to the patients with asthma, but without allergic rhinitis. Presence of 4G/4G genotype showed to be a risk factor for allergic rhinitis in patients with asthma. This shows that presence of at least one 4G allele is an important risk factor for allergic rhinitis in patients with asthma. Comparison of frequencies of ABO genotypes between the group of patients with asthma and allergic rhinitis and the control group showed no statistically significant connection between certain ABO genotypes and development of asthma. Furthermore, statistical analysis of connection between ABO genotypes and asthma in patients with asthma and allergic rhinitis in comparison with that connection in control group showed that there is no statistically significant connection between carriers of certain ABO genotype carriers and development of asthma.

(110 pages, 14 figures, 23 tables, 173 references, original in Croatian)

**Keywords: Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), asthma allergic rhinitis, ABO genotypes, pulmonary function**

**Supervisor:** Doc Irena Jukić, MD, PhD, CITM, MF JJS University of Osijek

**Reviewers:** Prof. Nada Oršolić, PhD PMF;

Prof. Sanja Popović-Grle, MD, PhD, MF University of Zagreb;

Assistant professor Jasna Bingulac Popović, PhD, CITM.

Thesis accepted: May, 5<sup>th</sup>, 2015.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. ABO sustav krvnih grupa</b> .....	2
1.1.1. Eritrocitne krvne grupe.....	3
1.1.2. Nasljeđivanje ABO sustava krvnih grupa.....	7
1.1.3. ABO sustav krvnih grupa i bolesti.....	8
<b>1.2. Inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1)</b> .....	11
1.2.1. Polimorfizam 4G/5G gena za PAI-1.....	13
1.2.2. Utjecaj 4G/5G polimorfizma PAI-gena na astmu.....	14
<b>1.3. Serotonin</b> .....	15
1.3.1. Sinteza i razgradnja serotonina.....	15
1.3.2. Serotonin u ljudskom organizmu.....	16
1.3.3. Klinički značaj trombocitnog serotonina.....	16
1.3.4. Patogenetska uloga serotonina (5-hidroksitriptamin, 5HT) kod astme.....	17
<b>1.4. Astma</b> .....	18
1.4.1. Pojavnost i epidemiologija astme.....	18
1.4.2. Definicija astme.....	19
1.4.3. Etiologija astme .....	19
1.4.3.1. Genetska predispozicija.....	20
1.4.3.2. Spol.....	20
1.4.3.3. Bronhalna hiperreaktivnost.....	21
1.4.3.4. Atopija.....	21
1.4.3.5. Alergeni.....	21
1.4.3.6. Infekcije dišnih puteva.....	22
1.4.3.7. Izloženost duhanskom dimu.....	22
1.4.3.8. Pretilost.....	22
1.4.3.9. Perinatalni čimbenici.....	22
1.4.3.10. Onečišćenje zraka.....	23
1.4.4. Patofiziologija astme.....	23
1.4.4.1. Upalna reakcija dišnih putova.....	23

---

1.4.4.1.1. Rana faza IgE posredovane reakcije.....	24
1.4.4.1.2. Kasna faza IgE posredovane reakcije.....	24
1.4.4.2. Strukturno-funkcionalne promjene.....	25
1.4.4.3. Remodeliranje bronha.....	25
1.4.4.4. Opstrukcija bronha.....	26
1.4.4.5. Hiperaktivnost bronha.....	26
1.4.5. Klasifikacija astme.....	27
1.4.6. Fenotipovi i endotipovi astme.....	28
<b>2.OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>29</b>
<b>3.MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>33</b>
3.1.1. Ispitanici.....	33
3.1.2. Uređaji i kemikalije.....	34
3.1.2.1. Laboratorijski uređaji.....	34
3.1.2.2. Kemikalije i pomoćna sredstva.....	36
3.1.2.3. Otopine.....	36
<b>3.2. Metode.....</b>	<b>37</b>
3.2.1. Izolacija genomske DNA na uređaju QIAcube.....	37
3.2.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	37
3.2.3. ABO genotipizacija pomoću PCR-SSP metode (alel specifični PCR)...38	
3.2.4. Real-time PCR metoda (PCR u „realnom“ vremenu).....	43
3.2.5. Alelna diskriminacija za određivanje genotipa.....	44
3.2.5.1. Alelna diskriminacija za ispitivanje 4G/5G polimorfizma.....	44
3.2.5.2. Program real-time umnožavanja PAI-1 4G/5G.....	44
3.2.5.3. Alelna diskriminacija na temelju dobivene fluorescencije.....	45
<b>3.3. Određivanje razine serotonina.....</b>	<b>45</b>

<b>3.4. Testovi plućne funkcije.....</b>	<b>45</b>
3.4.1. Spirometrija.....	45
3.4.2. Mjerenje respiratornih plinova.....	47
3.4.3. Mjerenje ukupnog imunoglobulina E (uIgE).....	48
<b>3.5. Statističke metode.....</b>	<b>49</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1. Rezultati usporedbe skupina bolesnika i kontrolne skupine.....</b>	<b>51</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>75</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>87</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>90</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>107</b>

# **1. Uvod**

## 1.1. ABO sustav krvnih grupa

Napredak tehnologije značajno je pomogao u razumijevanju procesa i spoznaja u brojnim granama ljudske djelatnosti, pa tako i u medicini. Svi medicinski postupci, i dijagnostički i terapijski neizmjereno su napredovali, a poglavito one grane čija je osnova razumijevanje molekularne razine funkcioniranja ljudskog organizma. Tako je razumljiv i sve veći interes za istraživanje određenih krvnih značajki te sličnosti i razlika unutar populacije. Uzorci periferne krvi su relativno lako dostupni, a rezultati istraživanja mogu značajno pomoći u svakodnevnom medicinskom radu. O krvnim grupama i njihovom značenju sve se više istražuje i piše od kraja prošlog i početka ovog stoljeća. Postojanjem krvnih grupa i poveznicama s pojedinim područjima našeg zdravlja, navikama i životom uopće bave se liječnici, biokemičari, biolozi, nutricionisti, psiholozi i sociolozi. Većina istraživanja bazirana je na fenotipskim podjelama krvnih grupa i to uglavnom ABO sustava kao klinički najznačajnijeg jer predstavlja imunološku barijeru protiv transfuzije inkompatibilne krvne grupe ili transplantacije organa.

Točno na prijelazu 19. u 20. stoljeće, 1900. godine austrijski liječnik Karl Landsteiner utemeljio je transfuzijsko liječenje otkrićem ABO sustava krvnih grupa. Tri glavne krvne grupe Landsteiner je objasnio postojanjem dva antigena A i B na eritrocitima, te protutijelima anti-A i anti-B u serumu. Najrjeđa AB krvna grupa opisana je desetak godina kasnije. Englezi Watkins i Morgan krajem sedamdesetih godina definiraju specifične ugljikohidrate i to N-acetilgalaktozamin za A i galaktozu za B krvnu grupu (Watkins 2001).

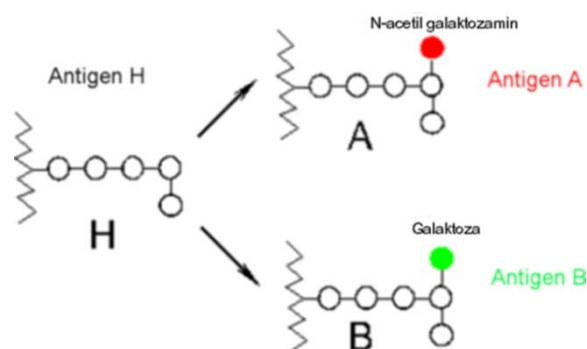
Brojni eritrocitni antigeni svrstani su u tridesetak sustava krvnih grupa. ABO geni su klonirani, što je omogućilo naprednije strukturne i funkcionalne analize ABO sustava i istovremeno uključivanje istraživača iz različitih znanstvenih grana (Yamamoto 1995). Tako se mnogobrojnim istraživanjima polimorfizma ABO gena bavi molekularna biologija. Glikobiologija, čiji se rezultati uspješno primjenjuju u transfuzijskoj medicini, forenzici, transplantacijskoj medicini, staničnoj i razvojnoj biologiji bavi se oligosaharidnim A i B antigenima. Imunologija proučava stvaranje, pojavnost, učinkovitost i uloge anti-A i anti-B protutijela, produkata A i B antigena, kao i mogući gubitak antigene ekspresije koji se povezuje uz pojavu nekih tumora (Mohandas i sur. 2005).

### 1.1.1. Eritrocitne krvne grupe

Preko 300 antigena otkrivenih na membrani eritrocita svrstano je u tridesetak sustava krvnih grupa sukladno poziciji gena koji ih determiniraju. Klinički najvažniji ABO sustav tako ima na jednom genskom mjestu (lokusu) gen za antigen A, B ili O. Prema kemijskom sastavu eritrocitni antigeni su proteini ili ugljikohidrati vezani za glikoproteine i glikolipide stanične membrane. Antigeni ABO, Lewis i P sustava krvnih grupa su ugljikohidrati i u njihovom nastajanju geni kontroliraju sintezu enzima glikoziltransferaze koja katalizira sintezu antigena. Proteinski antigeni su antigeni Rh, Kell, Kidd i Duffy sustava i njihova sinteza određena je izravno odgovarajućim genima (Daniels 2005).

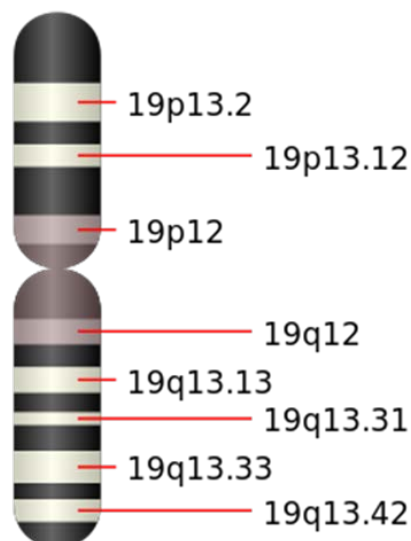
Prema Mendelovim zakonima se nasljeđuju geni koji reguliraju sintezu eritrocitnih antigena i većinom su kodominantni pa se na eritrocitima iskazuju antigeni naslijeđeni od oba roditelja, recesivni geni se fenotipski ne iskazuju u prisutnosti dominantnih. Kada postoji „normalni“ A gen, slabije inačice A-antigena (npr. A<sub>2</sub>) se ne iskazuju. Nasljeđivanjem amorfnih gena ne iskazuje se sinteza antigena ni u homozigotnoj formi, kao kod krvne grupe O u kojoj su oba gena na ABO lokusu promijenjena tako da nema sinteze aktivne glikoziltransferaze. Osobe koje nasljeđuju amorfne gene su tzv. null fenotipovi i oni su bez ijednog antigena određenog sustava krvnih grupa. U slučaju odsutnosti antigena na eritrocitnoj membrani mogu se uočiti i morfološke promjene eritrocita, pa čak i klinički znakovi blage anemije. Eritrocitne antigene uz strukturne gene kontroliraju i regulatorni geni (Kominato i sur. 2005).

Esencijalni prekursor antigena ABO sustava krvnih grupa je H antigen (Slika 1).



**Slika 1.** Shematski prikaz odnosa H, te A i B antigena (Preuzeto iz: [en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org))

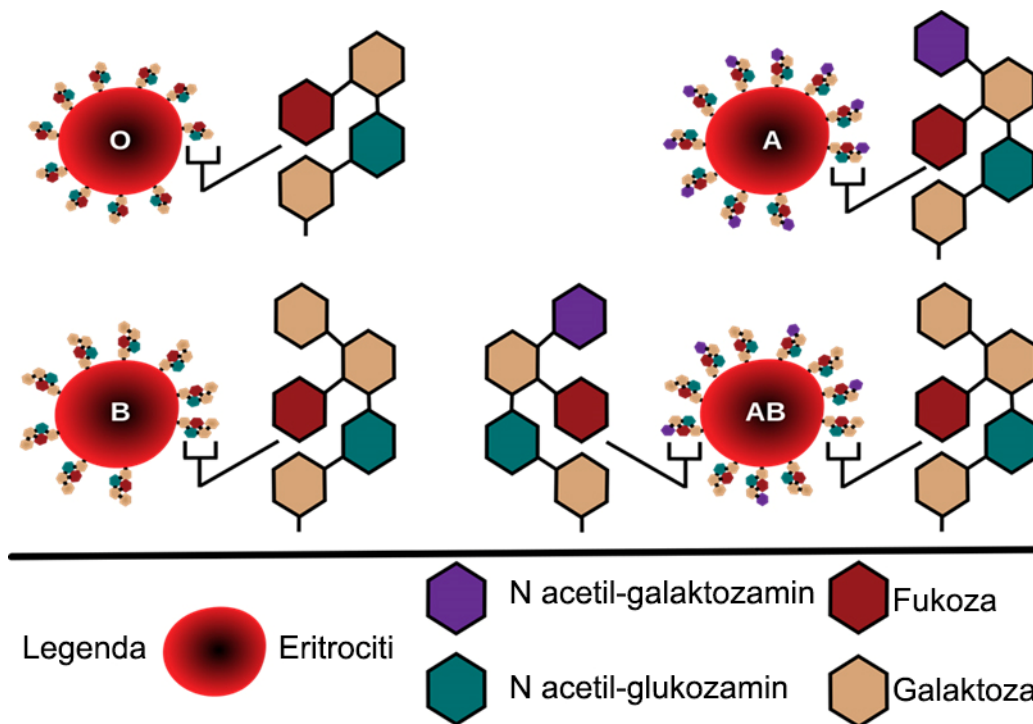
H lokus (FUT1) smješten je na 19 kromosomu (19p13.12, Slika 2) i sadrži 3 eksona koji obuhvaćaju 5 kb genomske DNA i kodira fukoziltransferazu (Slika 2) koja katalizira sintezu H antigena na eritrocitima.



*Slika 2. Shema 19. kromosoma (Preuzeto iz: ghr.nlm.nih.gov)*

ABO geni kontroliraju enzime transferaze koje dodaju šećere na H-antigen, bazičnu supstanciju s fukozom. Geni za A i B antigene su kodominantni, što znači da svaki gen određuje antigen neovisno o genu koji se nalazi na drugom alelu. Gen O je „recesivan“ jer je funkcionalno neaktivan. U njemu najčešće postoji delecija jednog nukleotida što uzrokuje prijevremenu šifru za završetak čitanja prepisivanja u transkripciji (tzv. stop kodon). Zbog toga nastaje neaktivna transferaza. Na kromosomu 9 je smješten humani ABO gen (9q34.1-q34.2) koji sadrži 7 eksona i 6 introna, a koji obuhvaćaju 18 kb genomske DNA. ABO tip krvne grupe je pod nadzorom jednog gena s tri alela:  $i$ ,  $I^A$  i  $I^B$ . Zadnja dva eksona (6 i 7) kodiraju domenu ABO glikoziltransferaze. Ovaj enzim modificira sadržaj ugljikohidratog antigena na eritrocitima i tako određuje tip (Slika 3). A i B aleli se razlikuju po 7 nukleotidnih zamjena, 4 od njih dovode do supstitucija različitih aminokiselina u proteinima (R176G, G235S, L266M, G268A). Ostaci na pozicijama 266 i 268 određuju A ili B specifičnost glikoziltransferaze koju kodiraju. A alel kodira glikoziltransferazu koja dodaje  $\alpha$ -N-acetilgalaktozamin na D-galaktozu na kraju H antigena, stvarajući A antigen. B alel kodira glikoziltransferazu koja dodaje  $\alpha$ -D-galaktozu na D-galaktozu na kraju H antigena, stvarajući B antigen. U slučaju O alela, ekson 6 sadrži deleciju koja rezultira gubitkom enzimske aktivnosti. O alel se razlikuje od alela A u deleciji samo jednog nukleotida - guanina na poziciji 261. Delecija uzrokuje nedostatak enzimske aktivnosti i H antigen ostaje nepromijenjen (Anstee 2009, Seltsam i sur. 2003).





*Slika 3. Shematski prikaz antigena ABO sustava krvnih grupa (Preuzeto iz: en.wikipedia.org)*

Antigeni na eritrocitima uvjetuju specifičnost protutijela u serumu, što je shematski prikazano na Slici 4.

	A	B	AB	O
Eritrocitna krvna grupa				
Antitijela u plazmi			Nema	
Antigeni na eritrocitu	A antigen	B antigen	A i B antigeni	Nema

*Slika 4. Antigeni ABO krvnih grupa na eritrocitima i IgM protutijela u serumu*

*(Preuzeto iz: en.wikipedia.org)*

Pomoću anti-A i anti-B antiseruma moguće je serološkim metodama odrediti šest fenotipova ABO sustava krvnih grupa: A, B, A2, A2B, AB i O. U imunohematološkom laboratoriju subtipovi pokazuju razlike u jačini aglutinacije eritrocita s anti-A, anti-B i anti-AB reagensima.

Metodama molekularne biologije omogućena je ABO genotipizacija. PCR-SSP metodom koja se temelji na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje na 3' kraju DNA ishodnice, moguće je dodatno razlikovati O1, O2, A1, A2 i B alele, tj. 15 različitih ABO genotipova (Issitt i sur. 1998).

Osim osnovnih alela, subtipizacijom je definirano puno rijetkih alela. Prema podacima preuzetim iz Blood group antigen mutation database definiran je 381 ABO alel (BGMUT 2016). Kao standardni alel je izabran A1O1 alel i nomenklatura subtipova je definirana prema A1O1 alelu. Aleli se razlikuju po samo nekoliko baza u kodirajućem slijedove ili u nekodirajućoj regiji gena. Polimorfizmi su nastali kao posljedica SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) ili intragenske rekombinacije uslijed konverzije gena (engl. *crossing over*).

### 1.1.2. Nasljeđivanje ABO sustava krvnih grupa

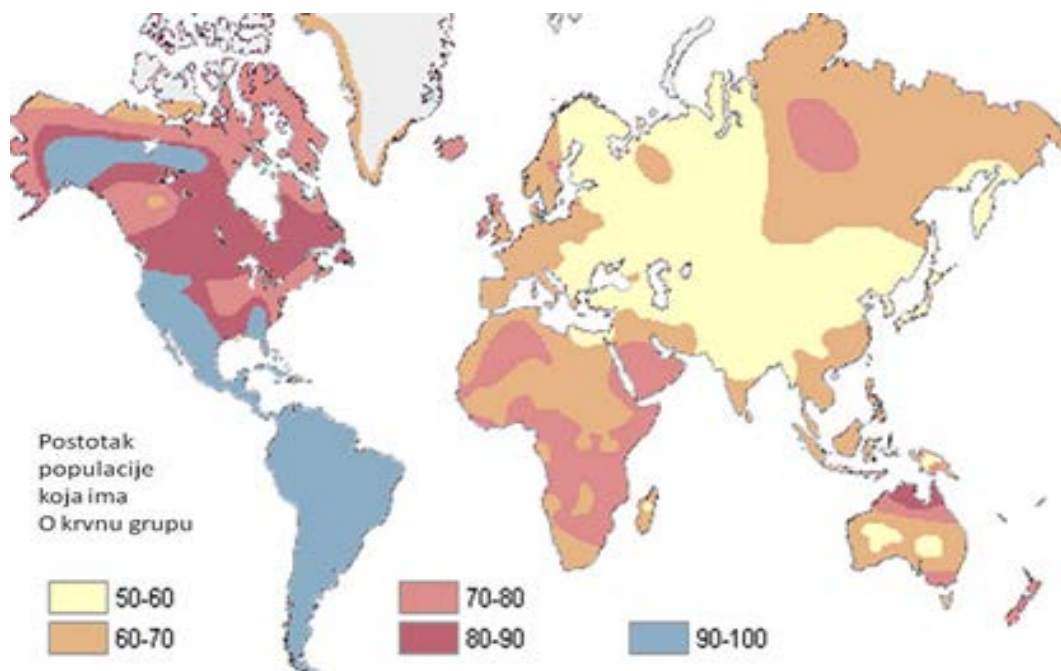
ABO sustav krvnih grupa nasljeđuje se od oba roditelja i pod kontrolom je jednog gena s 3 alela:  $i$ ,  $I^A$  i  $I^B$ . Alel  $I^A$  određuje grupu A, alel  $I^B$  određuje grupu B, a alel  $i$  rezultirati će O krvnom grupom.  $I^A$  i  $I^B$  su dominantni nad  $i$  alelom, pa će samo osobe koje naslijede  $ii$  od roditelja imati O krvnu grupu. Osobe koje imaju kombinaciju  $I^A I^A$  ili  $I^A i$  imaju krvnu grupu A. Osobe koje naslijede od roditelja  $I^B I^B$  ili  $I^B i$ , nositelji su krvne grupe B. Osobe s genotipom  $I^A I^B$  imaju oba fenotipa, jer  $i$  A i B pokazuju kodominaciju, što znači da roditelji krvne grupe A i krvne grupe B mogu imati dijete krvne grupe AB. Međutim, isti roditelji mogu imati i dijete krvne grupe O, ukoliko su oboje heterozigoti ( $I^B i$ ,  $I^A i$ ). Cis-AB fenotip ima jedan enzim koji stvara oba antigena,  $i$  A i B antigen. Kao posljedica toga dolazi do slabe ekspresije A ili B antigena, odnosno ekspresija nije na očekivanoj razini kao kod osoba s „normalnom“ A1 ili B krvnom grupom (Calafell i sur. 2008). Moguće kombinacije u nasljeđivanju sustava ABO krvnih grupa prikazane su u Tablici 1.

**Tablica 1.** *Moguće kombinacije u nasljeđivanju ABO krvnih grupa*

Krvne grupe roditelja		Otac			
		O	A	B	AB
Majka	O	O	O, A	O, B	A, B
	A	O, A	O, A	O, A, B, AB	A, B, AB
	B	O, B	O, A, B, AB	O, B	A, B, AB
	AB	A, B	A, B, AB	A, B, AB	A, B, AB

Zastupljenost pojedinih krvnih grupa iz ABO sustava značajno varira diljem svijeta po populacijama, a mogu se pratiti i varijacije unutar subpopulacija. Često su te raspodjele pokazatelji migracija stanovništva, ratova, invazija (Garratty i sur. 2004).

Preko 50% ljudi na svijetu su nositelji O krvne grupe. Najviše stanovnika koji nemaju A i B alele potječu iz Srednje i Južne Amerike, slijede stanovnici Sjeverne Amerike i afričkog kontinenta, te dio stanovništva u Zapadnoj Europi. Krvna grupa O je najmanje zastupljena u istočnoj Europi (Slika 5).



*Slika 5. Raspodjela nositelja O krvne grupe u svijetu (Preuzeto iz: anthro.palomar.edu)*

Zastupljenost pojedinih alela u populacijama je različita i postoje razlike prema etničkim skupinama. U Sjedinjenim Američkim državama alel A1 dvostruko češći kod bijelaca u odnosu na crnu rasu, dok je alel A2 je skoro izjednačeno zastupljen među bijelcima i crncima. Istovremeno alel A2 vrlo rijetko nalazimo kod pripadnika orijentalnih naroda. Među američkim Indijancima je daleko najčešće zastupljena O krvna grupa (88%), a uopće nema nositelja B alela.

### 1.1.3. ABO sustav krvnih grupa i bolesti

Hemolitičke transfuzijske reakcije, hemolitička bolest novorođenčeta, autoimune hemolitičke anemije, odbacivanje presatka dobro su poznata i istražena brojna bolesna stanja koja uzrokuju protutijela na ABO krvne grupe, ali postoje i mnoga istraživanja koja potvrđuju povezanost pojavnosti nekih bolesti s različitim genotipovima ABO krvnih grupa. Najčešće se navode tumorske bolesti, gastroduodenalne, kardiovaskularne i infekcije (Nayak 1997), a sve više se ispituje povezanost ABO sustava krvnih grupa kao genetičkog čimbenika, s različitim bolestima.

Tako je već pedesetih godina prošlog stoljeća uočena češća pojavnost karcinoma želuca kod osoba koje su fenotipske A krvne grupe. Kasnijim istraživanjima potvrđena su i obrazložena ova zapažanja. Naime, brojne maligne stanice razvijaju tumorski biljeg po imenu antigen

Thomsen-Friedenreich (antigen T i antigen Tn-slabije razvijen antigen) koji po strukturi sliči antigenu A (npr. karcinom želuca). Kod normalnih stanica antigen je potisnut, ali kada stanice postaju maligne, on se aktivira. Ako je karcinom dobro diferenciran, antigeni T su dominantni, a manje je antigena Tn. Kod slabo diferenciranih tumorskih stanica dominira oblik Tn. Svaki čovjek ima u organizmu, stvarajući ih primarno u crijevnoj flori, antitijela na antigen T i Tn. Krvne grupe A i AB pokazuju najmanje agresivnu reakciju na ta dva antigena zbog njihove sličnosti u strukturi s antigenom A, pa su stoga i najviše sklone malignim bolestima. Ova je hipoteza dobro dokumentirana (Maisonneuve i sur. 2009).

Utvrđeno je da je krvna grupa važan čimbenik u procjeni rizika razvoja maligne bolesti, kao i da utječe na procjenu stope preživljavanja oboljelih. Činjenica je da je gen koji određuje krvnu grupu jedan od najdominantnijih gena u tijelu i najjača podrška imunološkom sustavu. Imunološki sustav štiti organizma od stranih uzročnika, pa tako i od karcinogenih tvari sofisticiranim metodama. Jedna metoda uključuje nadzor kemijskih biljega koji se nazivaju antigenima i koji se nalaze na stanicama organizma. Antigen može biti svaka tvar na koju će imunološki sustav reagirati na odgovarajući način i moći razlučiti radi li se o vlastitom ili stranom. Imunološki sustav svaku sumnjivu tvar ili mikroorganizam uspoređuje s antigenom svoje krvne grupe. Protiv stranih antigena sustav stvara protutitijela i to je uobičajena zaštita organizma (Reid i sur. 2004).

Bolesnici s proširenom malignom bolesti imaju dokazane skoro dvostruko više razine Faktora VIII i vWF u odnosu na zdrave osobe. Fiziološki nositelji krvne grupe A i AB imaju prirodno povišenu razinu tih čimbenika, kao i povišenu razinu fibrinogena bjelancevine važne za zgrušavanje krvi, za upalne reakcije i zacjeljivanje rana. Razina fibrinogena je također povišena kod osoba s malignitetom. Rezultati brojnih istraživanja pokazuju rjeđu pojavnost metastaza kod bolesnika koji su uzimali antikoagulantnu terapiju (Jenkins i sur. 2006, Franchini i sur. 2012).

Istovremeno je zapaženo da su nositelji O krvne grupe skloniji autoimunim bolestima u kojima je pojačan nadzor i prekomjerno aktivan imunološki sustav. To je možda i razlog rjeđe pojave zloćudnih bolesti. Ipak, postoji nekoliko vrsta tumora koji se povezuju s krvnim grupama O (melanom) i B (karcinom kosti i mokraćnog mjehura) (Metoki i sur. 1989).

Povezanost pojavnosti malignih oboljenja i ABO sustava krvnih grupa je u središtu zanimanja brojnih istraživača. Utvrđena je češća pojava karcinoma kod osoba krvnih grupa A ili AB uz obrazloženje da tumorski biljezi imaju značajke nalik na antigen A, pa ih teško ili kasno

otkrivaju stanice imunološkog sustava nositelja krvnih grupa A i AB. Dokazano je da kod određenih vrsta karcinoma, posebice probavnog sustava, krvna grupa A ima više razine tumorskog supresorskog gena p53. Visoka razina tog gena upozorava da je tumor postao invazivniji te je počeo narušavati proizvodnju antigena krvne grupe (Iodice i sur. 2010). Dodatno povećan rizik od malignog oboljenja imaju sekretori čiji antigeni slobodno cirkuliraju tijelom i kojih je oko 80% u populaciji, pa su općenito više izloženi od nesekretora kojih je zastupljenost oko 20% (Jaff 2010). Ginekološki tumori su češći i povezuju se s lošijim prognozama kod žena s krvnom grupom A, kao karcinom endometrija, grlića maternice i jajnika. Žene nositeljice B krvne grupe su najmanje sklone zloćudnom tumoru jajnika (Marinaccio i sur. 1995). Uočeno je da više ljudi s krvnom grupom A oboli od karcinoma pluća, a manje je oboljelih s krvnom grupom O, čak i bez obzira na veliki rizik koje za pojavu ove bolesti nosi pušenje za kojeg je utvrđeno da taj snažan rizični čimbenik koji bi očekivano nadjačao sve razlike između krvnih grupa (Ulger i sur. 2002, Fukumoto i sur. 2015).

