

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Jerković

POVEZANOST VITAMINA D, A I E TE UPALNIH BIOMARKERA S REMISIJOM ASTME KOD ADOLESCENATA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Jerković

POVEZANOST VITAMINA D, A I E TE UPALNIH BIOMARKERA S REMISIJOM ASTME KOD ADOLESCENATA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof.dr.sc. Mirjana Turkalj
Prof.dr.sc. Kristian Vlahoviček

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivana Jerković

ASSOCIATION OF VITAMINS D, A, E AND INFLAMMATORY BIOMARKERS WITH ASTHMA REMISSION IN ADOLESCENTS

DOCTORAL THESIS

Mentors:
Professor Mirjana Turkalj, PhD
Professor Kristian Vlahoviček, PhD

Zagreb, 2026.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Dječjoj bolnici Srebrnjak, Referentnom centaru Ministarstva zdravstva za kliničku alergologiju djece, pod vodstvom mentora prof.dr.sc. Mirjane Turkalj i prof.dr.sc. Kristiana Vlahovičeka u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se mentorima prof.dr.sc. Mirjani Turkalj i prof.dr.sc. Kristianu Vlahovičeku na dostupnoj pomoći, korisnim savjetima i poticanju tijekom izrade disertacije.
Također, zahvaljujem kolegama Dječje bolnice Srebrnjak koji su sudjelovanjem i prijateljskom pomoći pridonijeli izradi disertacije.
Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na strpljenju, razumijevanju i neizmjernoj podršci.

INFORMACIJE O MENTORIMA

Prof.dr.sc. Mirjana Turkalj, dr.med. diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1998. godine specijalistica je pedijatrije, a od 2005. godine subspecijalistica alergologije i kliničke imunologije te pedijatrijske pulmologije. Od 2013. godine je docentica, a od 2019. godine je redovita profesorica na Hrvatskom katoličkom sveučilištu na Zdravstvenom studiju i Medicinskom fakultetu Sveučilišta. Radi kao subspecijalistica pedijatrije u Dječjoj bolnici Srebrnjak u Zagrebu, gdje je od 2010. do 2019. godine bila zamjenica ravnatelja, a od 2003. do 2024. godine voditeljica Referentnog centra za kliničku alergologiju djece Ministarstva zdravstva RH. Mirjana Turkalj je profesorica i predavačica na Medicinskom fakultetu i Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku, Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, studij na engleskom jeziku i drugima. Voditeljica je nekoliko znanstveno-istraživačkih projekata financiranih iz fondova EU-a. Napisala je više od 280 znanstvenih i stručnih radova i 30 poglavlja u knjigama s oko 2400 citata.
Njezini zdravstveni interesi su: imunološki mehanizmi astme i alergijskih bolesti kod djece, alergenska imunoterapija, alergija na hranu i imunoterapija hranom, utjecaj čimbenika okoliša na pojavu i razvoj alergijskih bolesti.

Prof.dr.sc. Kristian Vlahoviček rođen je u Zagrebu gdje je 1995. godine diplomirao molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za svoj magistarski rad radio je na problemu rendgenske kristalografije i razvio program za korekciju apsorpcije raspršenih rendgenskih podataka. Doktorirao je bioinformatiku/ biokemiju i dalje slijedeći svoje interese strukturne biologije, radeći na računalnom predviđanju strukturnih i fizikalno-kemijskih svojstava DNK. Proveo je 10 godina kao istraživački suradnik u Međunarodnom centru za genetski inženjering i biotehnologiju u Trstu u Italiji, gdje je također radio na računalnom predviđanju i klasifikaciji proteinskih domena korištenjem pristupa strojnog učenja. Godine 2002. osnovao je grupu za računalnu biologiju na Sveučilištu u Zagrebu, gdje se trajno preselio 2006. godine zahvaljujući instalacijskoj potpori EMBO programa mladih istraživača te usmjerio znanstvene interese prema novonastalom području genomike. Njegova bioinformatička grupa razvija računalne alate i koristi tehnike strojnog učenja za rješavanje otvorenih pitanja u razvojnoj genomici i metagenomici.

Godine 2011. postao je redoviti profesor na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Imao je nekoliko međunarodnih imenovanja, uključujući četverogodišnje izvanredno profesorsko mjesto na Sveučilištu u Oslu u Norveškoj i dvogodišnje izvanredno profesorsko mjesto na Sveučilištu u Skövdeu u Švedskoj. Od 2008. do 2012. godine bio je voditelj Odjela za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u nastavi četiriju poslijediplomskih kolegija: Bioinformatika, Algoritmi i programiranje, Statistika i strojno učenje te Računalna genomika. Tijekom njegovog vremena kao voditelja grupe pod njegovim je mentorstvom diplomiralo više od 30 doktorskih i magistarskih studenata. Njegov znanstveni dosje uključuje više od 60 publikacija u vrhunskim časopisima i predavanja u mnogim renomiranim institucijama diljem svijeta. Njegove istraživačke teme su: razvojna i diferencijacijska genomika, metagenomika, populacijska genomika i glikomika, podrijetlo višećelijnosti, epigenomika raka, razvoj računalnih metoda i primjena strojnog učenja u genomici i molekularnoj biologiji. Recenzent je u brojnim znanstvenim časopisima, kao i u nacionalnim i međunarodnim tijelima i programima za financiranje. Član je Academia Europaea i nekoliko strukovnih društava na nacionalnoj i međunarodnoj razini. Bio je član upravnog odbora vrlo uspješnog hrvatskog tijela za financiranje znanosti, Fonda Jedinstvo uz znanje (UKF) te je sudjelovao u nekoliko panela za izradu strategija na sveučilišnoj i nacionalnoj razini.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

POVEZANOST VITAMINA D, A I E TE UPALNIH BIOMARKERA S REMISIJOM ASTME KOD ADOLESCENATA

IVANA JERKOVIĆ
Dječja bolnica Srebrnjak

Kod pojedine djece i odraslih koji boluju od astme u nekom periodu života može doći do spontane remisije astme. Precizni biološki mehanizmi i prediktivni čimbenici razvoja remisije astme nisu do kraja razjašnjeni. U ovom istraživanju praćen je učinak vitamina i upalnih citokina na razvoj remisije bolesti. Mjerene su koncentracije vitamina D, A i E te IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, IFN-γ, ECP, hsCRP i FeNO-a. Ispitanici s astmom imali su statistički značajno niže vrijednosti vitamina A i E, u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Nije uočena razlika u koncentraciji vitamina D kod djece s astmom i zdrave djece. Ispitanici s remisijom astme imali su nižu koncentraciju vitamina D, A i E u odnosu na adolescente koji i dalje imaju simptome astme, iako razlika nije dosegla statističku značajnost. Koncentracija upalnih biomarkera bile su više kod adolescenata s aktivnom astmom u odnosu na adolescente s remisijom astme, ali samo za vrijednosti ECP-a, Eo, hsCRP -a i IFN-γ. Utvrđena je povezanost vitamina A i IL-4, IL-5 i IL-13 te vitamina E i IL-4 i IL-5 u cjelokupnom uzorku ispitanika te vitamina D i IFN-γ u skupini ispitanika s remisijom astme.

(92 stranice, 8 slika, 17 tablica, 214 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Ključne riječi: astma, remisija, djeca, vitamin D, A, E, upalni biomarkeri
Mentori: prof.dr.sc. Mirjana Turkalj
prof.dr.sc. Kristian Vlahoviček
Ocjenjivači: izv.prof.dr.sc. Snježana Židovec Lepej
prof.dr.sc. Domagoj Đikić
prof.dr.sc. Davor Plavec

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

ASSOCIATION OF VITAMINS D, A, E AND INFLAMMATORY BIOMARKERS WITH THE REMISSION OF ASTHMA IN ADOLESCENTS

IVANA JERKOVIĆ

Srebrnjak Children's Hospital

Some children and adults who suffer from asthma may experience spontaneous remission of asthma at some point in their lives. The precise biological mechanisms and predictive factors of the development of asthma remission are not fully understood. In this study, the effect of vitamins and inflammatory cytokines on the development of disease remission was monitored. Concentrations of vitamins D, A and E, as well as IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, IFN-γ, ECP, hsCRP and FeNO were measured. Subjects with asthma had statistically significantly lower values of vitamins A and E, compared to healthy subjects. No difference in vitamin D concentration was observed in children with asthma and healthy children. Subjects with asthma remission had lower concentrations of vitamins D, A and E compared to adolescents who still have asthma symptoms, although the difference did not reach statistical significance. The concentration of inflammatory biomarkers was higher in adolescents with active asthma compared to adolescents with asthma remission, but only for ECP, hsCRP and IFN-γ values. The association of vitamins A and IL-4, IL-5 and IL-13 and vitamins E and IL-4 and IL-5 was found in the entire sample of subjects and vitamins D and IFN-γ in the group of subjects with asthma remission.

(92 pages, 8 figures, 17 tables, 214 references, original in Croatian)
Keywords: asthma, remission, children, vitamins D, A, E, inflammatory biomarkers
Supervisors: Professor Mirjana Turkalj, PhD
Professor Kristian Vlahoviček, PhD
Reviewers: Associate Professor Snježana Židovec Lepej, PhD
Professor Domagoj Đikić, PhD
Professor Davor Plavec, PhD

Sadržaj

Popis slika iii
Popis tablica iv
Popis oznaka i kratica v
1. UVOD 1
1.1. Hipoteza 5
1.2. Ciljevi istraživanja 5
2. LITERATURNI PREGLED 6
2.1. Astma 6
2.1.1. Definicija astme 6
2.1.2. Prevalencija astme kod djece 6
2.1.3. Etiologija astme 7
2.1.4. Patofiziologija astme 12
2.1.5. Dijagnostički postupci 20
2.1.6. Fenotipovi astme u djetinjstvu 21
2.1.7. Remisija astme 22
2.2. Upalni biomarkeri u astmi 24
2.2.1. IL-4 24
2.2.2. IL-5 25
2.2.3. IL-13 25
2.2.4. TNF-α 26
2.2.5. IFN-γ 26
2.2.6. ECP 27
2.2.7. hsCRP 27
2.2.8. Eozinofili 28
2.2.9. Molekula FeNO 28
2.3. Vitamini 28
2.3.1. Vitamin D 29
2.3.2. Vitamin A 31
2.3.3 Vitamin E 31
3. ISPITANICI I METODE 33
3.1. Vrsta istraživanja 33
3.2. Ispitanici 33
3.3. Metode 35

4. REZULTATI.....46
4.1. Karakteristike ispitivanih skupina.....46
4.2. Razine upalnih parametara u ispitivanim skupinama.....50
4.3. Razine vitamina A, D i E u ispitivanim skupinama.....53
4.4. Povezanost razina upalnih markera s razinom vitamina A, D i E.....56
4.5. Nezavisni prediktori za remisiju astme.....58
5. RASPRAVA.....61
6. ZAKLJUČAK.....70
7. LITERATURA.....72
8. ŽIVOTOPIS.....90

Popis slika

Slika 1. Patofiziologija astme 19
Slika 2. Modeli i kriteriji za remisiju astme.....23
Slika 3. Imunoregulacijska aktivnost vitamina D na upalne stanice uključene u patogenezu astme.....30
Slika 4. Plućna funkcija po skupinama (N=134); FVC – forsirani vitalni kapacitet kao postotak od norme, FEV1 – forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi kao postotak od norme. 48
Slika 5. Vrijednosti ECP-a, FeNO-a i uIgE po skupinama (N=134).....51
Slika 6. Vrijednosti upalnih parametara (IFN-γ, IL-13, IL-4, IL-5, TNF-α) po skupinama (N=134).....52
Slika 7. Razine vitamina A, D i E u serumu po skupinama (N=134).....54
Slika 8. Forest plot omjera šansi (OR) i 95%-tnih intervala pouzdanosti (CI) za logističku regresijsku analizu za remisiju astme 59

Popis tablica

Tablica 1. Uvjeti analize vitamina D u plazmi metodom tekućinske kromatografije 40
Tablica 2. Uvjeti ionskog izvora (masenog spektrometra) u analizi vitamina D u plazmi.....40
Tablica 3. Tranzicije masa specifičnih za pojedine analite (vitamin D2, vitamin D3, epimer vitamin D3) u analizi vitamina D u plazmi metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom.....41
Tablica 4. Očekivana retencijska vremena za pojedine analite u analizi vitamina D u plazmi metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom 41
Tablica 5. Uvjeti analize vitamina A i E u plazmi metodom tekućinske kromatografije.....43
Tablica 6. Uvjeti ionskog izvora (masenog spektrometra) u analizi vitamina A i E u plazmi 43
Tablica 7. Tranzicije masa specifičnih za pojedine analite (vitamin A i vitamin E) u analizi vitamina A i E u plazmi metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom.....44
Tablica 8. Očekivana retencijska vremena za pojedine analite u analizi vitamina A i E u plazmi metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom 44
Tablica 9. Demografske i anamnestičke karakteristike te komorbiditeti po skupinama (N=134) 46
Tablica 10. Plućna funkcija po skupinama (N=134) 48
Tablica 11. Karakteristike astme u skupinama astmatičara (N=108) 49
Tablica 12. Upalni parametri po skupinama (N=134) 50
Tablica 13. Razine vitamina A, D i E po skupinama.....53
Tablica 14. Razine vitamina A, D i E po godišnjim dobima (N=134) 55
Tablica 15. Povezanost upalnih parametara s razinom vitamina A, D i E u svih ispitanika (N=129).....56
Tablica 16. Povezanost upalnih parametara s razinom vitamina A, D i E u ispitanika s remisijom astme (N=54) 57
Tablica 17. Logistička regresijska analiza za remisiju astme.....58

Popis oznaka i kratica

15S-HETE - 15(S)-hidroksieikozatetraenske kiseline (eng. *15-Hydroxyeicosatetraenoic acid*)

AAAAI - Američka akademija za alergologiju, astmu i imunologiju (eng. *American Academy of Allergy, Asthma and Immunology*)

ACAAI - Američki kolegij za alergologiju, astmu i imunologiju (eng. *American College of Allergy, Asthma and Immunology*)

ACQ - upitnik o kontroli astme (*Asthma Control Questionnaire*)

ACT - upitnik o kontroli astme (eng. *Asthma Control Test*)

ADAM33 - gen koji kodira disintegrin i metaloproteinazu 33 (eng. *A Disintegrin And Metalloproteinase 33*)

ADRB2 - beta-2 adrenergički receptor (eng. *beta-2 adrenergic receptor*)

AERD - respiratorna bolest pogoršana aspirinom (eng. *Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease*)

Ag - antigen

AIRQ - upitnik o oštećenju i riziku od astme (*Asthma Impairment and Risk Questionnaire*)

anti-IL-4R - antitijelo protiv receptora za interleukin-4 (eng. *Anti-Interleukin-4 Receptor*)

ATS - Američko torakalno društvo (eng. *American Thoracic Society*)

AUC - površina ispod ROC krivulje (eng. *Area Under the Curve*)

BMI - indeks tjelesne mase (eng. *Body Mass Index*)

CCR7 - C-C kemokinski receptor 7 (eng. *C-C chemokine receptor type 7*)

CLIA - kemiluminiscentna imunoanaliza (eng. *Chemiluminiscent immunoassay*)

DC - dendritična stanica (eng. *Dendritic cell*)

DKS - diferencijalna krvna slika

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (eng. *Deoxyribonucleic acid*)

ECP - eozinofilni kationski protein (eng. *Eosinophil Cationic Protein*)

EDN - neurotoksin izveden iz eozinofila (eng. *Eosinophil-Derived Neurotoxin*)

ELISA - enzimski imunotest (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Eo - eozinofili

EPX - eozinofilna peroksidaza (eng. *Eosinophil-peroxidase*)

ERS - Europsko respiratorno društvo (eng. *European Respiratory Society*)

FcεRI - receptor visokog afiniteta za IgE (eng. *high affinity IgE receptor*)

FDA - Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*)

FENO - frakcija izdahnutog dušičnog oksida (eng. *Fractional Exhaled Nitric Oxide*)

FEV1 - forsirani ekspiracijski volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi (*Forced Expiratory Volume in 1 second*)

FVC - forsirani vitalni kapacitet

GBD 2021 - studija globalnog tereta bolesti iz 2021. godine (eng. *Global Burden of Disease Study 2021*)

GERB - gastroezofagealna refluksna bolest

GINA - Globalna inicijativa za astmu (eng. *Global Initiative for Asthma*)

GM-CSF - faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (eng. *Granulocyte-Macrophage Colony-Simulating Factor*)

GSDMB - gen za gasdermin B na 17. kromosomu (eng. *Gasdermin B*)

GWAS - studija asocijacije na razini cijelog genoma (eng. *Genome-Wide Association Study*)

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-performance liquid chromatography*)

hsCRP - CRP velike osjetljivosti (eng. *highsensitivity C-Reactive Protein*)

IFN-γ - interferon gama (eng. *interferon gamma*)

IgE - imunoglobulin E

IKS - inhalacijski kortikosteroid

IL - interleukin

ILC - prirođene limfoidne stanice (eng. *Innate Lymphoid Cells*)

IQR - interkvartilni raspon (eng. *interquartile range*)

LC - tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*)

LT - leukotrieni

MBP - glavni bazni protein (eng. *major basic protein*)

miRNA - mala ribonukleinska kiselina (eng. *microRNA*)

MMP - matriksne metaloproteinaze (eng. *Matrix metalloproteinases*)

MS - masena spektrometrija (eng. *Mass spectrometry*)

ORMDL3 - gen na mjestu 17q21 na 17 kromosomu (eng. *Orosomucoid-like 3*)

OSA - opstruktivna apneja u snu (eng. *opstructive sleep apnea*)

PD20 - provokacijska doza 20

PEF - vršni ekspiracijski protok (eng. *Peak Expiratory Flow*)

PGE2 - prostaglandin E2

RNA - ribonukleinska kiselina (eng. *Ribonucleic acid*)

ROC krivulja - krivulja za određivanje dijagnostičke značajnosti (eng. *Receiver Operating Characteristic*)

RSV - respiratorni sincicijski virus (eng. *Respiratory syncytial virus*)

SNP - polimorfizama jednog nukleotida (eng. *Single nucleotide polymorphism*)

SPT - kožni ubodni test (eng. *Skin Prick Test*)

T2 upala - upala tipa 2 (eng. *Type 2 inflammation*)

TGF-β - transformirajući faktor rasta beta (eng. *Transforming growth factor-beta*)

Th1 - pomoćnički T limfociti 1 (eng. *T-helper 1*)

Th17 - pomoćnički T limfociti 17 (eng. *T-helper 17*)

Th2 - pomoćnički T limfociti 2 (eng. *T-helper 2*)

Th22 - pomoćnički T limfociti 22 (eng. *T-helper 22*)

Th9 - pomoćnički T limfociti 9 (eng. *T-helper 9*)

TIMP - tkivni inhibitori metaloproteinaza (eng. *Tissue inhibitors of Metalloproteinases*)

TLR – receptor sličan proteinu Toll (eng. *Toll-like receptor*)

TNF-α - čimbenik nekroze tumora α (eng. *Tumor Necrosis Factor- α*)

Treg stanice - regulatorne T-stanice

TSLP - timski stromalni limfopoetin (eng. *Thymic stromal lymphopoietin*)

uIgE - ukupni imunoglobulin E

UVB zračenje - ultraljubičasto zračenje B zrakama (eng. *ultraviolet B*)

VDBP - vitamin D transportni protein (eng. *vitamin D binding protein*)

1. UVOD

Astma je najčešća kronična bolest donjih dišnih puteva kod djece (1). Karakterizira je kronična upala dišnih putova uz prisutne epizode pogoršanja sa simptomima kratkoće daha, kašlja, zviždanja, stezanja i pritiska u prsištu. To je heterogena bolest koja se manifestira različitim fenotipovima i endotipovima, uzrokovana interakcijom genskih i okolišnih čimbenika (2). Dijagnoza astme temelji se na anamnezi s tipičnim simptomima, ograničenim protokom zraka prilikom izdisaja i pozitivnim bronhodilatacijskim testom (Globalna inicijativa za astmu-GINA 2023.) (3). Prema dominantnom pokretaču ili trigeru razlučeno je nekoliko fenotipova astme; astma izazvana alergenom, astma izazvana virusima, astma izazvana naporom, astma nejasne etiologije, od kojih je kod djece najčešća alergijska astma. Ona može bili udružena s drugim alergijskim bolestima poput atopijskog dermatitisa, alergijskog rinitisa, alergije na hranu te pozitivnom obiteljskom anamnezom za alergijske bolesti (4,5). Kod djece i odraslih koji boluju od astme može se u nekom periodu života razviti remisija astme. Remisija astme se definira kao stanje bez aktivnosti bolesti i može biti spontana ili rezultat terapije. Oko polovine djece kojoj je astma dijagnosticirana u predškolskoj dobi ulazi u remisiju tijekom adolescencije (6). Tijekom praćenja remisije bolesti uočeno je postojanje dva tipa remisije. Jedan tip je klinička remisija koja se definira kao odsustvo simptoma astme i neuzimanje terapije najmanje godinu dana. Drugi tip remisije je kompletna remisija kod koje osim prestanka simptoma i neuzimanja terapije oboljeli imaju i urednu plućnu funkciju (FEV1>90%) te normoreaktivnost bronha (bez bronhalne hiperreaktivnosti) (7). U istraživanjima provedenim kod djece uočeno je da tijekom višegodišnjeg razdoblja oko 30% djece razvije kliničku remisiju i 22% djece kompletnu remisiju astme (8).