Karcinom kostiju se najviše povezuje s krvnom grupom B, a najmanje s krvnom grupom A. Najveće predispozicije za leukemiju imaju osobe krvne grupe A, a najmanje osobe krvne grupe O, pogotovo žene.

Brojnim istraživanjima venskih tromboza potvrđena je češća pojavnost tromboembolijskih bolesti kod nositelja ne-O krvnih grupa koji posjeduju veću razinu von Willebrand faktora, što posreduje pojačanu adheziju i agregaciju trombocita (Wu i sur. 2008, Mannucci i sur. 2017). U odnosu na višestruko potvrđenu povezanost ABO krvnih grupa s venskim trombozama, većina istraživanja povezanosti ABO s arterijskim bolestima nije dala konzistentne rezultate (Clark i sur 2011). Dokazana je povezanost manje učestale pojave tromboze kod nositelja O krvne grupe, odnosno odgovornost alela A, B i diplotipa AB za nastanak trombotičkog rizika. Uz postojanje genetičkih trombotičkih čimbenika kao što su mutacije FV Leiden, protrombin G20210A i MTHFR C677T, taj rizik se još dodatno povećava (Garraty 2005).

Epstein-Barrov virus utječe na razvoj bolesti pa su osobe s krvnom grupom B, sklonijoj infekcijama, izložene nešto većem riziku (Janardhana i sur. 1991). Dokazana je i sklonosti pojedinih bakterija, virusa i parazita za vezanje na eritrocite s određenim antigenima krvnih grupa, koji djeluju kao receptori. Tako je uočeno da su nositelji O krvne grupe relativno rezistentni na teški oblik malarije (Cserti i sur. 2007). Pretpostavlja se da su glavne razlike u građi ABO sustava krvnih grupa, s obzirom na oligosaharidne komponente, u različitim

dijelovima svijeta bile uzrok izazivanju epidemija infektivnih bolesti u prošlosti (Blackwell i sur. 2002).

ABO sustav krvnih grupa očigledno ima važnu ulogu u zaštiti organizma i borbi protiv bolesti. Raspodjela krvnih grupa u svijetu svjedoči i o postojanju većih epidemija u nekim područjima u prošlosti. Veliki postotak O krvne grupe među američkim Indijancima podržava tezu o otpornosti ove grupe na zarazu sifilisom. Istovremeno su osobe O krvne grupe bile najmanje otporne na epidemiju kolere, a najrjeđe su oboljevale od tuberkuloze. Nisu sklone malignim oboljenjima gušterače, želuca, dojke, jajnika i cerviksa. Rjeđe oboljevaju od kardiovaskularnih bolesti, ali su skloniji ulkusima. Kod njih je uočen i veći rizik za oboljenje od malarije.

Nositelji A krvne grupe, uz povećani rizik za maligna oboljenja, posebno gastrointestinalnog sustava, češće razvijaju tromboembolijske bolesti. U prošlosti su bili otporniji na kugu, ali prijemčivi za velike boginje.

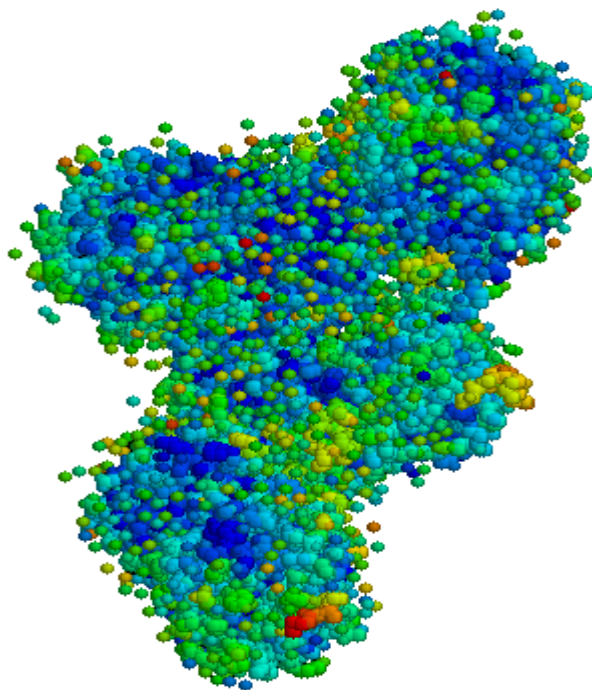
Sadašnja raspodjela krvne grupe B govori u prilog neotpornosti na kugu u srednjem vijeku, ali i prijemčivosti za virusne infekcije a po zadnjim provedenim istraživanjima u Švicarskoj, uz povećane ostale rizične čimbenike, dvostruko češće oboljevaju od infarkta miokarda od kontrolne skupine (Nydgger i sur. 2003).

Uloga ABO sustava krvnih grupa je neupitna i sigurno važna, možda i važnija od trenutnih spoznajnih mogućnosti. Svatko od nas živi sa svojom grupom, svaka ima svoje prednosti i nedostatke i ne postoji idealna, bar sa stanovišta njihove povezanosti s pojavnosti bolesti. Sigurno je da će se nastaviti istraživanja ovog važnog i kompleksnog sustava, ne samo kroz prizmu povezanosti s bolestima već i s drugih gledišta znanstvenih znatiželja.

## **1.2. Inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1)**

Inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1) je jednolančani glikoprotein molekulske mase oko 50 kD (Slika 6). Drugi naziv za PAI-1 je serpin-1 (akronim od SERin Proteaza INhibitori) koji pripada super porodici inhibitora serin proteaza. Aktivno mjesto čine aminokiseline Arg-346 i Met-347 koje čine peptidnu vezu istu kao u supstratu ciljne proteaze. PAI-1 sintetizira se u mnogim različitim tkivima i stanicama uključujući žilni endotel, megakariocite, makrofage, humani endometrij, peritoneum, adipozna tkiva, aktivirane mastocite. Kada je sintetiziran, PAI-1 se uglavnom skladišti u trombocitima, iako može biti izlučen i u struju

krvi ili odložen na subendotelnom matriksu. Sintetizira se u aktivnom obliku, ali u *in vivo* uvjetima je u aktivnom obliku stabilan oko dva sata. Cirkulirajući PAI-1 je vezan na vitronektin koji ga štiti od inaktivacije i može ga usmjeriti na mjesto vaskularne ozljede (Zorio i sur. 2008).



**Slika 6.** Inhibitor plazminogen aktivatora-1 (Preuzeto iz: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:PAI-1.png>)

PAI-1 regulira fibrinolitički sustav inhibirajući tkivni (tPA) i urokinazni (uPA) aktivator plazminogena. Glavna funkcija PAI-1 je smanjenje fibrinolize što dovodi do akumulacije fibrina, a povišenje u plazmi koncentracije PAI-1 utječe na normalni razarajući mehanizam fibrina i potiče trombozu. Prema nekim istraživanjima povišenje koncentracije PAI-1 osim što vodi do hipofibrinolize, smanjuje aktivnost metaloproteinaza matriksa (MMP) i staničnu adheziju, a ima ulogu i u tkivnom remodeliranju (Analiza gena za inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1), 2005).

PAI-1 je zbog svoje uloge u upali i koagulacijskoj kaskadi povezan s razvojem različitih bolesti kao što su: ateroskleroza, endometrijoza, duboka venska tromboza, metabolički sindrom, rak dojke itd. To sve je potaknulo brojna ispitivanja PAI-1 kao dijagnostičkog biljega za brojne bolesti (Zorio i sur. 2008, Rami 2014).

Neravnoteža između metaloproteinaza matriksa i njihovih inhibitora prisutna je kod astme što doprinosi remodeliranju dišnih puteva kao važnom mehanizmu slabljenja cjelokupne plućne

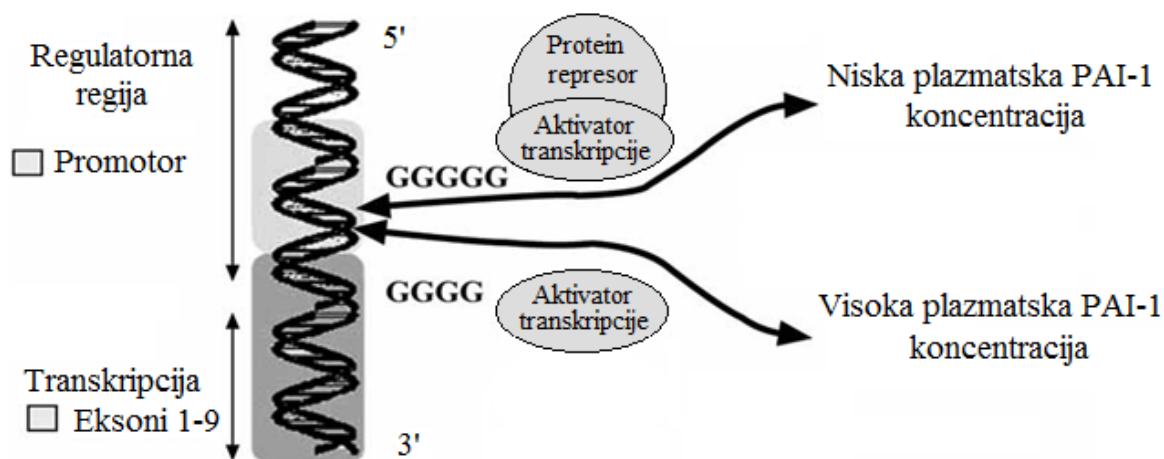


funkcije. Osim što PAI-1 doprinosi razvoju astme svojom ulogom u remodeliranju dišnih puteva doprinosi i bronhalnoj hiperreaktivnosti te alergijskoj upali. Važan izvor PAI-1 za tkivno remodeliranje dišnih puteva uzrokovano upalom predstavljaju stanice aktiviranih mastocita (Dijkstra i sur. 2011).

### 1.2.1. Polimorfizam 4G/5G gena za PAI-1

Pod pojmom polimorfizam gena smatramo prisutnost dvaju ili više različitih alela jednog gena u populaciji, pri čemu određeni alel mora biti prisutan u više od 1% ljudi u populaciji, inače se govori o mutaciji (Nussbaum i sur. 2007).

U promotorskoj regiji PAI-1 gena koji je smješten na ljudskom kromosomu 7q21.3-q22 utvrđeno je postojanje specifičnog polimorfizma 4G/5G koji utječe na ekspresiju PAI-1 (Slika 7). Radi se o polimorfizmu koji uključuje deleciju, odnosno inserciju gvaninske baze na -675 pb od promotora PAI-1 gena. Mnoga istraživanja su pokazala da homozigotne osobe s genotipom 4G/4G imaju koncentraciju PAI-1 u plazmi značajno veću nego osobe s genotipom 5G/5G, odnosno da je 5G alel transkripcijski manje aktivan u odnosu na 4G alel. Na oba se alela može vezati aktivator transkripcije, dok se samo na 5G alel može vezati represor transkripcije koji je koči (Madách i sur. 2010).



*Slika 7. Utjecaj 4G/5G polimorfizmu u PAI-1 genu na koncentraciju PAI-1 u plazmi (Modificirano prema: Kohler HP i sur. 2000)*

### 1.2.2. Utjecaj 4G/5G polimorfizma PAI-gena na astmu

Neka nova istraživanja bavila su se povezanošću -675 4G/5G polimorfizma u promotorskoj regiji PAI-1 gena s astmom u različitim populacijama (Nie i sur. 2012).

Prema rezultatima istraživanja može se zaključiti da je učestalost 4G/5G polimorfizma PAI-1 gena različita kod pripadnika različitih rasa i etničkih skupina. Zbog različitog načina života i međudjelovanja gena s čimbenicima okoliša, ne može se zaključiti da je rizik sličan u različitim populacijama (Bučková i sur. 2002).

Istraživanje koje su proveli Ozbek i suradnici u Turskoj, a obuhvaćalo je populaciju djece s astmom i/ili alergijskim rinitisom, ukazuje na to da je ispitivana populacija imala veću pojavnost 4G alela u usporedbi s njihovim zdravim vršnjacima iz kontrolne skupine (Ozbek i sur. 2009).

Prije više od jednog desetljeća Bučkova sa svojim suradnicima provela je istraživanje na populaciji bolesnika iz Češke s astmom i alergijskim bolestima koja podupire tezu da 4G alel 4G/5G polimorfizma PAI-1 gena može biti čimbenik rizika za nastanak IgE-posredovane astme i alergijskih bolesti (Bučková i sur. 2002).

Godinu dana kasnije Cho i suradnici u Velikoj Britaniji proveli su slično istraživanje te došli do istog zaključka, sa razlikom da je u britanskoj populaciji učestalost 4G alela bila nešto veća nego u češkoj populaciji (Cho i sur. 2001).

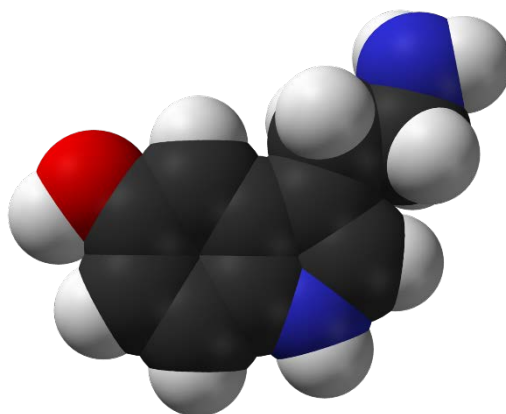
Provedena istraživanja ispitivanja povezanosti PAI-1 4G/5G polimorfizma s astmom u Turskoj koja je uključivala odrasle bolesnike, pokazala je da 4G/5G polimorfizam PAI-1 gena nije statistički značajan čimbenik u razvoju astme (Cosan i sur. 2009).

Iz dobivenih rezultata studije koju su proveli u Nizozemskoj Dijkstra i suradnici zaključilo se da polimorfizam PAI-1 gena ne utječe na nastanak astme, ali utječe na težinu i progresiju bolesti putem remodeliranja dišnih puteva, kao i na odgovor na terapiju inhalacijskim kortikosteroidima (Dijkstra i sur. 2011).

Nie i suradnici (2012) napravili su prvu meta-analizu koja je sadržavala osam dotad objavljenih relevantnih istraživanja o utjecaju 4G/5G polimorfizma PAI-1 gena na nastanak i razvoj astme budući da su mnoga ranija istraživanja pokazala dvojbene rezultate povezanosti PAI-1 4G/5G polimorfizma s astmom. Rezultati meta analize su pokazali da je 4G/5G polimorfizam PAI-gena rizičan čimbenik za razvoj astme (Nie i sur. 2012).

### 1.3. Serotonin

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je neurotransmiter i imunomodulator, po kemijskom sastavu biogeni amin (Slika 8) koji nastaje sintezom iz esencijalne aminokiseline triptofana. Poznat je po svojoj važnoj regulacijskoj ulozi u brojnim fiziološkim i staničnim odgovorima, uključujući i plućnu funkciju (Kim i sur. 2011, Lau i sur. 2012).



*Slika 8. Serotonin, 3D*

*(Preuzeto iz: <https://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin>, autor: Benjah-mm27)*

Djeluje na velik broj fizioloških funkcija, kao što su disanje, kardiovaskularna regulacija i termoregulacija, kao i na različite vrste ponašanja, uključujući regulaciju cirkadijanih ritmova (npr. ciklusa spavanja i budnosti), seksualnog ponašanja, apetita, agresije, osjetljivosti na bol i kognitivnih funkcija kao što su pamćenje i učenje (Lucki 1998). Uz njegovu dobro poznatu ulogu kao neurotransmitera u homeostazi središnjeg živčanog sustava, serotonin se pokazao i kao esencijalni medijator u perifernom imunonološkom sustavu (Dürk i sur. 2013).

Posreduje čitav niz centralnih i perifernih funkcija što čini njegovu fiziologiju vrlo kompleksnom.

#### 1.3.1. Sinteza i razgradnja serotonina

Sintetizira se iz aminokiseline L-triptofana, koji se djelovanjem enzima triptofanhidroksilaze prevodi u 5-hidroksitriptofan, a potom, djelovanjem dekarboksilaze aromatskih aminokiselina, u 5-hidroksitriptamin. Ovaj proces odvija se samo u stanicama koje sadrže

triptofan-hidroksilazu, a to su, u prvom redu, serotonergični neuroni u jezgrama rafe moždanog debla te, na periferiji, enterokromafine stanice tankog crijeva. U razgradnji serotonina glavnu ulogu ima enzim monoamin-oksidaza, čijim djelovanjem nastaje 5-hidroksiindolacetaldehid. On se najvećim dijelom posredstvom aldehid-dehidrogenaze prevodi u konačni metabolit serotonina, 5-hidroksiindol-octenu kiselinu (Popova 2006).

### **1.3.2. Serotonin u ljudskom organizmu**

Glavni izvor perifernog serotonina su enterokromafine stanice gastrointestinalne sluznice koje otpuštaju dio svog sadržaja serotonina u krvotok (Wade 1996).

Slobodni amin iz krvne plazme djelomično unose u sebe trombociti, a glavno metaboličko mjesto predstavljaju pluća, odnosno plućna mikrovaskulatura (Fuller 1986, Ortiz i sur. 1988).

Bazofili, trombociti i mastociti su upalne stanice koje sadrže visoke koncentracije 5-HT-a (Segal i sur. 1977, Jankovic 1989), od toga otprilike 99% 5-HT-a pohranjeno je u trombocitima (Karege i sur. 1994).

Trombociti sadrže nekoliko komponenti sličnih onim komponentama u centralnim 5-HT sinaptosomima. Budući da je koncentracija serotonina u trombocitima promijenjena brojnim patološkim stanjima, poput autizma, alkoholizma i depresije, trombociti se smatraju vrlo prikladnim perifernim modelom za proučavanje nekih komponenti centralnog 5-HT sustava (Muck-Seler i sur. 2011).

### **1.3.3. Klinički značaj trombocitnog serotonina**

Koncentracija trombocitnog serotonina u krvi dobar je pokazatelj homeostaze perifernog odjeljka serotonina u organizmu. Njegova koncentracija ispitivana je u mnogim granama medicine: ginekologiji (Gujrati i sur. 1994), imunologiji (Larsson i sur. 1989), kardiologiji (Williams i sur. 2001), hematologiji (Cortellazzo i sur. 1985), gastroenterologiji (Filatova, 1986). U bolesnika s depresijom uočen je smanjeni transport serotonina u trombocite, kao i smanjeno vezanje imipramina i paroksetina na 5-HT prijenosnik i u neuronima i na trombocitima (Meltzer i sur. 1981, Stahl 1985, Nemeroff, 1992).

Smanjena koncentracija serotonina u trombocitima, te smanjena koncentracija metabolita serotonina u cerebrospinalnoj tekućini uočena je u alkoholičara (Benedetti i sur. 1992).

U osoba zaraženih HIV-om nađena je za više od trećine snižena razina 5-HT u trombocitima (Larsson i sur.1989).

Neka istraživanja su se bavile razjašnjavanjem uloge trombocitnih koncentracija serotonina u astmi i primjene u otkrivanju novih (neotkrivenih) fenotipa astme, no to i dalje ostaje otvoreno pitanje u pulmologiji (Malmgren i sur. 1982).

#### **1.3.4. Patogenetska uloga serotonina (5-hidroksitriptamin, 5-HT) kod astme**

Dosadašnji istraživanja prikazala su vrlo važnu ulogu trombocita i produkata koje oni otpuštaju, kao 5-HT-a, u brojnim upalnim bolestima, uključujući i astmu (Kornerup i sur. 2007, Arreola i sur. 2015).

Za trombocite se otkrilo kako aktivno sudjeluju u većini glavnih mehanizama kod astme (Idzko i sur. 2015).

Također se pokazano kako 5-HT modulira aktivnost stanica koje su klasično uključene u mehanizam kod astme putem regulacije adhezije, migracije i proizvodnje citokina i kemokina. Istraživanje je pokazalo kako je 5-HT induktor proupalnih citokina (IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-8/CXCL8) koji se oslobađaju iz nekih mononuklearnih stanica periferne krvi, prateći kaskadu indukcije signala (Dürk i sur. 2005).

Po svemu prikazanom navedeni citokini imaju važnu ulogu u upalnome odgovoru astmatičnih pacijenata (Sousa i sur. 1996, Dürk i sur. 2013).

Uloga serotonina kod astme potvrđena je u nekoliko istraživanja. Postoji sve izgledniji dokaz kako su astmatski napadi potaknuti visokim razinama slobodnog serotonina u plazmi (Lechin i sur. 1996).

Simptomatski astmatički pacijenti imaju povišene razine slobodnog serotonina u plazmi u odnosu na asimptomatske pacijente (Jankovic 1989).

Također, slobodni serotonin je pozitivno povezan sa stupnjem težine bolesti i negativno povezan s plućnom funkcijom (Lechin i sur. 1996).

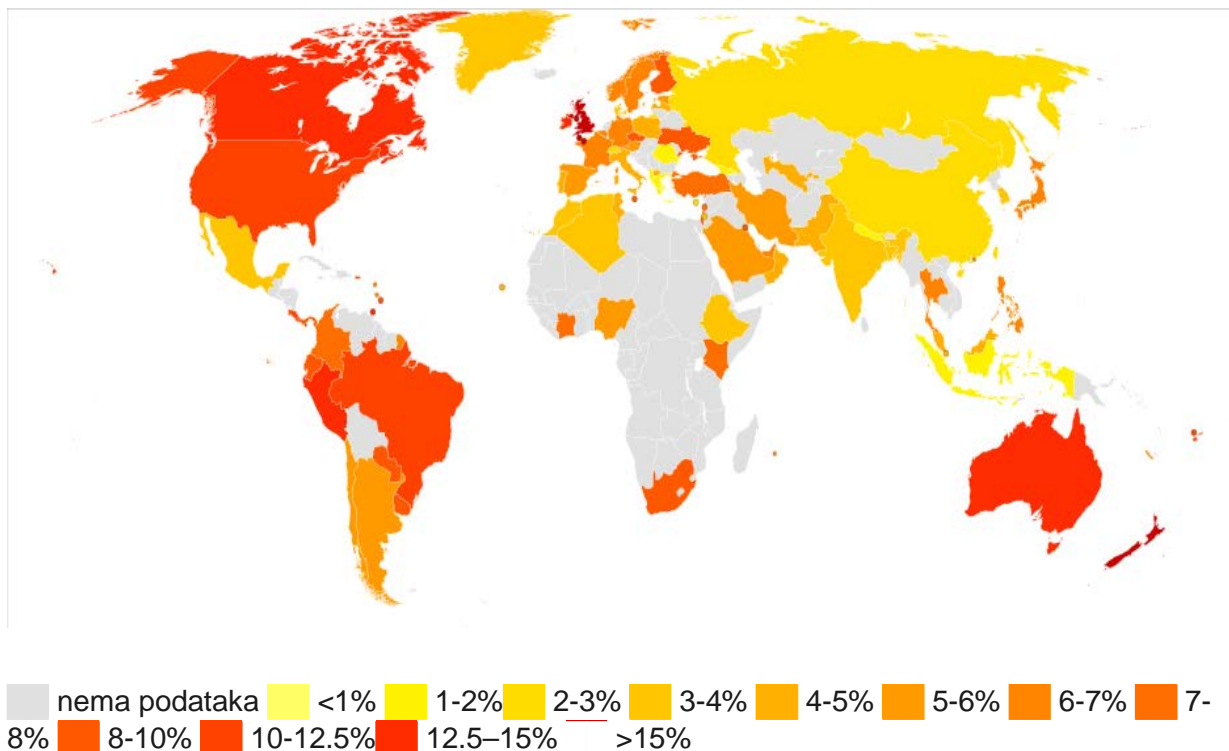
Serotonin je također poznat po tome što uzrokuje bronhokonstrikciju putem perifernih i centralnih puteva, kroz pojačavanje kolinergičke aktivnost (centralni put) i otpuštanje histamina (periferni put). Ovo predstavlja dodatnu potporu patogenetskoj ulozi 5-HT-a u astmi (Lechin i sur. 2004).

Većina dosad objavljenih istraživanja koja su se bavila povezanosti serotonina i astme bazirale su se na razinama slobodnog serotonina u plazmi ili serumu. Iako u literaturi postoje podaci o mogućoj uključenosti neurogene upale u patofiziologiji astme, točna uloga serotonina nije još uvijek u potpunosti razjašnjena (Way i sur. 2012).

## **1.4. Astma**

### **1.4.1. Pojavnost i epidemiologija astme**

Astma je kao bolest poznata od davnina. Riječ astma grčkog je podrijetla i izvedena je od korijena riječi koji znači puhati te označava disanje s teškoćom ili dahtanje. Pojavnost astme u svijetu danas se kreće između 1-18% ovisno o zemljopisnim područjima [The global burden of asthma report, Global initiative for asthma (GINA)]. Smatra se da u ovom trenutku postoji 300 milijuna oboljelih, a da će 2020. godine biti 400 milijuna bolesnika s astmom (Litonjua i sur. 2015). Najviša pojavnost astme nalazi se u Velikoj Britaniji, Novom Zelandu i SAD-u, zapravo u zemljama engleskog govornog područja (Slika 9.). U odnosu na različite rase, nema značajnih razlika u prevalenciji astme (Wechsler i sur. 2011). Pojavnost astme u Europi varira od 2 do 3,3% u Italiji, Španjolskoj, Njemačkoj, Austriji, Grčkoj i Estoniji te od 8 do 11,9% u Velikoj Britaniji Novom Zelandu i Australiji. Niže stope se uočavaju u Aziji, istočnoj Europi i Africi (Murray i sur. 2015). Među razvijenim zemljama, češća je u onima koje su manje razvijene, za razliku od zemalja u razvoju, gdje je češća u onima bogatijima. Razlog ovih razlika nije poznat. Više od 80% smrtnih slučajeva zbiva se u zemljama s niskim i srednjim prihodima (Anderson i sur. 2007). U Hrvatskoj je pojavnost astme srednje visoka i kreće se između 5-8% u djece i srednjoškolske mladeži (Stipić-Marković i sur. 2003). Tijekom nekoliko posljednjih desetljeća uočen je porast broja oboljelih od astme, do 50% svakih 10 godina [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Asthma-United States 1982-1992, 1995]. U posljednje se vrijeme u svijetu primjećuje plato porasta astme, u zemljama sa visokom prevalencijom (Bousquet i sur. 2005, Anandan i sur. 2010), te se čini da je daljnji porast astme zaustavljen i u djece (Wennergren 2011), i u odraslih (Bjerg i sur. 2011).



*Slika 9. Stope pojavnosti astme u različitim zemljama svijeta  
(Preuzeto iz: <http://ginasthma.org/pdf/GINABurdenReport.pdf>)*

#### 1.4.2. Definicija astme

Astma je heterogena bolest, većinom obilježena kroničnom upalom dišnih puteva. Bolest se klinički očituje ponavljanim napadima piskanja, zaduhe, pritiska u prsištu i kašlju, osobito noću i/ili u ranim jutarnjim satima. To je jedna od najčešćih kroničnih bolesti, osobito kod djece, a njezina učestalost je u porastu u razvijenim zemljama (Chang 2006, Pearce i sur. 2007). Prema teoriji upale, koja je potekla prije 100 godina, kroz analizu dišnih putova i plućnog parenhima, kod obduciranih pacijenata koji su umrli od astme, glavni uzrok patoloških promjena u astmatičara je kronična, ne-zarazna upala dišnih putova (Curschmann 1882, Hamid 2012).

#### 1.4.3. Etiologija astme

Astma je ozbiljna i proširena bolest, a rezultat je složenih međudjelovanja višestrukih genskih i okolišnih čimbenika. Smatra se kako je nedavno povećanje učestalosti astme uzrokovano promjenama epigenetskih čimbenika (nasljednih čimbenika koji nisu povezani sa strukturom DNA) i promjenama u životnom okruženju (Dietert, 2011). Najpoznatiji čimbenici rizika za astmu su genetska predispozicija, spol, bronhalna hiperreaktivnost, atopija, izloženost

alergenima, infekcijama, te duhanskom dimu, pretilost i perinatalni čimbenici. Postojanje ovih čimbenika i njihove kombinacije kod bolesnika utječu i na težinu bolesti i na odgovor na liječenje (Choudhry i sur. 2007).

#### 1.4.3.1. Genetska predispozicija

Astma je zapravo multigenetska bolest obzirom da nasljeđe u astmi ne slijedi klasičan mendelski model nasljeđivanja karakterističan za monogenetske bolesti. Različiti geni u različitim pojedincima dovode do istog fenotipa astme (lokusna heterogenost), dok je zajedničko djelovanje više gena kod istog pojedinca nužno za očitovanje određenog fenotipa astme (poligenetsko ili oligogenetsko nasljeđivanje) (Baldini i sur. 1999). Genetska istraživanja su se temeljila na više značajki astme: bronhalna hiperreaktivnost, atopija, stvaranje upalnih medijatora kao što su citokini, kemokini i čimbenici rasta te ravnoteža Th1 (pomoćnički T limfociti 1, engl. *T-helper 1*) i Th2 (pomoćnički T limfociti 2, engl. *T-helper 2*) imunskog odgovora (Strachan 1989). Genetska predispozicija za pojavu astme još nije poznata iako je utvrđena povezanost povećane serumske koncentracije ukupnog imunoglobulina E (IgE) i bronhalne hiperreaktivnosti s kromosomom 5q31 (Marsh i sur. 1994), visokoafinitetnog receptora za IgE (FcεRI) i kromosoma 11q13 (Shirakawa i sur. 1994), bronhalne hiperreaktivnosti i atopije s genom za TNF- $\alpha$  (čimbenik nekroze tumora  $\alpha$ , engl. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) (Ivković-Jureković 2005), te remodeliranja bronha i gena ADAM33 smještenog na kromosomu 20p (Cookson 2003).

#### 1.4.3.2. Spol

Poznato je da je u dječjoj dobi astma češća u dječaka nego u djevojčica, s vrhuncem predominacije muškog spola u pubertetu (Weiss i sur. 1995). Povišen rizik razvoja astme u muške djece vjerojatno je posljedica užih dišnih puteva, povišenog tonusa dišnih puteva (Gissler i sur. 1999) i moguće većom učestalošću atopije u muškog spola (IgE-senzitizacija), što ih predisponira za pogoršanje ograničenog protoka pri odgovoru na različite stimulanse (Sears i sur. 1993). U odrasloj dobi, nakon dvadesete godine života astma je jednako zastupljena u oba spola da bi nakon četrdesete godine života žene više oboljevale (Bush i sur. 2009). Pojavnost astme češća je u mladih nego u starijih osoba (Murray i sur. 2015).



### 1.4.3.3. Bronhalna hiperreaktivnost

Bronhalna hiperreaktivnost (BHR) je stanje pretjeranog odgovora na provokacijske čimbenike, što predstavlja čimbenik rizika za pojavu astme. To je nasljedna sklonosti koja usko korelira s razinom IgE u krvi i upalom dišnih puteva. Sklonost ka povišenju IgE u krvi nasljeđuje se zajedno sa bronhalnom hiperreaktivnošću, a gen odgovoran za BHR lociran je blizu lokusa za regulaciju razine serumskog IgE na kromosomu 5q (Postma i sur. 1995). Udruženost asimptomatske BH s upalom i remodeliranjem dišnih puteva, upućuje na postojanje upalnih promjena dišnih puteva prije pojave astme (Laprise i sur. 1997, Jansen i sur. 1999). Istraživanje koje je učinjeno u odraslih i djece je pokazao da je pojavnost astme dva do tri puta niža od pojavnosti BHR (Weiss i sur. 1993). Ova opažanja sugeriraju da astma i BHR nisu identičan fenomen. Hiperreaktivnost dišnih putova je potrebna ali ne i dostatna za razvoj kliničke slike astme.

### 1.4.3.4. Atopija

Genetska sklonost stvaranju visokih koncentracija protutijela klase IgE u doticaju s alergenima iz okoliša (atopija), je najsnažniji potvrđeni čimbenik rizika za razvoj astme (Hamilton i sur. 2010). U dječjoj dobi atopijsku podlogu ima čak 75-90% astme (Sporik i sur. 1990, Pearce i sur. 1999). Atopija se očituje povećanom koncentracijom ukupnih (uIgE) i specifičnih (sIgE) IgE protutijela u serumu i pozitivnim odgovorom u kožnom ubodnom testu na niz standardiziranih inhalacijskih i/ili nutritivnih alergena (Golden i sur. 2011).

### 1.4.3.5. Alergeni

Izloženost alergenima je važan čimbenik rizika za razvoj alergijske preosjetljivosti. Kod preosjetljivih osoba doticaj s alergenima dovodi do pogoršanja astme i/ili prisutnosti simptoma bolesti (Gold, 2000). Alergeni zatvorenih prostora su grinje iz kućne prašine, životinjski proteini kućnih ljubimaca (mačka, pas), žohari i gljivice. Najčešći alergeni zatvorenih prostora povezani s astmom su piroglifidne grinje *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras* i *Euroglyphus marinei*. Glavni alergeni vanjskih prostora povezani s astmom su peludi stabala, trava i korova (Wheatley 2015). Njihova koncentracija varira ovisno o geografskoj širini i atmosferskim prilikama, a peludne se mape mijenjaju kao posljedica klimatskih i

kulturoloških čimbenika i migracija stanovništva (D'amato i sur. 1998., Aït-Khaled i sur. 2009).

#### **1.4.3.6. Infekcije dišnih putova**

Infekcije respiratornim sincicijskim virusom (RSV) i virusom parainfluence u ranom djetinjstvu su važan čimbenik rizika za razvoj astme i alergije u kasnijoj dobi (Sigurs i sur. 2000, Gern i sur. 2002).

#### **1.4.3.7. Izloženost duhanskom dimu**

Pasivno pušenje, prvenstveno pušenje majki koje su tijekom prve godine života u užem doticaju s djecom, jedan je od najsnažnijih čimbenika rizika za nastanak astme (Wang i sur. 2008). Alergijska upala kod astme dovodi do povećane sekrecije sluzi, samim tim i do kašlja i osjećaja gušenja (Stapleton i sur. 2011). Kod dugogodišnjih pušača, duhanski dim također stimulira dodatno lučenje sluzi čiji višak dovodi do napada kašlja (Thompson i sur. 2005). Spazam mišića i otok sluznice bronha otežavaju disanje kod astmatičara, a sličan učinak ima i dugotrajna konzumacija duhanskog dima kod pušača (Stapleton i sur. 2011).

#### **1.4.3.8. Pretilost**

Pojavnost astme i pretilosti u stalnom je porastu, no njihova povezanost je zbog nedostatka provedenih istraživanja i dalje dvojbena (Ford 2005, Clerisme-Beaty i sur. 2009). Neka istraživanja ukazuju da pacijenti s povećanim indeksom tjelesne mase (BMI, engl. *Body Mass Index*) imaju veći rizik za razvoj astme (Beuther i sur. 2007, Shore i sur. 2005). Rizik je veći za nealergijsku nego za alergijsku astmu (Chen i sur. 2006). Povišen BMI može biti povezan i s težinom astme (Taylor i sur. 2008). U pretilih astmatičara nakon gubitka na tjelesnoj težini primijećeno je smanjenje subjektivnog osjećaja dispneje, poboljšanje spirometrijskih parametara i manje egzacerbacija astme (Stenius-Aarniala i sur. 2000).

#### **1.4.3.9. Perinatalni čimbenici**

Porod carskim rezom, dob majke, prijevremeni porod, prehrana tijekom trudnoće, novorođenačka žutica, opseg glave pri porodu i upotreba antibiotika tijekom prve godine

života povezuju se s razvojem astme u dječjoj dobi. Povećan uIgE u krvi pupkovine i pozitivna obiteljska anamneza u pravcu atopije su povezani s razvojem atopijske bolesti u djetinjstvu (Halcken 2003). Porod carskim rezom također povećava rizik za astme u djece (Tollånes i sur. 2008). Mediteranska prehrana u trudnoći smanjuju rizik za razvoj atopijskih bolesti i astmu u dječjoj dobi (Chatzi i sur. 2008).

#### **1.4.3.10. Onečišćenje zraka**

Onečišćivači zraka (sumporni dioksid, dušični oksidi, kiseli aerosoli i ozon) povezani su sa simptomima i egzacerbacijama astme (Devereux i sur. 2006).

#### **1.4.4. Patofiziologija astme**

Astmu karakterizira reverzibilna opstrukcija bronha, trajna bronhalna hiperreaktivnost, upala i remodeliranje bronha kao pretjerani odgovor dišnih putova na vanjski stimulus (alergen, iritans).

##### **1.4.4.1. Upalna reakcija dišnih putova**

U astmi kod upalne reakcije prisutne su brojne stanice i medijatori upale. Medijatori su dio unutarstaničnog signalnog puta koji omogućuje stanicama dišnih putova komunikaciju dovodeći ili do sanacije upalne reakcije ili nastanka kronične upale s trajnim oštećenjem tkiva. U alergijskoj upali tri su vrste stanica ključne: eozinofilni granulociti, limfociti T odnosno Th2-stanice i mastociti. Svaka od ovih stanica otpušta pohranjene upalne medijatore kao što su eozinofilni kationski protein (ECP, engl. *Eosinophil Cationic Protein*) iz eozinofilnih granulocita i histamin iz mastocita ili *de novo* stvorene upalne medijatore (leukotrijeni, prostaglandini) i citokine (interleukini). Upalna reakcija se odvija u dvije faze. Nakon udisanja antigena koji pokreće reakciju, dendritične stanice, odnosno stanice za predočavanje antigena (APC, engl. *Antigen Presenting Cells*), predočuju limfocitima T antigen u sklopu molekula drugog razreda glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC-II, engl. *Major Histocompatibility Complex class II*). T-limfociti tipa CD4 prepoznaju antigene pomoću specifičnih T-receptora (TCR, engl. *T cell receptor*) te dolazi do diferencijacije i aktivacije Th limfocita. Subpopulacija pomagačkih limfocita T (Th2-limfociti) produkcijom citokina potiče sintezu protutijela IgE klase u limfocitima B, te aktiviraju eozinofilne

granulocite koji podržavaju alergijsku upalu (Holt 2004). Interleukini (IL) 4 i 13, koje luče aktivirani limfociti T, ključni su u indukciji Th2 imunološkog odgovora, sudjeluju u aktivaciji i proliferaciji limfocita B koji posljedično tome sintetiziraju IgE protutijela specifična za navedeni antigen. Pri ponovnom doticaju s antigenom (sada alergenom) spajanje alergena i specifičnih IgE pričvršćenih na membrani mastocita, makrofaga i bazofilnih granulocita dovodi do pokretanja upalne alergijske reakcije.

#### **1.4.4.1.1. Rana faza IgE posredovane reakcije**

Kada ponovno izlaganje alergenu dovodi do unakrsnog povezivanja najmanje dvije IgE molekule spojene na Fc receptore na membrani mastocita, makrofaga i bazofilnih granulocita u alergične osobe to izaziva rani ili neposredni alergijski odgovor koji karakteriziraju degranulacija ovih stanica i sekrecija niza medijatora kao što su histamin, triptaza, eikosanoidi, i rodovi molekula s reaktivnim kisikom (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) te ekspresija adhezijskih molekula (Rosenwasser, 2007). Ovi medijatori izazivaju kontrakciju glatke muskulature bronha, vazodilataciju i povećanu propusnost krvnih žila tijekom prvih 4-6 sati nakon izlaganja alergenu. Također djeluju kemotaktički na neutrofilne, bazofilne i eozinofilne granulocite te monocite (O'Byrne i sur. 2001). Upalni medijatori aktiviraju i inducibilnu sintetazu dušičnog oksida (iNOS, engl. *inducible isoform Nitric Oxide Synthase*) koja potiče oslobađanje dušičnog oksida (NO) primarno iz epitelnih stanica dišnih putova. Povećana količina NO doprinosi upalnom procesu u astmi (Pijnenburg i sur. 2008).

#### **1.4.4.1.2. Kasna faza IgE posredovane reakcije**

Klasična kasna reakcija razvija se u oko 50% bolesnika 3-12 sati nakon izlaganja alergenu. Karakterizirana je trajnom bronhoopstrukcijom, hiperreaktivnošću bronha i remodeliranjem (Jeffery i sur. 2006, Boulet i sur. 2007). Nekoliko sati nakon izlaganja alergenu TNF- $\alpha$ , kojeg oslobađaju aktivirani mastociti, stimulira ekspresiju vaskularnih adhezijskih molekula na endotelnim stanicama krvnih žila što, u konačnici, rezultira transendotelnom migracijom različitih upalnih stanica. Th2 citokini (IL-3, IL-5 i GM-SCF) omogućuju preživljavanje aktiviranih upalnih stanica u bronhalnom tkivu zahvaljujući reduciranoj apoptozi, ali i posreduju u remodeliranju bronha aktiviranjem mirujućih stanica u ciljnom organu. IL-4 i IL-13 potiču epitelne stanice na proizvodnju transformirajućeg faktora rasta alfa (TGF- $\alpha$ , engl. *Transforming Growth Factor- $\alpha$* ). TGF- $\alpha$  putem autokrinog signalnog mehanizma dovodi do

metaplazije sluznice i proliferacije fibroblasta (Holgate 2007). U isto vrijeme, sekrecija IL-5 od strane Th2 stanica dovodi do daljnje aktivacije i infiltracije eozinofilnih granulocita (Broide 2001). Jednom uspostavljena alergijska reakcija može biti samoodrživa i može uzrokovati kroničnu bolest u genetski predisponiranog pojedinca.

#### **1.4.4.2. Strukturno – funkcionalne promjene**

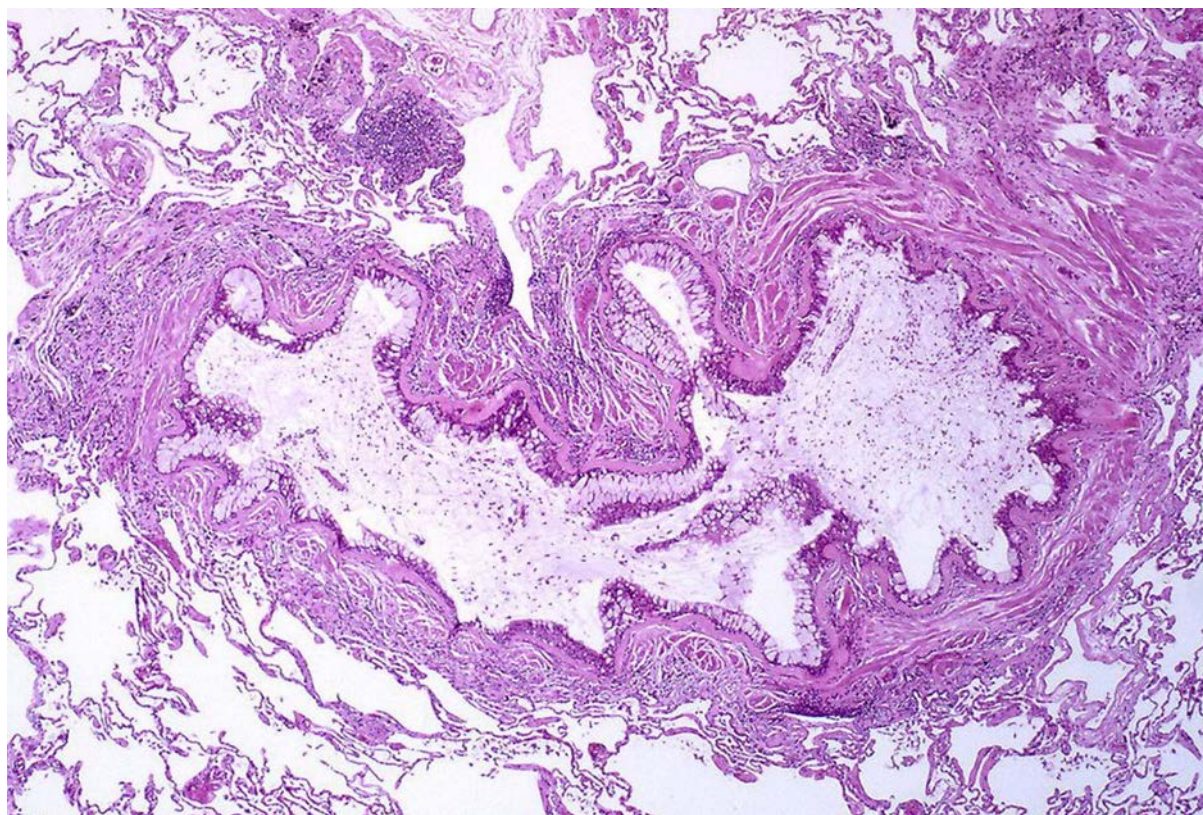
Glavno obilježje većine bolesnika sa simptomima astme je upala bronha, a karakterizira je nakupljanje upalnih stanica, promjene na razini epitela, i otpuštanje mnogih upalnih medijatora. Obilježja upale ovise o pokretaču i dobi, a mogu se razlikovati među fenotipovima astme. U upali sudjeluju eozinofilni granulociti, neutrofilni granulociti i limfociti T, koji infiltriraju epitel bronha (Holt 2004). Neutrofilna upala je povezana s virusnim pokretačima i težinom bolesti (Rosenwasser 2007). Eozinofilna upala ukazuje na atopiju, a odgovorna je i za duljinu trajanja simptoma (O'Byrne i sur. 2001). Uz upalu bronhalne sluznice odvijaju se i ostale promjene u dišnim putovima bolesnika s astmom. To su remodeliranje bronha, bronhoopstrukcija i bronhalna hiperreaktivnost.

#### **1.4.4.3. Remodeliranje bronha**

Jedan od karakteristika astme je i remodeliranje dišnih puteva. Remodeliranje je naziv koji se koristi za strukturne promjene u dišnim putevima koji se ne nalaze kod zdravih osoba (Bergeron i sur. 2010). To je proces koji dovodi do ireverzibilnih promjena u strukturi bronha a nastaje kao posljedica dugotrajne upale dišnih puteva. Taj proces podrazumijeva hipertrofiju mišića, neoangiogenezu i povećanu prokrvljenost, kroničnu infiltraciju upalnim stanicama, hiperplaziju vrčastih stanica, depoziciju kolagena, zadebljanje bazalne membrane i smanjenje elastičnosti zida dišnih putova (Bousquet i sur. 2000). Remodeliranje je osobito prisutno u vanjskom djelu malih dišnih puteva te je karakterizirano pojačanim odlaganjem fibronektina, kolagena I i III te pojačanom ekspresijom matriks metaloproteinaza 1, 2 i 9 (MMP). Promjene u vanjskim dijelovima malih dišnih puteva u bliskoj su vezi s perialveolarnim prostorom te mogu dovesti i do strukturnih promjena u plućnom parenhimu (Hamid 2012).

#### 1.4.4.4. Opstrukcija bronha

Opstrukcija bronha događa se uslijed kontrakcije glatkih mišića, edema i hipersekrecije sluzi. (Hamid 2012). Na histološkim preparatima prereza bronha vidljivo je zadebljanje bazalne membrane epitela, suženje lumena bronha kojeg ispunjava sluzavi eksudat uz vrčaste stanice i metaplaziju (Slika 10). Suženje je uglavnom reverzibilno uz terapiju, a uz tipične promjene kao što su povećanje broja eozinofila i zadebljanje lamine reticularis u bazalnoj membrani epitela, kasnije može doći do zadebljanja mišićnog sloja u stijenci uz povećanje broja žlijezda koje izlučuju sluz. Kod težih slučajeva dolazi do promjena i u samoj građi dišnih putova (Murray, 2015).



*Slika 10. Prerez kroz bronha, opstrukcija lumena bronhiola sluzavim eksudatom i zadebljanom bazalnom membranom epitela u bolesnika s astmom (Preuzeto iz: [http://www.flickr.com/photos/pulmonary\\_pathology/3705143121/](http://www.flickr.com/photos/pulmonary_pathology/3705143121/))*

#### 1.3.4.5. Hiperreaktivnost bronha

Hiperreaktivnost bronha je sklonost dišnih putova sužavanju nakon izlaganja različitim podražajima. Nastaje kao posljedica trajne upale bronhalnog stabla koja se očituje oštećenjem

bronhalnog epitela i prisutnošću upalnih stanica. Inducirana je inhalacijom alergena te aktivacijom neutrofilnih i eozinofilnih granulocita (Kumar i sur. 2005).

#### 1.4.5. Klasifikacija astme

Astma se prema težini kliničke slike, opstrukciji dišnih putova i varijabilnosti plućne funkcije, klasificira u četiri kategorije: povremena, blaga trajna, umjerena trajna i teška trajna astma (Tablica 2). Raspodjela se procjenjuje sukladno učestalosti simptoma, trajanju egzacerbacije, pojavnosti noćnih simptoma, te rezultatima mjerenja plućne funkcije: forsiranog izdisajnog (ekspiracijskog) volumena u 1 sekundi (FEV 1) kao najboljeg pokazatelja protoka i vršnog protoka zraka tj. maksimalne brzine izdaha (PEF).

*Tablica 2. Klasifikacija težine astme prema kliničkim simptomima*

<b>Intermitentna astma</b>	<b>Blaga trajna astma</b>	<b>Umjerena trajna astma</b>	<b>Teška trajna astma</b>
Simptomi manje od jednom tjedno	Simptomi više od jednom tjedno, ali manje od jednom dnevno	Simptomi svakodnevno	Simptomi svakodnevno
Kratke egzacerbacije	Egzacerbacije mogu utjecati na aktivnost ili spavanje	Egzacerbacije mogu utjecati na aktivnost ili spavanje	Česte egzacerbacije
Noćni simptomi ne više od dvaput mjesečno	Noćni simptomi više od dvaput mjesečno	Noćni simptomi više od jednom tjedno Svakodnevno korištenje inhalacijskih kratko djelujućih $\beta$ 2-agonista	Česti simptomi noćne astme Ograničenje fizičke aktivnosti
FEV1 ili PEF $\geq 80\%$  PEF ili FEV1 varijabilnost $< 20\%$	FEV1 ili PEF $\geq 80\%$  PEF ili FEV1 varijabilnost $< 20-30\%$	FEV1 ili PEF $60-80\%$  PEF ili FEV1 varijabilnost $> 30\%$	FEV1 ili PEF $\leq 60\%$  PEF ili FEV1 varijabilnost $> 30\%$

#### **1.4.6. Fenotipovi i endotipovi astme**

Pod pojmom fenotip razumijeva se skup vidljivih i mjerljivih značajki u bolesnika s astmom nastalih kao posljedica ekspresije genotipa i međureakcije s okolišem. Potreba za definiranjem različitih fenotipova astme nametnula se zbog pristupa pravilnoj terapiji astme, no nemamo jasnu i općeprihvaćenu kategorizaciju astme po fenotipu. Također, treba imati u vidu moguću promjenu, a vjerojatno i preklapanje fenotipova astme u bolesnika. Endotipom se smatraju vrste astme koje obilježava molekularna heterogenost nastala kao posljedica različite imunopatogeneze i/ili terapijskog odgovora. Svaki endotip može obuhvaćati više fenotipova astme kao što i određeni fenotipovi mogu biti prisutni u više endotipova.

Podjela astme kao najbolji opis fenotipova astme u odraslih temelji se na ovim obilježjima: 1. pokretaču i/ili okidaču bolesti (npr. alergijski, nealergijski, lijekovi, npr. acetilsalicilna kiselina, infekcije, napor), 2. kliničkoj slici (sipnja kao posljedica virusne infekcije ili ostalih višestrukih okidača bolesti, fenotip obilježen značajnim pogoršanjima, fenotip obilježen ireverzibilnom opstrukcijom dišnih putova) i 3. upalnim biljezima (eozinofilni, neutrofilni, miješani i neupalni fenotip).



## **2. Obrazloženje teme**

Imajući u vidu rasprostranjenost i ozbiljnost astme, a istovremeno i neke mogućnosti prevencije, nameće se zaključak da je važno ustanoviti sve čimbenike rizika koji mogu utjecati na prevenciju razvoja bolesti, pravovremeno dijagnosticiranje i odgovarajuće liječenje te eventualno smanje egzacerbacija bolesti. Još uvijek visoka pojavnost astme stavlja naglasak na istraživanje novih čimbenika rizika za razvoj ove bolesti s ciljem razjašnjenja patogeneze te bržeg prepoznavanja i liječenja.

Inhibitor plazminogen aktivatora-1(PAI-1) je glikoprotein koji regulira fibrinolitički sustav. Povišenje PAI-1 uzrokuje hipofibrinolizu, smanjuje aktivnost matriks metaloproteaza i staničnu adheziju. Ekspresija PAI-1 ovisi o polimorfizmu 4G/5G u promotorskoj regiji gena za PAI-1. Budući da se u plazmi osoba nositelja genotipa 4G/4G nalazi 25% viša koncentracija PAI-1 u odnosu na osobe s genotipom 5G/5G, rezultati istraživanja mogu ukazati da bi varijante gena za PAI-1 mogle biti rizični čimbenik za razvoj astme, posebice u nositelja alela 4G.

Za pojave poremećaja dišne funkcije kao jednog od vodećih javnozdravstvenih problema s kojima se suočava današnje društvo u razvijenim i srednje razvijenim zemljama definirani su mnogi čimbenici rizika. Iako su dosadašnja istraživanja pokazala povezanost ABO sustava krvnih grupa s pojavnosću gastrointestinalnih, kardiovaskularnih bolesti te tumora, u literaturi postoji malo podataka o povezanosti različitih genotipova ABO krvnih grupa kao genetičkog čimbenika i razvoja astme. Usporedbom učestalosti pojavnosti pojedinih ABO alela u zdravoj populaciji i kod ispitanika s poremećajem funkcije ventilacije možemo procijeniti koliko bi pojedini ABO aleli bili mogući rizični čimbenici u razvoju navedenih poremećaja. Ovo istraživanje je pokušaj definiranja značaja povezanosti ABO genotipa krvnih grupa sa pojavnosti astme u našoj populaciji. Rezultati mogu uputiti na ABO genotipizaciju kao dio obveznih pretraga kod sumnji na razvoj astme, a isto tako usmjerenje na pojačavanje preventive kod već postojeće pozitivne obiteljske anamneze vezano uz određenu ABO krvnu grupu.

Poznata je regulacijska uloga serotonina u brojnim fiziološkim i staničnim odgovorima, uključujući i plućnu funkciju. Dosadašnja istraživanja prikazala su vrlo važnu ulogu trombocita i produkata koje oni otpuštaju, kao 5-HT-a, u brojnim upalnim bolestima, uključujući i astmu. 5-HT modulira aktivnost stanica koje su klasično uključene u mehanizam kod astme putem regulacije adhezije, migracije i proizvodnje citokina te kemokina. Istraživanje je pokazalo kako je 5-HT induktor proupalnih citokina (IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-

8/CXCL8) koji imaju važnu ulogu u upalnome odgovoru astmatičnih pacijenata. Uloga serotonina kod astme potvrđena je u nekoliko istraživanja. Postoji sve izgledniji dokaz kako su astmatski napadi potaknuti visokim razinama slobodnog serotonina u plazmi. Simptomatski astmatički pacijenti imaju povišene razine slobodnog serotonina u plazmi u odnosu na asimptomatske pacijente, što dokazuje da je slobodni serotonin pozitivno povezan sa stupnjem težine bolesti i negativno povezan s plućnom funkcijom. Kroz pojačavanje kolinergičke aktivnosti (centralni put) i otpuštanje histamina (periferni put) serotonin uzrokuje bronhokonstrikciju, što predstavlja dodatnu potporu patogenetskoj ulozi 5-HT-a u astmi.