Mehanizam nastanka remisije je još uvijek nepoznat (9). Istraživanja pokazuju da je u kliničkoj remisiji i dalje prisutna upala dišnih puteva kao i njihovo remodeliranje. Biopsijom bronha utvrđen je povećan broj eozinofila, mastocita, makrofaga, T limfocita te interleukina 5 (IL-5) (10). Djeca s kliničkom remisijom imaju nerijetko i održanu bronhalnu hiperreaktivnost i/ili nižu plućnu funkciju. To ukazuje na činjenicu da prihvaćanje definicije remisije, samo kao odsustvo simptoma i terapije, nije adekvatno, jer se ne prepoznaju bolesnici sa subklinički aktivnom bolesti, rizikom perzistencije i progresije bolesti zbog nastavka remodeliranja dišnih putova (8). U adolescenata s remisijom smanjenje bronhalne hiperreaktivnosti se najčešće dokazuje metakolinskim testom (11).

Znanstvena je nepoznanica prepoznavanje čimbenika koji su povezani s mehanizmima razvoja remisije i smanjenjem ili nestankom upale u donjim dišnim putevima. Stoga bi čimbenici koji mogu modulirati imunološki odgovor ili kroničnu upalu mogli imati učinak na razvoj remisije u adolescenata s astmom.

Tijekom imunološkog odgovora, stanice imunosnog sustava međusobno komuniciraju preko signalnih molekula, citokina. Imunosni odgovor na infekciju reguliran je dinamičkim odnosom između Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina. Prema funkciji u organizmu dijele se na protu-upalne i pro-upalne citokine. Protu-upalni citokini kao što je interferon gama (IFN-γ), imaju ulogu u reguliranju i kontroli astme, za razliku od pro-upalnih citokina IL-4, IL-5. IL-13, faktora tumorske nekroze alfa (TNF-α) koji podržavaju upalu kod astme. Istraživanja su pokazala da postoji razlika u koncentraciji citokina kod djece s aktivnom astmom i astmom u remisiji. Tako je utvrđeno da djeca koja imaju aktivnu astmu imaju višu koncentraciju pro-upalnih citokina, za razliku od djece s remisijom astme (12).

Poznao je da su vitamini esencijalni mikronutrijenti koji imaju imunomodulatorsku ulogu, primarno u tzv. finom podešavanju imunološke reakcije, te uravnotežuju imunološki odgovor u borbi protiv infekcija sprječavajući pretjeranu upalu. Održavanje optimalne razine vitamina, posebno vitamina D, E, A i C ključno je i za urođeni i za stečeni imunološki odgovor (13). Također je poznato da vitamini djeluju kao ključni imunomodulatori u bolesnika s astmom utječući na diferencijaciju T-stanica, suzbijajući proupalne citokine i smanjujući upalu dišnih putova (14).

Vitamin D je vitamin topiv u mastima, važan za zdravlje kostiju kao i za imunosni sustav u borbi protiv mikroorganizama, kao što su respiratorni virusi koji su često okidači egzacerbacija astme. Sjedilački način života i promjene u prehrani mogu uzrokovati manjak vitamina D. Moguće je da je manjak vitamina D povezan s povećanjem reaktivnosti dišnih putova, nižom plućnom funkcijom, lošijom kontrolom astme i slabijim odgovorom na steroidnu terapiju (15). Mnoga istraživanja pokazala su povezanost manjka vitamina D s razvojem egzacerbacija astme (16, 17). Vitamin D ima i antimikrobni učinak te je brojnim istraživanjima utvrđeno da smanjuje broj respiratornih infekcija i egzacerbacija astme (18). Snižena koncentracija vitamina D povećava ekspresiju citokina koji potiču upalu (pro-upalni citokini) što ima za učinak upalu u dišnim putovima. U pojedinim istraživanjima je utvrđeno da uzimanje vitamina D poboljšava

kontrolu i smanjuje težinu astme (19,20). Također bolesnici s težim oblikom astme i nekontroliranom astmom imaju nižu koncentraciju D vitamina (21,22). Istraživanja pokazuju i razliku u koncentraciji vitamina D i ukupnog imunoglobulina E (uIgE) u bolesnika s egzacerbacijama i remisijom astme. Vitamin D je niži za vrijeme egzacerbacije nego u remisiji i kod zdrave djece, dok je uIgE povišen kod astmatičara i u egzacerbaciji i remisiji bolesti u odnosu na zdravu djecu (23). Prema epidemiološkim istraživanjima i meta-analizama manja koncentracija vitamina D u djece povezana je s povećanim rizikom za razvoj astme (24). Astma je bolje kontrolirana kod djece s urednim vrijednostima D vitamina (25).

Vitamin A je ime za grupu retinoida topivih u mastima uključujući retinol, retinal i retinil estere. Ključan je za funkcioniranje imunosnog sustava, vida, reprodukcije i staničnog rasta kao i diferencijaciju i normalno formiranje i održavanje srca, pluća, bubrega i drugih organa. Nadoknada se vrši putem hrane i dodataka prehrani. Prehrana s više vitamina A je povezana s boljom plućnom funkcijom i manjim rizikom za razvoj astme. Istraživanja su pokazala da bolesnici s astmom i oni koji imaju teži oblik astme imaju niže vrijednosti A vitamina u usporedbi sa zdravima i onima s blažom astmom. Jasno je da postoji povezanost između astme i deficita vitamina A, a u pojedinim istraživanjima je utvrđeno da uzimanje vitamina A može spriječiti astmu i smanjiti simptome bolesti (26,27).

Vitamin E je vitamin topiv u mastima. Poznat je njegov protuupalni i antioksidativni učinak te može imati pozitivan učinak na astmu. Također održava zdravlje kože i očiju te služi za obranu organizma protiv infekcija. Nekoliko istraživanja na životinjama pokazalo je da vitamin E smanjuje upalu dišnih putova za vrijeme respiratorne infekcije uzrokovane mikroorganizmima kao i razvoj upale kod astme (28). U istraživanjima na ljudima postoje oprečna istraživanja. U jednom istraživanju provedenom kod djece nije utvrđena razlika u koncentraciji vitamina E kod djece s astmom i zdrave djece (29). Dok je protuupalni učinak vitamina E u više istraživanja potvrđen, još uvijek je upitna uloga vitamina E u razvoju astme (30).

Poznato je da je astma kronična upalna bolest te su kod oboljelih nađene povišene vrijednosti pojedinih upalnih biljega koji bi mogli poslužiti kao biomarkeri. Biomarkeri su korisni u otkrivanju bolesti, stupnjevanju težine i aktivnosti bolesti, predviđanju prognoze bolesti te procjeni i praćenju odgovora na liječenje. Biomarkeri kod astme su mjerljivi biološki pokazatelji koji se koriste za identifikaciju specifičnih podtipova bolesti (endotipova),

predviđanje rizika od pogoršanja i usmjeravanje ciljanih bioloških terapija. Mogu se podijeliti u markere visoke upale tipa 2 (T2) i markere niske upale tipa 2 (T2).

Biomarkeri upale tipa 2 (T2) odražavaju eozinofilne ili alergijske putove astme. Vrlo su korisni za određivanje indikacija za liječenje biološkim lijekovima (npr. anti-IgE, anti-IL-5, anti-IL-4R). Najčešće se određuje broj eozinofila u krvi. Povišeni eozinofili obično >150 do >300 stanica/μL ukazuju na eozinofilnu upalu dišnih putova i usmjeravaju odabir biološke terapije. Frakcija izdahnutog dušikovog oksida (FeNO) je neinvazivni test kojim se mjeri dušikov oksid u izdahnutom zraku. Više razine ukazuju na upalu dišnih putova i pomažu u praćenju odgovora na kortikosteroide i biološke lijekove. Nadalje kao biomarkeri T2 upale određuju se ukupni serumski imunoglobulin E (IgE) ili alergen-specifična IgE antitijela u krvi, identificirajući alergijske fenotipove astme (31).

U astmi se osim navedenih koristi više biomarkera koji ukazuju na stupanj aktivnosti bolesti i razvoj upale, primjerice eozinofilni kationski protein (ECP), visoko osjetljiv C reaktivni protein (hsCRP).

Mjerenje ECP-a omogućava praćenje aktivnosti alergijske upale. Tijekom protuupalne terapije zabilježen je pad vrijednosti ECP-a te je njegova vrijednost niža u bolesnika s astmom u remisiji u odnosu na bolesnike tijekom akutne egzacerbacije (32).

Kao parametar upale koristi se i hsCRP. Koncentracija hsCRP veća je u bolesnika s astmom nego u zdrave djece. Povećana koncentracija povezana je s bronhalnom hiperreaktivnošću i respiratornim oštećenjima (33).

Osim navedenih biomarkera koji se primjenjuju u kliničkoj praksi u endotipizaciji astme, za praćenja dinamike i progresije bolesti, izbora i odgovora na terapiju, kao i procjeni rizika za razvoj remisije astme, istražuju se novi biomarkeri, kao što su citokini; interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5), interleukin 13 (IL-13), faktor tumorske nekroze alfa (TNF-α), interferon gama (IFN-γ).

1.1. Hipoteze:

H1: Adolescenti kod kojih se razvila remisija astme imaju višu koncentraciju vitamina D, A i E u odnosu na adolescente koji imaju aktivnu astmu
H2: Koncentracija upalnih biomarkera je viša kod adolescenata s aktivnom astmom u odnosu na adolescente s remisijom astme
H3: Koncentracija biljega upale (ECP, hsCRP i FeNO, IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, IFN-γ) je povezana s koncentracijom vitamina D, A i E

1.2. Ciljevi istraživanja:

C1: Utvrditi postoji li viša koncentracija vitamina D, A i E u adolescenata koji su razvili remisiju astme u usporedbi s adolescentima koji imaju aktivnu astmu
C2: Utvrditi postoji li povezanost upalnih biomarkera (ECP, hs-CRP, FeNO, IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, IFN-γ) s razvojem remisije astme kod adolescenata
C3: Utvrditi povezanost koncentracije vitamina D, A i E s koncentracijom biljega upale (ECP, hsCRP, FeNO, IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, IFN-γ) u adolescenata u remisiji astme

Cilj istraživanja je doprinijeti boljem razumijevanju uloge vitamina D, A i E te upalnih biomarkera u razvoju remisije kod djece s astmom. Još nije u potpunosti razriješeno zašto neka djeca kojima je astma dijagnosticirana u predškolskoj dobi ulaze u remisiju tijekom adolescencije, dok druga i dalje imaju simptome astme te potrebu za redovitom terapijom. U skladu sa spoznajama o sprezi okolišnih i genetičkih čimbenika u nastanku i razvoju astme, ključno je istražiti čimbenike rizika kako bi se planirala učinkovita prevencija, ali i liječenje astme te smo u skladu s tim pokušali istražiti može li nedostatak vitamina imati značajnu ulogu u razvoju astme te razvoju remisije bolesti kroz mjerenje razine vitamina D, A i E te utvrditi dijagnostičku vrijednost upalnih biomarkera za procjenu kontrole i terapije bolesti, rizika za perzistenciju i/ili remisiju astme.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Astma

2.1.1. Definicija astme

Astma je kronična upalna bolest dišnih putova, uzrokovana interakcijom okolišnih i genetskih čimbenika. Najčešće dominiraju simptomi piskanja, nedostatka zraka, stezanja u prsima i kašlja. U dijagnostičkim nalazima prisutna je smanjena plućna funkcija koja se poboljšava primjenom odgovarajućih lijekova. Simptomi astme ili egzacerbacija astme se pogoršavaju tijekom infekcije, izloženosti alergenima, hladnom zraku ili tjelesnom napor (GINA 2023.) (3).

2.1.2. Prevalencija astme kod djece

Astma je najčešća kronična bolest kod djece, globalna prevalencija često se procjenjuje na oko 9-10%. Prevalencija se značajno razlikuje ovisno o regiji i stupnju razvoja zemlje. U razvijenim zemljama poput Ujedinjenog Kraljevstva, kao i dijelovima Latinske Amerike prevalencija je preko 20%, dok u dijelovima Azije i Afrike ona iznosi 2-4%.

Podaci iz studije globalnog tereta bolesti (GBD 2021.) ipak pokazuju smanjenje globalne prevalencije astme kod djece i adolescenata za 29,78% od 1990. godine. Prema podacima iz navedene studije prevalencija astme u svijetu kod djece bila je oko 10,2%. U Aziji je prevalencija dječje astme bila najveća u Katru 21%, a najniža u Kuvajtu 2%. U Europi je prevalencija dječje astme bila najveća u Ujedinjenom Kraljevstvu 14%, a najniža u Grčkoj 4%. U Latinskoj Americi je prevalencija veća u Brazilu 17%, nego u Ekvadoru 12%, dok je u Sjevernoj Americi najveća u Meksiku 15%, a najniža u SAD-u 12%. Među euroazijskim zemljama prevalencija dječje astme u Turskoj bila je 15%, a u Rusiji 4% (34, 35).

Procjenjuje se da između 6% i 10% djece u Hrvatskoj boluje od astme. Postoje značajne razlike između kontinentalnog dijela i priobalja. U velikim gradovima i industrijskim centrima bilježe se nešto viši postoci, često povezani s kvalitetom zraka i većom izloženošću alergenima. Prema studijama hrvatskih autora prevalencija u gradu Zagrebu iznosi oko 6% (36), u Primorsko-goranskoj županiji u djece u dobi od 6 do 7 godina prevalencija je 9,7%, a u djece u dobi od 13 do 14 godina 8,4% (37), dok je za djecu u Međimurskoj županiji, u dobi od 12 do 14 godina, prevalencija 5,11% (38).

2.1.3. Etiologija astme

Genetika

Uz čimbenike okoliša, na predispoziciju za astmu snažno utječu genetski čimbenici. Ranije studije koje su proučavale razvoj astme unutar obitelji pokazale su da genetika igra važnu ulogu u razvoju astme i alergije (39). Novije studije o patomehanizmima astme i povezanosti s genetskim i epigenetskim čimbenicima primjenjivale su se studijama asocijacije na razini cijelog genoma (engl. *Genome-wide association studies,* GWAS), koje su identificirale tisuće genetskih varijanti povezanih s razvojem astme. Većina tih genetskih varijanti nalazi se u nekodirajućim genomskim regijama. Razvoj novih tehnologija u genomici i epigenetici otvorio je nove mogućnosti povezivanja genetskih varijanti s regulatornim elementima gena ugrađenim u nekodirajuće regije, što je doprinjelo otkrivanju molekularnih mehanizama koji leže u osnovi složene genetike i epigenetike astme (40).

Naime, Studije asocijacije na razini cijelog genoma identificirale su tisuće polimorfizama jednog nukleotida (SNP) povezanih s rizikom za razvoj astme. Većina tih varijanti koje se nalaze u nekodirajućim regijama reguliraju imunološki odgovor i strukturni integritet dišnih putova.

Primjera radi, lokus *ORMDL3/GSDMB (17q21)* je povezan s funkcijom epitelnih stanica, astmom s početkom u djetinjstvu i povećanim odgovorom dišnih putova. Nadalje, ključni geni povezani s imunološkim odgovorom uključeni su u signalizaciju citokina izvedenih iz epitela i upalu tipa 2. Gen *ADAM33* je povezan s preoblikovanjem dišnih putova (remodeliranjem) i strukturnim razvojem stanica glatkih mišića donjih dišnih puteva (41,42).

Geni i okoliš

Okolišni čimbenici uzrokuju tzv. epigenetske modifikacije. Naime, epigenetski mehanizmi mijenjaju način čitanja gena bez promjene temeljnog slijeda molekule DNA. Ove dinamičke promjene mogu biti uzrokovane izlaganjem okolišu i mogu trajati ili se čak prenositi transgeneracijski.

Razlučujemo nekoliko ključnih epigenetskih modifikacija:

1. Metilacija molekule DNA: Dodavanje metilnih skupina u blizini promotorskih regija obično potiskuje transkripciju. Promijenjeni obrasci metilacije često se opažaju u imunološkim stanicama i epitelu dišnih putova osoba s astmom.
2. Modifikacija histona: Promjene putem acetilacije ili metilacije histonskih repova modificiraju strukturu kromatina, "uključujući" ili "isključujući" upalne ili zaštitne gene.
3. Ekspresija mikroRNA (miRNA): Nekodirajuće molekule RNA reguliraju posttranskripcijsku ekspresiju gena, utječući na putove povezane s kontrakcijom glatkih mišića i upalom dišnih putova.

Izloženost okolišnim čimbenicima izravno djeluje na epigenetske i genetske modifikacije.

Geni kodiraju enzime koji inhibiraju inhalirane agense (npr. gen koji kodira glutation transferazu) i onečišćenje okoliša), dok u nekim slučajevima izloženost alergenima može imati učinak na ekspresiju gena putem epigenetskih mehanizama, poput metilacije molekule DNA ili modifikacije histona. Vjeruje se da je epigenetska modifikacija molekule DNA odgovorna za fenotipske razlike koje se razvijaju tijekom vremena između monozigotnih blizanaca. Putem epigenetske modifikacije molekule DNA kroz način života i izloženost kemikalijama dolazi do utjecaja na osjetljivost na bolesti (43). Prehrana, pušenje, infekcije, majčin stres čimbenici su koji utječu na fetalnu genetsku ekspresiju, a daljnja mogućnost za epigenetsku modifikaciju u ranom životu može omogućiti čimbenicima okoliša da modificiraju djetetov genom s potencijalom da uzrokuju alergiju i astmu. Izloženost duhanskom dimu ili česticama povezanim s prometom pokreće hiper- ili hipo-metilaciju u genima poput *ADRB2* (geni za beta-2 adrenergički receptor), što korelira sa lošijim odgovorom na protuupalnu terapiju (npr. IKS) ili s težinom simptoma astme.

In utero okruženje i rana izloženost mikrobima (higijenska hipoteza) oblikuju osnovne epigenetske profile T-stanica, određujući cjeloživotni rizik za razvoj alergijske astme (44,45,46).

Izloženost duhanskom dimu

Pušenje majki tijekom trudnoće kao i izloženost dimu nakon poroda povezano je s promjenama na dišnim putevima kod djece te povećanim rizikom od alergije na hranu (47).

Prehrana

Prehrana igra značajnu ulogu u kontroli rizika od razvoja astme, prvenstveno kroz učinak na sistemsku upalu i kontrolu tjelesne težine. Prehrana bogata antioksidansima, vlaknima i nezasićenim mastima (poput mediteranske prehrane) pomaže u smanjenju upale dišnih putova i poboljšanju kontrole bolesti. Suprotno tome, zapadnjačka prehrana bogata zasićenim mastima, prerađenim namirnicama i ultra-prerađenom hranom može pogoršati simptome astme i povećavati rizik od egzacerbacije astme.

Prehrana bogata antioksidansima (npr. vitamini C i E, beta-karoten) pomaže u neutralizaciji slobodnih radikala i smanjenju upale dišnih puteva, a povećan unos hrane bogate antioksidansima pozitivno korelira s boljom kontrolom astme.

Prehrana bogata vlaknima podržava zdrav crijevni mikrobiom, koji pozitivno modulira imunološki i protuupalni odgovor. Visoka konzumacija ultra-prerađene hrane (preko 30% dnevnih kalorijskih potreba) povezana je s gotovo četverostrukim povećanjem rizika od astme, što se primarno povezuje s unosom kemijskih aditiva i proupalnim sastojcima.

Pretjerani unos prerađenih ili masnih životinjskih proizvoda može potaknuti sustavnu upalu. Sulfiti i aditivi koji se nalaze npr. u suhom voću, ukiseljenim proizvodima i crnom vinu mogu izazvati akutnu bronhokonstrikciju ili pogoršanje astme kod osjetljivih osoba (48,49,50).

Nekoliko studija je pokazalo da je konzumiranje hrane s protuupalnim svojstvima (npr. omega-3 masne kiseline) i antioksidansa poput vitamina E i cinka tijekom trudnoće, povezano s nižim rizikom od atopijskih bolesti (51).

Dojenje

Utjecaj dojenja na rizik od atopije i astme razlikuje se prema studijama. Neke studije pokazale su zaštitnu ulogu (52), dok su druge pokazale višu stopu alergija i astme među dojenom djecom (53). Nekoliko pojedinačnih studija pokazale su da je isključivo dojenje tijekom najmanje 3 mjeseca povezano s nižim stopama astme između 2 i 5 godina starosti, s najvećim učinkom kod onih s atopijom u roditelja (54).

Higijenska hipoteza

Higijenska hipoteza pretpostavlja da izloženost dojenčeta značajnom broju infekcija i mnogim vrstama bakterija stimulira razvoj imunološkog sustava prema neastmatičnim fenotipovima (55). U sklopu navedenog veličina obitelji te broj i redoslijed braće i sestara mogu utjecati na rizik od razvoja astme. Iako je veličina obitelji (više od 4 djece) povezana sa smanjenim rizikom od astme, redoslijed rođenja nije važan (56).

Infekcije

Teške virusne respiratorne infekcije u ranom djetinjstvu poput infekcije humanim rinovirusima i respiratornim sincicijskim virusom (RSV) - značajno povećavaju dugoročni rizik od razvoja astme u djece školske dobi. Teške infekcije donjih dišnih putova poput RSV-a ili rinovirusa kod dojenčeta oštećuju dišne puteve i izazivaju trajne imunološke promjene. Bolesti piskanja uzrokovane rinovirusom značajno koreliraju s kasnijim razvojem alergijske (atopijske) astme. Visoka učestalost dječjih respiratornih infekcija u kombinaciji s alergijskim rizicima (poput senzibilizacije i alergije na grinje ili plijesni) značajno povećava vjerojatnost razvoja i dijagnoze astme u školskoj dobi (57,58,59). Teška virusna infekcija donjih dišnih putova kod dojenčadi s genetskom predispozicijom za alergiju, a koja su već senzibilizirana na inhalacijske alergene može dovesti do odstupanja prema Th2 odgovorima koji potiču astmu. Nije jasno jesu li ovi učinci infekcije donjih dišnih putova specifični za virus (npr. respiratorni sincicijski virus, rinovirus) ili izloženost alergenima može izazvati astmu čak i kod osoba koje nisu genetski predisponirane. Interakcije gena s izloženošću okolišu (uključujući alergene, onečišćenje zraka, duhanski dim i prehranu) moduliraju odgovor pojedinca na infekcije (60). Također ponavljane

infekcije donjih dišnih putova mogu utjecati na dojenčad koja je već u riziku od astme zbog obiteljske anamneze ili atopije (61).

Poznato je da u bolesnika s dijagnozom astme uobičajene infekcije dišnih puteva djeluju kao primarni okidači za akutne, potencijalno opasne egzacerbacije astme. Preko 80% iznenadnih pogoršanja astme kod djece i odraslih povezano je s virusnim patogenima poput infekcija virusima gripe, rinovirusima i koronavirusima. Bakterijske komplikacije poput infekcije *Mycoplasma pneumoniae* ili *Streptococcus pneumoniae* pogoršavaju postojeću upalu dišnih putova i produžuju vrijeme oporavka. Najnovija istraživanja pokazuju da osobe s kroničnom astmom imaju promijenjeni urođeni imunitet dišnih putova, što ih čini sklonijima teškim sekundarnim komplikacijama i infekcijama donjih dišnih putova i pluća (62,63,64).

Izloženost animalnim alergenima

Iako je nekoliko studija pokazalo niži rizik od razvoja atopije i astme kod izloženosti domaćim životinjama u ranom životu, zaključci studija o utjecaju izloženosti alergenima mačaka i pasa u kućnom mikrookolišu bili nedosljedni (65). U nekim studijama izloženost mačkama bila je povezana s većim rizikom od razvoja senzibilizacije na inhalacijske alergene, dok su druge studije pokazale niži rizik. Izloženost psima može biti zaštitna ne samo od razvoja specifične senzibilizacije na pseći alergen već i od drugih senzibilizacija (npr. na grinje iz kućne prašine) kao i rizika za razvoj astme (66).

Spol

Do dobi od 14 godina, incidencija i prevalencija astme veće su među dječacima nego među djevojčicama (67). Nakon toga raste incidencija astme među adolescenticama i mladim odraslim djevojčica, a veći udio dječaka razvije remisiju astme. Prije 12. godine života, dječaci imaju težu astmu od djevojčica, s većim stopama prijema u bolnicu. Odrasle žene imaju težu astmu od muškaraca, s više prijema u bolnicu i sporijim oporavkom. Većina autora pripisuje ove promjene u prevalenciji i težini događajima u pubertetu, iako mehanizmi za razlike među spolovima nisu utvrđeni (68).

Debljina

Pretilost je važan faktor rizika za morbiditet astme. Većina dokaza upućuje na neeozinofilne upalne mehanizme na molekularnoj razini. Zanimljivo je da pretilost usmjerava CD4+ T-limfocite prema Th1 diferencijaciji, što je povezano sa steroidno refraktornom astmom. Dodatni urođeni imunološki odgovori koji uključuju Th17 puteve i prirođene limfoidne stanice (ILC) također su uključeni. Jedinstveno je da su ILC-ovi tipa 3 (ILC3) koji eksprimiraju i IL-17 i IL-22 povezani s astmom povezanom s pretilošću.

Nedavno je pokazano da još jedan važan citokin, IL-6, uzrokuje sistemsku upalu u podskupini bolesnika s astmom s pretilošću i teškom bolešću. Značajno opažanje u ovoj studiji bile su povećane razine IL-6 u plazmi u podskupini pretilih bolesnika s težom astmom, a ne kod svih pretilih astmatičara. Posljedično, IL-17, IL-22 i IL-6, a ne Th2 citokini, mogu biti klinički relevantni kod pretilih bolesnika s teškom astmom (69).

Meta-analiza koja je uključivala 18 prospektivnih studija izračunala je 20%-tno povećanje rizika za astmu kod djece s prekomjernom težinom i 40%-tno povećanje rizika kod pretile djece (70).

2.1.4. Patofiziologija astme

Patofiziologija astme je složena i uključuje upalu dišnih putova, intermitentnu i reverzibilnu bronhoopstrukciju protoka zraka i bronhijalnu hiperreaktivnost. Mehanizam patogeneze upale kod astme može biti akutan, subakutan ili kroničan, a prisutnost edema dišnih putova i hipersekrecije sluzi također doprinosi opstrukciji protoka zraka i bronhijalnoj reaktivnosti. Složeni mehanizmi infiltracije mononuklearnim stanicama i eozinofilima, hipersekrecija sluzi, deskvamacija epitela, hiperplazija glatkih mišića bronha ili remodeliranje dišnih putova su različiti od bolesnika do bolesnika, u djece i odraslih, u različitim fenotipovima i endotipovima astme (71,72,73).

Rana i kasna faza IgE posredovane reakcije

Ranu fazu započinju antitijela klase IgE koja proizvode plazma stanice potaknute okidačima. Ta antitijela reagiraju na određene okidače u okolišu. Antitijela klase IgE se zatim vežu za mastocite i bazofile visokog afiniteta. Kada se udahne čimbenik rizika, mastociti oslobađaju citokine i na kraju degranuliraju. Iz mastocita se oslobađaju histamin, prostaglandini i leukotrieni. Te stanice pak kontrahiraju glatke mišiće i uzrokuju sužavanje dišnih putova (74). Th2 limfociti igraju ključnu ulogu jer sintetiziraju niz interleukina (IL-4, IL-5, IL-13) i faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF), koji pomažu u komunikaciji s drugim stanicama i održavaju upalu. IL-4 i IL-5 pomažu eozinofilima i bazofilima da prežive. IL-13 je uključen u remodeliranje, fibrozu i hiperplaziju (75).

Unutar sljedećih nekoliko sati nastupa kasna faza, u kojoj se eozinofili, bazofili, neutrofili te pomoćničke i memorijske T-stanice lokaliziraju u plućima, što uzrokuje bronhokonstrikciju i upalu. Mastociti također igraju važnu ulogu u donošenju reaktanata kasne faze na upaljena mjesta (76). Ključno je prepoznati oba ova mehanizma kako bi se ciljano djelovalo na terapiju i ublažila bronhokonstrikcija i upala, ovisno o težini bolesti. Kao rezultat upale i bronhokonstrikcije dolazi do povremene opstrukcije protoka zraka i otežanog disanja.

Hiperreaktivnost dišnih putova

Hiperreaktivnost dišnih puteva predstavlja pretjerani bronhokonstriktorni odgovor na različite podražaje. Postoji niz mehanizama koji dovode do hiperreaktivnosti dišnih putova. Neka objašnjenja su posljedica povećanog histamina iz mastocita ili povećanja mase glatkih mišića dišnih putova. Također, postoji povećani vagalni tonus i povećani unutarstanični slobodni kalcij koji dodatno pojačava kontraktilnost stanica glatkih mišića dišnih putova. Za procjenu hiperreaktivnosti dišnih putova koriste se bronhoprovokacijski testovi kako bi se odredila težina bolesti (77). Ovaj aspekt je klinički značajan jer je prisutnost hiperreaktivnosti dišnih putova povezana s većim padom plućne funkcije i povećanim rizikom od razvoja i pogoršanja astme od djetinjstva do odrasle dobi (78).

U kombinaciji s upalom, bijelim krvnim stanicama, eksudatom i sluzi koja zauzima bronhiole, osobi može biti sve teže normalno disati. Broj miofibroblasta, koji uzrokuju stvaranje kolagena, uzrokovat će povećanje epitela, što sužava sloj glatkih mišića i laminu reticularis (79). Kao rezultat toga, dolazi do povećanog zadebljanja bazalne membrane. Osoba može imati

nepovratnu opstrukciju protoka zraka, za koju se vjeruje da je posljedica preoblikovanja ili remodeliranja dišnih putova (80).

Remodeliranje donjih dišnih puteva

Remodeliranje se događa prelaskom epitelnih stanica u mezenhimalne, povećavajući sadržaj glatkih mišića. Epitelne stanice gube staničnu adheziju i funkcionalni polaritet s čvrstim spojevima, preoblikujući svoje stanice kako bi se razvile u mezenhimalne stanice. Osim toga, eozinofili mogu dodatno pogoršati remodeliranje dišnih putova zbog oslobađanja TGF-β i citokina interakcijama s mastocitima. Ovi mehanizmi remodeliranja dišnih putova mogu pogoršati upalu i astmu ako se ne liječe ispravno (81) .

Upalne stanice

Upala ima središnju ulogu u patofiziologiji astme te uključuje interakciju mnogih tipova stanica i medijatora s dišnim putovima što na kraju rezultira karakterističnim patofiziološkim značajkama bolesti. Naime, astmu pokreće složena mreža imunoloških stanica koje infiltriraju stijenke dišnih putova, uzrokujući kroničnu upalu, proizvodnju sluzi i sužavanje dišnih putova. Ključne stanice uključuju limfocite, eozinofile, mastocite, neutrofile, ali i makrofage, dendritičke stanice i epitelne stanice koje oslobađaju kemijske signalne proteine (citokine).

Limfociti

Upala dišnih putova kod astme vezana je uz subpopulaciju limfocita, T pomoćničkih stanica 1 i T pomoćničkih stanica 2 (Th1 i Th2), s različitim upalnim medijatorima i učincima na funkciju dišnih putova. Kod astme dolazi do pomaka prema Th2-citokinskom profilu što rezultira eozinofilnom upalom karakterističnom za astmu (82). Osim toga, stvaranje Th2 citokina (IL-4, IL-5 i IL-13) također bi moglo objasniti prekomjernu proizvodnju antitijela klase IgE, prisutnost eozinofila i razvoj hiperreaktivnosti dišnih putova. Ključni podtipovi limfocita u astmi osim pomoćničkih Th2 limfocita su:

a) urođene limfoidne stanice tipa 2 (ILC2), koje djeluju brzo bez prethodne senzibilizacije i oslobađaju velike količine IL-5 i IL-13 kao odgovor na epitelne alarmine,

b) Th1 i Th17 stanice koje su ključe u nealergijskoj astmi ili neutrofilnom endotipu astme karakterizirane otpornošću na steroide,

c) regulatorne T stanice (Tregs), čija je primarna uloga u potiskivanju prekomjernog imunološkog odgovora, a njihova funkcija ili broj mogu biti oštećeni u aktivnoj astmi (83,84).

Mastociti

To su multifunkcionalne stanice sposobne prepoznati molekularne obrasce povezane s patogenima putem receptora sličnih proteinu Toll (TLR), unutarnje signale putem citokinskih i kemokinskih receptora te antigene putem umrežavanja antitijela klase IgE s receptorom visokog afiniteta, FcεRI. Budući da se mastociti nalaze u tkivima imaju bitnu ulogu u pokretanju brzog odgovora na ulazak patogena i oštećenje tkiva. Kao odgovor na različite stimulanse poput alergena, citokina ili molekularnih obrazaca povezanih s patogenima, mastociti oslobađaju medijatore koji mogu regrutirati i poboljšati funkciju drugih imunoloških stanica poput T-stanica i dendritičnih stanica stvarajući vezu između urođenog i stečenog imuniteta. Osim toga, mastociti sudjeluju u prezentaciji antigena i potiču zacjeljivanje rana i popravak tkiva. Pacijenti s alergijskom astmom imaju povećan broj mastocita u plućima, koji se aktiviraju vezanjem alergena za receptor FcεRI (85,86).

Aktivacija mukoznih mastocita oslobađa bronhokonstriktorne medijatore (histamin, cisteinil-leukotriene, prostaglandin D2 (87). Povećani broj mastocita u glatkim mišićima dišnih putova može biti povezan s hiperreaktivnošću dišnih putova (88). Mastociti također mogu oslobađati veliki broj citokina kako bi promijenili okruženje dišnih putova i potaknuli upalu iako je izloženost alergenima ograničena.

Eozinofili

Eozinofili, kao specijalizirani granulociti, igraju ključnu ulogu u pokretanju različitih upalnih odgovora. Eozinofili sadrže razne kationske proteine koji su pohranjeni u eozinofilnim granulama kao što su eozinofilni kationski protein kationski protein (ECP), glavni bazni protein (MBP), neurotoksin izveden iz eozinofila (EDN) i eozinofilna peroksidaza (EPX). Ovi proteini mogu uzrokovati upalu, oštećenje tkiva i degranulaciju mastocita. Osim toga, TGF-β oslobođen iz eozinofila potiče proliferaciju fibroblasta i proizvodnju izvanstaničnog matriksa, doprinoseći preoblikovanju dišnih putova. Lipidni medijatori, poput eikosanoida, oslobođeni iz eozinofila doprinose patogenezi astme oslobađanjem metabolita 15(s)-hidroksieikozatetraenske kiseline

(15S-HETE) iz 15-lipoksigenazne putanje, što dovodi do eozinofilije dišnih putova, povećane proizvodnje sluzi u dišnim putovima i subepitelnog preoblikovanja (89,90).

Povećani broj eozinofila postoji u dišnim putovima većine, ali ne svih, osoba koje boluju od astme (91). Povećanje eozinofila često je povezano s većom težinom astme. Osim toga, brojne studije pokazuju da liječenje astme kortikosteroidima smanjuje eozinofile u cirkulaciji i dišnim putovima paralelno s kliničkim poboljšanjem.
Eozinofilna astma se klinički može manifestirati u dva glavna oblika: atopijska i neatopijska. Unutar tih kategorija eozinofilna astma se dalje dijeli na;
a) atopijsku astmu u djetinjstvu ili astmu s ranim početkom,
b) eozionofilnu astmu u odraslih ili eozinofilnu astmu s kasnim početkom
c) respiratornu bolest pogoršanu aspirinom (AERD).
Značajna razlika među ovim fenotipovima leži u stupnju tkivne eozinofilije (92).

Neutrofili

Neutrofili su najzastupljenije stanice u perifernoj krvi i pohranjeni su u plućnim kapilarama. Ove stanice igraju važnu ulogu u urođenom imunološkom odgovoru ubijanjem mikroba, fagocitozom, oslobađanjem granula i stvaranjem neutrofilnih izvanstaničnih zamki. Uloga neutrofila u astmi je dvojbena (93). Uočena je povišena razina neutrofila u dišnim putevima bolesnika s astmom, koji su liječeni glukokortikoidima, ali i kod pacijenata s astmom koji nisu liječeni steroidima. Klaster analiza je pokazala da je broj neutrofila u sputumu povezan s težim fenotipovima astme (94).
Neutrofili su povećani u dišnim putovima i sputumu osoba s teškom astmom, tijekom akutnih egzacerbacija i u prisutnosti pušenja. Njihova patofiziološka uloga ostaje neizvjesna, mogu biti odrednica nedostatka odgovora na liječenje kortikosteroidima (95). Nadalje, prekomjeran udio neutrofila može pogoršati upalu i remodeliranje bronha. Stoga je liječenje neutrofilne upale, posebno u bolesnika s teškom ili loše kontroliranom astmom bitno u upravljanju i kontroli bolesti (96).

Dendritičke stanice

Ove stanice su visoko specijalizirane imunološke stanice koje funkcioniraju kao ključne stanice koje prezentiraju antigen, a koje stupaju u interakciju s alergenima s površine dišnih putova, a zatim migriraju u regionalne limfne čvorove kako bi stupile u interakciju s regulatornim stanicama i u konačnici stimulirale proizvodnju Th2 stanica iz naivnih T stanica (97). Ovisno o uključenoj podskupini dendritičkih stanica, mikromiljeu citokina i prirodi aktivacijskog signala, dendritičke stanice pripremaju pomoćničke CD4+ T-limfocite koji se potom diferenciraju u nekoliko različitih podskupina, kao što su Th1, Th2, Th9 i Th17 stanice (98). Nadalje, dendritičke stanice su uključene u održavanje imunološke homeostaze. Imunološka homeostaza postiže se primjenom nekoliko tolerogenih mehanizama, kao što su indukcija anergije T stanica, instrukcija regulatornih T (Treg) limfocita i proizvodnja regulatornih citokina, kao što su IL-10, IL-27 i TGF-β (99). Sve veći je broj dokaza da dendritičke stanice imaju važnu ulogu u patomehanizmu astme. U eksperimenatalnim modelima terapijski prenešene dendritičke stanice s imunoregulatornim svojstvima suprimirale su aberantni Th2 alergijski odgovor i spriječile razvoj alergijske upale dišnih putova (100).

Makrofagi

Makrofagi su najbrojnije stanice u dišnim putovima, a alergeni ih mogu aktivirati putem IgE receptora niskog afiniteta kako bi oslobodili upalne medijatore i citokine koji pojačavaju upalni odgovor (101). Makrofagi igraju ključnu ulogu u procesu razvoja ireverzibilnih, fibrotičnih promjena u dišnim putevima, proizvodnjom profibrotičkih citokina, faktora rasta i enzima poput matriksnih metaloproteinaza (MMP) i tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP). Osim toga, identifikacija novih genetskih markera pružila je dokaze o snažnoj genetskoj komponenti u fibrozi unutar makrofagima regulirane fibroze. Iako makrofagi doprinose progresiji preoblikovanja dišnih putova i razvoju subepitelne fibroze, terapijske intervencije usmjerene na supresiju fibrotičkih promjena uzrokovanih makrofagima još nisu razvijene, niti implementirane u kliničku praksu (102,103,104).

Epitelne stanice

Bronhalni epitel sastoji se od pet glavnih tipova stanica, tj. cilijiranih, pahuljastih, vrčastih, bazalnih i suprabazalnih stanica, uz rjeđe tipove stanica poput jonocita, neuroendokrinih stanica i čuperkastih/četkastih stanica u pseudo-stratificiranoj organizaciji, koja prekriva bazalnu membranu.

U bolesnika s astmom, kombinacija utjecaja okolišnih čimbenika i čimbenika specifičnih za pacijenta dovodi do poremećaja epitelne barijere. Oštećenje epitela stimulira oslobađanje epitelnih citokina, kao što su timusni stromalni limfopoetin (TSLP), interleukin IL-25 i IL-33, koji djeluju na epitelne, subepitelne i imunološke tipove stanica kako bi potaknuli višestruke patofiziološke promjene koje su u osnovi razvoja, perzistencije i pogoršanja astme. Te promjene uključuju hipersekreciju i začepljenje sa sluzi, smanjenu otpornost na virusnu infekciju, preoblikovanje dišnih putova, imunološku hiperreaktivnost, hipertrofiju glatkih mišića dišnih putova i hiperreaktivnost dišnih putova.

Stvaranje upalnih medijatora, regrutiranje i aktivacija upalnih stanica te infekcija respiratornim virusima mogu uzrokovati da epitelne stanice proizvode više upalnih medijatora ili oštete sam epitel. Proces popravka, nakon ozljede epitela, može biti abnormalan kod astme, što dodatno pogoršava opstruktivne lezije koje se javljaju kod astme (105,106,107).