Većina dosad objavljenih istraživanja koje su se bavile povezanosti serotonina i astme bazirale su se na razinama slobodnog serotonina u plazmi ili serumu. Iako u literaturi postoje podaci o mogućoj uključenosti neurogene upale u patofiziologiji astme, točna uloga serotonina nije još uvijek u potpunosti razjašnjena. Razlike u kvantitativnim vrijednostima serotonina kod bolesnika s astmom u odnosu na kontrolnu skupinu može nam biti od pomoći u dijagnostici kao dodatni biomarker kod osoba koje boluju od astme i alergijskog rinitisa.

## **3. Materijali i metode**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Ispitanici

Prvu skupinu ispitanika sačinjavali su bolesnici s klinički i laboratorijski potvrđenom dijagnozom astme. Prikupljeno je, uz njihov potpisani pristanak, 149 uzoraka krvi. Uzorci su prikupljeni u Klinici za plućne bolesti Jordanovac, pri Kliničkom bolničkom centru „Zagreb“ nakon odobrenja Etičkog povjerenstva ustanove. Navedeni bolesnici sačinjavali su ispitivanu skupinu A. U njoj su bile 92 žene i 52 muškaraca u dobi od 18 do 88 godina. Kod bolesnika je uzeta detaljna anamneza o dobi i životnom stilu ispitanika, pozitivnoj obiteljskoj anamnezi, respiratornim problemima u djetinjstvu, određen je okidač koji pokreće astmatski napad, podaci o alergenima koji utječu na tijek bolesti, potrebom za hitnim intervencijama i broju hospitalizacija zbog egzacerbacije bolesti zadnjih godinu dana, komorbiditetu, odnosno prisutnosti drugih bolesti (hipertenzija, *diabetes mellitus*, gastroesofagealna refluksna bolest-GERB, cerebrovaskularne bolesti) i pušenju. Bolesnicima je također određen fenotip astme. Svim ispitanicima s astmom uzet je fizikalni status, učinjeni su testovi plućne funkcije kojim se odredio stupanj težine ventilacijske disfunkcije, učinjen je Ventolin test, FeNO, a od laboratorijskih testova određivanje IgE.

Nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu istraživanje je rađeno na 153 uzorka krvi, zdravih, nesrodnih dobrovoljnih davatelja krvi koji u osobnoj niti obiteljskoj anamnezi nisu imali poremećaj ventilacijske funkcije pluća. Davatelji su građani Republike Hrvatske, starosne dobi usporedive s ispitivanom skupinom bolesnika. Prije uzimanja uzorka krvi potpisom su potvrdili pristanak za ispitivanje koje smo planirali učiniti. Uzorci krvi dobrovoljnih davatelja predstavljaju kontrolnu populacijsku skupinu u ovom istraživanju (skupina K). Kontrolnu skupinu sačinjavali su 82 žene i 71 muškarca u dobi od 23 do 73 godina.

Svim ispitanicima iz skupina bolesnika (skupine A) i iz kontrolne skupine (skupina K) uzet je uzorak od 8,5 mL periferne krvi u epruvetu (Vacutainer<sup>®</sup> Plastic PPT) s antikoagulansom poliesterskim polimernim gelom sa suhim K<sub>2</sub>EDTA (Etilen-diamino-tetra-octena kiselina) (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*).

Uzorci su pripremani za molekularno testiranje u Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu. Nakon stajanja na sobnoj temperaturi najviše do

2 sata centrifugirani su 10 minuta na 2500 okretaja/min. Nakon toga su zamrznuti na temperaturi od -80 °C. Testiranje je provedeno u više serija po desetak uzoraka.

### **3.1.2. Uređaji i kemikalije**

U Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Odjelu za molekularnu dijagnostiku provedeno je cjelokupno laboratorijsko ispitivanje sa standardno korištenim priborom i na postojećim uređajima.

#### **3.1.2.1. Laboratorijski uređaji**

Svi korišteni laboratorijski uređaji su uredno validirani sukladno sustavu osiguranja kvalitete. U Tablici 3 nabrojani su laboratorijski uređaji:

Tablica 3. Popis korištenih uređaja, njihove namjene i proizvođača

UREĐAJ	NAMJENA	PROIZVOĐAČ
QIAcube uređaj	uređaj za automatsku izolaciju nukleinskih kiselina	Qiagen, Njemačka
PCR uređaji ABI 2700 i ABI 9700	uređaji za umnožavanje genskih ulomaka	Applied Biosystems, SAD
AB 7500 real-time PCR System	izvođenje RT-PCR	Applied Biosystems, SAD
Elchrom sustav	izvođenje elektroforeze	Elchrom, Švicarska
Kodak kamera	slikanje gelova nakon elektroforeze	Kodak, SAD
Transiluminator	obasjavanje UV svjetlosti	
Centrifuge	centrifugiranje uzoraka	Eppendorf 5415R, Eppendorf, Njemačka
Termoblok	inkubacija uzoraka	Eppendorf, Njemačka
Mučkalica	izolacija uzoraka	Eppendorf, Njemačka
Sterilni kabineti s laminarnim protokom zraka Hereaus HS 12/2 Iskra pio LFVP 9	odvajanje uzoraka i izrada reakcijske smjese za polimerazne lančane reakcije i RT-PCR	Thermolectron LED GmbH, Njemačka Iskra PIO d.o.o, Slovenija

### **3.1.2.2. Kemikalije i pomoćna sredstva**

Kit koji je korišten za izolaciju nukleinskih kiselina:

QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen, Njemačka)

Za amplifikaciju u PCR-SSP metodi korištena je:

Taq DNA polimeraza (250 U) (Qiagen, Njemačka)

dNTP (100 mM) (Applied Biosystems, SAD)

Za elektroforezu umnoženih PCR produkata uporabljen je komercijalni gel:

PCR Check IT Wide Mini 4x25 gel with EtBr (AL-Labortechnik, Austrija)

Za kontrolu veličine PCR produkta korišten je molekularni biljeg od 100 pb (1 µg/µL)

100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Za real-time PCP određivanje polimorfizma PAI-1 4G/5G korišteni su:

2x Univerzalni master mix

Custom TaqMan SNP genotyping assay za PAI-1 (Applied Biosystems, SAD)

Od standardnog laboratorijskog pribora korišteni su:

Vacutainer epruvete s K<sub>3</sub>EDTA (BD Vacutainer, UK) za uzimanje uzoraka krvi

filter tipsovi od 10, 100 i 1000 µL i pipete (Eppendorf, Njemačka)

tipsovi bez filtera za nanošenje na elektroforezu 100 µL (Sarstedt, Njemačka)

epruvete od 2 mL za izradu PCR smjese (Eppendorf, Njemačka)

stripovi od po 8 jažica i poklopci (Applied Biosystems, SAD)

### **3.1.2.3. Otopine**

U ispitivanju su korištene slijedeće otopine i njihovi proizvođači:

Bidestilirana voda, Aqua pro injectione (HZTM, Hrvatska)

Etanol, 70 i 100% (Kemika, Hrvatska)

Etidij bromid 10 mg/mL (Sigma, Austrija)

Pufer za nanošenje uzoraka na gel 5X (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Pufer za elektroforezu 1xTAE sadrži 2% 40XTAE (Kemika, Hrvatska; Sigma, Austrija)



## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija genomske DNA na uređaju QIAcube

Iz pune krvi izolirana je genomska DNA visokog stupnja čistoće i prinosa na QIAcube uređaju (Qiagen, Njemačka). QIAcube uređaj je robotska radna stanica za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina i koristi već postojeće standardne QIAgen kitove za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama (silika gel membrane) i njihove protokole. U našem ispitivanju korišten je protokol QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen, Njemačka) za izolaciju genomske DNA iz pune krvi.

Lizirajući pufer (AL) vrši lizu uzorka pri čemu pH i ionska jakost lizata sprječavaju vezanje interferirajućih tvari na membranu. Enzimskom reakcijom pomoću proteinaze K se uklanjaju stanični proteini i druge makromolekule koje bi mogle inhibirati ili ometati PCR reakciju. DNA iz liziranog uzorka se pomoću apsolutnog etanola adsorbira na QIAamp silika-gel membranu QIAamp spin kolone. Potom se DNA koja je vezana na membranu pročišćava dvostrukim ispiranjem pomoću dva pufera (AW1 i AW2), nakon čega se eluira s membrane puferom za eluciju (AE). Izolirana genomska DNA se može zatim umnažati PCR-reakcijom. Za izolaciju DNA upotrijebljavali smo volumen EDTA uzorka od 200  $\mu\text{L}$  pomoću komercijalnog kita QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen, Njemačka). Volumen dodane proteinaze K ovisio je o broju uzoraka koji su uključeni u sustav izolacije. Proces automatizirane izolacije DNA za 12 uzoraka na uređaju QIAcube traje 90 minuta. Izolirana DNA eluirana je u 200  $\mu\text{L}$  pufera za eluciju AE.

### 3.2.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Pod lančanom reakcijom polimeraze (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) podrazumijeva se metoda kojom se u *in vitro* uvjetima relativno kratki dio DNA slijeda umnožava u veliki broj identičnih kopija.

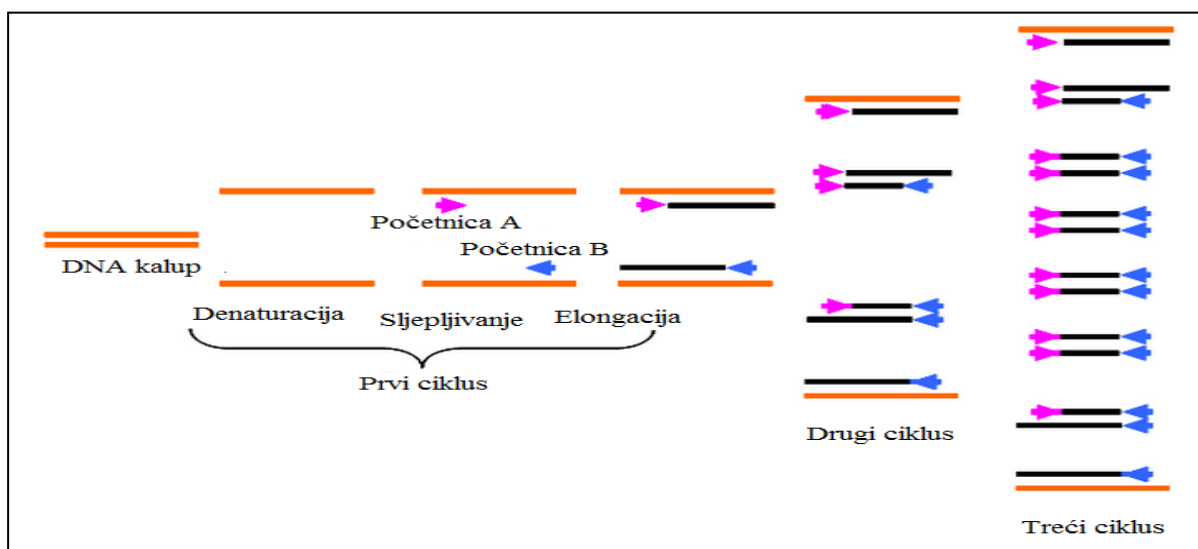
PCR reakcija temelji se na djelovanju DNA (Taq) polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi komplementarni lanac, pri čemu veličina sintetiziranog ulomka DNA molekule odgovara duljini koju omeđuju izabrane početnice.

Reakcijska smjesa za PCR reakciju sadrži kalup DNA, par specifičnih početnica, odgovarajući pufer, smjesu deoksiribonukleotida (dNTP-a) u jednakom omjeru (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), magnezijeve ione i termostabilnu DNA polimerazu i bidestiliranu vodu.

Osnovni koraci svih PCR protokola su:

1. Denaturacija dvolančane DNA u dva jednolančana lanca na temperaturi 94-96 °C tijekom 3-5 minuta
2. Specifično vezanje početnica na komplementarne dijelove DNA pri temperaturi 50-60 °C
3. Sinteza komplementarnog lanca, odnosno produljivanje DNA lanca na 72 °C

Kontinuiranim ponavljanjem denaturacije, vezanja početnica na kalup i produljivanja DNA slijeda tijekom 20-40 ciklusa umnožavanja količina umnožene ciljane DNA eksponencijalno raste pa se dobiveni slijed nukleotida dalje može upotrijebiti u molekularnoj dijagnostici (Slika 11).



Slika 11. PCR reakcija (Preuzeto iz: [www.slideshare.net](http://www.slideshare.net))

### 3.2.3. ABO genotipizacija pomoću PCR-SSP metode (alel specifični PCR)

Prilikom određivanja ABO genotipova bolesnika i DDK korištena je PCR-SSP (od engl. *Sequence Specific Primers*) metoda, preuzeta iz literature (Gassner i sur. 1996), a modificirana u laboratoriju Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.

PCR-SSP metoda je podvrsta polimerazne lančane reakcije, a metoda se zasniva na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje u jednoj bazi na 3' kraju DNA ishodnice.

Dakle, kada je nukleotid na 3' kraju ishodnice komplementaran slijedu na kraju alela, doći će do umnožavanja (amplifikacije) DNA slijeda. Kada 3' nukleotid ishodnice nije komplementaran kalupu, neće doći do umnožavanja DNA slijeda ili će se umnožiti u vrlo maloj količini.

Svim ispitanicima određivani su glavni ABO alelni geni :O<sup>1</sup>, O<sup>2</sup>, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> i B pomoću lančane reakcije polimerazom, uz uporabu 8 parova početnica specifičnih za određene slijedove pojedinih ABO alela u osam paralelnih PCR reakcija. U svakoj SSP reakciji istodobno je napravljeno umnožavanje ulomka gena za humani hormon rasta (HGH, engl. *Human growth hormon*) kao interna pozitivna kontrola, da bi se potvrdila prisutnost DNA u reakcijskoj smjesi.

Korištene početnice i veličine produkata navedene su u Tablici 4.

Tablica 4. Početnice korištene za ABO genotipizaciju

Alel	Naziv	Sekvenca početnice	Veličina umnoženog PCR ulomka (pb)
<b>0<sup>1</sup></b>	01-r	5'-ATA TAT ATG GCA AAC ACA GTT AAC CCA ATG-3'	
	01-a	5'-TTA AGT GGA AGG ATG TCC TCG TCG TA-3'	1/139
	01-b	5'-TAA GTG GAA GGA TGT CCT CGT CGT G-3'	2/137
<b>0<sup>2</sup></b>	02-r	5'-AGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC- 3'	
	02-a	5'-TCG ACC CCC CGA AGA AGC T- 3'	3/194
	02-b	5'-CGA CCC CCC GAA GAA GCC- 3'	4/193
<b>B</b>	B-r	5'- AGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC- 3'	
	B-a	5'-ATC GAC CCC CCG AAG AGC G- 3'	5/195
	B-b	5'-CCG ACC CCC CGA AGA GCC- 3'	6/194
<b>A<sup>2</sup></b>	A2-r/2	5'-GTG TGT GTG ATT TGA GGT GGG GAC- 3'	
	A2-7	5'-CAG GCG GTC CGG AAG CG- 3'	7/172
	A2-8	5'- CAG GCG GTC CGG AAC ACG- 3'	8/173
	HGH-a	5'-TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A- 3'	434
	HGH-b	5'-CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC- 3'	

Nakon umnožavanja, otkrivanje produkata PCR-SSP napravljeno je pomoću elektroforeze na gelovima s etidij bromidom, pri naponu od 60-100 V (Sambrook 1989). Etidij bromid je spoj koja se umrežava u niti DNA koja obasjana UV svjetlom svijetli. Nakon završene elektroforeze, gel se obasjava pod UV transiluminatorom, svjetlošću valne duljine 254 nm, pri čemu se specifični umnoženi ulomci DNA vide kao svijetle vrpce, koje se dokumentiraju pomoću fotografiranja kamerom. Dobivene kombinacije alel-specifičnog PCR- a (prisutnost ili odsutnost umnožene DNA-vrpce za pojedini ABO genotip) očitane su iz Tablice 5. ABO aleli i genotipovi imenovani su po nomenklaturi prema podacima Yamamota (Yamamoto 1995).

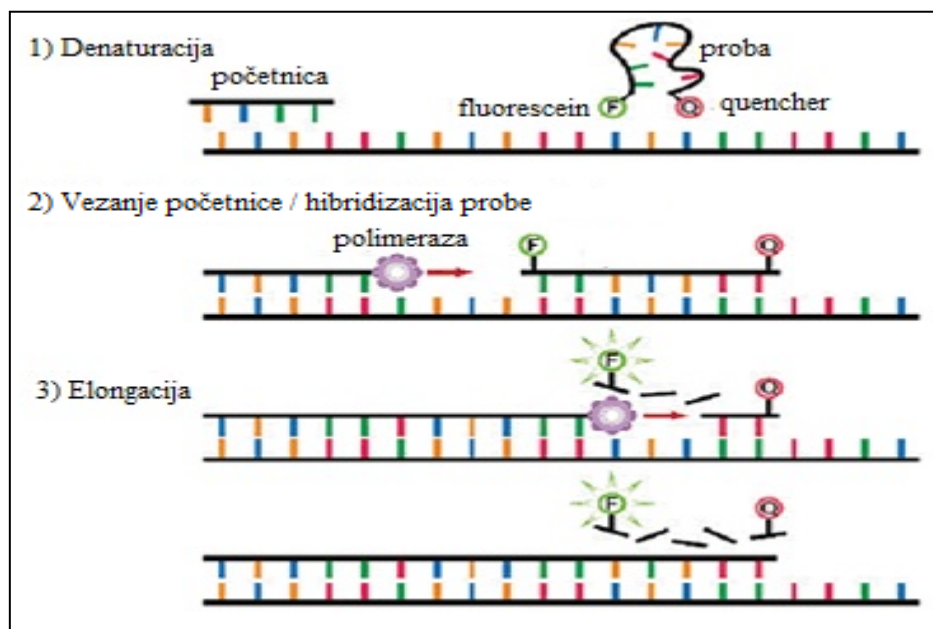
Tablica 5. Tablica za očitavanje ABO genotipa

Reakcija br.	1	2	3	4	5	6	7	8		
PCR produkt (pb)	139	137	194	193	195	194	172	173		
Specifičnost	O <sup>1</sup>	non O <sup>1</sup>	O <sup>2</sup>	non O <sup>2</sup>	B	non B	A <sup>2</sup>	non A <sup>2</sup>		
Rezultati:									Genotip:	Fenotip:
Pozicija 1-pozitivna (O <sup>1</sup> )	+	-	-	+	-	+	-	+	O1O1	O
	+	+	+	+	-	+	-	+	O1O2	O
	+	+	-	+	+	+	-	+	O1B	B
	+	+	-	+	-	+	-	+	O1A1	A
	+	+	-	+	-	+	+	+	O1A2	A
Pozicija 3-pozitivna (O <sup>2</sup> )	-	+	+	-	-	+	-	+	O2O2	O
	-	+	+	-	+	+	-	+	O2B	B
	-	+	+	+	-	+	-	+	O2A1	A
	-	+	+	+	-	+	+	+	O2A2	A
Pozicija 5-pozitivna (B)	-	+	-	-	+	-	-	+	BB	B
	-	+	-	+	+	+	-	+	A1B	AB
	-	+	-	+	+	+	+	+	A2B	AB
Pozicije 2/4/6 poz. (non O <sup>1</sup> /O <sup>2</sup> /B)	-	+	-	+	-	+	-	+	A1A1	A
	-	+	-	+	-	+	+	+	A1A2	A
	-	+	-	+	-	+	+	-	A2A2	A

### 3.2.4. Real-time PCR metoda (PCR u „realnom“ vremenu)

Real-time PCR (RT-PCR) metoda kao inačica klasičnog PCR-a podrazumijeva praćenje PCR umnožavanja tijekom cijele reakcije (on-line PCR, kinetički PCR), što predstavlja veliku prednost u odnosu na klasičnu PCR reakciju završne faze pomoću agaroznih gelova, a visoka osjetljivost metode postignuta je pomoću fluorescentnih proba i početnica.

Umnožavanje DNA prati se preko ugradnje obilježenih početnica u PCR produkt, pri čemu se generira porast intenziteta fluorescencije. Real-time TaqMan PCR tehnologija koristi dvostruko označenu fluorescentnu probu. Naime, reporter boja koja emitira fluorescentnu svjetlost vezana je za 5' kraj TaqMan probe, dok je prigušivač boje (engl. *Quencher*; onaj koji gasi) vezan za 3' kraj. U fazi hlađenja nakon denaturacije DNA kada se za ciljni dio DNA vežu neobilježene početnice, dolazi i do vezanja TaqMan probe za specifičnu regiju DNA. Potom Taq polimeraza dodaje nukleotide 3'-5' polimeraznom aktivnošću pri čemu istovremeno dolazi i do uklanjanja TaqMan probe sa kalupa DNA zbog 5'-3' egzonukleazne aktivnosti. Ovim procesom se prigušivač fluorescencije udaljava od reporter boje, te ona emitira fluorescenciju jer se prigušivač više ne nalazi na odgovarajućoj udaljenosti od reportera i nema blokade emisije. Real-time metoda koristi se u analizi ekspresije gena, i u analizi SNP-ova (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) tj. alelnoj diskriminaciji.



Slika 12. Real-time TaqMan PCR tehnologija (Preuzeto iz: [www.gibthai.com](http://www.gibthai.com))

### 3.2.5. Alelna diskriminacija za određivanje genotipa

Za alelnu diskriminaciju tj. određivanje genotipa pomoću RT-PCR metode koriste se dvije TaqMan probe koje se razlikuju u jednoj ciljnoj bazi i obilježene su različitim bojama, te emitiraju različitu fluorescenciju. Ukoliko RT-PCR uređaj detektira jednu boju – prisutan je jedan alel; ukoliko detektira drugu boju – prisutan je drugi alel; dok detekcija obje boje istovremeno označava prisustvo heterozigota.

#### 3.2.5.1. Alelna diskriminacija za ispitivanje 4G/5G polimorfizma

U kabinetu za sterilni rad s laminarnim protokom zraka je pripremljena reakcijska smjesa za real-time PCR na uređaju AB 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems, SAD). Reakcijska smjesa sadrži:

12,5 µL 2x Univerzalni master mix	}	22 µL+ 3 µL DNA kalupa
0,6 µL Custom TaqMan SNP genotyping assay za PAI-1		
8,9 µL bidestilirane vode		

Svaki uzorak je bio ukupnog volumena 25 µL. Napravljena je reakcijska smjesa za 20 uzoraka te se u svaku PCR epruvetu otpipetiralo po 22 µL. Potom je u svaku epruvetu dodano po 3 µL uzorka genomske DNA. U negativnu kontrolu je umjesto genomske DNA dodano 3 µL bidestilirane vode. U svakoj seriji od 20 uzoraka bile su po tri pozitivne kontrole u koje je dodano po 1 µL uzorka heterozigota (4G/5G), odnosno 1 µL uzorka homozigota (4G/4G i 5G/5G) za PAI-1 polimorfizam. Epruvete su potom začepljene stavljene u uređaj AB 7500 real-time system, odabran program za umnožavanje.

#### 3.2.5.2. Program real-time umnožavanja PAI-1 4G/5G

HOLD 50 °C 2 min -aktivacija enzima AmpErase uracil-N-glycosylase

HOLD 95 °C 10 min -aktivacija AmpliTaq Gold enzima

40 ciklusa umnožavanja:

95 °C 15 sek, denaturacija

60 °C 1 min, vezanje primera i ekstenzija lanca

detekcija fluorescencije na 60 °C



### **3.2.5.3. Alelna diskriminacija na temelju dobivene fluorescencije**

Na temelju umnožavanja, tj. porasta krivulje fluorescencije, real-time PCR produkti razvrstavaju se u grafu automatski na homozigote (4G/4G i 5G/5G za PAI-1 polimorfizam) uzduž horizontalne, odnosno vertikalne osi; heterozigote (4G/5G za PAI-1 polimorfizam) dijagonalno u odnosu na negativnu kontrolu umnožavanja (bez fluorescencije) na dnu lijevog kuta grafa.

## **3.3. Određivanje razine serotonina**

Uzorak krvi (8 mL) za određivanje razine serotonina trombocita uzme se u plastičnu špricu koja je sadržavala 2 mL ACD antikoagulansa. Koncentracije serotonina u trombocitima odredi se spektrofotometrijskom metodom prema (Muck-Seler i sur., 2002). Ukratko, trombociti se izdvoje pomoću centrifugiranja cijele krvi na plazmu koja je bogata trombocitima i razbiju se sonifikacijom. Uzorci standarda, negativne kontrole (voda) i trombocitnih sonifikata analiziraju se u duplikatima. Svi su se uzorci deproteinizirali s 1 mL 10%-tne otopine ZnSO<sub>4</sub> te s 0,5 mL otopine 1N NaOH. Za pripremu fluorofora u deproteinizirane uzorke dodano je 0,2 mL 0,1%-tnog L-cisteina te 1,2 mL 0,05%-tnog ortoftalaldehida. Mjerenje fluorescencije serotonina izvodi se na 'Varian Cary Eclipse' spektrometrijskom fluorimetru (Varian Optical Spectroscopy Instruments, Mulgrave, Australia) na valnim duljinama od 345 i 484 nm ekscitacije (ili pobuđivanja) i emisije. Razine proteina trombocita određene su fotometrijskom metodom (Lowry i sur. 1951).

## **3.4. Testovi plućne funkcije**

### **3.4.1. Spirometrija**

Spirometrija je objektivna, neinvazivna i reproducibilna pretraga, osjetljiva na rane promjene u plućnoj funkciji i podrazumijeva osnovne testove plućne funkcije koji mjere udahnuti i izdahnuti zrak. Koristi se za otkrivanje prisutnosti ili isključivanje plućnih bolesti, utvrđivanja stupnja oštećenja plućne funkcije, kao i za monitoriranje učinaka profesionalne/okolišne izloženosti štetnim agensima i za određivanje učinaka lijekova (Pellegrino i sur. 2005).

Prije izvođenja pretrage provjerava se kalibracija uređaja, odnosno očitavaju li se ispravne vrijednosti volumena zraka, uštrcavanjem poznatog volumena zraka špricama i provjerom

očitanje vrijednosti. Ispitaniku se uzimaju osobni podatci (ime, prezime, spol, dob i rasa), mjeri visina (ili procjenjuje prema rasponu ruku) i težina. Prije testiranja reverzibilnosti dišnih puteva ispitanik mora biti bez lijekova koji djeluju na dišne puteve (6 sati za kratkodjelujuće bronhodilatatore i 24 sata za dugodjelujuće). Ispitanik mora imati uspravan stav prilikom izvođenja pretrage: mora sjediti uspravno, neprekriženih nogu, stopalima širokom površinom dodirivati pod. Mora se olabaviti bilo kakav tijesan komad odjeće, a zubne proteze se ne vade.