Citokini

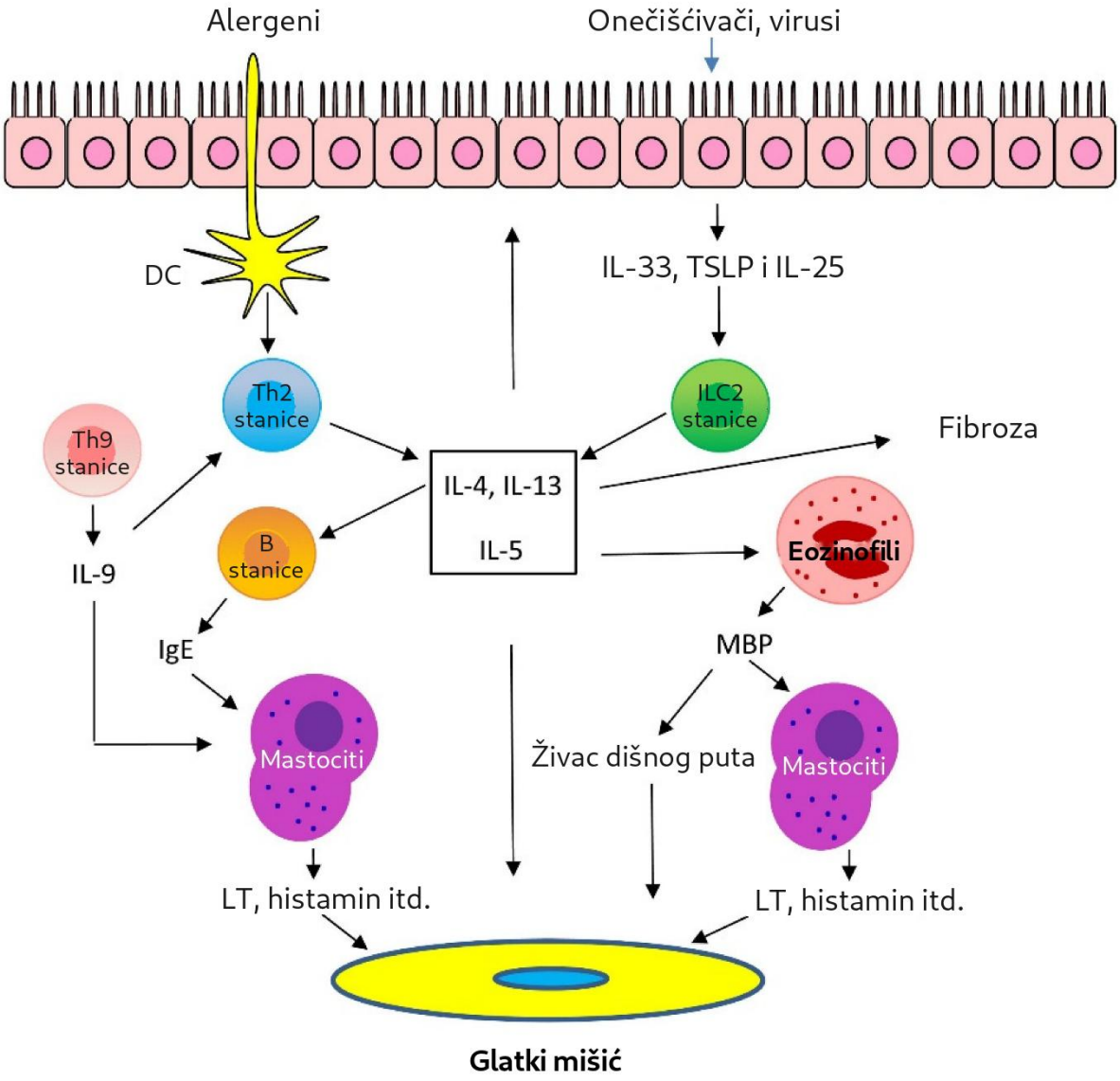
Citokini usmjeravaju i modificiraju upalni odgovor kod astme i vjerojatno određuju njezinu težinu. Unutar populacija pacijenata s astmom identificirani su različiti fenotipovi i endotipovi astme koji se mogu široko stratificirati prema prisutnosti upale tipa 2 ili ne-tipa 2 (uključuje upalu tipa 1 i/ili tipa 17), na temelju populacija granulocita u krvi i sputumu, te prisutnošću upalnih markera ili citokina.

Citokinski profil Th2 uključuje IL-5, koji je potreban za diferencijaciju i preživljavanje eozinofila te IL-4 koji je važan za diferencijaciju Th2 stanica, a zajedno s IL-13 važan je za stvaranje antitijela klase IgE. Ključni citokini uključuju IL-1β i TNF-α, koji pojačavaju upalni odgovor, te faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF), koji produžuje preživljavanje eozinofila u dišnim putovima.

Upala tipa 1 uključuje povećanje populacija urođenih i adaptivnih imunoloških stanica, uključujući makrofage, neutrofile i Th1 stanice. IFN-γ, IL-1β i TNF-α su ključni upalni medijatorimi koji se proizvode kod upale tipa 1.

Upalni odgovor tipa 17 važan je za obranu domaćina od bakterijskih i gljivičnih infekcija u plućima. Nakon aktivacije, Th17 stanice proizvode IL-17A među ostalim upalnim citokinima (IL-6, IL-17F, IL-21, IL-22 i IL-23) koji regrutiraju i aktiviraju neutrofile. Kod djece i odraslih s teškom astmom, povećani neutrofili u sputumu i razine IL-17A povezani su s lošim odgovorom na kortikosteroide kod alergijske i nealergijske astme.

Upalni odgovor tipa 2 ima središnju ulogu u patogenezi astme i primarna je meta novih bioloških terapija. Međutim, neke osobe s astmom imaju fenotipove i endotipove koji nisu tip 2 s aktivacijom putova tipa 1 i/ili tipa 17, stvarajući složeno upalno okruženje koje je teško kontrolirati standardnim terapijama (108,109,110,111).



Slika 1. Patofiziologija astme (preuzeto i prilagođeno prema Habib i sur., 2022)

DC – dendritičke stanice, LT – leukotrieni, MBP – glavni bazni protein, TSLP – timski stromalni limfopoetin

Na Slici 1 prikazana je patofiziologija astme. Kada alergeni uđu u donje dišne putove, dendritičke stanice (DC) prezentiraju alergene Th2 stanicama, koje luče Th2 citokine, uključujući interleukin IL-5, IL-4 i IL-13. IL-4 i IL-13 aktiviraju B stanice, koje proizvode antiotijela klase IgE. Antitijela klase IgE se potom vežu na površinu mastocita. Kada isti alergeni uđu u dišne putove, oni stupaju u interakciju s IgE, što potiče mastocite na oslobađanje medijatora, poput leukotriena (LT), histamina i IL. Ovi medijatori iritiraju glatke mišiće dišnih putova i izazivaju bronhokonstrikciju. Osim toga, IL-5 olakšava regrutiranje eozinofila u pluća. Eozinofili također oslobađaju medijatore, uključujući glavni bazni protein (MBP), koji stimulira mastocite na oslobađanje histamina i LT. Nadalje, IL-13 izravno senzibilizira kontrakciju glatkih mišića dišnih putova, stimulira epitelne stanice na lučenje mucina i inducira fibrozu. Th9 stanice mogu lučiti IL-9, koji aktivira Th2 stanice i potiče nakupljanje mastocita. Konačno, oštećenje epitela infekcijom i zagađivačima inducira oslobađanje citokina, uključujući timski stromalni limfopoetin (TSLP), IL-25 i IL-33, koji aktiviraju urođene limfoidne stanice tipa 2 (ILC2) i proizvode Th2 citokine, poput IL-5 i IL-13 (112).

2.1.5. Dijagnostički postupci

Dijagnoza astme postavlja se na temelju obiteljske i osobne anamneze, prisutnih simptoma, kliničkog pregleda i dijagnostičkih testova.

Dijagnostički testovi uključuju:

a) laboratorijsku obradu (apsolutni broj eozinofilnih granulocita u krvi, koncentraciju ukupnog i specifičnih IgE u serumu, koncentraciju ECP-a, hsCRP)

b) kožni ubodni test koji se koristi kao dodatni test kako bi se utvrdilo jesu li alergije uzrok astme (113)

c) mjerenje parametara plućne funkcije
   -spirometrija kao osnovni test za astmu mjeri volumen zraka i brzinu protoka zraka
   -bronhodilatacijski test koji se primjenjuje ako nalaz spirometrije ukazuje na opstrukciju. Nakon primjene bronhodilatatora ponavlja se spirometrija kako bi se vidjelo poboljšanje funkcije pluća
   -test vršnog protoka (eng. Peak Expiratory Flow-PEF) obavlja se malim ručnim uređajem (eng. Peak flow meter) kojim se kod kuće prati promjena disanja u različito doba dana kroz duži period (114)

-metakolinski test kod kojeg nakon inhalacije metakolina dolazi do suženja dišnih putova te se na taj način testira osjetljivost pluća na okidače (115)

d) mjerenje dušićnog oksida u izdahu (FeNO) mjeri količinu dušikovog oksida u izdahu, što može ukazivati na upalu dišnih putova (116)

e) rendgenska snimka prsnog koša radi se kako bi se isključila druga stanja (poput upale, stranog tijela) koja bi mogla uzrokovati probleme s disanjem

2.1.6. Fenotipovi astme u djetinjstvu

Interakcija između genetske pozadine i faktora rizika ranog života u razvoju astme dovodi do heterogenosti fenotipova astme u djece. Klinički fenotipovi povezani su s upalnim endotipovima, ali unutar fenotipa može postojati više endotipova. Specifični za pedijatrijske poremećaje piskanja su ovisni o dobi te međusobno djelujući odnosi između kliničkih fenotipova (težina bolesti, vremenski obrazac simptoma), vrste upale, okolišnih okidača (npr. virusne infekcije, alergeni, zagađivači), odgovora na liječenje i komorbiditeta.

Najočitije fenotipiziranje temelji se na simptomima, kao što su težina simptoma (blagi do umjereni naspram teškog), prisutnosti ili odsutnosti atopije, stopi egzacerbacija, obrascu simptoma (epizodični, intermitentni, rekurentni/kronični) i okidačima (infekcije, alergeni). Procjena okidača i perzistencija simptoma piskanja rezultirala je dvama fenotipovima među predškolskom djecom s piskanjem. Jedan je fenotip prolazni poremećaji piskanja koji se često opaža u prvim godinama života, obično nakon virusnih infekcija, a karakterizira ga epizodni obrazac simptoma i interkurentni intervali bez simptoma. Ova skupina često ne dobiva dijagnozu astme. Drugi fenotip su djeca s tipično rekurentnim ili kroničnim piskanje koja imaju simptome potaknute višestrukim čimbenicima okoliša (virusi, alergeni, zagađivači, vježbanje) u prvim godinama života, ali imaju tendenciju da perzistiraju u kasnijem djetinjstvu i ostaju stabilni nakon 6. godine života (117).

Među astmatičnom djecom identificirana su dva fenotipa na temelju prisutnosti atopije. Alergijska astma karakterizirana je senzibilizacijom na alergene (specifična antitijela klase IgE) i prisutnošću atopičnih bolesti (npr. atopijski dermatitis, alergijski rinitis). Nealergijska astma ne pokazuje alergijsku senzibilizaciju niti dodatne atopijske bolesti (118). Alergijska astma je daleko češća u djetinjstvu, snažno povezana s eozinofilnom upalom i biomarkerima tipa 2 (T2). Većina ove djece obično dobro reagira na inhalacijske kortikosteroide (IKS) (119).

Fenotipovi astme u djece mogu pomoći u odgovoru na pitanja o optimalnom liječenju pojedine djece i mogu se temeljiti na kliničkim, vremenskim, razvojnim ili upalnim karakteristikama. Fenotipovi mogu biti korisni u predviđanju perzistentne astme, identificiranju personaliziranih opcija za prevenciju i personaliziranju liječenja ili modifikacije bolesti.

2.1.7. Remisija astme

Remisija je definirana kao privremeno ili trajno smanjenje ili povlačenje simptoma bolesti (120). Može uključivati kliničku odsutnost simptoma, ali i laboratorijske testove i testove plućne funkcije. Osim spontanog povlačenja simptoma i normalizacije određenih testova, remisija astme, posebno u teškim slučajevima, može se postići i pravilnom upotrebom lijekova (121).

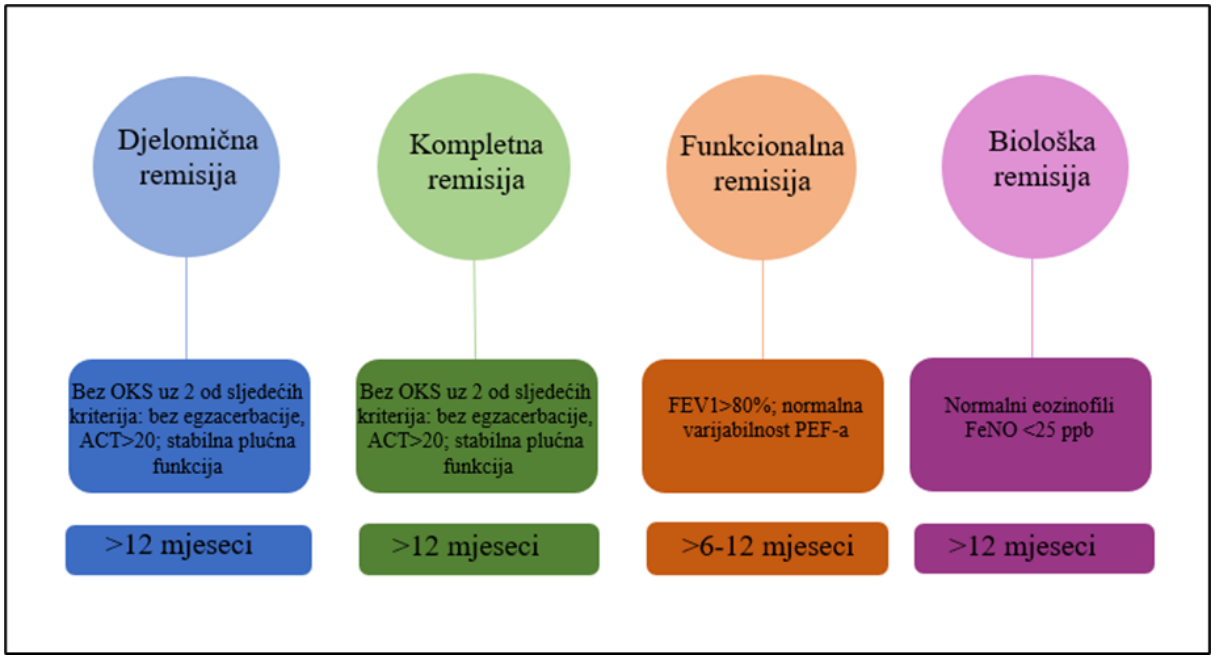
U posljednjih nekoliko godina pojam remisije astme privlači pozornost i ostaje tema rasprave, posebno u dječjoj populaciji.

Većina studija koristi klinički utemeljene definicije remisije, oslanjajući se na potpunu odsutnost respiratornih simptoma. Ovaj pristup je jednostavan za korištenje u kliničkoj praksi, međutim, može podcijeniti perzistentnu subkliničku aktivnost bolesti, posebno kod djece koja prijavljuju malo simptoma, ali pokazuju abnormalnu funkciju pluća ili perzistentnu upalu dišnih putova. Mali broj studija u svoje definicije remisije uključila je objektivne mjere, poput spirometrije ili metakolinskog testa.

U novije vrijeme razmatra se da u definiciju kompletne remisije osim kliničke remisije i funkcionalne remisije karakterizirane normalnom ili barem stabilnom funkcijom pluća, bude uključena i biološka remisija (povlačenje ili supresija upale tipa 2, što se odražava biomarkerima poput molekule FeNO i eozinofila (122).

Godine 2023. konsenzus zajedničke radne skupine ACAAI (American College of Allergy, Asthma and Immunology), AAAAI (American Academy of Allergy, Asthma and Immunology) i ATS (American Thoracic Society) predložio je 6 kriterija za remisiju tijekom liječenja, koji se svi moraju održavati najmanje 12 mjeseci: bez egzacerbacija, bez izostanaka s posla ili škole zbog astme, stabilna ili poboljšana funkcija pluća, korištenje niskih do srednjih doza kontrolne terapije, ACT (Asthma Control Test) rezultat >20, AIRQ (Asthma Impairment and Risk Questionnaire) rezultat <2, ACQ (Asthma Control Questionnaire) rezultat <0,75 i korištenje lijekova za ublažavanje simptoma ograničeno na jednom mjesečno (123).

Postoje različite definicije remisije astme (klinička, funkcionalna, biološka remisija). Klinička remisija odnosi se na stanje bez simptoma, bez pogoršanja i bez potrebe za salbutamolom najmanje 12 mjeseci. Funkcionalna remisija uključuje normalizaciju ili značajno poboljšanje plućne funkcije. Biološka remisija uključuje normalizaciju biomarkera i odsutnost upale dišnih putova (Slika 2) (124).



Slika 2. Modeli i kriteriji za remisiju astme (preuzeto i prilagođeno prema Bondi i sur., 2026)

OKS- oralni kortikosteroidi, ACT- test kontrole astme, FEV1- forsirani ekspiracijski volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi, PEF- vršni ekspiracijski protok, FeNO- frakcija izdahnutog dušičnog oksida (preuzeto i prilagođeno prema Bondi i sur., 2026)

Trenutne definicije, kriteriji i strategije liječenja remisije astme razvijeni su prvenstveno uzimajući u obzir odraslu populaciju, iako se remisija kao koncept dugo vremena koristi u dječjoj astmi. Iako sveobuhvatan, predloženi skup kriterija za odrasle možda nije savršeno prikladan u pogledu njihove primjenjivosti na djecu u kliničkoj praksi.

Prirodna ili spontana remisija astme u kojoj simptomi nestaju i lijekovi se prekidaju na dulje vrijeme javlja se u 20% do 30% slučajeva, najčešće kada astma počne u djetinjstvu. Temeljni biološki mehanizmi spontane remisije nisu do kraja razjašnjeni, a uključuju smanjenje upale, imunoloških odgovora tipa 2, normalizaciju upalnih stanica, posebno eozinofila u dišnim putovima i djelomično ili potpuno povlačenje bronhijalne hiperreaktivnosti (125).

Remisija je češća kod adolescenata nego kod odraslih, sa stopama remisije od 16–60%. Povećana vjerojatnost spontane remisije astme povezana je s blagom bolešću i manjom upalom dišnih putova prije adolescencije, muškim spolom, nižom koncentracijom molekule FeNO-a, odsutnošću ili blažom alergijskom senzibilizacijom, odsutnošću komorbiditeta; ekcema i rinokonjunktivitisa, pretilosti, te odsutnošću izlaganja duhanskom dimu i obiteljske anamneze za alergiju i astmu (126).

Godine 1996., Andersson i suradnici distribuirali su upitnik roditeljima djece u dobi od 7 do 8 godina u 3 općine na sjeveru Švedske. Među 3430 ispitanika, nakon medicinske procjene, ovi su autori identificirali 248 djece s astmom. Ta su djeca ponovno procjenjivana svake godine do dobi od 19 godina. Remisija je definirana kao: neupotreba lijekova za astmu i bez piskanja tijekom 12 mjeseci prije završetka anketa. U dobi od 19 godina, 21% je bilo u remisiji, 38% je imalo periodičnu astmu, a 41% perzistentnu astmu. Remisija je bila češća među dječacima. Ovi su autori također otkrili da je niska vjerojatnost remisije povezana sa senzibilizacijom na krznene životinje i s početnom težinom astme (127).

2.2. Upalni biomarkeri u astmi

Američka FDA definira molekularne biomarkere kao karakteristične pokazatelje bioloških ili patogenih procesa, koji reagiraju na izloženost ili intervencije (128). Biomarkeri u astmi su mjerljivi pokazatelji – poput eozinofila u brisu nasofarinksa, vrijednosti koncentracije molekule FENO-a, citokina koji otkrivaju temeljnu upalu dišnih putova, odnosno identificiraju specifične podtipove bolesti (endotipove) poput upale tipa 2, procjenjuju stupanj kontrole astme, rizik za egzacerbacije, usmjeravaju odabir ciljanih bioloških lijekova te prate učinak terapije. Mjerenje biomarkera je danas osnova za primjenu tzv. personalizirane i precizne medicine u kliničku praksu (129).

2.2.1. IL-4

Interleukin (IL)-4 je ključni citokin u razvoju alergijske upale. Povezan je s lučenjem antitijela klase IgE od strane B-limfocita (130). IgE-posredovani imunološki odgovori dodatno su pojačani IL-4 zbog njegove sposobnosti da pojača receptore antitijela klase IgE na površini stanica i to receptor antitijela klase IgE niskog afiniteta (FcεRII; CD23) na B-limfocitima i mononuklearnim fagocitnim stanicama te receptor antitijela klase IgE visokog afiniteta (FcεRI)

na mastocitima i bazofilima (131). IgE ovisna aktivacija mastocita izazvana IL-4 ima ključnu ulogu u razvoju neposrednih alergijskih reakcija. Dodatni mehanizam kojim IL-4 doprinosi opstrukciji dišnih putova kod astme je indukcija ekspresije gena mucina i hipersekrecija sluzi (132).

IL-4 je povećan u serumu i bronhoalveolarnom ispirku alergičnih osoba. Uočeno je da je vrijednost IL-4 niža kod djece u remisiji astme, nego kod djece s aktivnom astmom (133).

2.2.2. IL-5

Interleukin (IL)-5 je povezan s eozinofilijom djelujući uglavnom na stanice eozinofilnog podrijetla, gdje stimulira njihov rast i diferencijaciju, poboljšava njihovo preživljavanje i potiče oslobađanje njihovog granularnog sadržaja na mjestu upale (134), igra ulogu u stimuliranju bazofila induciranjem oslobađanja histamina i stvaranja leukotriena C4 iz bazofila u alergijskim stanjima. Dokazana je uloga IL-5 u remodeliranju dišnih putova (135).

Prema nekim studijama citokin IL-5 značajno je viši u serumu djece koja će imati perzistentnu astmu u usporedbi s onima koja će ući u remisiju (136).

2.2.3. IL-13

Interleukin (IL)-13 je citokin tipa 2 za koji se pokazalo da je važan u patogenezi astme i drugih eozinofilnih poremećaja. Učinci IL-13 u tim stanjima uključuju utjecaj na epitelne stanice, povećano lučenje sluzi, povećanu hiperreaktivnost dišnih putova i transport eozinofila do mjesta oštećenja tkiva putem kemotaksije (137).

Kod eozinofilnih poremećaja poput astme, dolazi do povećane proizvodnje eozinofila i naknadne migracije eozinofila u pluća i povećanih razina citokina tipa 2 (IL-4 i IL-13) koje pojačavaju proizvodnju kemokina koji pojačavaju kemotaksiju za transport eozinofila iz cirkulacije u dišne putove (138). Glavna funkcija IL-13 u astmatičnim dišnim putovima je induciranje kemotaksije eozinofila na mjesto ozljede.

Uočene su značajno više razine serumskog IL-13 u bolesnika s teškom astmom u odnosu na zdrave dobrovoljce, a te su razine snažno korelirale s potpisom gena tipa 2 u bronhijalnom epitelu. Zanimljivo je da je kod bolesnika s umjerenom do teškom astmom serumski IL-13 bio snažno pozitivno povezan s brojem eozinofila u krvi (139).

Razine IL-13 u serumu u skupini s remisijom astme i skupini s akutnom astmom bile su značajno više od onih u zdravoj kontrolnoj skupini, a razine IL-13 u serumu u skupini s akutnom astmom bile su značajno više od onih u skupini s remisijom astme (140).
Biološki lijekovi koji ciljaju put IL-13, IL-4 i IL-5 pokazali su učinkovitost, posebno u podskupinama pacijenata s dokazima eozinofilne bolesti. Značajno je da se sam broj eozinofila u krvi koristi kao biomarker u mnogim kliničkim studijama. Pacijenti s visokim eozinofilima iskusili su veću kliničku korist od terapija protiv tipa 2 u usporedbi s pacijentima s nižim eozinofilima (141,142).

2.2.4. TNF-α

Faktor tumorske nekroze-α (TNF-α) prepoznat je kao važan faktor u mnogim upalnim događajima ovisnim o citokinu. Poznato je da se TNF-α oslobađa u alergijskim odgovorima iz mastocita i makrofaga putem IgE-ovisnih mehanizama, a povišene razine su dokazane u bronhoalveolarnoj tekućini astmatičara koji su izloženi alergenima. Dodatni podaci ukazuju na to da TNF-α može pojačati adhezijske molekule, olakšati imigraciju upalnih stanica u stijenku dišnih putova i aktivirati profibrotičke mehanizme u subepitelu. Ovi podaci upućuju na to da TNF-α igra ulogu u pokretanju upale dišnih putova i stvaranju hiperreaktivnosti dišnih putova (143). Wasserman i sur. (2012.) objavili su rezultate istraživanja lokalnih i sistemskih imunoloških parametara povezanih s remisijom simptoma astme kod djece (136). Ispitali su citokine perifernih mononuklearnih stanica i profile lokalnih medijatora u 3 skupine pacijenata u dobi od 12 do 18 godina: adolescente s kontinuiranim simptomima astme, djecu koji su imali perzistentne simptome u ranom djetinjstvu, ali kod kojih su se oni povukli i kontrolnu skupina. Pacijenti iz prve skupine pokazali su povišen broj eozinofila i eozinskih kationskih proteina, a također i povećan IL-5 u sputumu, što nije uočeno u drugoj skupini te povećanu proizvodnju citokina tipa 1 IL-12, IFN-γ i TNF-α u prvoj skupini, u usporedbi s drugom skupinom što upućuje na to da je smanjena ekspresija IL-12, IFN-γ i TNF-α, kao i smanjena eozinofilna upala, povezana s povlačenjem simptoma astme (136).

2.2.5. IFN-γ

Interferon-γ (IFN-γ) je produkt Th1 stanica i ima inhibitorne učinke na diferencijaciju Th2 stanica. Ovi citokini su uključeni u patogenezu astme i alergija. U tom kontekstu, utvrđeno

je da je proizvodnja IFN-γ kod astme smanjena, što može smanjiti njihovu sposobnost inhibicije sinteze IgE i alergijske upale.
Međutim u ranije navedenoj studiji, smanjena ekspresija IFN-γ bila je povezana s remisijom astme, dok su djeca s aktivnom astmom imala povišene vrijednosti (136).

2.2.6. ECP

Eozinofilni kationski protein (ECP) je biomarker, koji zbog aktivacije odnosno degranulacije tkivnih eozinofilnih granulocita dospijeva u cirkulaciju.
ECP također stimulira proizvodnju sluzi u dišnim putovima i oslobađanje histamina iz bazofila i mastocita in vitro. Serumska koncentracija ECP-a je povećana u astmatičara tijekom akutne egzacerbacije u odnosu na bolesnike s astmom u remisiji (144).
ECP dobro korelira s upalom dišnih putova, ali ne i s bronhalnom hiperreaktivnošću (145). Povišen je i kod drugih atopičnih bolesti i nije dijagnostički specifičan za astmu. Međutim, pokazalo se da je koristan u procjeni težine astme, uzimanjem protuupalne terapije te je pokazatelj kada je vrijeme za smanjenje terapije inhalacijskim kortikosteroidima (146). Iako postoje neki dokazi da na razine ECP-a utječu dob, pušenje, cirkadijalni ritam i sezonske varijacije, čini se da je samo pušenje klinički značajno (147).

2.2.7. hsCRP

Serumski C-reaktivni protein velike osjetljivosti, hsCRP (*eng.* high sensitivity C-Reactive Protein) je marker sistemske upale niskog stupnja u različitim stanjima kao što su kardiovaskularni poremećaji i šećerna bolest (148). Sistemsku upalu kod astme podržava porast proinflamatornih citokina u cirkulaciji, poput interleukina (IL)-6 i TNF-α, posljedično i povećanje reaktanata akutne faze poput CRP-a, te prisutnost imunoloških stanica, poput neutrofila i prirodnih stanica ubojica kod astmatičnih bolesnika (149). Nekoliko studija izvješćuje o povezanosti između hsCRP, osjetljivog markera sistemske upale i astme. Studija s pedijatrijskim ispitanicima pokazala je da su razine hsCRP u serumu bile više kod astmatičnih pacijenata nego kod zdravih kontrolnih ispitanika te da postoje pozitivne veze između razina hsCRP u serumu i težine astme (150). Druge studije izvijestile da je hsCRP bio povišen u neatopičnih astmatičnih bolesnika, ali ne i u atopičnih astmatičnih bolesnika (151).

2.2.8. Eozinofili

Broj eozinofilnih granulocita u perifernoj krvi kolerira s težinom astme i bronhalnom hiperreaktivnošću. Tijekom egzacerbacije bolesti i izlaganja alergenima dolazi do porasta broja cirkulirajućih eozinofilnih granulocita, a kortikosteroidna terapija smanjuje njihov broj u cirkulaciji (152). Razine eozinofila u krvi ili dišnim putovima često ukazuju na teži oblik astme, veći rizik od čestih pogoršanja i smanjenu funkciju pluća, što zahtijeva specijalizirano dijagnostičko testiranje i ciljane terapije. Mnoge studije su pokazale pozitivnu vezu između molekule FeNO i broja eozinofila u sputumu (153,154).

2.2.9. Molekula FeNO

Frakcionirani izdahnuti dušični oksid, FENO (*eng.* Fractional Exhaled Nitric Oxide) predstavlja neposredni marker oksidacijskog stresa i stupnja upale malih dišnih putova te zajedno sa spirometrijskim vrijednostima čini temelj kliničkog praćenja učinka protuupalne terapije u astmatičara. Mjerenja frakcijskog izdahnutog NO (FeNO) mogu biti korisna za praćenje odgovora na liječenje astme zbog navodne povezanosti između FeNO i prisutnosti upale u astmi (155). Molekula FeNO je plinovita molekula koju sintetizira sintaza dušikovog oksida, a koja se eksprimira u epitelu dišnih putova i povećava se u upalnom stanju. Mjerenje molekule FeNO je neinvazivna metoda za procjenu upale dišnih putova kod astme. Test je relativno jednostavan i njegovi rezultati su odmah dostupni (156).

2.3. Vitamini

Vitamini igraju ključnu ulogu u pravilnom funkcioniranju organizama. Poremećaji njihove razine, koji se smatraju nedostatkom ili viškom, pospješuju razvoj raznih bolesti, uključujući bolesti kardiovaskularnog, imunološkog ili dišnog sustava, uključujući astmu. Određeni vitamini, kao što su vitamin D, E i A, igraju značajnu ulogu u patomehanizmu astme, te liječenju astme modificiranjem imunološkog odgovora, smanjenjem upale i suzbijanjem oksidativnog stresa u dišnim putovima. Iako su nedostaci vitamina često povezani s pogoršanom funkcijom pluća i sklonošću egzacerbacijama astme, još uvijek je dvojbeno da njihova suplementacija poboljšava kontrolu bolesti (14).

2.3.1. Vitamin D

Prekursor vitamina D može se dobiti iz dva primarna izvora: unosom putem prehrane iz izvora kao što su riblje ulje, riblja jetra, žumanjak i dodaci prehrani te izlaganjem kože UVB zračenju (157). Nakon izlaganja UVB zračenju, 7-dehidrokolesterol se u koži pretvara u previtamin D3, čime se pokreće proces sinteze vitamina D.

Međutim, između studenog i ožujka koža proizvodi malo vitamina D, posebno na sjeveru. Stoga razina vitamina D značajno pada tijekom zime u umjerenim područjima gdje je izloženost suncu ograničena tijekom značajnog dijela godine. Kao rezultat toga, prehrambeni izvori vitamina D postaju ključni za sprječavanje insuficijencije (158).

Prema nekoliko studija, čak i na sunčanim mjestima, insuficijencija vitamina D još uvijek je česta u zemljama u razvoju, unatoč upotrebi multivitamina i povećanju unosa hrane. To bi moglo biti povezano s promjenama u načinu života, kao što su manje izlaganje sunčevoj svjetlosti, više vremena provedenog u zatvorenom prostoru, promjene u prehrani i korištenje kreme za sunčanje (159).

Kalcitriol kontrolira aktivnost i proliferaciju T-limfocita, a istovremeno smanjuje upalu i ekspresiju citokina. Ova djelovanja upravljaju adaptivnim imunološkim sustavom.

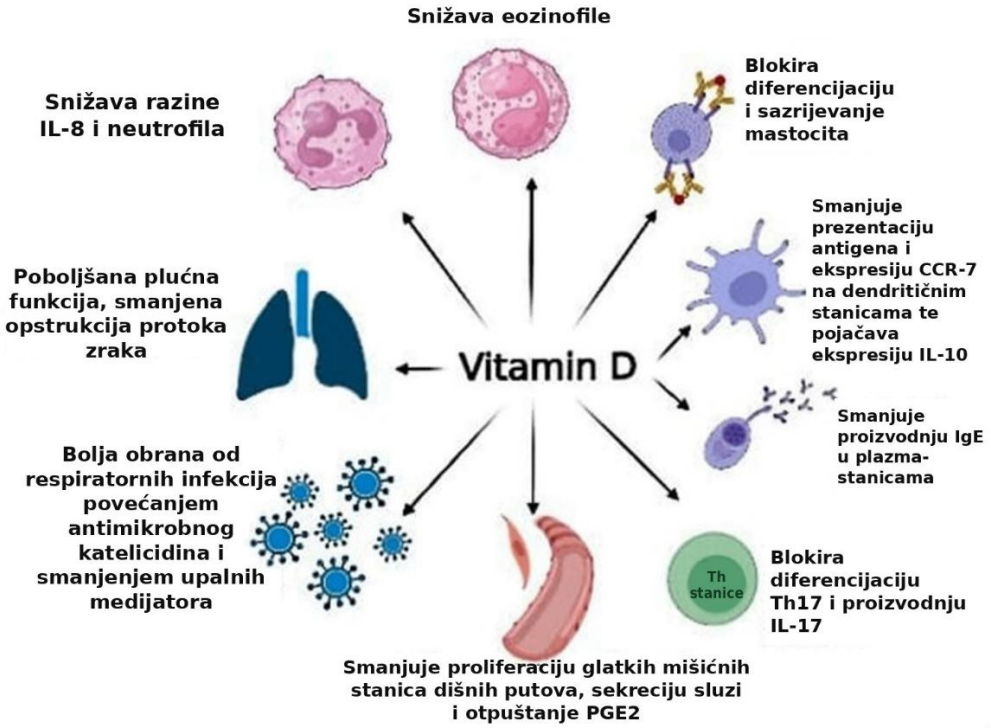
Studije su pokazale da vitamin D stimulira regulatorne T-stanice (Treg), smanjuje imunološke odgovore Th2 i Th17 te pojačava proizvodnju IL-10, što sve može sniziti razinu antitijela klase IgE (160).

Svjetska organizacija za alergije potvrđuje da nedostaju dokazi koji bi potkrijepili tvrdnju da suplementacija vitaminom D može smanjiti vjerojatnost razvoja alergijskih bolesti kod djece iako se smatra da vitamin D regulira funkciju limfocita, mastocita, stanica koje prezentiraju antigen i strukturnih stanica u heterogenim endotipovima astme kako bi se kontrolirala upala, što pruža dokaze o uzročnoj vezi.

Kada su izolirane mononuklearne stanice periferne krvi pacijenata s teškom astmom izložene metabolitima vitamina D te stanice ne proizvode IL-17A. Umjesto toga, metaboliti vitamina D podržavaju antivirusne odgovore u epitelnim stanicama dišnih putova (161). Ovi mehanizmi pružaju dokaze o uključenosti vitamina D kao sekundarnog preventivnog sredstva u ublažavanju pogoršanja astme i upale (18). Neke studije su pokazale da liječenje vitaminom D smanjuje egzacerbacije astme za 30% kod pacijenata s blagom do umjerenom astmom i niskim razinama vitamina D (162).

Nedavne studije na odraslima i djeci pokazale su veću prevalenciju niskih razina vitamina D kod astmatičara nego u općoj populaciji. Štoviše, niske razine vitamina D povezane su s težim oblikom astme i oštećenom plućnom funkcijom. Astmatični pacijenti s nedostatkom vitamina D pokazali su povećanu hiperreaktivnost dišnih putova i potrebe za kortikosteroidima, a vitamin D mogao bi povećati njihov odgovor na glukokortikoide (163,164).

Utvrđeno je da vitamin D ublažava upalu povezanu s alergijskom astmom, smanjuje proliferaciju, proizvodnju proupalnih citokina i lučenje sluzi. Pokazalo se da vitamin D smanjuje ekspresiju CCR-7, sazrijevanje i prezentaciju antigena u DC-ima, potiče ekspresiju IL-a. U T-limfocitima zabilježeno je da vitamin D pomiče ravnotežu s Th17 stanica na Treg stanice, što se očituje smanjenom proizvodnjom IL-17 i povećanom proizvodnjom IL-10, inhibira diferencijaciju i proliferaciju B-stanica u plazma stanice i vjeruje se da igra ulogu u smanjenju proizvodnje antitijela, inhibira diferencijaciju, sazrijevanje, vraćanje u prvobitno stanje i lučenje citokina iz mastocita, neutrofila i eozinofila (Slika 3) (165).



Slika 3. Imunoregulacijska aktivnost vitamina D na upalne stanice uključene u patogenezu astme (preuzeto i prilagođeno prema Tibrewal i sur., 2023)

IL- interleukin, Ag- antigen, PGE2- prostaglandin E2, Th17- T pomoćne stanice 17, IgE- immunoglobulin E, CCR7- C-C kemokinski receptor 7

2.3.2. Vitamin A

Vitamin A je neophodan za očuvanje integriteta epitela i ima protuupalne učinke u plućima te prevenira remodeliranje dišnih putova. Nedostatak vitamina A potiče i pogoršava već postojeću upalu (166). Osim toga, vitamin A je potreban za aktivaciju B-limfocita putem poboljšanja sinteze imunoglobulina i proizvodnje sekretornog Ig A u dišnim putovima. On sprječava programiranu staničnu smrt i održava vitalnost T i B-limfocita (167). Dokazi pokazuju da je razina vitamina A u serumu djece s astmom značajno niža nego kod zdrave djece, te da postoji značajna korelacija između njegove koncentracije i težine astme (168). Na terapijskoj razini, učinak vitamina A na poboljšanje funkcije pluća kod pacijenata s kroničnom astmom ostaje kontroverzan. Neke studije su izvijestile da suplementacija vitaminom A (kao antioksidansom) nema očite kliničke koristi, dok su neke studije potvrdile da terapija potpomognuta vitaminom A može značajno skratiti trajanje respiratornih simptoma (kašalj, piskanje) kod djece s bronhijalnom astmom, poboljšati funkciju pluća, smanjiti upalne markere i povećati razinu T stanica (169,170). Osim toga, povećane razine vitamina A i 25-hidroksivitamina D3 (25OHD3) u serumu povezane su s poboljšanom funkcijom pluća i kvalitetom života kod djece s astmom u remisiji. Praćenje i održavanje odgovarajućih razina vitamina A može pomoći u kontroli simptoma astme i smanjenju učestalosti napadaja (171).

2.3.3 Vitamin E

Vitamin E jedan je od čimbenika iz okoliša koji može modificirati razvoj alergije u ranoj životnoj dobi kao i odgovore na alergen nakon senzibilizacije. Različit učinak vitamina E ovisi o različitim funkcijama izoformi. Studije pokazuju da izoforme vitamina E, α-tokoferol i γ-tokoferol, imaju suprotne funkcije u regulaciji alergijske upale i razvoju alergijskih bolesti, pri čemu α-tokoferol ima protuupalna djelovanja, a γ-tokoferol proupalna djelovanja kod alergije i astme. Razlike u prevalenciji astme po zemljama mogu biti rezultat, barem djelomično, razlika u konzumaciji ova dva izoforma tokoferola. Ljudi dobivaju izoforme vitamina E iz hrane, ulja za kuhanje, formula za dojančad i vitaminskih dodataka te na taj način mogu povećati konzumaciju izoforme γ-tokoferola (172,173). Zemlje s najvišim razinama γ-tokoferola u plazmi imaju tendenciju prema najvećoj stopi prevalencije astme (174).

Prema studiji, trogodišnja djeca s visokim razinama α-tokoferola i niskim razinama γ-tokoferola u plazmi imala su značajno bolju plućnu funkciju (viši FEV1) u dobi od 7 godina nego djeca s niskim razinama α-tokoferola i visokim razinama γ-tokoferola (175).

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Vrsta istraživanja

Istraživanje je postavljeno kao prospektivna, usporedna, studija kohorte slučaj-kontrola. Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima, odobreno od Etičkog povjerenstva Dječje bolnice Srebrnjak (14.04.2022.) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu (27.06.2022.).
Adolescenti su uključeni u studiju nakon potpisivanja informiranog pristanka njihovih roditelja, odnosno zakonskih skrbnika.

3.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 134 ispitanika podijeljenih u tri skupine u dobi od 10 do 18 godina:

1. Kontrolna skupina, 26 zdravih ispitanika oba spola (upareni sa skupinom 2 i 3 gleda spola, dobi te sezoni uzorkovanja vitamina)
2. Skupina u potpunoj remisiji, 58 djece oba spola kojima je astma dijagnosticirana prije adolescencije, a prije uključivanja su bili najmanje godinu dana ili više u kompletnoj remisiji
3. Skupina s aktivnom astmom, 50 dijete oba spola kojima je astma dijagnosticirana prije adolescencije, a koji imaju aktivnu astmu obzirom na simptome i liječenje (upareni sa skupinom 2 glede spola, dobi te sezoni uzorkovanja vitamina)

Uključujući kriteriji za istraživanje su:
Prva skupina

- dob od 10. do 18. godine života
- prethodno zdrava djeca kojima nije dijagnosticirana astma
- djeca s urednom obiteljskom i osobnom anamnezom glede atopijskih bolesti (alergijski rinitis, atopijski dermatitis, nutritivna alergija)

Druga skupina

- dob od 10. do 18. godine života
- adolescenti koji su godinu dana ili više u kompletnoj remisiji astme (bez simptoma astme kako noću, tako i u naporu, bez egzacerbacija bolesti zadnjih godinu dana ili duže, koji ne uzimaju protuupalnu terapiju niti su bili liječeni biološkim lijekovima, imaju urednu plućnu funkciju i urednu normoreaktivnost bronha)

Treća skupina

- dob od 10. do 18. godine života
- djeca s aktivnom astmom (prisutni simptomi i pogoršanja astme kao i potreba za redovitom protuupalnom terapijom, koji imaju poremećaj plućne funkcije, te hiperreaktivnost bronha)

Dijagnoza astme postavljena je na temelju GINA i ATS/ERS smjernica (3,176).

Isključujući kriteriji za istraživanje su:

- djeca mlađa od 10 godina
- maligne bolesti
- aktivne ili loše kontrolirane autoimune bolesti
- dijagnoza cistične fibroze
- nadomjesna terapija vitaminima D, A i E
- preboljena infekcija dišnih putova do unatrag četiri tjedna prije ispitivanja koja bi mogla utjecati na rezultate dijagnostičkih testova

3.3. Metode

Istraživanje je provedeno u Dječjoj bolnici Srebrnjak na Klinici za pedijatriju, na Odjelu za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku, Znanstveno-istraživačkom odjelu i Odjelu za plućnu funkcijsku dijagnostiku.

Tijekom pregleda u Alergološkoj ambulanti Klinike za pedijatriju, liječnika subspecijalista dječje alergologije i kliničke imunologije, uzeta je detaljna osobna i obiteljska anamneza te su prikupljeni podaci o prehrani, izloženosti duhanskom dimu, bavljenju sportom, mjestu stanovanja grad/selo-onečišćenja, izloženosti suncu ovisno o mjestu stanovanja, komorbiditetnim bolestima (pretilost, alergijski rinitis, atopijski dermatitis, gastroezofagealna refluksna bolest (GERB)), kontaktu sa životinjama, vremenu uzimanja uzoraka s naznakom godišnjeg doba, broju i težini egzacerbacije astme zadnju godinu dana, uzimanju terapije za astmu unatrag godinu dana (kontinuirano ili povremeno), atopiji u obitelji.