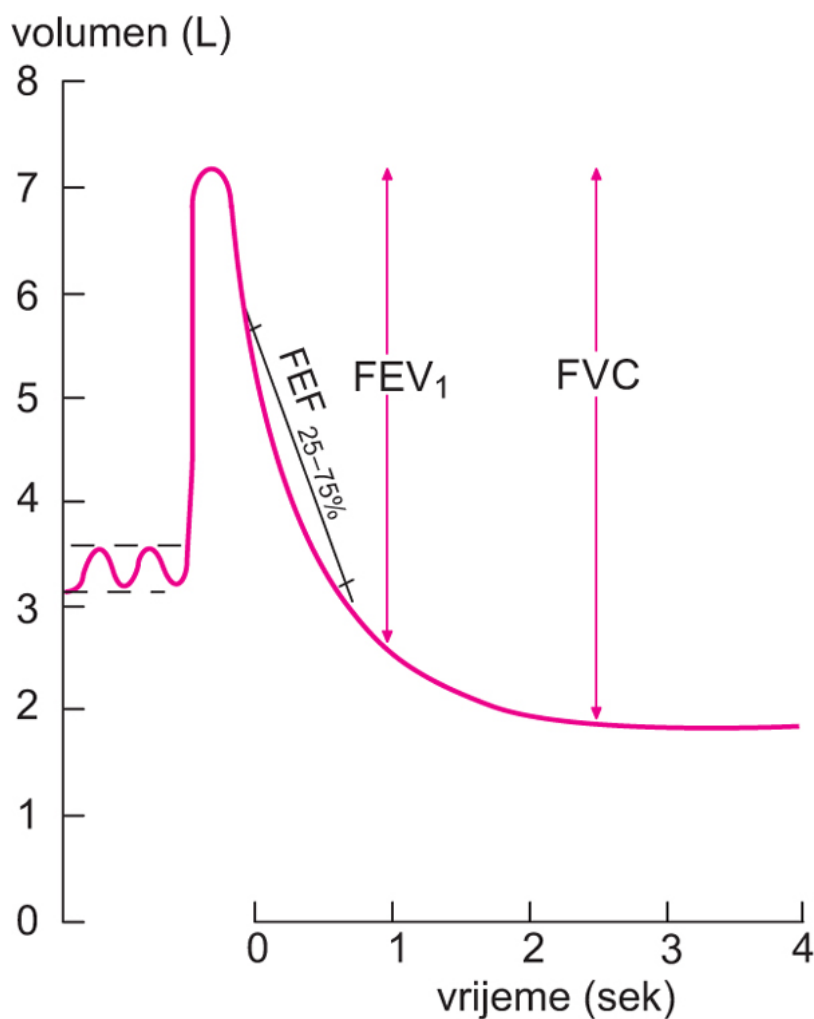
Spirometrijom smo u ispitanika mjerili slijedeće parametre: forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi (FEV1), forsirani vitalni kapacitet (FVC), FEV1/FVC omjer i vršni izdisajni protok (PEF). Mjerenja vršena na aparatu MasterScreen PFT, Njemačka.

Za mjerenje forsiranog izdisajnog volumena ispitanika se zamoli da prvo napravi nekoliko normalnih udisaja, pa onda duboki udisaj koristeći usni dio spirometra, koji je popraćen daljnjim bržim, punim udisajima. Alternativno, ispitanik može uzeti puni udisaj i tijesno ustima obuhvatiti usni dio uređaja, prije nego napravi puni izdisaj. Isto tako, ispitanik može prvo u potpunosti isprazniti pluća, a zatim napraviti brzi puni udisaj koji je popraćen punim izdisajem. Slijedeće tehnike mogu biti korisne za pacijente koji mogu postići veliki udah nakon izdisanja. Za FVC i FEV1 ispitanik maksimalno duboko udahne pa izdiše najjače i najbrže što može i nastavlja sve dok ima zraka u plućima. PEF se dobija iz FEV1 i FVC. Prilikom izvođenja spirometrije neophodno je korištenje kvačica za nos.

Astma se dijagnosticira ispitivanjem reverzibilnosti opstrukcije dišnih puteva korištenjem spirometra (MasterScreen PTF, Njemačka).

Spirometrijski nalazi se moraju interpretirati isključivo usporedbom s referentnim ili procijenjenim vrijednostima, uzimajući u obzir 4 glavne odrednice (dob, spol, visina, rasa). Normalan nalaz u većini slučajeva podrazumijeva vrijednost FEV1 koja je  $\geq 80$  % od predviđene vrijednosti.

Forsiranom spirometrijom kvantitativno se određuje udisajni (inspiratorni) i izdisajni (ekspiratorni) protok zraka. Nosnice ispitanika moraju biti stisnute (zatvorene) štipaljkom. Ekspiratorni protok se mjeri tako da ispitanik udiše što dublje može (usne moraju biti dobro priljubljene uz usnik), a izdiše snažno i potpuno što je moguće brže u aparat koji bilježi volumen izdahnutog zraka (forsirani vitalni kapacitet - FVC) i volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi (forsirani ekspiratorni volumen u 1 sekundi - FEV1) (Slika 13).



*Slika 13. Normalan spirometrijski nalaz (Preuzeto iz: MDS)*

FEV<sub>1</sub> = forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi forsiranog vitalnog kapaciteta; FEF 25–75% = forsiran ekspiratorni protok tijekom ekspiracije 25–75% od FVC; FVC = forsirani vitalni kapacitet (maksimalna količina zraka snažno izdahnutu nakon maksimalnog udaha).

### 3.4.2. Mjerenje respiratornih plinova

Respiratorni plinovi u mirovanju rade se iglenom punkcijom arterijske krvi, najčešće iz radijalne ili kubitalne arterije, iz koje se dobiju parametri parcijalnog tlaka kisika pO<sub>2</sub>, parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida pCO<sub>2</sub>, saturacija hemoglobina kisikom, acido bazni status krvi.

Mjerenje koncentracije dušičnog monoksida u izdahnutom zraku (FENO, engl. *Fraction of exhaled nitric oxide measurements*) test je za dokazivanje upale bronhalne sluznice. Radi se o vrlo jednostavnoj i brznoj pretrazi. Otpušteni dušični monoksid prezentira se brzinom izdahnutog dušičnog monoksida (VNO), a izračunava se kao umnožak koncentracije dušičnog monoksida u nL/L i brzine ekspiratornog protoka izražene u L/min:  $VNO(nL/min) = NO(nL/L) \times \text{brzina protoka (L/min)}$ . Mjerenje izdahnutog dušičnog monoksida učinjeno je po preporukama ATS/ERS (189) na aparatu NiOX (Aerocrine, Švedska) te izraženo u ppb-ima (dijelova na milijardu).

### **3.4.3. Mjerenje ukupnog imunoglobulina E (uIgE)**

Laboratorijska mjerenja ukupnog imunoglobulina E (uIgE) izvršena su iz uzoraka periferne krvi dobivenim venepunkcijom.

Kvantitativno određivanje se vrši iz uzoraka periferne krvi dobivenim venepunkcijom koji su od uzimanja do testiranja čuvani na temperaturi od 2 do 8°C, a svi su obrađeni unutar 2 do 3 dana na analizatoru Immulite 2000 Systems Analysers (Abbott, USA).

Koncentracija ukupnog IgE određivana je fluoro-enzim-imunokemijskom metodom (FEIA, Fluoro Enzyme Immuno Assay) uz inkubaciju od 30 minuta. Alergen iz reagensa koji je kovalentno vezan na nosač specifično reagira s IgE-om (ukupnim ili specifičnim) iz seruma ispitanika. Slijedi ispiranje IgE-a, te dodavanje monoklonalnog mišjeg anti-IgE protutijela obilježenog s beta-galaktozidazom. Na kraju se dodaje supstrat 4-metil-umbeliferil-beta-galaktozid i mjeri fluorescencija. Ona je razmjerna koncentraciji ukupnog IgE-a u ispitivanom uzorku. Metoda je standardizirana prema Sekundarnom referentnom pripravku Svjetske zdravstvene organizacije (2nd WHO International Reference Preparation of Human Serum Immunoglobulin E, IRP 75/502).

### 3.5. Statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. U analizi su se koristile metode deskriptivne statistike, te su se kategorijske i nominalne varijable prikazivale kroz apsolutne frekvencije i odgovarajuće udjele, dok su se kvantitativne vrijednosti prikazale kroz medijane i interkvartilne raspone. Normalnost raspodjele podataka analizirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom te su se shodno dobivenim rezultatima pojedinih upitnika, ali i malom uzorku u daljnjoj statističkoj analizi koristili neparametrijski statistički testovi.

Razlike u kategorijskim varijablama između ispitivane i kontrolne skupine, odnosno ABO i PAI grupa analizirane su  $X^2$  testom, dok je Fisherov test korišten u analizi statističke značajnosti kada je barem jedna frekvencija u kontingencijskoj tablici bila manja od 5. Razlike u kvantitativnim varijablama analizirale su se Kruskal-Wallisovim testom. Izračunati su Spearmanovi korelacijski koeficijenti između pojedinih kvantitativnih vrijednosti i razine serotonina u ispitivanoj skupini astmatičara.

Binarna logistička regresija je provedena za procjenu utjecaja PAI-1 4G/5G genotipa, dobi i spola na vjerojatnost da astmatičari imaju pozitivne simptome alergijskog rinitisa. Odnos između učestalosti PAI-1 genotipova u odnosu na očekivane populacijske frekvencije analiziran je pomoću Hardy-Weinberg ravnoteže (*Deriving genotypic and allelic frequencies*, <http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc431/popgen/popgen2.htm>).

Sve *P* vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 23 ([www.spss.com](http://www.spss.com)).

## **4. Rezultati**

#### 4.1. Rezultati usporedbe skupina bolesnika i kontrolne skupine

U istraživanju su obuhvaćene dvije skupine ispitanika. Jednu (A) su sačinjavali bolesnici s dijagnosticiranom astmom, drugu (K), kontrolnu - zdravi dobrovoljni davatelji krvi koji u obiteljskoj anamnezi nemaju alergijskih i pulmoloških bolesti.

Usporedili smo zajedničke rezultate ispitivanja skupine A (bolesnici s bronhalnom astmom) s rezultatima dobivenim u kontrolnoj skupini (K). U skupini bolesnika bilo je ukupno 149 ispitanika, a u kontrolnoj 153.

Razvrstavanjem podataka prema spolu i dobi (Tablica 6) vidljiva je veća zastupljenost žena (61,7%) u odnosu na skupinu muškaraca (38,3%) među bolesnicima. Omjer u kontrolnoj skupini je također na strani žena (59,4%). Kontrolnu skupinu sačinjavali su mlađi ispitanici u interkvartalnom rasponu od 34,5 do 50 godina, dok je u ispitivanoj skupini taj raspon od 40 do 70 godina.

**Tablica 6.** Podaci o spolu i dobi kod skupine bolesnika i kontrolne skupine

	Skupina		P X <sup>2</sup> test
	Ispitivana n=149	Kontrolna n=153	
Muški: n (%)	57 (38,3%)	71 (46,4%)	0,152
Ženski: n (%)	92 (61,7%)	82 (53,6%)	
Dob (godine): medijan (interkvartilni raspon)	60,0 (40,0-70,0)	43,0 (34,5-53,0)	<0,001

U Tablici 7 prikazana je raspodjela krvnih grupa bolesnika i kontrolne skupine prema ABO fenotipu i genotipu. Među bolesnicima je najzastupljenija A krvna grupa. Vodeći genotip je O1O1 čiji su nositelji zastupljeni s 27,5%, dok je u kontrolnoj skupini najviše nositelja također O1O1 genotipa (30,1%). U fenotipskoj A krvnoj grupi najzastupljeniji je genotip O1A1 kod bolesnika (22,8%) koji je također najzastupljeniji i u kontrolnoj skupini (25,5%). U fenotipskoj B krvnoj grupi najzastupljeniji je genotip O1B1 i u skupini bolesnika (16,8%) i u kontrolnoj skupini (17,6%). Kod nositelja krvne grupe AB češće je zastupljen A1B genotip u odnosu na A2B genotip i kod bolesnika i kod ispitanika iz kontrolne skupine.

*Tablica 7. ABO genotipovi kod skupine bolesnika i kontrolne skupine*

ABO fenotip	ABO genotip	Ispitivana skupina		Kontrolna skupina		P X <sup>2</sup> test
		N	%	N	%	
A	A1A1	4	2,7%	6	3,9%	0,167
	A1A2	3	2,0%	1	0,7%	
	A2A2	1	0,7%	0	0,0%	
	O1A1	34	22,8%	39	25,5%	
	O1A2	17	11,4%	6	3,9%	
	O2A1	2	1,3%	2	1,3%	
B	O1B	25	16,8%	27	17,6%	0,135
	O2B	2	1,3%	0	0,0%	
	BB	0	0,0%	2	1,3%	
AB	A1B	9	6,0%	12	7,8%	0,756
	A2B	3	2,0%	3	2,0%	
O	O1O1	41	27,5%	46	30,1%	0,624
	O1O2	8	5,4%	8	5,2%	
	O2O2	0	0,0%	1	0,7%	



Ispitanicima u ispitivanoj i kontrolnoj skupini odredili smo genotipove inhibitora plazminogen aktivatora-1 (PAI-1). Usporedni rezultati njihove zastupljenosti prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8 prikazuje razlike u raspodjeli PAI-1 genotipova 4G/4G, 4G/5G i 5G/5G između ispitivane i kontrolne skupine. Razlike nisu bile statistički značajne ( $P=0,152$ ), odnosno najzastupljeniji PAI-1 genotip u obje skupine bio je 4G/5G: 83 (55,7%) u ispitivanoj skupini, odnosno 70 (45,8%) u kontrolnoj skupini. Najmanje zastupljen je genotip 5G/5G i u jednoj i u drugoj skupini i to nešto iznad 20%.

**Tablica 8.** Statistička analiza usporedbe PAI-1 genotipova 4G/4G, 4G/5G i 5G/5G u ispitivanim skupinama

		Skupina				P X <sup>2</sup> test
		Ispitivana n=149		Kontrolna n=153		
		N	%	N	%	
PAI-1	4G/4G	35	23,5%	50	32,7%	0,152
	4G/5G	83	55,7%	70	45,8%	
	5G/5G	31	20,8%	33	21,6%	

Ispitanicima u obje skupine određivali smo razinu serotonina. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9 prikazuju razlike u razinama serotonina između ispitivane i kontrolne skupine. Ispitivana skupina astmatičara ima značajno niže razine serotonina u odnosu na kontrolu ( $P=0,018$ ).

**Tablica 9.** Statistička analiza razlike u razinama serotonina između ispitivane i kontrolne skupine

Skupina	N	Min	Max	Centile			P	
				25.	Medijan	75.		
Serotonin	Ispitivana	137	0,13	2,46	0,78	1,09	1,44	0,018
	Kontrolna	89	0,45	4,93	0,91	1,20	1,75	

Indeks tjelesne mase određen je svim ispitanicima u ispitivanoj i kontrolnoj skupini, a dobiveni rezultati i njihova usporedba prikazani su u Tablici 10.

Statistička analiza razlike u razinama indeksa tjelesne mase između ispitivane i kontrolne skupine (Tablica 10) ukazuju da je ispitivana skupina imala značajno veći ITM ( $P=0,004$ )

**Tablica 10.** Statistička analiza razlike u razinama indeksa tjelesne mase između ispitivane i kontrolne skupine

Skupina	N	Min	Max	Centile			P	
				25.	Medijan	75.		
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	Ispitivana	147	16,9	47,1	23,3	26,6	30,1	0,004
	Kontrolna	153	18,3	36,7	22,45	25,1	27,9	

Vršni protok zraka (PEF) mjereno je svim ispitanicima u obje skupine. Rezultati su prikazani u Tablici 11. Dobiveni rezultati ukazuju na statistički značajnu razliku između ispitivane i kontrolne skupine ( $P < 0,001$ ) u vrijednosti PEF.

**Tablica 11.** Statistička analiza razlike u mjerenju vršnog protoka zraka (PEF) između ispitivane i kontrolne skupine

Skupina	N	Minimum	Maksimum	Centile			P	
				25.	Medijan	75.		
PEF	Ispitivana	146	17,3	132,9	56,8	72,8	92,55	<0,001
	Kontrolna	153	360	690	420	500	610	

Svim ispitanicima su mjereni biljezi plućnih funkcija FEV 1 (forsirani ekspiracijski volumen u 1 sekundi kao najbolji pokazatelj protoka), FVC (forsirani vitalni kapacitet, maksimalna količina zraka koju pacijent može snažno izdahnuti nakon maksimalnog udaha) i PEF (vršni protok zraka, maksimalna brzina izdaha). Rezultati ovih vrijednosti prikazani su u Tablici 12. Statistička analiza biljega plućne funkcije ABO fenotipa u bolesnika sa astmom ne pokazuje značajne razlike u vrijednostima biljega plućne funkcije: FEV1, FEV/FVC i PEF (Tablica 12).

**Tablica 12. Statistička analiza usporedbe plućne funkcije kod ABO fenotipa u bolesnika s astmom\***

	ABO	N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
FEV1 (%)	0	49	34,80	125,30	55,15	68,00	89,40	0,375
	A	60	20,90	119,40	52,30	80,10	91,75	
	B	27	30,40	106,40	62,20	82,60	91,80	
	AB	12	36,00	101,30	51,30	66,25	84,33	
FEV/FVC	0	49	37,69	99,26	57,11	65,47	75,75	0,741
	A	60	38,08	98,82	61,57	68,79	77,39	
	B	27	0,67	82,48	61,12	69,71	77,52	
	AB	12	40,26	83,24	47,51	68,40	76,08	
PEF	0	103	37,20	690,00	73,10	400,00	600,00	0,843
	A	113	17,30	650,00	70,75	116,10	450,00	
	B	56	30,80	650,00	85,90	395,00	460,00	
	AB	27	41,10	640,00	68,40	410,00	580,00	

\*Rezultati obrađeni *Kruskal-Wallis testom*

Kratice:

FEV 1 – forsirani ekspiracijski volumen u 1. sekundi

FVC – forsirani vitalni kapacitet

PEF – maksimalna brzina izdaha

Svim bolesnicima s astmom određene su kvantitativne vrijednosti oksigenacije i uspoređene su vrijednosti prema fenotipovima ABO krvnih grupa. U Tablici 13 prikazane su razlike u kvantitativnim vrijednostima oksigenacije kod bolesnika s astmom obzirom na ABO fenotipove krvnih grupa gdje je vidljivo da ne postoje statistički značajne razlike između nositelja pojedinih fenotipova ABO krvnih grupa ( $P=0,326$ ).

**Tablica 13.** Razlike u kvantitativnim vrijednostima oksigenacije kod bolesnika s astmom obzirom na fenotipove krvnih grupa\*

	ABO	N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
pO <sub>2</sub>	O	41	55,00	97,00	71,50	79,00	85,00	0,326
	A	52	52,00	95,00	73,25	79,00	83,75	
	B	23	60,00	99,00	71,00	78,00	84,00	
	AB	9	68,00	103,00	78,50	80,00	90,00	

\*Rezultati su obrađeni *Kruskal-Wallis testom*

Kratica:

pO<sub>2</sub> – parcijalni tlak kisika

Mjerenje frakcije dušičnog oksida u izdahnutom zraku (FENO) i imunoglobulina E (IgE) kao važnih biomarkera provedeno je kod svih bolesnika s astmom. Dobivene vrijednosti su uspoređene prema ABO fenotipovima, a rezultati su prikazani u Tablici 14.

Iz Tablice 14 je vidljivo da nema statistički značajne razlike u kvantitativnim vrijednostima biomarkera (FENO i IgE) kod bolesnika s astmom obzirom na fenotipove ABO krvnih grupa, iako je značajnost IgE na graničnoj razini ( $P=0,074$ ).

**Tablica 14.** Razlike u kvantitativnim vrijednostima biomarkera (FENO i IgE) kod bolesnika s astmom obzirom na fenotipove ABO krvnih grupa\*

	ABO	N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
FENO	O	44	1,90	144,20	7,35	20,75	42,20	0,915
	A	55	4,30	134,00	10,00	19,00	49,30	
	B	26	3,50	112,50	8,63	18,55	52,10	
	AB	10	5,30	70,50	10,88	20,15	36,18	
IgE	O	41	1,00	5000,00	46,00	165,00	351,50	0,074
	A	47	6,28	2847,00	52,00	187,00	456,00	
	B	24	5,86	1418,00	58,38	108,50	377,75	
	AB	8	12,00	452,00	20,15	37,35	118,93	

\*Rezultati obrađeni *Kruskal-Wallis testom*

Kratice:

FENO - frakcije dušičnog monoksida u izdahnutom zraku

IgE - imunoglobulin E

Biljezi plućne funkcije (FEV 1, FEV/FVC, PEF) uspoređeni su kod nositelja pojedinih PAI-1 genotipova kod bolesnika s astmom, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 15. Iz Tablice 15 vidljivo je da nema značajne razlike u vrijednostima FEV1, FEV/FVC i PEF u usporedbi s tri PAI-1 genotipa.

**Tablica 15.** Statistička analiza usporedbe plućne funkcije kod PAI-1 4G/5G genotipa u bolesnika s astmom \*

	PAI-1	N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
FEV1 (%)	4G/4G	34	30,40	114,50	49,20	70,00	88,03	0,139
	4G/5G	83	32,10	125,30	59,20	78,90	93,80	
	5G/5G	31	20,90	107,80	55,90	71,40	87,70	
FEV/FVC	4G/4G	34	40,26	91,43	58,32	66,51	76,49	0,329
	4G/5G	83	0,67	99,26	62,02	68,71	77,04	
	5G/5G	31	38,08	88,53	52,83	65,40	74,14	
PEF	4G/4G	84	30,80	690,00	81,68	435,00	600,00	0,155
	4G/5G	152	22,20	670,00	72,13	115,85	460,00	
	5G/5G	63	17,30	680,00	72,50	390,00	450,00	

\*Rezultati su obrađeni *Kruskal-Wallis testom*

Kratice:

FEV 1 – forsirani ekspiracijski volumen u 1. sekundi

FVC – forsirani vitalni kapacitet

PEF – maksimalna brzina izdaha

Kvantitativne vrijednosti oksigenacije promatrane su u odnosu na pojedine genotipove PAI-1 a rezultati kvantitativnih vrijednosti oksigenacije kod bolesnika s astmom obzirom na PAI-1 4G/5G genotipove su prikazani u Tablici 16. Rezultati pokazuju da nema statistički značajne razlike između pojedinih genotipova ( $P=0,497$ ).

**Tablica 16.** Razlike u kvantitativnim vrijednostima oksigenacije kod bolesnika s astmom obzirom na PAI-1 genotipove \*

	PAI-1	N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
pO <sub>2</sub>	4G/4G	31	58,00	99,00	76,00	80,00	84,00	0,497
	4G/5G	67	55,00	103,00	75,00	79,00	85,00	
	5G/5G	27	52,00	95,00	70,00	78,00	82,00	

\*Rezultati su obrađeni *Kruskal-Wallis testom*

Kratice:

pO<sub>2</sub> – parcijalni tlak kisika



Kvantitativne vrijednosti biomarkera FeNO (frakcija dušičnog monoksida u izdahnutom zraku) i IgE (imunoglobulin E) uspoređivane su kod nositelja pojedinih PAI-1 genotipova. Rezultati su prikazani u Tablici 17. Razlike u kvantitativnim vrijednostima biomarkera (FeNO i IgE) kod bolesnika s astmom obzirom na PAI-1 4G/5G genotipove ne pokazuju statistički značajne razlike u oba promatrana parametra.

**Tablica 17.** Razlike u kvantitativnim vrijednostima biomarkera (FeNO i IgE) kod bolesnika s astmom obzirom na genotipove PAI-1 4G/5G\*

	PAI-1	N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
FENO	4G/4G	33	6,90	127,20	11,20	16,50	47,60	0,607
	4G/5G	75	1,90	134,00	9,00	21,90	41,00	
	5G/5G	27	3,40	144,20	6,50	18,40	42,60	
IgE	4G/4G	28	6,28	1076,00	27,43	188,00	435,00	0,671
	4G/5G	69	1,00	5000,00	54,95	153,00	401,00	
	5G/5G	23	5,86	2980,00	49,50	124,00	302,00	

\*Rezultati obrađeni *Kruskal-Wallis testom*

Kratice:

FENO – frakcije dušičnog monoksida u izdahnutom zraku

IgE – imunoglobulin E

Kvantitativne vrijednosti serotonina uspoređivane su sa anamnestički važnim parametrima, sa PAI-1 genotipovima i fenotipovima ABO krvnih grupa. Rezultati su prikazani u Tablicama 18 i 19.

Tablica 18 prikazuje razlike u kvantitativnim vrijednostima serotonina kod bolesnika s astmom u odnosu na promatrane katogorijske vrijednosti. Iz rezultata Tablice 18 vidljivo je da nema značajnih razlika u vrijednostima serotonina u odnosu na promatrane varijable: spol, povećanje arterijskog tlaka, šećernu bolest, gastroezofagealni refluks, pušenje, tip astme (alergijska, nealergijska), alergijski rinitis, okidač (stres, hladnoća), pozitivne alergene, PAI-1 genotip, ABO fenotip.

**Tablica 18.** Razlike u kvantitativnim vrijednostima serotonina kod bolesnika s astmom u odnosu na promatrane katogorijske vrijednosti\*

Serotonin vs ispitivani parametri		n	Medijan	25. centila	75. centila	P
Spol	Muški	57	1,08	0,79	1,51	0,347
	Ženski	92	1,15	0,88	1,48	
Pozitivna obiteljska anamneza	Ne	73	1,06	0,77	1,45	0,630
	Da	72	1,10	0,83	1,44	
HA	Ne	93	1,12	0,88	1,44	0,120
	Da	56	1,02	0,70	1,33	
DM	Ne	130	1,09	0,84	1,44	0,134
	Da	19	0,93	0,57	1,19	
GERB	Ne	129	1,10	0,84	1,44	0,295
	Da	20	0,96	0,71	1,25	
CVB	Ne	146	1,08	0,79	1,44	0,825
	Da	3	1,19	0,57	1,67	
Pušenje	Ne	87	1,10	0,87	1,45	0,975
	Da	16	1,33	0,90	1,87	
	Bivši pušač	42	1,05	0,73	1,25	
Fenotip astme	Alergijska	81	1,10	0,90	1,44	0,300
	Ne-alergijska	67	0,97	0,74	1,45	
GINA	I	22	1,25	0,92	1,49	0,695
	II	26	0,98	0,63	1,26	
	III	44	1,12	0,85	1,46	
	IV	54	1,05	0,79	1,45	

Tablica 18. – nastavak

Alergijski rinitis	Ne	56	1,07	0,76	1,32	0,471
	Da	89	1,10	0,87	1,46	
Okidač: stres	Ne	135	1,09	0,82	1,41	0,718
	Da	14	1,24	0,54	1,64	
Okidač: hladnoća	Ne	117	1,06	0,77	1,39	0,228
	Da	32	1,19	0,89	1,50	
Okidač: alergen	Ne	92	1,03	0,77	1,39	0,261
	Da	57	1,11	0,91	1,44	
Okidač: respiratorna infekcija	Ne	78	1,01	0,82	1,32	0,055
	Da	71	1,18	0,77	1,51	
Pozitivni alergeni	Ne	59	0,99	0,77	1,42	0,482
	Da	88	1,10	0,82	1,44	
PAI-1 4G/5G	4G/4G	35	1,13	0,82	1,52	0,116
	4G/5G	84	1,15	0,87	1,48	
	5G/5G	30	1,05	0,73	1,32	
ABO grupe-fenotip	O	49	1,12	0,83	1,54	0,799
	A	61	1,09	0,85	1,48	
	B	27	1,15	0,87	1,55	
	AB	12	1,10	0,94	1,31	

\*Rezultati obrađeni *Kruskal-Wallis testom*

Kratice:

GINA – Smjernice Globalne inicijative za astmu (engl. *Global Initiative for Asthma*)HA – Povećan krvni tlak (*Hypertensio arterialis*)GERB – Gastroezofagealna refluksna bolest (engl. *Gastroesophageal reflux disease*)DM – Povišena razina šećera (lat. *Diabetes mellitus*)CVD – Kardiovaskularne bolesti (engl. *Cardiovascular disease*)

Kako bi se utvrdila povezanost vrijednosti serotonina s ostalim promatranim kvantitativnim vrijednostima (dob, duljina pušenja, broj cigareta, dob postavljanja dijagnoze, trajanje bolesti, imunoglobulin E, broj egzacerbacija, parcijalni tlak kisika u krvi, forsirani ekspiracijski volumen, omjer forsiranog ekspiracijskog volumena i forsiranog vitalnog kapaciteta, koncentracija dušikovog monoksida u izdahnutom zraku, maksimalna brzina izdaha, indeks tjelesne mase, monoamin oksidaza) izračunati su korelacijski koeficijenti rho koji su prikazani u Tablici 19. Od svih promatranih varijabli, značajna je pozitivna korelacija vrijednosti serotonina u odnosu na FENO – koncentraciju dušičnog monoksida u izdahnutom zraku ( $\rho=0,200$ ,  $P=0,026$ ) i eozinofile u nosu ( $\rho=0,220$ ,  $P=0,039$ ) što upućuje da su veće vrijednosti serotonina povezane s većim vrijednostima navedenih varijabli (i obrnuto).

**Tablica 19.** Korelacijski koeficijenti rho razine serotonina u odnosu na ostale kvantitativne vrijednosti

<b>Serotonin vs ispitivani parametri</b>		
Dob (godine)	Korelacijski koeficijent rho	-0,162
	<i>P</i>	0,015
Duljina pušenja (godine)	Korelacijski koeficijent rho	0,045
	<i>P</i>	0,610
Broj cigareta	Korelacijski koeficijent rho	0,019
	<i>P</i>	0,832
Pušački indeks	Korelacijski koeficijent rho	0,046
	<i>P</i>	0,596
Dob postavljanja dijagnoze	Korelacijski koeficijent rho	-0,061
	<i>P</i>	0,484
Trajanje bolesti	Korelacijski koeficijent rho	-0,003
	<i>P</i>	0,974
IgE	Korelacijski koeficijent rho	0,129
	<i>P</i>	0,184
Broj egzacerbacija	Korelacijski koeficijent rho	0,016
	<i>P</i>	0,858
pO <sub>2</sub>	Korelacijski koeficijent rho	0,044
	<i>P</i>	0,639
FEV1 (%)	Korelacijski koeficijent rho	0,016
	<i>P</i>	0,850
FEV/FVC	Korelacijski koeficijent rho	-0,012
	<i>P</i>	0,893

Tablica 19. - nastavak

FENO	Korelacijski koeficijent rho	0,200
	<i>P</i>	<b>0,026</b>
PEF	Korelacijski koeficijent rho	0,105
	<i>P</i>	0,116
BMI	Korelacijski koeficijent rho	-0,098
	<i>P</i>	0,142
eozinofili (nos)	Korelacijski koeficijent rho	0,220
	<i>P</i>	<b>0,039</b>
eozinofili (sputum)	Korelacijski koeficijent rho	0,037
	<i>P</i>	0,732
MAO	Korelacijski koeficijent rho	0,157
	<i>P</i>	0,068

\*Rezultati su prikazani kao *Spearmanov korelacijski koeficijent rho*

Kratice:

pO<sub>2</sub>- parcijalni tlak kisika u krvi

FEV1- forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi

FEV1/FVC – omjer FEV1 i forsiranog vitalnog kapaciteta

FENO –koncentracija dušičnog monoksida u izdahnutom zraku

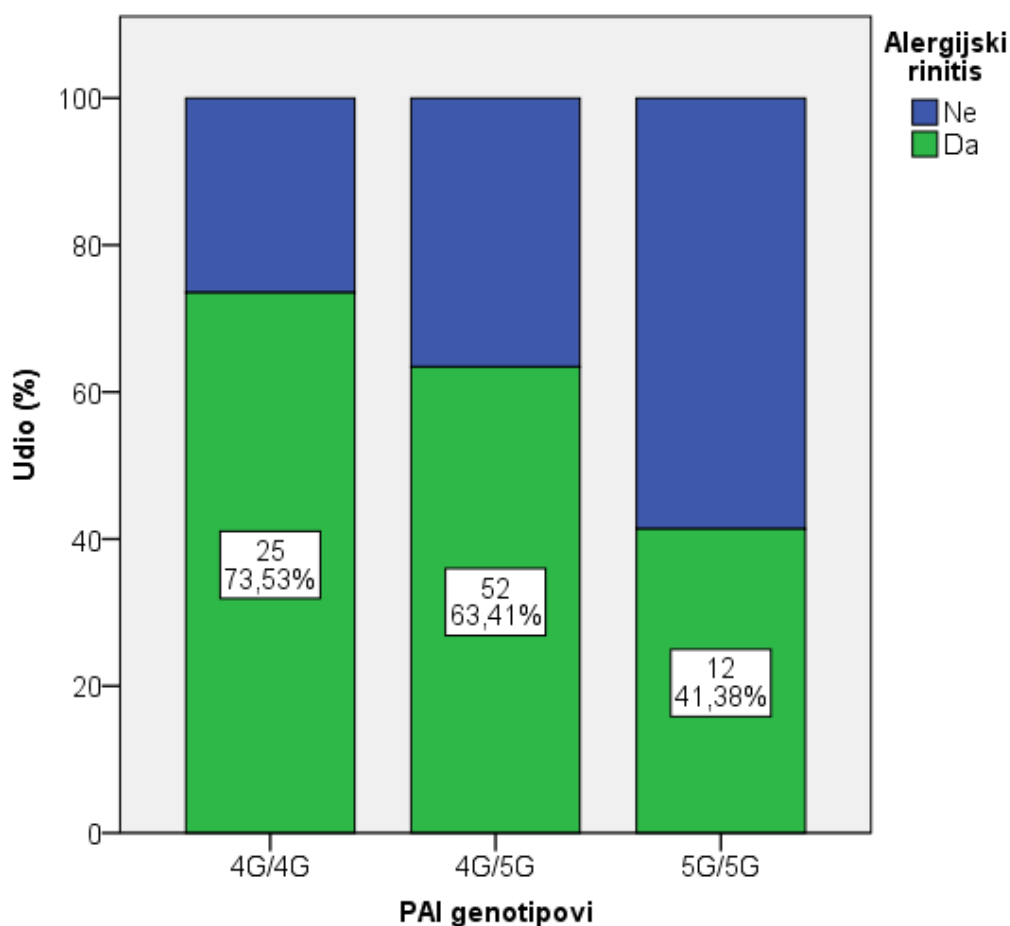
PEF – maksimalna brzina izdaha

BMI – indeks tjelesne mase

MAO- monoamin oksidaza

Analizom povezanosti PAI-1 genotipova i pojavnosti alergijskog rinitisa uočene su značajne razlike u prevalenciji alergijskog rinitisa kod pojedinih PAI-1 genotipova. Daljnjom statističkom obradom se pokušalo ustanoviti postoje li još neke razlike koje bi bile povezane s pozitivnom anamnezom alergijskog rinitisa. Rezultati su prikazani na Slici 14 gdje je vidljivo da unutar PAI-1 genotipa 4G/4G skoro  $\frac{3}{4}$  ispitanika ima alergijski rinitis, dok u genotipu 5G/5G prisutno samo 41% ispitanika ( $P=0,017$ ).

Prema Slici 14 vidljivo je da ispitanici koji su homozigoti 4G/4G imaju najveću učestalost alergijskog rinitisa, dok ispitanici s alelom 5G/5G najmanju.



*Slika 14. Prikaz statističke analize usporedbe PAI-1 genotipova kod bolesnika s alergijskim rinitisom*



Rezultate analize Hardy-Weinbergove ravnoteže PAI-1 4G/5G genotipova pokazuje Tablica 20. Analiza Hardy-Weinbergove ravnoteže PAI-1 4G/5G genotipova obzirom na pojavnost u svih bolesnika s astmom, odnosno samo onih astmatičara koji imaju alergijski rinitis pokazuje da kod astmatičara nema značajnog odstupanja od ekvilibrijuma ( $P=0,155$ ), dok kod bolesnika koji imaju i alergijski rinitis zabilježena su značajna odstupanja ( $P=0,037$ ) što ukazuje da raspodjela pojedinih genotipova u ovih bolesnika statistički značajno odudara od ravnoteže.

**Tablica 20.** Analiza Hardy-Weinberg ravnoteže PAI-1 4G/5G genotipova obzirom na pojavnost u svih bolesnika s astmom, odnosno samo onih astmatičara koji imaju alergijski rinitis

PAI-1: svi astmatičari	Promatrani	Očekivani
Uobičajeni homozigot 4G/4G	34	38,3
Heterozigot 4G/5G	81	72,4
Rijetki homozigot 5G/5G	30	34,3
Var. al. frekv.	0,49	
$X^2 =$	2,02	
$X^2$ test $P$ vrijednost =	0,155	1 df

PAI-1: alergijski rinitis	Promatrani	Očekivani
Uobičajeni homozigot 4G/4G	25	29,8
Heterozigoti 4G/5G	53	43,4
Rijetki homozigot 5G/5G	11	15,8
Var. ale. Frekv	0,42	
$X^2 =$	4,36	
$X^2$ test $P$ vrijednost =	0,037	1 df

Kratica: Var. ale. frekv. – varijacija elelne frekvencije

Brojni parametri koji bi mogli biti poveznica između astme i pojavnosti alergijskog rinitisa su analizirani i dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 21. Iz Tablice 21 vidljivo je da oboljeli od astme s alergijskim rinitisom imaju značajno učestaliju pozitivnu obiteljsku anamnezu ( $P=0,008$ ).

**Tablica 21.** Razlike u socio-demografskim i kliničkim parametrima među bolesnicima oboljelim od kronične astme sa i bez alergijskog rinitisa\*

		Alergijski rinitis				$\chi^2$	P
		Ne N=56		Da N=89			
		N	%	N	%		
Spol	Muško	19	33,9%	36	40,4%	0,62	0,431
	Žensko	37	66,1%	53	59,6%		
Obiteljska anamneza	Ne	36	64,3%	37	41,6%	7,09	0,008
	Da	20	35,7%	52	58,4%		
Povišen krvni tlak	Ne	27	48,2%	62	69,7%	6,67	0,010
	Da	29	51,8%	27	30,3%		
Šećerna bolest	Ne	48	85,7%	78	87,6%	0,11	0,738
	Da	8	14,3%	11	12,4%		
Gastroezofagealni Reflus	Ne	50	89,3%	75	84,3%	0,73	0,394
	Da	6	10,7%	14	15,7%		
Kardiovaskularne bolesti	Ne	56	100,0%	86	96,6%	1,93	0,165
	Da	0	0,0%	3	3,4%		
Drugi komorbiditeti	Ne	21	37,5%	40	44,9%	0,78	0,377
	Da	35	62,5%	49	55,1%		
Respiratorne tegobe u djetinjstvu	Ne	45	80,4%	62	69,7%	2,03	0,154
	Da	11	19,6%	27	30,3%		
Fenotip astme	Alergijska	16	28,6%	63	70,8%	24,70	<0,001
	Ne-alergijska	40	71,4%	26	29,2%		
GINA smjernice	I	11	19,6%	11	12,4%	1,49	0,685
	II	9	16,1%	17	19,1%		
	III	16	28,6%	28	31,5%		
	IV	20	35,7%	33	37,1%		

Tablica 21. - nastavak

Okidač: Stres	Ne	53	94,6%	78	87,6%	1,93	0,165
	Da	3	5,4%	11	12,4%		
Okidač: Hladnoća	Ne	44	78,6%	69	77,5%	0,02	0,883
	Da	12	21,4%	20	22,5%		
Okidač: Alergen	Ne	45	80,4%	43	48,3%	14,79	<0,001
	Da	11	19,6%	46	51,7%		
Okidač: Respiratorna infekcija	Ne	25	44,6%	49	55,1%	1,49	0,222
	Da	31	55,4%	40	44,9%		
Izloženost alergenima	Ne	36	64,3%	20	22,7%	24,87	<0,001
	Da	20	35,7%	68	77,3%		
Hitne intervencije	Ne	22	39,3%	52	58,4%	5,04	0,025
	Da	34	60,7%	37	41,6%		
Hospitalizacija	Ne	34	61,8%	59	66,3%	0,30	0,585
	Da	21	38,2%	30	33,7%		

\*Rezultati obrađeni  $\chi^2$  testom

U Tablici 22 uspoređivani su kvantitativni socio-demografski i klinički parametri u ispitivanoj skupini bolesnika s astmom u odnosu na pojavnost alergijskog rinitisa, a rezultati su obrađeni Mann-Whitney U testom.

U analizi skupine bolesnika oboljelih od astme, bolesnici sa alergijskim rinitisom su značajno mlađi (medijan 56 godina) u odnosu na bolesnike bez alergijskog rinitisa čiji je medijan 62 godine starosti (Tablica 22). Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika između bolesnika sa alergijskim rinitisom u odnosu na bolesnike bez alergijskog rinitisa ( $P=0,033$ ). Dijagnoza kod osoba bez alergijskog rinitisa postavljena je prosječno u 43. godini života dok je u skupini s alergijskim rinitisom ta dijagnoza postavljena u ranijoj dobi (prosječno 35 godina), što je i statistički značajna razlika ( $P=0,016$ ). Iako su i jedni i drugi imali određene respiratorne smetnje u djetinjstvu, nije pronađena statistički značajna razlika koja bi ukazivala na veću pojavnost alergijskog rinitisa u kasnijoj dobi.

**Tablica 22.** Razlike u kvantitativnim socio-demografskim i kliničkim parametrima među pacijentima oboljelim od kronične astme sa i bez alergijskog rinitisa

	Alergijski rinitis						Z	P
	Ne N=56			Da N=89				
	Median	Percentile		Median	Percentile			
		25	75		25	75		
Godine	62,50	45,50	72,00	56,00	36,00	67,00	-2,13	0,033
Pušenje: pack years	0,00	0,00	19,75	0,00	0,00	5,00	-1,28	0,199
Starost kod postavljanja dijagnoze	43,00	31,00	58,00	35,00	20,00	53,00	-2,41	0,016
Trajanje bolesti	13,00	8,00	20,00	15,00	10,00	25,00	-1,20	0,229
IgE	64,05	32,65	211,50	232,00	87,70	499,00	-3,45	0,001
Broj egzacerbacija	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	-0,02	0,981
pO <sub>2</sub>	75,00	67,00	82,00	80,00	76,00	85,00	-3,11	0,002
FEV <sub>1</sub> (%)	71,80	55,90	91,80	78,90	57,10	90,40	-0,60	0,546
FEV/FVC	67,07	59,07	75,45	69,21	61,12	77,04	-1,17	0,240
FENO	18,40	7,70	50,40	20,00	10,00	36,70	-0,50	0,614
PEF	66,40	52,30	85,10	82,00	61,20	95,00	-2,10	0,036
ITM	27,30	24,20	31,60	26,55	23,05	29,70	-1,00	0,319
Serotonin	1,07	0,76	1,32	1,10	0,87	1,46	-0,77	0,440
MAO	44,22	41,20	54,92	44,51	35,71	54,31	-0,61	0,541

\*Rezultati obrađeni Mann - Whitney U testom

Tablica 23 prikazuje predikciju nastanka alergijskog rinitisa u bolesnika koji boluju od astme. Bolesnici koji imaju PAI 5G/5G genotip u odnosu na PAI 4G/4G imaju 3,74 puta (1/0,267) manji rizik javljanja simptoma alergijskog rinitisa, s obzirom na njihovu dob i spol.

**Tablica 23.** Predikcija nastanka alergijskog rinitisa u bolesnika koji boluju od astme\*

	OR	95% CI		P
		Donji	Gornji	
PAI-1 4G/4G (ref.)				0,045
PAI-1 4G/5G	0,64	0,261	1,572	0,330
PAI-1 5G/5G	<b>0,27</b>	<b>0,091</b>	<b>0,782</b>	<b>0,016</b>
Dob (godine)	0,98	0,961	1,001	0,059
Ženski spol	0,75	0,364	1,565	0,450

\*Rezultati obrađeni *binarnom logističkom regresijom*

## **5. Rasprava**

Astma je jedna od najčešćih kroničnih bolesti, osobito kod djece, a njena učestalost je u porastu u razvijenim zemljama (Stipić-Marković i sur 2003, Chang 2006, Pearce i sur. 2007).

To je upalna bolest dišnih puteva karakterizirana hiperreaktivnošću bronha i privremenim epizodama opstrukcije dišnih puteva. Glavni uzrok patoloških promjena u astmatičara je kronična, neinfektivna upala dišnih puteva (Curschmann 1882, Hamid 2012).

Budući da se pod dišnim putevima podrazumjeva respiratorna cijev od nosa do najmanjih alveola u plućima, vrlo česti problemi koji se vežu uz astmu su i klinički simptomi gornjih dišnih puteva, poznati kao i alergijski rinitis.

Patofiziologija astme i alergijskog rinitisa je složena i uključuje utjecaj brojnih čimbenika, genetičkih i okolišnih. Ove su bolesti blisko povezane, ali kad se predočavaju zajedno, smatraju se različitim fenotipom i endotipom astme. Važno je istaknuti da je težina bolesti astme i alergijskog rinitisa često podcijenjena kako od pacijenata tako i od liječnika (Demoly i sur. 2013), a predstavlja težak teret za društvo svugdje u svijetu.

Rasvijetljavanje patofiziologije astme, pronalaženje biljega (biomarkera) za dijagnostiku te utvrđivanje ključnih mjesta u imunosnoj reakciji na kojima je moguća blokada upale sve više je moguće zahvaljujući napretku i novim spoznajama bazične imunologije. Genska istraživanja pokazuju da promjene u aktivaciji gena imaju ključnu ulogu u indukciji alergijskih bolesti. Ova hipoteza je potvrđena pomoću istraživanja koja pokazuju promjene u ekspresiji gena nakon imunoterapije (Lotwal i sur. 2011, Pevec i sur. 2012).

Jedan od gena koji je dokazano povezan s astmom je plazminogen aktivator inhibitor-1 (PAI-1) (Szeffler i sur. 2012, Chung i sur. 2015, Apter i sur. 2015), što potvrđuju i naši rezultati gdje smo našli jasnu povezanost između polimorfizma PAI-1 -675 4G/5G i razvoja alergijskog rinitisa kod pacijenata s astmom u hrvatskoj populaciji (Tablica 23).

PAI-1 pripada superporodici inhibitora serin proteaze koji regulira fibrinolitički sustav, primarno inhibicijom tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) i urokinaza plazminogen aktivatora (uPA). PAI-1, kao ključni inhibitor fibrinolize, igra važnu ulogu u bronhalnoj hiperreaktivnosti, hipersekreciji sluzi i remodeliranju dišnih puteva, tri uobičajene komplikacije kronične upale dišnih puteva kod astme (Madách i sur. 2010, Nie i sur. 2012).

Noviji radovi na mišjim modelima pokazali su da je izlaganje alergenima rezultiralo povećanjem koncentracije PAI-1 i Th2 citokina u plućima, uz povećanje broja eozinofila u bronhima, što dovodi do remodeliranja bronha, povećanog stvaranja sub-epitelnog kolagena, hipertrofije glatkog mišića i povećane angiogeneze (Tezuka i sur. 2015). Također je poznato da je ekspresija PAI-1 gena znatno povećana u aktiviranih mastocita, koje su glavne



efektorske stanice kod astme i drugih alergijskih bolesti (Ma i sur. 2007). Nedavna istraživanja Choa i suradnika (2015) ispitivala su međurekciju između mastocita i epitelnih stanica u stvaranju PAI-1. Dokazali su da su humani mastociti izravni izvor PAI-1 koji sudjeluje u remodeliranju dišnih puteva. Također se TGF- $\beta$ -posredovanom aktivacijom bronhalnih epitelnih stanica stvara dodatni PAI-1. Liu i suradnici (2015) ukazuju da mala molekula koja je inhibitor PAI-1, nazvana TM5275, može imati terapijski potencijal za astmu, smanjujući eozinofilni alergijski odgovor, koji je prisutan i u alergijskom rinitisu.

Ekspresija gena PAI-1 regulirana je djelomično 4G/5G polimorfizmom u promotorskoj regiji PAI-1 gena koji uključuje brisanja ili umetanja guaninske baze na -675 bp nukleotid u odnosu na početno mjesto transkripcije (RS 1799889 od -675). Istraživanja su pokazala da ljudi s genotipom- 675 4G/4G imaju veću transkripcijsku aktivnost PAI-1 od onih s 5G/5G genotipom (Cho i sur. 2001).

Naše istraživanje je u skladu s istraživanjem Cho i sur. (2001) gdje smo potvrdili da prisutnost genotipa 4G/4G jest značajan rizični faktor za alergijski rinitis kod pacijenata s astmom (Tablica 23). Unutar ovog istraživanja koje je obuhvatilo 149 ispitanika oboljelih od astme, 23,49% je imalo PAI-1 genotip 4G/4G, 55,70% genotip 4G/5G, dok ih je 20,81% imalo genotip 5G/5G. Međutim, ako uzmemo u obzir bolesnike s astmom koji su bolovali i od alergijskog rinitisa, a takvih je bilo 89 bolesnika; PAI-1 genotip 4G/4G je imalo značajno više bolesnika, točnije 73,53%, genotip 4G/5G imalo je 63,41%, dok je 41,38% nositelja genotipa 5G/5G (Slika 14).

Kod 153 ispitanika unutar našeg istraživanja kontrolne skupine, učestalost genotipa 4G/4G je 32,70%, genotipa 4G/5G je 45,80%, dok učestalost genotipa 5G/5G iznosi 21,60% (Tablica 8). Analiza ovih rezultata  $\chi^2$  testom je pokazala da nema statistički značajne razlike u učestalosti PAI-1 4G/5G genotipova između skupine oboljelih od astme i kontrolne skupine ( $P=0,152$ ).

Kod te skupine bolesnika s astmom koji su bolovali i od alergijskog rinitisa utvrđene su statistički značajne razlike u učestalosti alergijskog rinitisa u usporedbi s kontrolnom skupinom s obzirom na PAI-1 4G/5G genotipove ( $P=0,017$ ). Ispitanici koji su imali PAI-1 genotip 4G/4G, imali su najveću učestalost alergijskog rinitisa, dok oni s genotipom 5G/5G imali najmanju. Prema ovom rezultatu postoje naznake o zaštitnom učinku alela 5G na nastanak alergijskog rinitisa u bolesnika s astmom. Dobiveni rezultati potvrđuju važnost

biljega PAI-1 4G/5G polimorfizma kao ključne komponente uključene u patofiziologiju astme i alergijskog rinitisa, posebice u bolesnika gdje su ove bolesti prisutne u kombinaciji.

Važnost PAI-1 potvrđuje Sejima i suradnici koji su pokazali kako fibrinolitičke komponente, poput PAI-1, imaju ulogu, ne samo u trombolizi i proteolizi, nego i u imunološkom odgovoru mijenjajući ravnotežu između Th2 i Th1 reakcije, što predstavlja ključnu ulogu PAI-1 u alergijskoj upali. Nadalje, bitne činjenice za etiologiju alergijskog rinitisa dolaze i iz istraživanja Maa i koautora (2007) gdje je pokazano da PAI-1 potiče razvoj astme preko PAI-1 mRNA i proteina koji su s visokom vjerojatnošću inducirani transkripcijskom regulacijom u aktiviranim mastocitima, koji su glavne efektorske (izvršiteljske) stanice u astmi i drugim alergijskim bolestima.

Malo istraživanja postoji o -675 4G/5G PAI-1 polimorfizmu i alergijskom rinitisu kod odraslih. Bučkova i suradnici (2002) su proveli istraživanje kako bi se odredila poveznica između -675 4G/5G polimorfizma i razvoja astme posredovane s IgE protutijelom, kao i drugih alergijskih bolesti, u češkoj populaciji. U svom istraživanju uključio je 207 pacijenata i 186 zdravih ljudi kao kontrolnu skupinu. Učestalost 4G alela je bila značajno veća kod asmatičara, u odnosu na kontrolnu skupinu. Njihovi su rezultati bili prvi koji su podržali ideju da 4G alel u sklopu 4G/5G polimorfizma može biti rizični čimbenik za nastanak astme posredovane IgE protutijelom i ostalih alergijskih bolesti (Bučková i sur. 2002).

Ozbek i koautori (2009) su istražili raspodjelu PAI-1 -675 4G/5G polimorfizma u grupi od 99 turske djece s alergijskim rinitisom, gdje su došli do zaključka da je pojavnost 4G alela značajno viša u djece s alergijskim rinitisom, u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu na što ukazuju i naši rezultati prikazani u (Tablica 23) ali na odraslim bolesnicima. Unutar naših rezultata vidljivo je da prisutnost barem jednog 4G alela ispitivanog polimorfizma PAI-1 -675 4G/5G jest važni rizični faktor za alergijski rinitis kod pacijenata s astmom što je u skladu s dobivenim rezultatima Bučkinove i sur (2002) i Ozbeka i sur. (2009).

Suprotno ovim rezultatima, Dijkstra i suradnici su proučavali korelaciju između -675 PAI-1 4G/5G polimorfizma i razvoja astme, težine bolesti i odgovora na udahnute kortikosteroide kod 281 asmatičara i 1390 pripadnika opće populacije u Nizozemskoj (Dijkstra i sur. 2011).

Istraživanja Dijkstra i sur. (2011), za razliku od nas, nisu pokazala statistički značajne razlike u genotipskoj razdiobi između bolesnika asmatičara i zdravih kontrola. Bolesnici s astmom koji su nositelji PAI-1 5G alela imali su više razine IgE i slabiju razinu plućne funkcije na pregledima, smanjene maksimalne održane plućne funkcijske razine te brže opadanje plućne funkcije, u usporedbi s bolesnicima nositeljima 4G/4G genotipa. Konačno, 5G alel su povezali s nižom pojavnošću kompletne remisije astme kod praćenja bolesti. Prema

dobivenim rezultatima ovog istraživanja autori su zaključili kako PAI-1 nije gen gen rizika za astmu, nego njegova prisutnost više utječe na ozbiljnost bolesti, napredovanje i dugoročni ICS odgovor asmatičara.

Zbog suprostavljenih rezultata malog broja istraživanja koja su se bavila ispitivanjem korelacije između -675 4G/5G polimorfizma PAI-1 gena i astme, a posebno još i kombinacije s alergijskim rinitisom, prvotna je postavka našeg istraživanja bila da možda postoji razlika u učestalosti 4G i 5G alela spomenutog polimorfizma samo kod astme, u odnosu na kombinaciju bolesti, tj. alergijski rinitis u astmi, što su rezultati ovog istraživanja i potvrdili. Prema našim rezultatima (Tablica 23) bolesnici kod kojih je dijagnosticirana astma a koji imaju genotip PAI-1 -675 5G/5G u odnosu na PAI 4G/4G imaju 3,74 puta manji rizik za pojavnost simptoma alergijskog rinitisa te smatramo da PAI-1 5G/5G genotip, tj. 5G alel ima zaštitnu ulogu za razvoj bolesti alergijskog rinitisa i astme.

Osim toga, astma i alergijski rinitis se u zadnjih 50-ak godina u pacijenata često pronalaze združeni, pa se govori o astmi s alergijskim rinitisom. Postoje brojna istraživanja koja su se bavila poveznicom alergijskog rinitisa i astme (El-Helaly i sur. 2012). Tako, primjerice unutar istraživanja Lombardi i suradnika (2001), koje je uključivalo 99 pacijenta praćenih u razdoblju od 10 godina nakon što im je dijagnosticirana astma ili alergijski rinitis ili oboje, potvrđeno je da 32% pacijenata s početnim alergijskim rinitisom razvilo je astmu, a 50% pacijenata samo s početnom astmom razvilo je alergijski rinitis.

Svjetska zdravstvena organizacija provela je istraživanje naslovljeno ARIA (Alergijski Rinitis i njegov utjecaj na astmu) koje se bavilo ispitivanjem utjecaja alergijskog rinitisa na astmu. ARIA je zaključila kako bi se alergijski i nealergijski rinitis trebali smatrati rizičnim čimbenikom za razvoj astme ([www.who.int/gard/en/](http://www.who.int/gard/en/)) ([www.whiar.org](http://www.whiar.org)).