Također se svakom ispitaniku izmjerila tjelesna visina i tjelesna masa, izračunat je indeks tjelesne mase (BMI) te su apsolutne vrijednosti uspoređene s percentilnim krivuljama rasta specifičnim za spol i dob djeteta.

Ispitanici su ispunili upitnike o kontroli astme za djecu u dobi od 4-11 godina (Childhood Asthma Control Test-C-ACT) i upitnik o kontroli astme za djecu od 12 godina i više (ACT) (177,178).
Prema podacima iz literature, za oba testa bodovni zbir od 19 i niže otkriva nekontroliranu astmu u zadnja 4 tjedna. C-ACT se sastoji od sedam pitanja (učestalost simptoma izazvanih fizičkom aktivnošću, učestalost kašlja i noćnih simptoma; broj bodova 0-27), od kojih na prva četiri odgovara dijete, a na zadnja tri odgovara roditelj. ACT se sastoji od pet pitanja (broj bodova 5-25) te na svih pet pitanja odgovaraju djeca.

Provedena je procjena težine astme prema GINA smjernicama ovisno o broju napadaja i potrebe za lijekovima te je evidentiran broj egzacerbacija prema stupnju težine astmatskog napada u zadnjih godinu dana.
Ispitanici su u skupine raspoređeni ovisno o fenotipu astme.

Liječenje inhalacijskim kortikosteroidima (IKS) uključeno je kao klinička varijabla, zabilježena je samo kao binarna varijabla (da/ne).

Učinjen je i klinički pregled djece te je svakom ispitaniku napravljen kožni ubodni test (SPT) na inhalacijske alergene.

Provedeno je mjerenje plućne funkcije spirometrijskim mjerenjem i prikazom krivulje protok-volumen uz bronhodilatacijski test salbutamolom, izmjeren je plućni FeNO pri 50 i 350 mL/s protoka.

Spirometrija je provedena pomoću kompjuteriziranog spirometra (GANSHORN Medizin Electronic GmbH, Niederlauder, Njemačka) prema smjernicama ATS-a (179). Analizirani su volumen zraka izdahnut u 1 s (FEV1), forsirani vitalni kapacitet (FVC) i omjer FEV1/FVC koji su zabilježeni i izraženi kao postotak predviđenih vrijednosti, prema Austrijskim normama za populaciju djece (180), a koje se koriste u Dječjoj bolnici Srebrnjak u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Bronhodilatacijski test je dijagnostički postupak za mjerenje reverzibilnosti suženja dišnih putova. Nakon učinjene spirometrije sva djeca su dobila salbutamol te je nakon 15 min ponovljena spiromerija. Povećanje FEV1 i/ili FVC $\geq$ 12% početne vrijednosti koristio se kao kriterij za pozitivan bronhodilatacijski test prema preporuci ERS/ATS (181).

Mjerenje FeNO-a

U skladu sa standardima ATS-a, mjerenja FeNO provedena su prije spirometrijskih testova. Razine izdahnutog NO mjerene su metodom jednog izdisaja pri 50 mL/s tijekom 10 s pomoću NiOX analizatora (Aerocrine AB, Solna, Švedska) izraženo u ppb-ima, a u skladu s preporukama ERS/ATS-a. Za adolescente vrijednosti ispod 5 su niske, normalne vrijednosti su u rasponu od 5 do 25, visoke od 26 do 35, a vrlo visoke iznad 35 ppb (182).

Mjerenje bronhalne hiperreaktivnosti

Djeci s dijagnozom astme (djeci s remisijom astme i djeci s aktivnom astmom) napravljen je bronhoprovokacijski test metakolinom (metakolinski test) koji služi za dokazivanje pretjerane osjetljivosti (hiperrekatvinosti) sluznice bronha i pomoćno je sredstvo za dijagnostiku astme.

Test se provodi tako da ispitanik učini bazičnu spirometriju a zatim započinje izvođenje bronhoprovokativnog testa udisanjem fiziološke otopine, a poslije postupno rastućim dozama metakolina u točno određenoj koncentraciji u više navrata, a nakon svake inhalacije se ponavlja spirometrija. Prate se spirometrijske vrijednosti do kraja testa ili do kriterija koji zadovoljavaju pozitivan nalaz. Ako dođe do suženja dišnih putova (pad FEV1 $\geq$ 20%) obustavlja se daljnje testiranje i test smatramo pozitivnim. Zatim se daje salbutamol, prati se plućna funkcija do povratka na osnovne vrijednosti (početna spirometrija). Doza potrebna za izazivanje smanjenja od 20% poznata je kao provokacijska doza (PD20) izražava se u mg/mL (183). (JAEGER Njemačka).

Određivanje biomarkera

Svakom se ispitaniku napravila analiza uzorka krvi dobivene venepunkcijom za diferencijalnu krvnu sliku (DKS), ECP, hsCRP, uIgE.
Dio ostatnog biološkog uzorka koji je prikupljen tijekom rutinske dijagnostičke obrade (2 mL) odvojen je za analizu citokina metodom enzimskog imunotesta (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), a dodatnih 2 mL krvi za analizu vitamina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) spregnutom s masenom spektrometrijom (eng. *liquid chromatography/ mass spectrometry*, LC/MS).

Eozinofili (u sklopu DKS) određivan je morfološkom analizom krvnog razmaza, izmjereni na hematološkom brojaču XN 550 (Sysmex, Japan).
Koncentracija ECP i ukupni IgE su izmjereni analitičkom metodom: kemiluminiscentna imunoanaliza (CLIA) na analizatoru Immulite 2000 Xpi (Siemens, Njemačka).
Koncentracija hsCRP je izmjeren imunoturbidimetrijskom analitičkom metodom na analizatoru AU680 (Beckman Coulter, USA).

ELISA (citokini)

Nakon uzorkovanja krvi venepunkcijom u epruvete s gelom koji sadrži aktivator zgrušavanja (BD Vacutainer SST tubes, Becton Dickinson and Company Inc, Franklin Lakes, NJ, SAD), serum je izdvojen centrifugiranjem uzorka krvi na 3000 g, 10 min na sobnoj temperaturi. Serum je izdvojen u mikroepruvete i pohranjen na -80°C do naknadne analize.

Koncentracije citokina (IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ i TNF-α) u serumu određene su metodom ELISA korištenjem komercijalno dostupnih setova reagensa:

- IL-4 (Human IL-4 ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD)
- IL-5 (Human IL-5 ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD)
- IL-13 (Human IL-13 ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD)
- IFN-γ (Human IFN-gamma ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD)
- TNF-α (Human TNF alpha ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD).

Na polipropilenske pločice s 96 jažica imobilizirano je protutijelo za vezanje specifično za svaki citokin inkubacijom preko noći na 4°C. Nespecifično vezana protutijela uklonjena su ispiranjem 3 puta puferom za ispiranje (uz namakanje pufera za ispiranje u svakom ciklusu pranja u trajanju od cca 1 minute). Potom su jažice blokirane inkubacijom 1 h na sobnoj temperaturi u ELISPOT Diluent reagensu kako bi se dodatno izbjeglo nespecifično vezanje i lažno pozitivni rezultati. Reagens za blokiranje potom je ispran 3 puta korištenjem pufera za ispiranje. Standardi poznatih koncentracija citokina serijski su dvostruko razrijeđeni u ELISPOT Diluent reagensu ukupno 8 puta. Uzorci, standardi i slijepa proba (ELISPOT Diluent reagens) inkubirani su preko noći na 4°C. Nespecifično vezani antigeni uklonjeni su ispiranjem 5 puta puferom za ispiranje. Detekcijsko protutijelo inkubirano je 1 h na sobnoj temperaturi, nakon čega su nespecifično vezana protutijela isprana 5 puta puferom za ispiranje. Potom je dodan kompleks streptavidina i peroksidaze hrena, inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi i ispran 5 puta puferom za ispiranje. Zatim je dodan supstrat (3,3′,5,5′-tetrametilbenzidin, TMB), inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi te je nakon toga dodana otopina za zaustavljanje reakcije (2N H_2SO_4). Optička gustoća na valnoj duljini 450 nm (OD_{450}) u uzorcima očitana je korištenjem čitača mikrotitarskih pločica ELISA Plate Analyser (Global Diagnostics B, Geel, Belgija).

Granica detekcije za test za IL-4 i IL-5 je 1,5 pg/mL, za IL-13 i TNF-α je 3,9 pg/mL, a za IFN-γ 0,5 pg/mL.

Mjerenje vitamina

LC/MS (vitamin D)

Nakon uzorkovanja krvi venepunkcijom u epruvete s antikoagulansom K2EDTA (BD Vacutainer EDTA tubes, Becton Dickinson and Company Inc, Franklin Lakes, NJ, SAD), plazma je izdvojena centrifugiranjem uzorka krvi na 3500 rpm, 10 min na 16°C. Plazma je izdvojena u mikroepruvete i pohranjena na -20°C do naknadne analize.

Koncentracija vitamina 25-OH-vitamina D3 u uzorcima plazme određena je metodom HPLC spregnutom s masenom spektrometrijom, LC/MS trostrukog kvadrupola. Priprema uzoraka plazme za analizu i injektiranje u LC/MS sustav provedena je korištenjem komercijalno dostupnog seta reagensa Jasem 25-hydroxy Vitamin D2&3, epi-Vit D3 (Altium International Laboratuvar Cihazlari A.S., Istanbul, Turska). Ukratko, u 200 μL uzoraka plazme, kalibratora poznatih koncentracija u 4 točke te kontrola (liofiliziranih plazmi poznate koncentracije 25-OH-vitamina D3, rekonstituiranih u vodi, u 2 točke) dodano je 100 μL reagensa za oslobađanje vitamina D od njegovog transportnog proteina (eng. *vitamin D binding protein*, VDBP) koji sadrži metanol, cinkov sulfat i mravlju kiselinu. Zatim je dodano 25 μl internog standarda D_6-25-OH-vitamin D3. Naposlijetku je dodano 975 μL metanola za deproteinizaciju te su uzorci centrifugirani na 3600 g, 5 min. Supernatant (600 μL) ispipetiran je u epruvete sa zatamnjenim staklom te termostatiran na 4°C u *auto-sampler* modulu LC/MS sustava do injekcije i analize.

Volumen od 10 μL tako pripremljenih uzoraka, kalibratora, kontrola kao i slijepe probe (metanol) injektirano je u LC/MS sustav (Agilent Infinity Bio-inert 1260/Agilent-6465 Ultivo, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, SAD). Tekućinska kromatografija reverzne faze provedena je na C18 silika koloni u ukupnom trajanju od 10 min po injektiranju, uz mobilnu fazu A: 5%-tni metanol uz dodatak 0,1% mravlje kiseline (v/v) i 2mM amonijevog formijata i mobilnu fazu B: 100%-tni metanol uz dodatak 0,1% mravlje kiseline (v/v) prema parametrima navedenim u Tablici 1.

Tablica 1. Uvjeti analize vitamina D u plazmi metodom tekućinske kromatografije

Vrijeme (min)	**Mobilna faza A (%)**	**Mobilna faza B (%)**	**Protok (mL/min)**
0,00	22	78	0,6
3,80	22	78	0,6
3,81	2	98	0,6
6,30	2	98	0,6
6,31	22	78	0,6
10	22	78	0,6

Između injektiranja injekcijska igla isprana je s minimalno 10 volumena mješavine vode i metanola u omjeru od 1:1.

Uvjeti ionskog izvora prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti ionskog izvora (masenog spektrometra) u analizi vitamina D u plazmi

Polarnost	Pozitivna
Temperatura plina	150 °C
Protok plina	10 L/min
Tlak nebulizera	40 psi
Temperatura obložnog plina	300°C
Protok obložnog plina	10 L/min
Napon kapilare	3000 V (pozitivni)
Napon mlaznice	0 V

Kvalitativna i kvantitativna analiza rezultata odrađena je na temelju ciljnih tranzicija masa analita i produkata kolizije (Tablica 3.), kao i retencijskih vremena specifičnih za svaki analit (Tablica 4).

Tablica 3. Tranzicije masa specifičnih za pojedine analite (vitamin D2, vitamin D3, epimer vitamin D3) u analizi vitamina D u plazmi metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom

Naziv spoja	**Prekursorski ion**	**Rezolucija MS1**	**Produktni ion**	**Rezolucija MS2**	**Dwell**	**FV**	**CE**	**Polarnost**
25-OH-vitamin D2 (kvantitativno)	413,3	jedinica	395,3	jedinica	100	120	6	pozitivna
25-OH-vitamin D2 (kvalitativno)	413,3	jedinica	355,3	jedinica	100	110	6	pozitivna
25-OH-vitamin D3 (kvantitativno)	401,3	jedinica	383,3	jedinica	100	120	6	pozitivna
25-OH-vitamin D3 (kvalitativno)	401,3	jedinica	365,3	jedinica	100	120	6	pozitivna
3-epi-25-OH-vitamin D3	401,3	Jedinica	383,3	jedinica	100	120	6	pozitivna
D_6-25-OH-D3 vitamin (interni standard)	407,3	jedinica	389,3	jedinica	100	120	6	pozitivna

Tablica 4. Očekivana retencijska vremena za pojedine analite u analizi vitamina D u plazmi metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom

Naziv spoja	**Retencijsko vrijeme (min)**
25-OH-vitamin D2	3,1
25-OH-vitamin D3	2,99
3-epi-25-OH-vitamin D3	3,55
D_6-25-OH-vitamin D3	2,965

Iako su mjereni i vitamin D2, vitamin D3 te epi vitamin D3, analizirane su samo koncentracije vitamina 25-OH-vitamin D3 u serumu zbog njihove veće biološke i kliničke relevantnosti što je u skladu s uobičajenom kliničkom praksom, budući da je vitamin D3 značajno učinkovitiji od vitamina D2 u podizanju i održavanju ukupne razine 25(OH)D u serumu. Razine 25-OH vitamina D3 izražene su u μg/L. Vrijednosti jednake ili veće od 20 μg/L smatrane su normalnima, vrijednosti između 10 i 19,99 μg/L definirane su kao nedostatak, a vrijednosti niže od 10 μg/L definirane su kao ozbiljan nedostatak (184, 185, 186).

LC/MS (vitamini A i E)

Nakon uzorkovanja krvi venepunkcijom u epruvete s antikoagulansom K2EDTA (BD Vacutainer EDTA tubes, Becton Dickinson and Company Inc, Franklin Lakes, NJ, SAD), plazma je izdvojena centrifugiranjem uzorka krvi na 3500 rpm, 10 min na 16°C u mikroepruvete i pohranjena na -20°C do naknadne analize.

Koncentracija vitamina A i E u uzorcima plazme određena je metodom HPLC spregnutom s masenom spektrometrijom, LC/MS trostrukog kvadrupola. Priprema uzoraka plazme za analizu i injektiranje u LC/MS sustav provedena je korištenjem komercijalno dostupnog seta reagensa Jasem Vitamin A&E in Serum/Plasma LC-MS/MS Analysis Kit (Altium International Laboratuvar Cihazlari A.S., Istanbul, Turska). Ukratko, u 200 μL uzoraka plazme, kalibratora poznatih koncentracija u 3 točke te kontrole (liofilizirane plazme poznate koncentracije retinola i α-tokoferola, rekonstituirane u vodi) dodano je 100 μL reagensa za oslobađanje vitamina D od transportnih proteina i lipoproteinskog matriksa koji sadrži metanol, cinkov sulfat, amtioksidans (askorbinskou kiselinu) i mravlju kiselinu. Zatim je dodano 25 μL internog standarda vitamin E-D_6. Naposlijetku je dodano 975 μL metanola za deproteinizaciju te su uzorci centrifugirani na 3600 g, 5 min. Supernatant (600 μL) ispipetiran je u epruvete sa zatamnjenim staklom te termostatiran na 4°C u *auto-sampler* modulu LC/MS sustava do injekcije i analize.

Tako pripremljeni uzorci od 10 μL, kalibratora, kontrole kao i slijepe probe (metanol) injektirano je u LC/MS sustav (Agilent Infinity Bio-inert 1260/Agilent-6465 Ultivo, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, SAD). Tekućinska kromatografija reverzne faze provedena je na C18 silika koloni u ukupnom trajanju od 6 min po injektiranju, uz mobilnu fazu A: 5%-tni metanol uz dodatak 0,1% mravlje kiseline (v/v) i 2mM amonijevog formijata i mobilnu fazu B: 100%-tni metanol uz dodatak 0,1% mravlje kiseline (v/v) prema parametrima navedenim u Tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti analize vitamina A i E u plazmi metodom tekućinske kromatografije

Vrijeme (min)	**Mobilna faza A (%)**	**Mobilna faza B (%)**	**Protok (mL/min)**
0,00	2	98	0,7
6,00	2	98	0,7

Između injektiranja injekcijska igla isprana je s minimalno 10 volumena mješavine vode i metanola u omjeru od 2:1.

Uvjeti ionskog izvora navedeni su u Tablici 6.

Tablica 6. Uvjeti ionskog izvora (masenog spektrometra) u analizi vitamina A i E u plazmi

Polarnost	Pozitivna
Temperatura plina	350 °C
Protok plina	11 L/min
Tlak nebulizera	50 psi
Temperatura obložnog plina	400°C
Protok obložnog plina	11 L/min
Napon kapilare	6000 V (pozitivni)
Napon mlaznice	1000 V

Kvalitativna i kvantitativna analiza rezultata odrađena je na temelju ciljnih tranzicija masa analita i produkata kolizije (Tablica 7), kao i retencijskih vremena specifičnih za svaki analit (Tablica 8).

Tablica 7. Tranzicije masa specifičnih za pojedine analite (vitamin A i vitamin E) u analizi vitamina A i E u plazmi metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom

Naziv spoja	**Prekursorski ion**	**Rezolucija MS1**	**Produktni ion**	**Rezolucija MS2**	**Dwell**	**FV**	**CE**	**Polarnost**
Vitamin A-retinol (kvantitativno)	269,2	jedinica	81,1	jedinica	100	50	24	pozitivna
Vitamin A-retinol (kvalitativno)	269,2	jedinica	355,3	jedinica	100	50	18	pozitivna
Vitamin E-α-tokoferol (kvantitativno)	431,3	jedinica	165,1	jedinica	200	100	30	pozitivna
Vitamin E-α-tokoferol (kvalitativno)	431,3	jedinica	137,3	jedinica	200	100	50	pozitivna
Vitamin E-D_6 (interni standard)	437,3	jedinica	171,1	jedinica	200	100	30	pozitivna

Tablica 8. Očekivana retencijska vremena za pojedine analite u analizi vitamina A i E u plazmi metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom

Naziv spoja	**Retencijsko vrijeme (min)**
Vitamin A (retinol)	1,948
Vitamin E (α- tokoferol)	4,310
Vitamin E- D_6	4,279

Statističke metode

Statistička obrada provedena je korištenjem statističkih programskih paketa STATISTICA v.14 (Cloud Software Group Inc., FL, USA) te MedCalc v.23 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium[1]; 2026).

Potrebna veličina uzorka (minimalno 20 po skupini) izračunata je na temelju rezultata istraživanja Yusuffa i sur. (2022). uz očekivanu razliku među skupinama za vitamin D od 3,2 ng/mL uz standardnu devijaciju od 3,4 ng/mL te uz statističku snagu od 80 % te alfa = 0,05 (22).

Kategorijske varijable prikazane su kao učestalost te udio (%), a kontinuirane kao medijan (M) i interkvartilni raspon (IQR). Za usporedbu među skupinama varijable će se usporediti korištenjem hi-kvadrat ili Fisher egzakt testa za kategorijske varijable, odnosno korištenjem Mann-Whitney U-testa ili Kruskal-Wallis ANOVA ovisno o skupina. Povezanost između varijabli utvrđena je korištenjem Spearmanovog koeficijenta korelacije. Provedena je logistička regresijska analiza (multivarijatna) kako bi se utvrdila povezanost razvoja remisije astme s razinom vitamina D, A i E, te razinom biomarkera te ROC analiza uz prikaz površine ispod krivulje (AUC), osjetljivosti, specifičnosti, pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti uz 95 %-tne intervale pouzdanosti (95 % CI) za navedene ispitivane nezavisne varijable ili njihove kombinacije. Rezultat logističke regresije za remisiju astme prikazan je forest plotom. Kao statistički značajna vrijednost korišten je $p < 0,05$ za sve korištene testove uz odgovarajuću korekciju za višestruke usporedbe kada je to potrebno.

[1] https://www.medcalc.org

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike ispitivanih skupina

U istraživanje je uključeno 134 ispitanika (adolescenta) prosječne dobi 13,6 godina iz tri skupine (zdrave kontrole, N=26; ispitanici čija je astma u remisiji, N=58; ispitanici s aktivnom astmom, N=50).