Rezultati od El-Helaly i suradnika (2012) pokazali su kako pacijenti s astmom i alergijskim rinitisom imaju lošiju plućnu funkciju u usporedbi s pacijentima koji imaju samo astmu. Od 3 skupine (skupina 1 – samo alergijski rinitis, skupina 2- samo astma, skupina 3 – združeni alergijski rinitis i astma) pokazalo se kako pacijenti iz skupine 3 imaju najlošije plućne funkcionalne testove i veći stupanj težine astme. Također je pokazano kako skupina samo s alergijskim rinitisom također ima narušene plućne funkcionalne testove, poglavito reducirani FEF25-75.

U našem istraživanju (Tablica 22, Tablica 21) pacijenti s alergijskim rinitisom bili su značajno mlađi od onih s astmom bez alergijskog rinitisa ( $P=0,033$ ) te su značajno učestalije imali pozitivnu obiteljsku anamnezu astme ( $P=0,008$ ). Ti su pacijenti učestalije imali

alergijski fenotip astme što ukazuje da je prisutnost alergena važna kao okidač za pogoršanje astme. Bolesnici s alergijskim rinitisom i astmom imali su četiri puta višu razinu IgE, više vrijednosti parcijalnog tlaka kisika ( $pO_2$ ) i veće vrijednosti PEF (Tablica 22).

Genotip polimorfizma 4G/4G PAI-1 bio je značajno učestaliji kod pacijenata s alergijskim rinitisom, u odnosu na pacijente s astmom a bez alergijskog rinitisa. Naše je istraživanje pokazalo povišenu učestalost 4G/4G genotipa PAI-1 kod bolesnika s alergijskim rinitisom (Tablica 23). Regresijskom analizom potvrdili smo da je prisutnost 4G/4G genotipa značajni čimbenik rizika za alergijski rinitis kod pacijenata s astmom i da je 4G/5G PAI-1 heterozigotni genotip također povezan s alergijskim rinitisom, ali s graničnom vrijednosti statističkog značaja. Temeljem navedenog, naši rezultati potvrdili su pretpostavke o značaju -675 PAI-1 polimorfizma kod alergijskih respiratornih bolesti, kao što je alergijski rinitis. Međutim, treba naglasiti da ovaj naš nalaz može imati ograničavajuće značenje s obzirom na broj bolesnika uključenih u istraživanje, te smatramo da u budućim istraživanjima svakako bi trebali u analizu uključiti daleko veći broj bolesnika. Međutim, i ako smo u našem istraživanju imali 149 bolesnika i 153 zdravih ispitanika kontrolne skupine možemo reći da dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima Nie i sur. (2012) koji je u svom istraživanju imao za cilj provjeriti utjecaj 4G/5G polimorfizma PAI-1 gena kao čimbenika rizika u astmi. Njegovo istraživanje je uključivalo ukupno 1817 bolesnika koji su bolovali od astme i 2327 kontrolnih osoba bez bolesti ali za razliku od naših istraživanja nije uključivalo bolesnike s alergijskim rinitisom. Sveukupni rezultati ove meta-analize potvrdili su statistički značajne razlike učestalosti 4G i 5G alela između bolesnika i kontrolne skupine. Međutim, ova istraživanja bila su po mnogo čemu različita: po etničkim i rasnim značajkama, po životnoj dobi sudionika istraživanja, po uključivanju djece, ili odraslih ili miješanih dobnih skupina u istraživanju, pa zbog nekonzistentnosti kriterija za uključivanje u meta-analizu, treba biti oprezan prema dobivenom zbirnom rezultatu. Nadalje, unutar ovog istraživanja izdvajanjem bjelačke populacije analiza između bolesnika s astmom i kontrone skupine nije pokazala poveznicu između PAI-1 4G/5G polimorfizma i astme (Nie i sur. 2012).

Autor meta-analize zaključio je na kraju da je s obzirom na složenu patogenezu nastanka astme, malo vjerojatno da će polimorfizam u jednoj bazi (SNP) jednog gena predstavljati povećani rizik za razvoj astme bez istovremenog razmatranja međudjelovanja s ostalim polimorfnim genima rizičnim za astmu (Nie i sur. 2012). To je nedvojbeno tako, ali ipak se čini kada se uzme u obzir na koje sve patološke mehanizme u astmi može utjecati PAI-1, da

polimorfizam 4G/5G može predstavljati dosta važan čimbenik rizika za udružene bolesti kao što su alergijski rinitis i astma, što je dokazano i u ovom istraživanju (Tablica 23).

Kako se međudjelovanja genskih i okolišnih čimbenika razlikuju od populacije do populacije, tako se mijenja i utjecaj polimorfizma 4G/5G PAI-1 gena na nastanak i razvoj astme. Štoviše, razlike se mogu javiti i unutar iste populacije, pa je iz tog razloga potrebno provesti daljnja multicentrična istraživanja s većim brojem bolesnika kako bi se dobili što statistički vjerodostojniji rezultati (Bora i sur. 2013).

Plazminogen aktivacijski sustav i plazmin, kao i PAI-1 predstavljaju važne fibrinolitičke sustave ključne za patogenezu kroničnih respiratornih bolesti kao što je astma, za kronične opstruktivne i intersticijske plućne bolesti, kao i za karcinome (Stewart i sur. 2013). PAI-1, i intersticijski urokinazni plazminogen aktivator (uPAR) su medijatori upalnog procesa te kroz te procese sudjeluju u remodeliranju pluća. Stoga postaju sve zanimljiviji ciljevi za terapijsko djelovanje pomoću novih lijekova koji mogu zaustaviti djelovanje PAI-1 u upali i remodeliranju dišnih puteva u astmi (Lee i sur. 2012, Schuliga i sur. 2013).

Moderne metode molekularne biologije omogućile su detaljna istraživanja polimorfnih varijanti gena i njihova utjecaja na razvoj bolesnih stanja na razini stanice.

Osim ispitivanja utjecaja polimorfizma PAI-1 4G/5G, drugi dio rada bio je posvećen istraživanju genotipova ABO krvne grupe na ventilacijsku funkciju pluća kod astme.

Postoje razlike u zastupljenosti određenih alela ABO u populacijama i različitim etničkim skupinama. Nedavna istraživanja bavila su se ispitivanjem povezanosti ABO sustava krvnih grupa kao genetičkog čimbenika s različitim bolestima (Garraty 2005, Iodice i sur. 2010, Franchini i sur. 2012). Naša druga hipoteza (pretpostavka) bila je kako u respiratornim bolestima, astmi i alergijskom rinitisu, može postojati povećana pojavnost određenih genotipova ABO sustava krvnih grupa. Zbog toga smo proveli određivanje ABO genotipova što omogućuje bolju razlučivost između ABO alela, u odnosu na samo određivanje ABO fenotipa na osnovne četiri krvne grupe. Eksperimentalni nalazi odbacili su našu drugu hipotezu budući da su pokazali kako ne postoji razlika u učestalosti ABO genotipova između dviju ispitivanih skupina, bolesnika i kontrolne skupine (vidi rezultate Tablice 7).

Istraživanja koja su ispitivala povezanost genotipova ABO krvnih grupa s astmom i alergijskim rinitisom također su iznimno rijetka. Istraživanje Falsarele i suradnika (2011) na 168 pacijenata koji su imali alergijski rinitis i na istom tolikom broju zdravih pojedinaca u Brazilu pokazalo je marginalne razlike s obzirom na ABO fenotip osim krvna grupe O koja je bila povezana s alergijskim rinitisom (OR 1,735; 95 % CI 1,127-2,673). Zanimljivo je da je

omjer izgleda OR za fenotip O u bolesnika s alergijskim rinitisom i kontrolnih subjekata bio statistički značajan za muške, ali ne i ženske bolesnike (Falsarella i sur. 2011).

Iako, sveukupno nisu utvrđene razlike u učestalosti ABO genotipova između bolesnika i kontrolne skupine, naše istraživanje je pokazalo da je među bolesnicima s astmom bila najzastupljenija A krvna grupa (Tablica 7). U fenotipskoj A krvnoj grupi najzastupljeniji je genotip O1A1 kod bolesnika (22,8%) koji je također najzastupljeniji i u kontrolnoj skupini (25,5%). Vodeći genotip je O1O1 čiji su nositelji zastupljeni s 27,5%. dok je u kontrolnoj skupini najviše nositelja također genotipa O1O1 (30,1%). U fenotipskoj B krvnoj grupi najzastupljeniji je genotip O1B1 i u skupini bolesnika (16,8%) i u kontrolnoj skupini (17,6%). Kod nositelja krvne grupe AB češće je zastupljen A1B genotip u odnosu na A2B genotip i kod bolesnika i kod ispitanika iz kontrolne skupine (Tablica 7).

S obzirom da su neka istraživanja pokazala da bolesnici s povećanim indeksom tjelesne mase (BMI), imaju veći rizik za razvoj astme, u ovom radu također je ispitivana razlika u razinama indeksa tjelesne mase između ispitivane skupine asmaticara i kontrolne skupine. Prema našim istraživanjima (Tablica 10) ispitivana skupina bolesnika s astmom je imala značajno veći BMI ( $P=0,004$ ).

Našim dobivenim rezultatima možemo zaključiti da je kod asmaticara, veliki broj bolesnika s prekomjernom težinom, a uočeno je i da su adipozni bolesnici češće prisutni kod nealergijskog fenotipa astme. Naši rezultati su u skladu s ranije provedenim istraživanjima koja ukazuju da pacijenti s povećanim indeksom tjelesne imaju veći rizik za razvoj astme (Shore i sur. 2005, Beuther i sur. 2007). Također, povišen BMI može biti povezan i s težinom astme (Taylor i sur. 2008). Ti rezultati ukazuju da možemo pretpostaviti da je povećani BMI prediktivni čimbenik za razvoj bolesti (zajedno s drugim genskim čimbenicima), ali ne objektivno obilježje astme. Pojavnost astme i pretilost u stalnom je porastu, a pretilost kao javnozdravstveni problem koji je danas sve više proširen, ujedno i najčešći komorbiditet astme. Pretilost je povezana s povećanim rizikom egzacerbacija astme, pogoršanim respiracijskim simptomima i slabom kontrolom astme. Točni mehanizmi ostaju nepoznati, ali su vjerojatno višeznačni, od mehaničkih promjena dišnog puta i plućnog parenhima do sustavnih upalnih i metaboličkih poremećaja koji na kraju utječu na plućnu funkciju, kao i na odgovor na terapiju (Shore i sur. 2005, Beuther i sur. 2007). Međutim, činjenica da nije svaki pretili asmaticar jednako pogođen pretilošću (u pogledu njegove astme), naglašava brojne izazove i kompleksnosti u razumijevanju poveznice pretilosti i astme (Baffi i sur. 2015).

Na tu poveznicu utječu brojni čimbenici, poput dobi, spola, rase i okruženja. Trebalo bi provoditi više istraživanja na tom području kako bi se spoznalo za koje populacije je povišeni indeks tjelesne mase najveći rizik.

Fenotip astme povezan s pretilošću pokazuje trend sve učestalije pojavnosti u kliničkoj praksi. Razumijevanje mehanizma koji dovodi do slabije kontrole astme u pretilih pacijenata ostaje nerazjašnjen mehanizam (Çelebi i sur. 2016).

Astma kod pretilih pacijenata mogla bi biti posve jedinstven fenotip astme kod koje bolesnici imaju puno ozbiljniju bolest i koja slabo reagira na konvencionalnu terapiju. Čimbenici koji bi mogli doprinosti patogenezi astme u pretilih osoba su mehanički čimbenici (slabija ventilacija), kao i promijenjeni upalni i imunološki odgovori povezani s pretilošću (Dixon i sur. 2010).

U usporedbi s bolesnicima koji nemaju povišeni BMI, pretili bolesnici s astmom puno češće pokazuju stalne simptome astme, imaju više izostanaka s posla, više koriste kratkodjelujuće beta agoniste, inhalirajuće kortikosteroide kao i bilo koji drugi lijek za kontrolu astme prema GINA smjernicama. Također, pretili bolesnici imaju manje izgleda za remisiju astme i imaju veće izgleda za teži perzistentni oblik astme (GINA IV) (Taylor i sur. 2008).

Novija istraživanja pokazala su kako je prekomjerna težina bila neprepoznata, nedijagnosticirana i neliječena u djece koja su hospitalizirana zbog astme. Kod starije djece postojala je jaka poveznica između pretilosti i stupnja težine kronične astme (Borgmeyer i sur. 2016).

Međutim, u istraživanju provedenom na populaciji od 125 djece (1-16 god, područje Nevade), BMI se nije pokazao kao važan prediktor težine astme. Iako su pretila djeca pokazala senzibilizaciju na alergene, pretila djeca su imala manje izgleda za alergijsku senzitivaciju i niže izgleda za polisenzitivaciju, u usporedbi s asmatičkom djecom koja su imala normalnu tjelesnu masu (Lucas i sur. 2016).

Također se pokazalo da u pojedinaca koji imaju BMI ispod  $25 \text{ kg/m}^2$ , rizik za astmu nastalu u odrasloj dobi progresivno je povećan s povišenjem BMI-a, s povećanjem rizika od 12% kod osoba s BMI-em od 25 do  $29 \text{ kg/m}^2$  pa sve do gotovo 250%-tnog povećanja tog rizika kod pojedinaca s BMI-om  $50 \text{ kg/m}^2$  i većim. Međutim, stupanj povezanosti pretilosti i povećanog rizika za razvoj astme u odrasloj dobi je pod utjecajem dobi, spola i rase. Jača poveznica između pretilosti i astme pronađena je u žena (u odnosu na muškarce), a slabiju povezanost prethodno spomenutog imaju crnci (u usporedbi s ne-hispanskim bijelcima) (Koebnick i sur. 2016). Među našim ispitanicima (Tablica 10) minimalni BMI bio je  $16,9 \text{ kg/m}^2$ , maksimalni  $47,1 \text{ kg/m}^2$  (medijan  $26,6 \text{ kg/m}^2$ ). Medijan BMI kontrolne skupine bio je  $25,1 \text{ kg/m}^2$ , što je

značajno niže ( $P=0,004$ ) u odnosu na bolesnike s astmom. Bolesnici s BMI  $<25 \text{ kg/m}^2$  činili su 63,5% bolesnika s alergijskim astmom i samo 36,5% bolesnika s nealergijskim fenotipom astme. Pretili bolesnici s BMI  $> 30 \text{ kg/m}^2$  činili su 43,2% bolesnika s alergijskom astmom i 56,8% bolesnika s nealergijskom fenotipom astme.

Optimalna i na smjernicama utemeljena kontrola astme trebala bi rezultirati minimalnom pojavnosti egzacerbacija u većine bolesnika. Osim niskih razina FEV1 u stabilnosti te potrebe za trajnim liječenjem kortikosteroidima, jedan od prediktora egzacerbacija astme je i visoki BMI (Papaioannou i sur. 2016).

Istraživanje Çelebi Sözen i suradnika (2016) pokazalo je kako postoji značajna poveznica između debljine i kontrole astme. Nadalje, pokazalo se je da povećanje tjelesne mase i neatopija također pogoršavaju kontrolu astme. U svijetlu tog istraživanja, koje je pokazalo kako debljanje vodi k smanjenju kontrole astme, istraženo je kako mršavljenje može poboljšati tijek astme (Çelebi Sözen i sur. 2016).

Suradljivost bolesnika i provođenje standardne terapije ne poboljšava sposobnost postizanja kontrole srednje teške do teške astme kod pretilih bolesnika (za BMI veći od 30). Bolesnice, u odnosu na muške bolesnike, imale su sve manje izgleda održati dobro kontroliranu astmu po jedinici podizanja BMI-a (Scott i sur. 2016).

U našem istraživanju određene su i vrijednosti plućne funkcije (Tablica 12). Obzirom da su u ispitivanoj skupini bili bolesnici koji boluju od astme, za očekivati je bila izrazito značajna razlika u vrijednostima vršnog protoka zraka (PEF) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ( $P<0,001$ ) što potvrđuje dobar odabir ispitanika za ispitivanu skupinu (Tablica 11).

Također je prikazana statistička analiza usporedbe plućne funkcije kod ABO fenotipa u bolesnika s astmom gdje nismo zabilježili značajne razlike u izmjeranim vrijednostima plućne funkcije FEV1, FEV/FVC i PEF kao niti razliku u vrijednostima oksigenacije ( $pO_2$ ) kod asmaticara ( $P=0,326$ ) između nositelja pojedinih krvnih grupa (Tablica 13).

Gledajući fenotipove krvnih grupa nismo našli statistički značajne razlike u kvantitativnim vrijednostima biomarkera FeNO (frakcija dušičnog monoksida u izdahnutom zraku) i IgE (imunoglobulin E) kod bolesnika s astmom.

Istraživanjem plućne funkcije kod PAI-1 4G/5G genotipova u bolesnika s astmom također nismo pronašli značajne razlike u vrijednostima FEV1, FEV/FVC i PEF. Prikazane su i razlike u kvantitativnim vrijednostima oksigenacije kod bolesnika s astmom obzirom na PAI-1 4G/5G genotipove gdje također nisu uočene statistički značajne razlike između pojedinih genotipova ( $P=0,497$ ).



Poznato je također da bolesnici koji boluju od astme imaju povećani rizik od anksioznosti i razvoja depresije, što je i razumljivo i dobro istraženo.

Međutim, relativno malo je ispitivanja provedeno i objavljeno o povezanosti astme sa serotoninom (5-HT) kao i alergijskog rinitisa s 5-HT-om u ljudi.

Nedavno istraživanje Yanga i suradnika (2016) otkrilo je značajne razlike u razdiobi polimorfizma gena za serotonininski prijenosnik između zdravih ispitanika i bolesnika koji boluju od astme bez anksioznosti te onih s anksioznosti.

Najnovija istraživanja pokazala su da postoji značajan porast u ekspresiji 5-HT<sub>2A</sub> gena u mononuklearima perferne krvi PBMCs asmaticara (Ahangari i sur. 2015). Za razliku od navedenog istraživanja, istraživanje Farjadian i suradnika (2013) nije pokazalo poveznicu između polimorfizma gena za serotonininski prijenosnik i blage do umjerene perzistentne (ili trajne) astme u djece.

Ipak, povećane razine serotoninina otkrivene su u tekućini dobivenoj bronhoalveolarnom lavažom, u miševa i ljudi s astmom, nakon provokacije alergenom (Durk i sur. 2013). Međutim, Ciprandi i sur. (2011) su pokazali da je razina serotoninina u serumu povećana kod pacijenata s alergijskim rinitisom, izvan sezone polenacije. Ova istraživanja pokazuju i izravnu poveznicu između kvalitete života bolesnika s alergijskim rinitisom i razine serotoninina. Temeljem navedenog autori smatraju da sezonski alergijski rinitis utječe na koncentraciju serotoninina i da serumski serotonin može poslužiti kao biomarker u bolesnika s alergijskim rinitisom (Ciprandi i sur. 2011).

Također otkriveno je kako su polimorfizam samo jednog nukleotida i haplotipovi gena serotonininskog receptora HTR4 povezani s fenotipom astme i da genetske varijacije HTR4 mogu utjecati na razvoj ili sklonost razvoju astme (Kim i sur. 2014).

U našem istraživanju ispitivana skupina asmaticara imala je značajno niže razine serotoninina u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P=0,018$ ), što je bilo i za očekivati obzirom da serumski serotonin može prema prethodnim istraživanjima poslužiti i kao biomarker pacijenata koji imaju egzacerbaciju astme i alergijskog rinitisa (Tablica 9). Nisu zapažene značajne razlike u izmjerenim vrijednostima serotoninina u odnosu na spol, povećanje arterijskog tlaka, ezofagealni refluks, pušenje, pojedine PAI-1 genotipove, tip astme, pojedine okidače (stres, hladnoća), niti pojedine ABO fenotipove. Naši rezultati korelacijskog koeficijenta  $\rho$  s obzirom na razinu serotoninina u odnosu na dob, broj cigareta kod pušača, duljinu pušenja, pušački indeks, FeNO, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC, PEF, vrijednost imunoglobulina E, broj egzacerbacija, parcijalni tlak O<sub>2</sub>, forsirani ekspiracijski volumen, maksimalnu brzinu izdaha, indeks tjelesne mase ukazuju na značajnu pozitivnu korelaciju vrijednosti serotoninina u

odnosu na koncentraciju dušičnog monoksida u izdahnutom zraku i eozinofila u nosu ( Tablice 19).

Brojna istraživanja u svijetu već godinama su usmjerena na otkrivanje čimbenika koji utječu na pojavnost astme koja je veliki javnozdravstveni problem. Svaki doprinos u istraživanju utjecaja pojedinih brojnih čimbenika može pridonijeti u razumijevanju ovog kompleksnog problema i pomoći u prevenciji ili njegovom smanjenju.

## **6. Zaključci**

1. U provedenom istraživanju utvrdili smo povezanost između polimorfizma PAI-1 -675 4G/5G i razvoja alergijskog rinitisa kod pacijenata s astmom u hrvatskoj populaciji. Utvrdili smo značajno višu učestalost genotipa 4G/4G kod astmatičara s alergijskim rinitisom u usporedbi s pacijentima oboljelim od astme koji alergijski rinitis nemaju. Analiza regresije pokazala kako je prisutnost genotipa 4G/4G značajan rizični faktor za alergijski rinitis kod pacijenata s astmom. Genotip 4G/5G također je povezan s alergijskim rinitisom, ali s graničnim statističkim značajem. Ovo pokazuje da je prisutnost barem jednog 4G alela ispitivanog polimorfizma PAI-1 -675 4G/5G već važni rizični faktor za alergijski rinitis kod pacijenata s astmom. Stoga bi liječnici trebali obraćati više pažnje na pacijente s fenotipovima alergijskog rinitisa i astme koji također imaju i PAI-1 4G/4G genotip.
2. Bolesnici kod kojih je dijagnosticirana astma a koji imaju genotip PAI-1 -675 5G/5G u odnosu na PAI 4G/4G imaju 3,74 puta (1/0,267) manji rizik za pojavu simptoma alergijskog rinitisa, kontrolirano prema njihovoj dobi i spolu. Stoga možemo zaključiti da PAI-1 5G/5G genotip, tj. 5G alel vrši zaštitnu ulogu za razvoj bolesti alergijskog rinitisa i astme.
3. Statističkom analizom razlika u razinama indeksa tjelesne mase između ispitivane i kontrolne skupine utvrdili smo da je ispitivana skupina imala značajno veći BMI u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P=0,004$ ). Ti rezultati ukazuju da je povećani BMI prediktivni čimbenik za razvoj astme u RH.
4. Genotipovi krvnih grupa ABO sustava nisu uočeni kao dodatni čimbenik rizika za pojavnost astme i alergijskog rinitisa. Statistička analiza povezanosti nositelja pojedinih genotipova ABO sustava u bolesnika u usporedbi s genotipovima ABO u kontrolnoj skupini nije ukazivala na značajne razlike. To znači da genotip ABO prema rezultatima ovog istraživanja nije genetički čimbenik za razvoj astme niti alergijskog rinitisa u ispitivanim skupinama.

5. Ispitivanjem vrijednosti plućne funkcije (FEV1, FEV1/FVC, PEF), kvantitativne vrijednosti oksigenacije kod bolesnika s astmom ( $P=0,326$ ), kao i vrijednosti biomarkera (FeNO i IgE), nisu zabilježene značajne statističke razlike između pojedinih krvnih grupa kod navedenih parametara, tj. nema statistički značajne razlike između kontrolne skupine i bolesnika sa astmom uzevši u obzir genotipove krvnih grupa i gore navedene parametre.
  
6. Pojedini genotipovi polimorfizma PAI-1 -675 4G/5G ne utječu na pojavnost razlika biomarkera ventilacijske funkcije kod bolesnika s astmom. Uspoređivane su razlike u kvantitativnim vrijednostima oksigenacije kod bolesnika s astmom pri čemu nisu zabilježene značajne razlike između pojedinih genotipova ( $P=0,497$ ). Razlike u kvantitativnim vrijednostima biomarkera (FeNO i IgE) kao niti razlike u vrijednostima FEV1, FEV/FVC i PEF također nisu utvrđene.
  
7. Statističkom obradom utvrđeno je da ispitivana skupina koju su sačinjavali bolesnici astmatičari ima značajno niže vrijednosti razine serotonina u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ( $P=0,018$ ). Ovo je u skladu s činjenicom da bolesnici koji boluju od astme imaju povećani rizik od anksioznosti i depresije.

## **7. Literatura**

- Ahangari G, Koochak SE, Amirabad LM, Deilami GD (2015) Investigation of 5-HT<sub>2A</sub> gene expression in PBMCs of patients with allergic asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets* 14:60-64
- Aït-Khaled N1, Pearce N, Anderson HR, Ellwood P, Montefort S, Shah J (2009) Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) phase three. *Allergy*. 64(1): 123-148
- Analiza gena za inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1), 2005., <http://www.medri.uniri.hr>, pristupljeno 30. 7. 2016.
- Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OC, Sheikh A (2010) Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy* 65 (2): 152–167
- Anderson, HR, Gupta R, Strachan DP, Limb ES (2007) 50 years of asthma: UK trends from 1955 to 2004. *Thorax* 62 (1): 85–90
- Anstee DJ (2009) Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* 114: 248-256
- Apter A J (2015) Advances in adult asthma diagnosis and treatment in 2014. *J Allergy Clin Immunol* 135(1): 46–53
- Arreola R, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Velasco-Velázquez M, Garcés-Alvarez ME, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabian S, Pavón L (2015) Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *J Immunol Res* 2015:354957.
- Baffi CW, Winnica DE, Holguin F (2015) Asthma and obesity: mechanisms and clinical implications. *Asthma Res Pract* 1(1): 1-7
- Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD (1999) A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 976-983
- Benedetti MS, Dostert P (1992) Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors. *Adv Drug Res* 23: 65-125

- Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q (2010) Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Can Respir J* 17:85-93
- Beuther DA, Sutherland ER (2007) Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 661-666
- Bjerg A, Ekerljung I, Middelveld R, Dahlén SE, Forsberg B, Franklin K, Larsson K, Lötvall J, Olafsdóttir IS, Torén K, Lundbäck B, Janson C (2011) Increased prevalence of symptoms of rhinitis but not of asthma between 1990 and 2008 in Swedish adults: comparisons of the ECRHS and GA<sup>2</sup>LEN surveys. *PLoS One* 6(2): e16082
- Blackwell CC, Dundas S, James VS, et al. (2002) Blood group and susceptibility to disease caused by *Escherichia coli* O157. *J Infect Dis* 185: 393-396
- Bora E, Soyler R, Arikan-Ayyildiz Z, Uzuner N, Giray-Bozkaya Ö, Erçal D, Karaman Ö, Ülgenalp A (2013) Plasminogen activator inhibitor -1 and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms in Turkish asthmatic children. *Allergol Immunopathol* 41(1): 11-16
- Borgmeyer A, Ercole PM, Niesen A, Strunk RC (2016) Lack of recognition, diagnosis, and treatment of overweight/obesity in children hospitalized for asthma. *Hosp Pediatr* 6(11): 667-676
- Boulet LP, Gauvreau G, Boulay ME, O'Byrne P, Cockcroft DW (2007) The allergen bronchoprovocation model: an important tool for the investigation of new asthma antiinflammatory therapies. *Allergy* 62: 1101-1110
- Bousquet J, Bosquet PJ, Godard P, Daures JP (2005) The public health impact of asthma. *Bull WHO* 83(7): 548-554
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM (2000) Asthma: From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1720-1745
- Broide DH (2001) Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 108: 65-71
- Bučková D, Izakovičová Hollá L, Vácha J (2002) Polymorphism 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with IgE-mediated allergic diseases and asthma in the Czech population. *Allergy* 57: 446-448



- Bush A, Menzies-Gow A (2009) Phenotypic differences between pediatric and adult asthma. *Proc Am Thorac Soc* 6 (8): 712–719
- Calafell F, Bertranpetit J, Ramírez-Soriano A, Saitou N, Blancher A, Roubinet F (2008) Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Hum Genet* 124: 123–135
- Centers for Disease Control and Prevention(CDC).Asthma-United States, 1982-1992. *MMWRMorb Mortal Wkly Rep* 1995;43(51-52)952-5
- Chang C (2006) Treatment of asthma in children. In: Gershwin ME, Albertson TE, eds. *Current clinical practice: bronchial asthma: a guide for practical understanding and treatment*, 5th ed. NJ: Humana Press Inc,pp. 65–111.
- Chatzi L, Torrent M, Romieu I, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Vioque J, Kogevinas M, Sunyer J (2008) Mediterranean diet in pregnancy is protective for wheeze and atopy in childhood. *Thorax* 63(6): 507-513
- Chen Y, Dales R, Jiang Y(2006) The association between obesity and asthma is stronger in nonallergic than allergic adults. *Chest* 130(3): 890-895
- Cho SH, Hall IP, Wheatley A, Dewar J, Abraha D, Del Mundo J, Lee H, Oh CK (2001) Possible role of the 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 gene in the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108: 212-214
- Cho SH, Lee SH, Kato A, Takabayashi T, Kulka M, Shin SC, Schleimer RP (2015) Cross-talk between human mast cells and bronchial epithelial cells in plasminogen activator inhibitor - 1 production via transforming growth factor- $\beta$ 1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52: 88-95
- Choudhry S, Seibold MA, Borrell LN, Tang H (2007) Dissecting complex diseases in complex populations: asthma in latino americans. *Proc Am Thorac Soc* 4(3): 226–233
- Chung KF, Adcock IM (2015) Clinical phenotypes of asthma should link up with disease mechanism. *Curr Opinion Allerg Clin* 15: 56-62
- Ciprandi G, De Amici M, Tosca M, Alesina R, Marseglia G, Fuchs D (2011) Serotonin in allergic rhinitis: a possible role for behavioural symptoms. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 10(3): 183-188
- Clark P, Wu O (2011) ABO blood groups and thrombosis: a causal association, but is there value in screening? *Future Cardiol* 7: 191-201

- Clerisme-Beaty EM, Karam, S, Rand C, Patino CM, Bilderback A, Riekert KA, Okelo SO, Diette GB (2009) Does higher body mass index contribute to worse asthma control in an urban population? *J Allergy Clin Immunol* 124(2): 207-212
- Cookson W (2003) A new gene for asthma. Would you ADAM and Eve it? *Trends in Genet* 19: 169-172
- Cortellazzo S, Viero P, Buczke W, Barbui T, De Gaetano G (1985) Platelet 5-hydroxytryptamine transport and storage in myeloproliferative disorders. *Scand J Haematol* 34: 146-151
- Cosan D, Kurt E, Kurt H, Degirmenci I, Kuçukarabaci B, Metintas M, Kucuk MU, Gunes HV, Colak E (2009) Plasminogen activator inhibitor type-1 gene 4G/5G polymorphism in Turkish adult patients with asthma. *Genet Test Mol Biomarkers* 13: 543-546
- Cserti CM, Dzik WH (2007) The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* 110: 2250-2258
- Curschmann H (1882) Über Bronchiolitis exudativa und ihr Verhältniss zum Asthma nervosum. *Dtsch Arch Klin Med* 32: 1-34
- Çelebi Sözüner Z, Zeynep, Aydın Ö, Mungan D, Mısırlıgil Z (2016) Obesity-Asthma Phenotype: Effect of Weight Gain on Asthma Control in Adults. *Allergy Asthma Proc* 37(4): 311–317
- Daniels G (2005) The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol* 14: 143–153
- D'amato G, Spiekma FT, Liccardi G, Jager S, Russo M, Kontou-Filli K (1998) Pollenrelated allergy in Europe. *Allergy* 53: 567-578
- Demoly P, Calderon MA, Casale T, Scadding G, Annesi-Maesano I, Braun JJ (2013) Assessment of disease control in allergic rhinitis. *Clin Transl Allergy* 3(1): 7
- Devereux G, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Harbour PJ, Helms PJ, Seato A (2006) Low maternal vitamin E intake during pregnancy is associated with asthma in 5 year-old children. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 499

- Dietert, RR (2011) Maternal and childhood asthma: risk factors, interactions, and ramifications. *Reprod Toxicol* 3 (2): 198–204
- Dijkstra A, Postma DS, Bruinenberg M, van Diemen CC, Boezen H, Koppelman G, Timens W, Vonk JM (2011) SERPINE1 -675 4G/5G polymorphism is associated with asthma severity and inhaled corticosteroid response. *Eur Respir J* 38: 1036-1043
- Dixon AE, Holguin F, Sood A, Salome CM, Pratley RE, Beuther DA, Celedón JC (2010) An Official American Thoracic Society Workshop Report: Obesity and Asthma. *Proc Am Thorac Soc* 7(5): 325–335
- Dürk T, Duerschmied D, Müller T, Grimm M, Reuter S, Vieira RP, Ayata K, Cicko S, Sorichter S, Walther DJ, Virchow JC, Taube C, and Idzko M (2013) Production of serotonin by tryptophan hydroxylase 1 and release via platelets contribute to allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 187(5): 476-485
- Dürk T, Panther E, Müller T, Sorichter S, Ferrari D, Pizzirani C, Di Virgilio F, Myrtek D, Norgauer J, Idzko M (2005) 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *Int Immunol* 17(5): 599-606
- Dürk T, Duerschmied D, Müller T, Grimm M, Reuter S, Vieira RP, Ayata K, Cicko S, Sorichter S, Walther DJ, Virchow JC, Taube C, Idzko M. (2013) Production of serotonin by tryptophan hydroxylase 1 and release via platelets contribute to allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 187(5): 476-485
- El-Helaly N, Samy SM, Tarek SI, Morcos WM, El-Hoshy HM, Mohamed DA (2012) Pulmonary function changes in allergic rhinitis with or without bronchial asthma. *J Am Science*. 8(1): 110-114
- Farjadian S, Moghtaderi M, Fakhraei B, Nasiri M, Farjam M (2013) Association between serotonin transporter gene polymorphisms and childhood asthma. *J Asthma*. 50(10): 1031-1035
- Falsarella N, Ferreira AI, Nakashima F, de Mattos Cde C, de Mattos LC (2011) Evidence of an association between the O blood group and allergic rhinitis. *Bras Hematol Hemoter* 33: 444-448

- Filatova NA (1986) Amine oxidase activity and blood serotonin levels in cancer of the gastrointestinal tract and lung. *Vopr Med Khim* 32: 36-39
- Ford ES (2005) The epidemiology of obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 115: 897-909
- Franchini M, Favaloro EJ, Targher G, Lippi G (2012) ABO blood group, hypercoagulability and cardiovascular and cancer risk. *Crit Rev Clin Lab Sci* 49: 137-149
- Fukumoto K, Taniguchi T, Usami N, et al. The ABO blood group is an independent prognostic factor in patients with resected non-small cell lung cancer. *J Epidemiol* 25(2): 110–116
- Fuller RW (1986) Biochemical pharmacology of the serotonin system. *Adv Neurol* 43: 469-471
- Garratty G, Glynn SA, McEntire R (2004) ABO and Rh(D) phenotype frequencies of different racial/ethnic groups in the United States. *Transfusion* 44: 703-706
- Garraty G (2005) Relationship of blood groups to disease: do blood group antigens have a biological role?. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 43: 113-121
- Gassner C, Schmarl A, Nussbaumer W, Schönitzer D (1996) ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 88: 1852-1856
- Gern JE, Busse WW (2002) Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nat Rev Immunol* 2: 132-138
- Gissler M, Jarvelin MR, Louhiala P, Hemminiki E (1999) Boys have more health problems in childhood than girls: follow-up of the 1987 Finnish birth cohort. *Acta Paediatr* 88: 310-314
- Gold DR (2000) Environmental tobacco smoke, indoor allergens and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 108:643-651
- Golden DB, Moffitt J, Nicklas RA, Freeman T, Graft DF, Reisman RE (2011) Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update 2011. *J Allergy Clin Immunol* 127:852

- Gujrati VR, Goyal A, Gaur SPS, Singh N, Shanker K, Chandravati K (1994) Relevance of platelet serotonergic mechanisms in pregnancy induced hypertension. *Life Sci* 55: 327-33.
- Halken S (2003) Early sensitisation and development of allergic airway disease - risk factors and predictors. *Paediatr Respir Rev* 4: 128-134
- Hamid Q (2012) Pathogenesis of small airways in asthma. *Respiration* 8: 4-11
- Hamilton RG, MacGlashan DW Jr, Saini SS (2010) IgE antibody-specific activity in human allergic disease. *Immunol Res* 47:273
- Holgate ST (2007) Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120: 1233-1244
- Holt PG (2004) The role of airway dendritic cell populations in regulation of Tcell responses to inhaled antigens: Atopic asthma as paradigm. *J Aerosol Med* 15: 161-168
- Idzko M, Pitchford S, Page C (2015) Role of platelets in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 135(6): 1416-1423
- Iodice S, Maisonneuve P, Botteri E, Sandri MT (2010) ABO blood group and cancer. *Eur J Cancer* 46: 3345-3350
- Issitt PD, Anstee DJ (1998) *Applied blood Group Serology*. APA 6th ed. Montgomery Scientific Publications. Durham NC
- Ivković-Jureković I (2005) HLA antigeni i mikrosatelitni lokusi vezani uz čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) u djece s atopijskom astmom. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Jaff MS (2010) Higher frequency of secretor phenotype in O blood group - its benefits in prevention and/or treatment of some diseases. *Int J Nanomedicine* 2: 901-905
- Janardhana V, Propert DN, Green RE (1991) ABO blood groups in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 51: 113-120
- Jankovic BD (1989) Neuroimmunomodulation: facts and dilemmas. *Immunol Lett.* 21: 101-106

- Jansen DF, Rijcken B, Schouten JP, Kraan J, Weiss ST, Timens W (1999) The relationship of skin test positivity, high serum total IgE levels, and peripheral blood eosinophilia to symptomatic and asymptomatic airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 924-931
- Jeffery P, Haahtela T (2006) Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one-airway condition. *BMC Pulmonary Medicine* 6(1):S5
- Jenkins PV, O'Donnell JS (2006) ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all?. *Transfusion* 46: 1836-1844
- Karege F, Widmer J, Bovier P, Gaillard J-M (1994) Platelet Serotonin and Plasma Tryptophan in Depressed Patients: Effect of Drug Treatment and Clinical Outcome. *Neuropsychopharmacology* 10(3): 207-214
- Kim TH, An SH, Cha JY, Shin EK, Lee JY, Yoon SH, Lee YM, Uh ST, Park SW, Park JS, Kim YH, Choi JS, Lee SO, Park BL, Shin HD, Park CS (2011) Association of 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4 (5-HTR4) gene polymorphisms with asthma. *Respirology* 16(4): 630-638
- Koebnick C, Fischer H, Daley MF, Ferrara A, Horberg MA, Waitzfelder B, Rohm Young D, Gould MK (2016) Interacting Effects of Obesity, Race, Ethnicity and Sex on the Incidence and Control of Adult-Onset Asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol* 12: 50
- Kohler HP, Grant PJ (2000) Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 342:1792–1801.
- Kominato Y, Hata Y, Matsui K, Takizawa H (2005) Regulation of ABO expression. *Leg Med* 7: 263-265
- Kornerup KN, Page CP (2007) The role of platelets in the pathophysiology of asthma. *Platelets* 18(5): 319-328
- Kumar M1, Verma NS, Tiwari S, Pandey US (2005) Sympathetic hyperactivity in patients of bronchial asthma. *Indian J Physiol Pharmacol.* 49(1): 89-94
- Laprise C, Boulet LP (1997) Asymptomatic airway hyperresponsiveness: a three-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 403-409

- Larsson M, Hagberg L, Norkrans G, Forsman A (1989) Indole amine deficiency in blood and cerebrospinal fluid from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Neurosci Res* 23: 441-446
- Lau WK, Chan-Yeung MM, Yip BH, Cheung AH, Ip MS, Mak JC (2012) COPD Study Group of the Hong Kong Thoracic Society. The role of circulating serotonin in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 7(2):e31617
- Lechin F, van der Dijs B, Orozco B, Lechin M, Lechin AE (1996) Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 77:245-253
- Lechin F, van der Dijs B, Lechin AE (2004) Treatment of bronchial asthma with tianeptine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26: 1-5.
- Lee SH, Eren M, Vaughan DE, Schleimer RP, Cho SH (2012) A plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor reduces airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46(6): 842-846
- Litonjua AA, Apter AJ, Weiss ST (2015) Asthma: Epidemiology. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. 5th ed.. New York, NY, McGraw-Hill Education.
- Liu RM, Eldrige S, Watanabe N, Deshane JS, Kuo HC, Jiang C, Wang Y, Liu G, Schwiebert L, Miyata T, Thannickal VJ (2015) Therapeutic potential of an orally effective small molecule inhibitor of plasminogen activator inhibitor for asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310: 328-336
- Lombardi C, Passalacqua G, Gargioni S, Senna G, Ciprandi G, Scordamaglia A, Canonica GW (2001) The natural history of respiratory allergy: a follow-up study of 99 patients up to 10 years. *Respir Med* 95(1): 9-12
- Lotwal J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjerner L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF jr (2011) Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *JACI* 127: 355-360
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

- Lucas JA, Moonie S, Olsen-Wilson K, Hogan MB (2016) Asthma, allergy, and obesity: examining the relationship among Nevada children. *J Asthma*.14: 1-6
- Lucki I (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry* 44: 151-162
- Madách K, Aladzsiy I, Szilágyi A, Fust G, Gál J, Péntes I, Prohászka Z (2010) 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study. *Critical Care* 14: R79.
- Maisonneuve P, Iodice S, Löhr JM, Lowenfels AB (2009) ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 101: 1156
- Malmgren R, Grubbström J, Olsson P, Theorell H, Tornling G, Unge G (1982) Defective serotonin (5-HT) transport mechanism in platelets from patients with endogenous and allergic asthma. *Allergy* 37(1): 29-39
- Mannucci PM, Franchini M. (2017) Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med*. 129(10): 1245-1250
- Marinaccio M, Traversa A, Carioggia E et al. (1995) Blood groups of the ABO system and survival rate in gynecologic tumors. *Minerva Ginecol* 47: 69-76
- Ma Z, Jhun B, Oh CK (2007) Upstream stimulating factor-1 mediates the E-box-dependent transcriptional repression of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in human mast cells. *FEBS Lett* 581: 4485-4490
- Meltzer H, Arora R, Baber R, Tricou B (1981) Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients. *Arch Gen Psychiatry* 38: 1322-1329
- Metoki R, Kakudo K, Tsuji Y, Teng N, Clausen H, Hakomori S (1989) Deletion of histo-blood group A and B antigens, and expression of incompatible A antigen in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 81: 1151-1157
- Mohandas N, Narla A (2005) Blood group antigens in health and disease. *Curr Opin Hematol* 12: 135-137
- Muck-Seler D, Pivac N (2011) Serotonin: an overview. *Period Biol* 113: 29-41



- Muck-Seler D, Pivac N, Sagud M, Jakovljevic M, Mihaljevic-Peles A (2002) The effects of paroxetine and tianeptine on peripheral biochemical markers in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 1235-1243
- Murray and Nadel's textbook of respiratory medicine. (2015) 6th ed. Print Book & E-Book. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier
- National Asthma Education and Prevention Program: Expert panel report II (1997) Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute (NIH publication no. 97-4051), Bethesda
- Nayak SK (1997) ABO blood groups in different diseases. *J Ind Med* 87: 449-452
- Nemeroff CB (1992) The presynaptic serotonin uptake site in depression. *Clin Neuropharmacol* 15: 347-348
- Nie W, Li B, Xiu Q (2012) The -675 4G/5G Polymorphism in Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Is Associated with Risk of Asthma: A Meta-Analysis. *PloS One* 7:e34385
- Nussbaum, Robert L (2007) *Genetics In Medecine*. 7 ed Canada: Thompson & Thompson, pp. 116-422.
- Nydgger UE, Wuillemin WA, Julmy F, Meyer BJ, Carrelet TP (2003) Association of ABO histo-blood group Ballele with myocardial infarction. *Eur J Immunogenet* 30: 201-206
- O'Byrne P, Persson CG, Church MK (2001) Cellular and mediator mechanisms of the early phase response. *Allergy*. 31(5): 325-326
- Ortiz J, Artigas F, Gelpi E (1988) Serotonergic status in human blood. *Life Sci* 43: 983-990
- Ozbek OY, Atac FB, Ogus E, Ozbek N (2009) Plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism in Turkish children with asthma and allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 30: 41-46
- Papaoannou AI, Kostikas K, Bakakos P, Papaporfyriou A, Konstantellou E, Hillas G, Papatheodorou G, Koulouris NG, Papiris S, Loukides S (2016) Predictors of future exacerbation risk in patients with asthma. *Postgrad Med* 128(7): 687–692
- Pearce N, Pekkanen J, Beasley R (1999) How much asthma is really attributable to atopy?. *Thorax* 54: 268-272

- Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, Robertson C (2007) Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62: 758–766
- Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R (2005) ATS/ERS Task Force. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Resp J* 26: 948-68
- Pevec B, Radulović, Pevec M, Stipić Marković A (2012) House dust mite-specific immunotherapy alters the basal expression of T regulatory and FcERI pathway genes. *Int Arch Allergy Immunol* 159: 287-296
- Pijnenburg MW, De Jongste JC (2008) Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review. *Clin Exp Allergy* 38: 246-259
- Popova NK (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *BioEssays* 28: 495-503
- Postma DS, Bleeker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI (1995) Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 333: 894-900
- Rami A Al-Horani (2014) Serpin regulation of fibrinolytic system: implications for therapeutic applications in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 12 (2): 91-125
- Reid ME, Mohandas N (2004) Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin hematol* 41: 93–117
- Rosenwasser L (2007) New insights into the pathophysiology of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 28: 10-15
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. ColdSpring Harbour Laboratory Press
- Schuliga M, Westall G, Xia Y, Stewart AG (2013) The plasminogen activation system: new targets in lung inflammation and remodeling. *Curr Opin Pharmacol* 13(3): 386-393

- Scott L, Li M, Thobani S, Nichols B, Morphew T, Kwong KY (2016) Factors Affecting Ability to Achieve Asthma Control in Adult Patients with Moderate to Severe Persistent Asthma. *J Asthma*: 53(6): 644–649
- Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD (1993) Atopy in childhood I. Gender and allergen related risks for development of hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy* 23: 941-948
- Segal DM, Taurog JD, Metzger H (1977) Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2993-2997
- Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, Sugo T, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Ishida T, Ichimura K, Sakata Y (2005) Protection of plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice from nasal allergy. *J Immunol* 174: 8135-8143
- Seltsam A, Hallensleben, Kollmann A, Blasczyk R (2003) The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood* 102: 3035-3042
- Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WO, Hopkin JM (1994) Association between atopy and variants of the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* 7: 125-129
- Shore SA, Fredberg JJ (2005) Obesity, smooth muscle, and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 115: 925-927
- Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B (2000) Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1501-1507
- Sousa AR, Lane SJ, Nakhosteen JA, Lee TH, Poston RN (1996) Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 154(4 Pt 1): 1061-1066
- Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ (1990) Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood: a prospective study. *N Eng J Med* 323: 502-507

- Stahl SM (1985). Platelets as pharmacological models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons. *Physiology and Pharmacology*. New York: Academic Press, pp. 307-340
- Stapleton M, Howard-Thompson A, George C, Hoover RM, Self TH (2011) Smoking and asthma. *J Am Board Fam Med* 24 (3): 313–322
- Stenius-Aarniala B, Poussa T, Kvarnström J, Grönlund EL, Ylikahri M, Mustajoki P (2000) Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study. *BMJ* 320 :827
- Stewart CE, Sayers I (2013) Urokinase receptor orchestrates the plasminogen system in airway epithelial cell function. *Lung* 191(2): 215-225
- Stipić-Marković A, Pevec B, Pevec MR, Čustović A. (2003) Prevalence of symptoms of asthma allergic rhinitis, conjunctivitis and atopic eczema: ISAAC in population of school children in Zagreb. *Acta Med Croatica* 57(4): 281-285
- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 299: 1259-1260
- Szeffler S, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, Hunt JF, Kita H, Liu AH, Panettieri RA Jr, Schleimer RP, Minnicozzi M (2012) Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 129: 19-23
- Taylor B, Mannino D, Brown C, Crocker D, Twum-Baah N, Holguin F (2008) Body mass index and asthma severity in the National Asthma Survey. *Thorax* 63:14-20
- Tezuka T, Ogawa H, Azuma M, Goto H, Uehara H, Aono Y, Hanibuchi, M, Yamaguchi Y, Fujikawa T, Itai A, Nishioka Y (2015) IMD-4690, a novel specific inhibitor for plasminogen activator inhibitor-1, reduces allergic airway remodeling in a mouse model of chronic asthma via regulating angiogenesis and remodeling-related mediators. *Plos One* 10 :e0121615
- The global burden of asthma report. *Global\_Asthma\_Report\_2014.pdf*. [www.globalasthmareport.org](http://www.globalasthmareport.org), pristupljeno 30. 7. 2016.
- Thomson NC, Spears M (2005) The influence of smoking on the treatment response in patients with asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5 (1): 57–63

- Tollånes MC, Moster D, Daltveit AK, Irgens LM (2008) Cesarean section and risk of severe childhood asthma: a population-based cohort study. *J Pediatr* 153: 112
- Ulger AF, Keklik T, Kumbasar OO, Arbak P, Demirkazyk A, Güngör A, Ereku S, Alper D (2002) Prognostic significance of blood group antigen expression of tumor tissue in lung cancer patients. *Tumori* 88: 395-399
- Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD (1996) Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci* 16: 2352-2364
- Way K. W. Lau, Moira M. W. Chan-Yeung, Benjamin H. K. Yip, Amy H. K. Cheung, Mary S. M. Ip, Judith C. W. Mak (2012) The Role of Circulating Serotonin in the Development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One*. 7(2):e31617
- Watkins M (2001) The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med* 11: 243-265
- Wang L, Pinkerton KE (2008) Detrimental effects of tobacco smoke exposure during development on postnatal lung function and asthma. *Birth Defects Res C Embryo Today* 84:54-60
- Wechsler ME, Casto M, Lehman E, Chinchilli VM, Sutherland ER, Denlinger L, Lazarus SC, Peters SP, Israel E (2011) NHLBI Asthma Clinical Research Network. Impact of race on asthma treatment failures in the asthma clinical research network. *Am J Respir Crit Care Med* 184(11): 1247-1253
- Weiss ST, Gold DR (1995) Gender differences in asthma. *Pediatr Pulmonol* 19: 153-155
- Weiss ST, Speizer FE (1993) Epidemiology and natural history. In: *Bronchial Asthma Mechanisms and Therapeutics*, 3rd ed, Weiss EB, Stein M (Eds), Little Brown, Boston, pp. 15-25
- Wennergren G (2011) The prevalence of asthma has reached a plateau. *Acta Pediatr* 100(7): 938-939
- Wheatley LM, Togias A (2015) Clinical practice. Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 372(5): 456-463

- Williams RB1, Marchuk DA, Gadde KM, Barefoot JC, Grichnik K, Helms MJ, Kuhn CM, Lewis JG, Schanberg SM, Stafford-Smith M, Suarez EC, Clary GL, Svenson IK, Siegler IC. (2001) Central Nervous System Serotonin Function and Cardiovascular Response to Stress. *Psychosomatic Med* 63: 300-305
- Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P (2008) ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 6: 62-69
- Yamamoto F (1995) Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox Sang* 69:1-7
- Yang Y, Zhao M, Zhang Y, Shen X, Yuan Y (2016) Correlation of 5-HTT, BDNF and NPSR1 gene polymorphisms with anxiety and depression in asthmatic patients. *Int J Mol Med*. 38(1): 65-74
- Zorio E, Gilabert-Estellés J, España F, Ramón LA, Cosin R, Estellés A (2008) Fibrinolysis: The key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem* 15: 923-929

## **8. Životopis**

## **ŽIVOTOPIS**

Marina Lampalo rođena je u Šibeniku 1. veljače 1975. godine. Osnovnu školu i školu za Zdravstvene tehničare laborantskog smjera završila je u Zagrebu. Na Sveučilištu u Zagrebu diplomirala je na Medicinskom fakultetu 2001. godine. Liječnički staž odradila je na KB Sveti Duh, a stručni ispit za liječnike položila 2002. godine. Nakon toga radila je kao terenski liječnik u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu. Specijalizaciju iz interne medicine započela je krajem 2003. godine u Klinici za plućne bolesti Jordanovac te uspješno položila specijalistički ispit u ožujku 2008. Subspecijalistički ispit iz pulmologije položila je u studenom 2010. godine. Zaposlena je kao odjelni liječnik internist-pulmolog u KBC Zagreb, Klinika za plućne bolesti Jordanovac, na Zavodu za opstruktivne bolesti i alergologiju. Doktorski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu upisala je 2013. godine i položila sve ispite.

U svrhu znanstvene i stručne edukacije pristupnica je sudjelovala s radovima na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima.

Članica je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog pulmološkog društva i Torakalnog društva.

Dobitnica je prve nagrade Toraksa za najbolji znanstveni rad 2016. g.

Majka je jednog djeteta.



## **PUBLICIRANI RADOVI**

### **Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima**

1. Lampalo M, Jukic I, Bingulac-Popovic J, Marunica I, Petlevski R, Pavlisa G, Popovic-Grle S. Polymorphism 4G/5G of the plasminogen activator inhibitor 1 gene as a risk factor for the development of allergic rhinitis symptoms in patients with asthma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017 Mar 3.

### **Sažeci u zbornicima skupova**

1. Lampalo M., Ferara N., Barišić B., Ivičević A., Miculinić N., Krmptoić D., Basara L., Popović-Grle S1. The impact of biomarkers on ventilation disorder in allergic and non-allergic adult asthma patients // 5.Kongres Hrvatskog torakalnog društva sa međunarodnim sudjelovanjem 2015.

2. Pavliša G., Puretić H., Žuljević E., Hećimović A., Vukić Dugac A., Lampalo M., Jakopović M., Samaržija M. The impact of routine intensive care procedures on the endotracheal tube cuff pressure // 6.Kongres Hrvatskog torakalnog društva sa međunarodnim sudjelovanjem 2016.

3. Lampalo M, Jukić I, Bingulac Popović J, Ferara N, Safić-Stanić H, Popović-Grle S. Obesity is an often modifiable factor in allergic and of nonallergic asthma phenotypes // 7. Kongres Hrvatskog torakalnog društva sa međunarodnim sudjelovanjem 2017.

4. Vurdelja I., Lampalo M., Prentašić D., Barišić B., Krmptoić D., Miculinić N., Popović-Grle S. NIV // 7.Kongres Hrvatskog torakalnog društva sa međunarodnim sudjelovanjem 2017.

5. Pavliša G., Puretić H., Žuljević E., Džubur F., Labor M., Hećimović A., Vukić Dugac A., Janković Makek M., Lampalo M., Jakopović M., Samaržija M. Risk factors for invasive mechanical ventilation in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease // 7.Kongres Hrvatskog torakalnog društva sa međunarodnim sudjelovanjem 2017.

6. Pavliša G., Puretić H., Žuljević E., Džubur F., Hećimović A., Vukić Dugac A., Janković Makek M., Labor M., Lampalo M., Jakopović M., Samaržija M. Hospital

readmission rate and mortality after severe exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease // 7.Kongres Hrvatskog torakalnog društva sa međunarodnim sudjelovanjem 2017.

7. Lampalo M., Ferara N., Jukić I., Bingulac Popović J., Safić Stanić H., Popović Grle S. Atopy in asthma and ABO genotype // East-Central European Conference of Pulmonology, Pécs, Hungary,2017.