Tablica 9. Demografske i anamnestičke karakteristike te komorbiditeti po skupinama (N=134)

Varijable		Zdravi (N=26)	Remisija (N=58)	Aktivna astma (N=50)	P-vrijednost
Dob (godine)		13,6	14,15	13	0,1658 #
		11,3-16,0	11,4-16,0	11,1-14,4	
Spol	M	12 (46,2%)	44 (75,9%)	28 (56,0%)	0,0158 §
	Ž	14 (53,8%)	14 (24,1%)	22 (44,0%)	
Tjelesna masa (kg)		54	53,15	55,28	0,7897 #
		43,50-66,00	45,00-69,70	44,00-72,90	
Tjelesna visina (cm)		163,9	166,6	162,45	0,7933 #
		154,00-172,00	151,00-175,00	152,10-172,30	
BMI (kgm^{-2})		19,26	20,51	21,24	0,2255 #
		17,08-23,03	18,34-23,00	18,22-24,78	
Pretilost		3 (11,5%)	9 (15,5%)	12 (24,0%)	0,3320 §
Izloženost duhanskom dimu		15 (57,7%)	26 (44,8%)	24 (48,0%)	0,5494 §
Život u gradu		14 (53,8%)	35 (60,3%)	28 (56,0%)	0,8270 §
Pozitivna obiteljska anamneza		0 (0%)	37 (63,8%)	32 (64,0%)	<0,0001 §
Zdrava prehrana		5 (19,2%)	16 (27,6%)	19 (38,0%)	0,2093 §
Sport		18 (69,2%)	43 (74,1%)	32 (64,0%)	0,5220 §
Izlaganje suncu		11 (42,3%)	23 (39,7%)	9 (18,0%)	0,0257 §
Kućni ljubimci		16 (61,5%)	35 (60,3%)	22 (44,0%)	0,1702 §
Atopijski dermatitis		0 (0%)	12 (20,7%)	7 (14,0%)	0,0425 §
Alergijski rinitis		0 (0%)	48 (82,8%)	40 (80,0%)	<0,0001 §
+SPT na inhalacijske alergene		1 (3,8%)	55 (94,8%)	43 (86,0%)	<0,0001 §
GERB		7 (26,9%)	2 (3,4%)	12 (24,0%)	0,0029 §
OSA		0 (0%)	3 (5,2%)	3 (6,0%)	0,4595 §

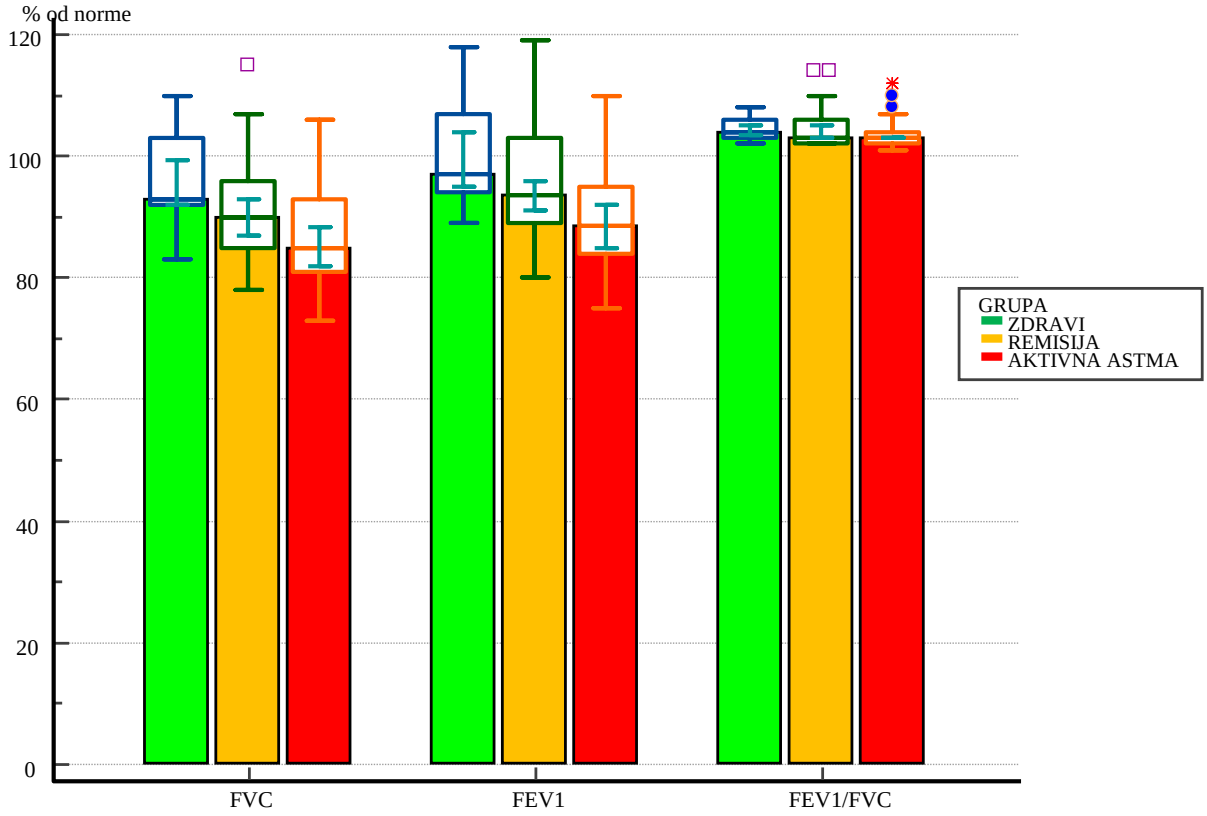
Podaci su prikazani kao: medijan i 25.-75. percentila ili kao broj i udio; # p-vrijednost je rezultat Kruskal-Wallis testa; § p-vrijednost je rezultat hi-kvadrat testa;
BMI – indeks tjelesne mase, SPT – skin-prick test, GERB – gastroezofagealna refluksna bolest, OSA – opstruktivna apneja u snu.

Skupine su bile podjednake obzirom na demografske karakteristike što je vidljivo iz Tablice 9. Nije utvrđena statistički značajna razlika među skupinama za raspodjelu prema dobi (p=0,1658), tjelesnoj masi (p=0,7897), tjelesnoj visini (p=0,7933), BMI-ju (p=0,2255), učestalosti pretilosti (p=0,3320), izloženosti duhanskom dimu (p=0,5494), životu u gradu/selu (p=0,8270), tipu prehrane (zdrava/nezdrava) (p=0,2093), učešću u sportskim aktivnostima (p=0,5220), izloženosti kućnim ljubimcima (p=0,1702) te simptomima opstruktivne „sleep" apneje, skraćeno OSA-e (p=0,4595) (Kruskal-Wallis test ili hi-kvadrat test među skupinama).
Skupine su se značajno razlikovale za raspodjelu prema spolu uz najviše dječaka u skupini u remisiji (75,9%), a najmanje u skupini zdravih (46,2%; p=0,0158, hi-kvadrat test), prema učestalosti pozitivne obiteljske anamneze (zdravi 0%, remisija 63,8%, aktivna astma 64%; p<0,0001, hi-kvadrat test), učestalosti atopijskog dermatitisa (p=0,0425, hi-kvadrat test), alergijskog rinitisa (p<0,0001, hi-kvadrat test) te pozitivnog SPT na inhalacijske alergene (p<0,0001, hi-kvadrat test) gdje su alergijski komorbiditeti bili podjednake učestalosti u obje skupine s astmom, a praktički nisu bili prisutni u skupini zdravih ispitanika.
Utvrđena je i značajna razlike vezana uz učestalost GERB-a koji je bio podjednake učestalosti u zdravih i ispitanika s aktivnom astmom (26,9% i 24%), a niske učestalosti u skupini koja je bila u remisiji astme (3,4%; p=0,0029, hi-kvadrat test).
Očekivano plućna funkcija se statistički značajno razlikovala među skupinama (Tablica 10.) te Slika 4. Spirometrijski parametri bili su najviši u skupini zdravih ispitanika, a najniži u skupini ispitanika s aktivnom astmom (p=0,0001; p<0,0001; p=0,0101; Kruskal-Wallis test), iako razlike nisu bile klinički bitno različite (posebice za parametar FEV1/FVC koji je glavni marker opstruktivnih smetnji ventilacije).
Učestalost pozitivnog bronhodilatacijskog testa je bila veća od 0 samo u skupini s aktivnom astmom (16,0%; p=0,0008, hi-kvadrat test), usporedivo s pozitivnim metakolinskim testom (19,1%; p<0,0001, hi-kvadrat test).

Tablica 10. Plućna funkcija po skupinama (N=134)

	Zdravi (N=26)	Remisija (N=58)	Aktivna astma (N=50)	P-vrijednost
FVC%	93,00[a]	90	85,00[a]	0,0001 [#]
	92,00-103,00	85,00-96,00	81,00-93,00	
FEV1%	97,00[a]	93,5	88,50[a]	<0,0001 [#]
	94,00-107,00	89,00-103,00	84,00-95,00	
FEV1/FVC	104,00[a]	103	103,00[a]	0,0101 [#]
	103,00-106,00	102,00-106,00	102,00-104,00	
+ bronhodil. test	0 (0%)	0 (0%)	8 (16,0%)	0,0008 [§]
+ metakol. test	NP	0 (0%)	21 (19,1%)	<0,0001 [§]

Podaci su prikazani kao: medijan i 25.-75. percentila ili kao broj i udio; [#] p-vrijednost je rezultat Kruskal-Wallis testa; [§] p-vrijednost je rezultat hi-kvadrat testa; [a,b] grupe označene istim slovom značajno se razlikuju u *post-hoc* testu prema Dunnu. FVC% – forsirani vitalni kapacitet kao postotak od norme, FEV1% – forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi kao postotak od norme.



Slika 4. Plućna funkcija po skupinama (N=134); FVC – forsirani vitalni kapacitet kao postotak od norme, FEV1 – forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi kao postotak od norme.

Tablica 11. Karakteristike astme u skupinama astmatičara (N=108)

Varijable	Remisija (N=58)	Aktivna astma (N=50)	P-vrijednost
Fenotip astme			
Alergijska	55 (94,8%)	43 (86,0%)	0,0001
Inducirana naporom	0 (0%)	3 (6,0%)	0,0759
Nealergijska	0 (0%)	1 (2,0%)	0,4290
Nejasno	3 (5,2%)	3 (6,0%)	0,4595
Korištenje lijekova			
Kontinuirano	0 (0%)	42 (84,0%)	<0,0001
Povremeno	0 (0%)	8 (16,0%)	0,0016
Težina astme			
Povremena	0 (0%)	42 (84,0%)	<0,0001
Blaga	0 (0%)	5 (10,0%)	0,0141
Umjerena	0 (0%)	3 (6,0%)	0,0597
Teška	0 (0%)	0 (0%)	0,9999
Težina astme prema broju egzacerbacija u prethodnih godinu dana			
Blaga	0 (0%)	44 (88,0%)	<0,0001
Umjereno teška	0 (0%)	6 (12,0%)	0,0069
Teška	0 (0%)	0 (%)	0,9999

Podaci su prikazani kao: broj i udio (%); § p-vrijednost je rezultat hi-kvadrat testa.

Karakteristike astme su se značajno razlikovale po učestalosti između skupine u remisiji i skupine s aktivnom astmom. Alergijska astma je bila značajno učestalija u skupini u remisiji (94,8% prema 86%; p=0,0001, hi-kvadrat test). Kontinuirano i povremeno korištenje lijekova očekivano je bilo značajno učestalije u skupini s aktivnom astmom (0% prema 84% te 0% prema 16%; p<0,0001 te p=0,0016, hi-kvadrat test). Također je težina astme bila značajno različita (bez obzira na to je li utvrđena na temelju učestalosti simptoma ili na temelju učestalosti egzacerbacija) jer se u ispitanika koji su bili u remisiji nije mogla odrediti, a u ispitanika s aktivnom astmom se kretala od povremene (84%) do umjerene (6%) odnosno umjereno teške (12%) (p<0,05, hi-kvadrat test) (Tablica 11).

4.2. Razine upalnih parametara u ispitivanim skupinama

U Tablici 12 te na Slikama 5 i 6 prikazana je raspodjela upalnih parametara po skupinama (ECP, Eo, FeNO, hsCRP, IFN-γ, IL-13, IL-4, IL-5, TNF-α, uIgE). Nisu utvrđene statistički značajne razlike za ECP (iako je bio viši u skupini s aktivnom astmom; 27 prema 36 µg/L; p=0,185, Kruskal-Wallis test), Eo (p=0,065, Kruskal-Wallis test), hsCRP (p=0,8003, Kruskal-Wallis test) te TNF-α (p=0,5129, Kruskal-Wallis test).

Tablica 12. Upalni parametri po skupinama (N=134)

Varijable	Zdravi (N=26)	Remisija (N=58)	Aktivna astma (N=50)	P-vrijednost
ECP (µg/L)	27,3	27,45	36,4	0,1850
	19,50 do 41,40	12,70 do 48,00	22,40 do 47,30	
Eo x10^9/L	0,24	0,24	0,33	0,0650
	0,12 do 0,31	0,16 do 0,46	0,19 do 0,54	
FeNO (ppb)	7,00[a,b]	13,00[a]	8,50[b]	0,0006
	6,00 do 9,00	8,00 do 21,00	6,00 do 27,00	
hsCRP (mg/L)	0,34	0,34	0,37	0,8003
	0,16 do 1,22	0,15 do 1,50	0,25 do 0,88	
IFN-γ (pg/ml)	0,25[a]	0,25	0,51[a]	0,0001
	0,25 do 0,25	0,25 do 0,25	0,25 do 1,71	
IL-13 (pg/ml)	5,86[a,b]	1,95[a]	1,95[b]	<0,0001
	1,95 do 10,98	1,95 to 1,95	1,95 do 1,95	
IL-4 (pg/ml)	0,75[a]	1,56[a]	0,75	<0,0001
	0,75 do 0,75	0,75 do 1,56	0,75 do 0,75	
IL-5 (pg/ml)	7,99[a,b]	11,30[a]	10,08[b]	<0,0001
	7,46 do 8,70	9,96 to 12,14	9,16 do 11,06	
TNF-α (pg/ml)	1,95	1,95	1,95	0,5129
	1,95 do 1,95	1,95 do 1,95	1,95 do 1,95	
uIgE (kIU/L)	56,50[a,b]	391,50[a]	269,50[b]	<0,0001
	18,60 do112,00	211,00 do947,00	91,90 do 633,00	

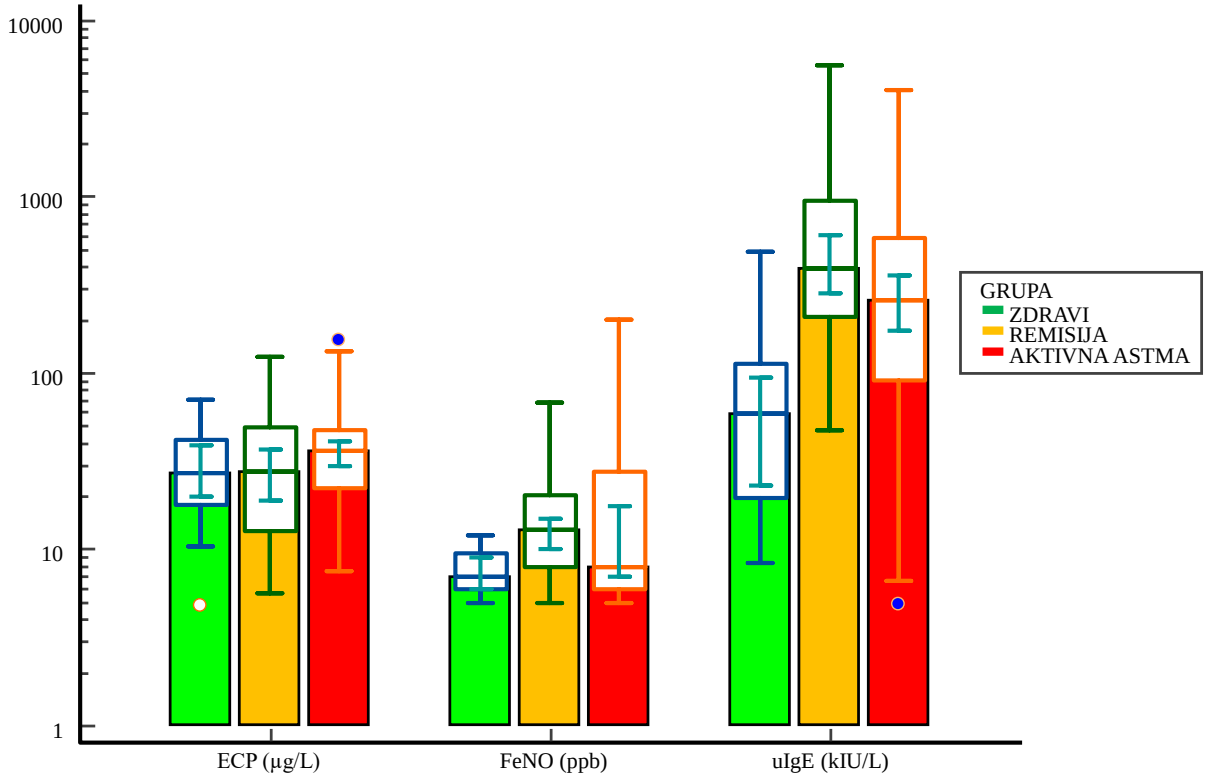
Podaci su prikazani kao: medijan i 25.-75. percentila, p-vrijednost je rezultat Kruskal-Wallis testa; [a,b] grupe označene istim slovom značajno se razlikuju u *post-hoc* testu prema Dunnu.
ECP-eozinofilni kationski protein, Eo-eozinofili, FeNO-frakcionirani izdahnuti dušićni oksid, hsCRP-C-reaktivni protein velike osjetljivosti, IFNγ-interferon-γ, IL-13-interleukin-13, IL-4-interleukin-4, IL-5-interleukin-5, TNFα-faktor tumorske nekroze-α, uIgE-ukupni imunoglobulin E.

Utvrđene su značajno više vrijednosti u skupini s remisijom za FeNO (13 ppb prema 7 odnosno 8,5 ppb; p=0,0006, Kruskal-Wallis test), IL-4 (1,56 pg/ml prema 0,75 odnosno 0,75 pg/ml; p<0,0001, Kruskal-Wallis test), IL-5 (11,30 pg/ml prema 7,99 odnosno 10,08 pg/ml; p<0,0001, Kruskal-Wallis test) te uIgE (391 kIU/L prema 56 odnosno 269 kIU/L; p<0,0001, Kruskal-Wallis test).

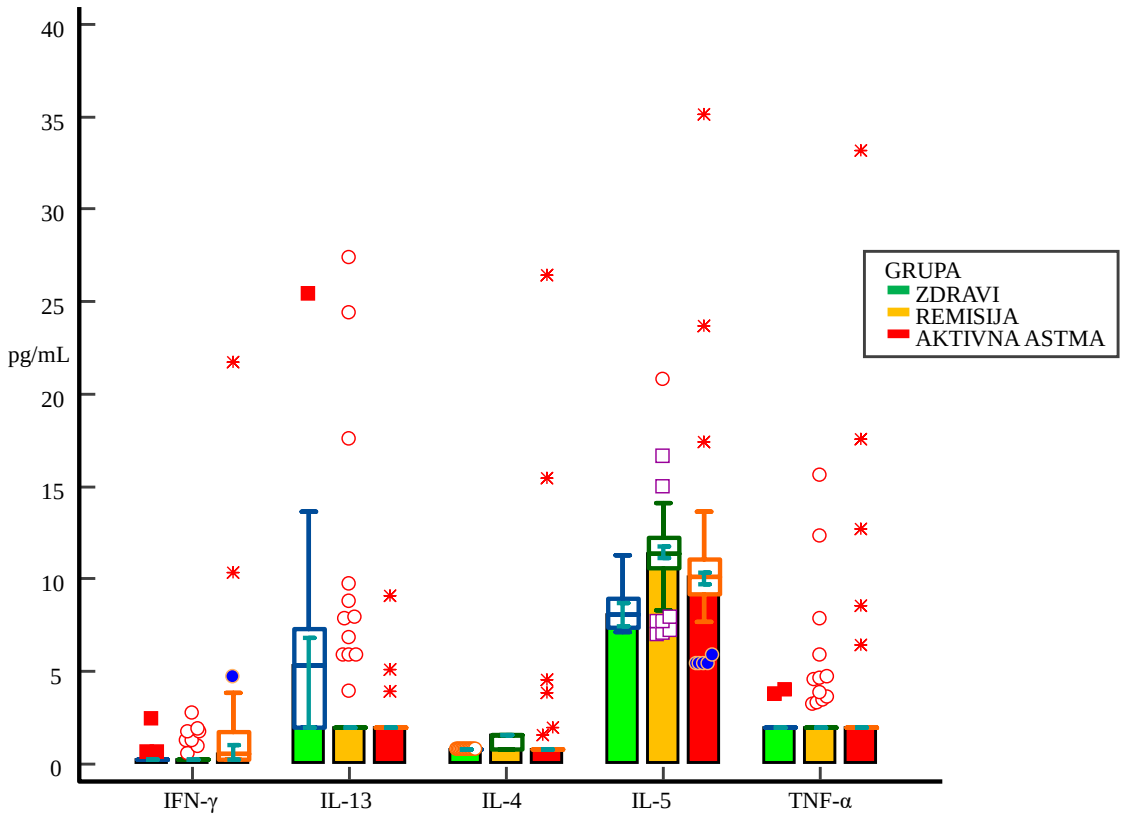
U skupini s aktivnom astmom utvrđene su najviše vrijednosti za IFN-γ (0,51 pg/ml prema 0,25 odnosno 0,25 pg/ml; p=0,0001, Kruskal-Wallis test).

U skupini zdravih utvrđene su najviše vrijednosti za IL-13 (5,86 pg/ml prema 1,95 odnosno 1,95 pg/ml; p<0,0001, Kruskal-Wallis test).

Hipoteza H2 samo je djelomično potvrđena jer su koncentracija upalnih biomarkera bile više kod adolescenata s aktivnom astmom u odnosu na adolescente s remisijom astme, ali samo za vrijednosti ECP-a, Eo u krvi, hsCRP -a i IFN-γ.



Slika 5. Vrijednosti ECP-a, FeNO-a i uIgE po skupinama (N=134)



Slika 6. Vrijednosti upalnih parametara (IFN-γ, IL-13, IL-4, IL-5, TNF-α) po skupinama (N=134)

4.3. Razine vitamina A, D i E u ispitivanim skupinama

U Tablici 13 te na Slici 7 prikazane su prosječne razine vitamina A, D i E u ispitivanih skupina.

Tablica 13. Razine vitamina A, D i E po skupinama

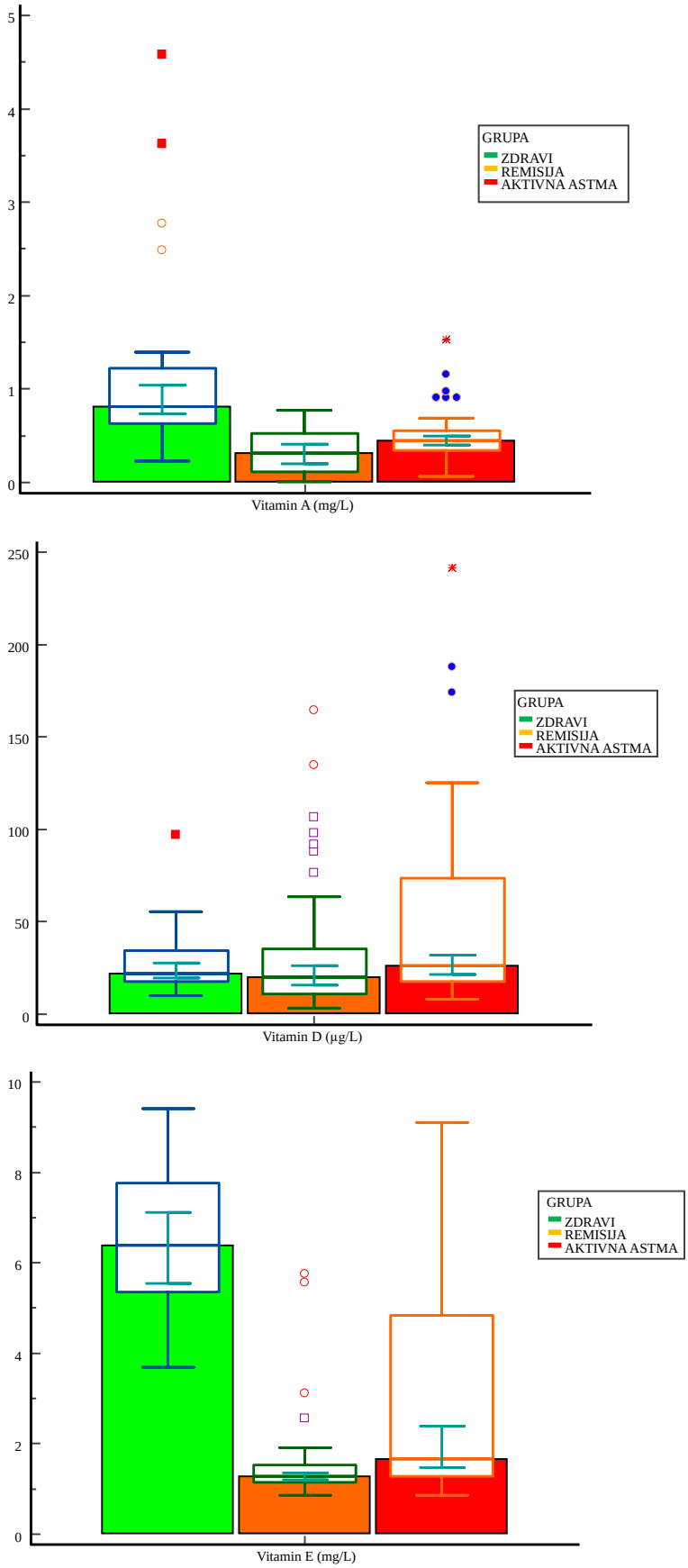
Varijable	Zdravi (N=26)	Remisija (N=58)	Aktivna astma (N=50)	P-vrijednost
Vitamin A (mg/L)	0,81[a,b]	0,32[a]	0,45[b]	<0,0001
	0,63 to 1,22	0,11 to 0,53	0,34 to 0,55	
Vitamin D (µg/L)	22,22	20,16	26,26	0,0829
	17,73 to 34,32	11,05 to 35,37	17,54 to 73,38	
Vitamin E (mg/L)	6,38[a,b]	1,28[a]	1,66[b]	<0,0001
	5,36 to 7,76	1,15 to 1,53	1,29 to 4,84	

Podaci su prikazani kao: medijan i 25.-75. percentila; p-vrijednost je rezultat Kruskal-Wallis testa; [a,b] grupe označene istim slovom značajno se razlikuju u *post-hoc* testu prema Dunnu.

Iz Tablice 13 i Slike 7 je vidljivo da je utvrđena najniža razina svih vitamina (A, D i E) u skupini u remisiji astme s time da je statistički značajna razlika utvrđena za vitamine A i E ($p<0,0001$ za oba vitamina, Kruskal-Wallis test) dok za vitamin D nije utvrđena statistički značajna razlika među skupinama ($p=0,0829$, Kruskal-Wallis test).

Najviša razina vitamina A i E utvrđena je u skupini zdravih (vitamin A, 0,81 mg/L prema 0,32 odnosno 0,45 mg/L; vitamin E, 6,38 mg/L prema 1,28 odnosno 1,66 mg/L).

Hipoteza H1 nije dokazana jer su ispitanici s remisijom astme imali nižu koncentraciju vitamina D, A i E u odnosu na adolescente koji imaju aktivnu astmu iako razlika nije dosegla statističku značajnost.



Slika 7. Razine vitamina A, D i E u serumu po skupinama (N=134)

Tablica 14. Razine vitamina A, D i E po godišnjim dobima (N=134)

		Vitamin A (mg/L)	Vitamin D (µg/L)	Vitamin E (mg/L)
Godišnje doba	N	AS (SD)	AS (SD)	AS (SD)
PROLJEĆE	33	0,508 (0,461)	28,46 (25,15)	2,473 (2,104)
LJETO	42	0,526 (0,421)	41,18 (36,44)	3,485 (2,739)
JESEN	32	0,713 (0,997)	45,97 (55,96)	2,920 (2,515)
ZIMA	27	0,515 (0,384)	31,78 (40,25)	3,532 (2,893)
P-vrijednost		0,9802	0,2710	0,5855

p-vrijednost je rezultat Kruskal-Wallis testa; AS – aritmetička sredina, SD -standardna devijacija.

Iz Tablice 14 je vidljivo da se razine vitamina A, D i E nisu statistički značajno razlikovale bez obzira na godišnje doba kada su uzorkovane (p=0,9802; p=0,2710; p=0,5855; Kruskal-Wallis test).

4.4. Povezanost razina upalnih markera s razinom vitamina A, D i E

Tablica 15. Povezanost upalnih parametara s razinom vitamina A, D i E u svih ispitanika (N=129)

Par varijabli	Važeći	Spearman	t(N-2)	p-vrijednost
Vitamin D i ECP	129	0,008	0,090	0,929
Vitamin D i hsCRP	129	0,126	1,429	0,155
Vitamin D i IL-4	123	-0,059	-0,655	0,514
Vitamin D i IL-5	127	-0,024	-0,263	0,793
Vitamin D i IL-13	127	-0,020	-0,223	0,824
Vitamin D i TNF-α	127	-0,091	-1,019	0,310
Vitamin D i IFN-γ	125	0,071	0,791	0,430
Vitamin D i FeNO	129	-0,130	-1,473	0,143
Vitamin A i ECP	126	-0,044	-0,491	0,625
Vitamin A i hsCRP	126	0,080	0,888	0,376
Vitamin A i IL-4	**121**	**-0,290**	**-3,301**	**0,001**
Vitamin A i IL-5	**124**	**-0,348**	**-4,100**	**0,000**
Vitamin A i IL-13	**124**	**0,229**	**2,593**	**0,011**
Vitamin A i TNF-α	124	0,063	0,699	0,486
Vitamin A i IFN-γ	122	-0,001	-0,012	0,990
Vitamin A i FeNO	126	-0,105	-1,178	0,241
Vitamin E i ECP	124	0,024	0,268	0,789
Vitamin E i hsCRP	124	-0,053	-0,586	0,559
Vitamin E i IL-4	**120**	**-0,326**	**-3,741**	**0,000**
Vitamin E i IL-5	**122**	**-0,298**	**-3,415**	**0,001**
Vitamin E i IL-13	122	0,133	1,468	0,145
Vitamin E i TNF-α	122	-0,001	-0,008	0,994
Vitamin E i IFN-γ	120	0,052	0,570	0,570
Vitamin E i FeNO	124	-0,106	-1,179	0,241

Tablica 16. Povezanost upalnih parametara s razinom vitamina A, D i E u ispitanika s remisijom astme (N=54)

Par varijabli	N	Spearman	t(N-2)	p-vrijednost
Vitamin D i ECP	53	-0,052	-0,370	0,713
Vitamin D i hsCRP	53	0,103	0,737	0,464
Vitamin D i IL-4	52	0,113	0,806	0,424
Vitamin D i IL-5	53	0,069	0,497	0,622
Vitamin D i IL-13	53	-0,013	-0,093	0,926
Vitamin D i TNF-α	53	0,004	0,031	0,975
Vitamin D i IFN-γ	**53**	**-0,283**	**-2,108**	**0,040**
Vitamin D i FeNO	53	-0,027	-0,196	0,846
Vitamin A i ECP	54	-0,099	-0,714	0,479
Vitamin A i hsCRP	54	0,169	1,235	0,222
Vitamin A i IL-4	53	-0,040	-0,289	0,774
Vitamin A i IL-5	54	0,065	0,469	0,641
Vitamin A i IL-13	54	0,213	1,571	0,122
Vitamin A i TNF-α	54	0,182	1,333	0,188
Vitamin A i IFN-γ	54	-0,086	-0,622	0,537
Vitamin A i FeNO	54	0,052	0,377	0,708
Vitamin E i ECP	53	0,037	0,262	0,794
Vitamin E i hsCRP	53	-0,035	-0,247	0,806
Vitamin E i IL-4	53	0,129	0,926	0,359
Vitamin E i IL-5	53	0,154	1,116	0,270
Vitamin E i IL-13	53	-0,046	-0,332	0,741
Vitamin E i TNF-α	53	0,093	0,669	0,507
Vitamin E i IFN-γ	53	0,005	0,033	0,974
Vitamin E i FeNO	53	0,078	0,558	0,579

Iz Tablice 15 je vidljivo da je u okviru cijelog uzorka ispitanika utvrđena statistički značajna povezanost razine vitamina A s razinama IL-4, IL-5 i IL-13 (R=-0,29, p=0,001; R=-0,348, p=0,000; R=0,229, p=0,011; Spearmanova rang korelacija) te povezanost razine vitamina E s razinama IL-4 i IL-5 (R=-0,326, p=0,000; R=-0,298, p=0,001; Spearmanova rang korelacija). Navedene povezanosti su bile blage do umjerene biološke razine.

Iz Tablice 16 je vidljivo da je u skupini ispitanika s remisijom utvrđena značajna povezanost samo razine vitamina D s razinom IFNγ (R=-0,283, p=0,040; Spearmanova rang korelacija). Navedena povezanost je bila blage biološke razine.

Hipoteza H3 da je koncentracija biljega upale (ECP, hsCRP i FeNO, IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, IFN-γ) je povezana s koncentracijom vitamina D, A i E je djelomično potvrđena jer je ista

utvrđena za vitamin A i IL-4, IL-5 i IL-13 te za vitamin E i IL-4 i IL-5 u cjelokupnom uzorku ispitanika te za vitamin D i IFN-γ u skupini ispitanika s remisijom astme.

4.5. Nezavisni prediktori za remisiju astme

Tablica 17. Logistička regresijska analiza za remisiju astme

Ukupna podudarnost modela

Nulti model -2 Log vjerodostojnost	122,829
Puni model -2 Log vjerodostojnost	38,706
Hi-kvadrat	84,123
Stupnjeva slobode (DF)	25
Razina značajnosti	P < 0,0001
Cox & Snell R^2	0,6114
Nagelkerke R^2	0,8169

Koeficijenti i standardne pogreške (SE, eng. *Standard Error*)

Varijable	Koeficijent	SE	Wald	P-vrijednost
ECP (µg/L)	0,0044	0,033508	0,01688	0,8966
Eo	1,8818	3,47142	0,2938	0,5878
FeNO (ppb)	-0,0183	0,0281	0,4249	0,5145
GERB=1	**-5,3377**	**2,38449**	**5,011**	**0,0252**
hsCRP (mg/L)	1,1155	0,65798	2,8741	0,09
IFN-γ (pg/mL)	**-2,4132**	**1,0497**	**5,2851**	**0,0215**
IL-13 (pg/mL)	0,1999	0,21775	0,8427	0,3586
IL-4 (pg/mL)	**0,8959**	**0,42783**	**4,3856**	**0,0362**
IL-5 (pg/mL)	0,0749	0,19486	0,1477	0,7008
Sunce=1	-1,2565	1,3794	0,8297	0,3624
TNF-α (pg/mL)	0,6377	0,36101	3,1198	0,0773
uIgE (kIU/L)	0,0002	0,0010202	0,04033	0,8408
Vitamin A (mg/L)	**-9,9918**	**4,57229**	**4,7755**	**0,0289**
Vitamin D (µg/L)	**-0,0400**	**0,018705**	**4,5844**	**0,0323**
Vitamin E (mg/L)	-0,4782	0,41041	1,3574	0,244
Izloženost duhanskom dimu=1	-1,2838	1,30917	0,9616	0,3268
Dob (godine)	0,5510	0,30537	3,2561	0,0712
Spol=2	-1,9699	1,47928	1,7733	0,183
Sport=0	-1,1776	1,69192	0,4844	0,4864
Grad/selo=0	-0,7952	1,42784	0,3102	0,5776
Postavljena dijagnoza astme (godine)	**-2,6241**	**1,02788**	**6,5174**	**0,0107**
Prehrana=1	0,5622	1,51312	0,138	0,7103
Pretilost=1	0,5492	1,94842	0,07945	0,778
Prvi simptomi (godine)	1,2646	0,7232	3,0578	0,0803
SPT na inhalacijske alergene=0	-0,9037	2,62652	0,1184	0,7308
Konstanta	10,0922	6,25661	2,602	0,1067

Tablica 17. – nastavak

Klasifikacijska tablica

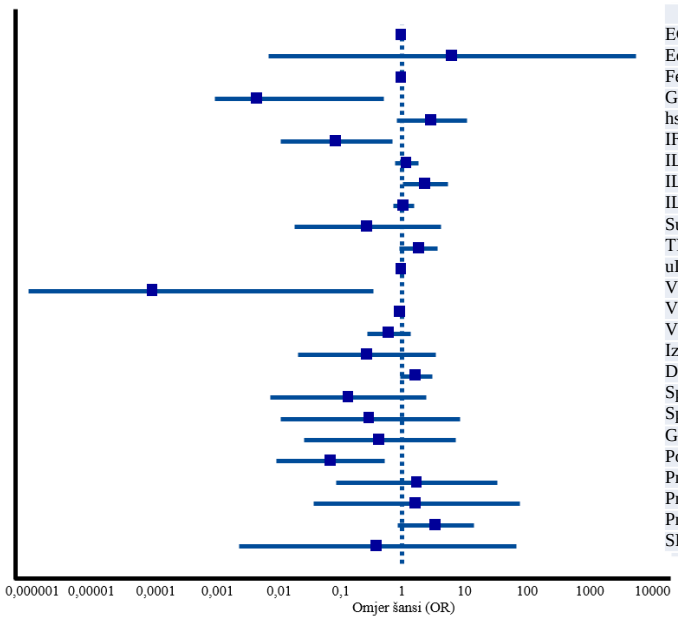
Aktualna grupa	Predviđena grupa		Postotak ispravnih
	Aktivna astma	Remisija	
Aktivna astma	37	4	90,24%
Remisija	3	45	93,75%
Postotak ispravno klasificiranih			92,13%

Analiza ROC krivulje

Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,971
Standardna pogreška (SE)	0,0152
95%-tni interval pouzdanosti (CI)	0,911 - 0,995

U Tablici 17 te na Slici 8 (*forest-plot*) prikazani su rezultati multivarijatne logističke regresijske analize koja je utvrdila da su kao statistički značajni nezavisni prediktori za remisiju astme izlučeni GERB, razine IFN-γ, IL-4, vitamina A i D te dob kad je postavljena dijagnoza astme. GERB, razine IFN-γ, vitamina A i D i dob postavljene dijagnoze astme negativno su povezani s remisijom dok je razina IL-4 pozitivno povezana s remisijom (koeficijent Tablica 17 te OR Slika 8).

Prediktivna vrijednost modela vidljiva je iz površine ispod ROC krivulje (AUC) koja iznosi 0,971 (95%-tni CI, 0,911-0,995). Model ispravno predviđa klasifikaciju 92,13% ispitanika u skupine s remisijom odnosno s aktivnom astmom.



Varijabla	OR	95% CI
ECP (µg/L)	1,004	0,941 - 1,073
Eo	6,565	0,007 - 5918
FeNO (ppb)	0,982	0,929 - 1,037
GER=1	0,005	0,0001 - 0,515
hsCRP (mg/L)	3,051	0,840 - 11,079
IFNγ (pg/mL)	0,089	0,011 - 0,700
IL-13 (pg/mL)	1,221	0,797 - 1,871
IL-4 (pg/mL)	2,449	1,059 - 5,666
IL-5 (pg/mL)	1,078	0,736 - 1,579
Sunce=1	0,285	0,019 - 4,251
TNFα (pg/mL)	1,892	0,933 - 3,839
uIgE (kIU/L)	1,000	0,998 - 1,002
Vitamin A (mg/L)	0,0001	0,00001 - 0,357
Vitamin D (µg/L)	0,961	0,926 - 0,997
Vitamin E (mg/L)	0,620	0,277 - 1,386
Izloženost duhanskom dimu=1	0,277	0,021 - 3,605
Dob (god.)	1,735	0,955 - 3,157
Spol=2	0,139	0,008 - 2,533
Sport=0	0,308	0,011 - 8,487
Grad/selo=0	0,452	0,028 - 7,414
Postavljena dg. astme (god.)	0,072	0,010 - 0,544
Prehrana=1	1,754	0,090 - 34,051
Pretilost=1	1,732	0,038 - 78,894
Prvi simptomi (god.)	3,542	0,858 - 14,616
SPT na inhalacijske alergene=0	0,405	0,002 - 69,708

Slika 8. Prikaz *Forest plot* omjera šansi (OR) i 95%-tnih intervala pouzdanosti (CI) za logističku regresijsku analizu za remisiju astme

Hipoteza H3 je djelomično potvrđena rezultatima logističke regresije za remisiju astme gdje su kao nezavisni prediktivni čimbenici za remisiju astme utvrđene razine vitamina A i D te IFN-γ i IL-4.

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje nastojalo je razjasniti ulogu i povezanost vitamina A, D i E kao i upalnih biomarkera (hsCRP, ECP, FeNO, IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ, TNF-α,) kod adolescenata s prirodnom remisijom astme i onih s aktivnom astmom kao i procjenu rizika za pogoršanje astme ili razvoj remisije te praćenje kontrole bolesti.

Prirodna remisija astme je spontano, neliječeno stanje u kojem je bolesnik barem 12 mjeseci ili dulje bio bez simptoma astme, pogoršanja astme ili pada plućne funkcije. Remisija astme nije trajno izlječenje, jer nerijetko bolesnici imaju zadržanu hiperreaktivnot dišnih putova, te može doći do recidiva kasnije u životu. Zašto neka djeca u adolescentnom periodu razviju prirodnu remisiju bolesti, dok drugi ne, nije do kraja razjašnjeno. Patomehanizam razvoja prirodne remisije astme se intenzivno istražuje.

Prema našim rezultatima skupine bolesnika s aktivnom bolesti, remisijom astme i skupina zdravih su se značajno razlikovale za raspodjelu prema spolu uz najviše dječaka u skupini u remisiji (75,9%), a najmanje u skupini zdravih (46,2%; p=0,0158, hi-kvadrat test). Međutim, prema učestalosti pozitivne obiteljske anamneze (zdravi 0%, remisija 63,8%, aktivna astma 64%; p<0,0001, hi-kvadrat test), učestalosti atopijskog dermatitisa (p=0,0425, hi-kvadrat test), alergijskog rinitisa (p<0,0001, hi-kvadrat test) te pozitivnog SPT na inhalacijske alergene (p<0,0001, hi-kvadrat test) kao i alergijski komorbiditeti bili su podjednake učestalosti u obje skupine s astmom, a praktički nisu bili prisutni u skupini zdravih ispitanika.

Slični rezultati objavljeni su u studiji s 879 bolesnika kojima je od liječnika postavljena dijagnoza astme kod kojih se prirodna remisija razvila u bolesnika kojima je astma dijagnosticirana u djetinjstvu, češće kod muškaraca (do 36,7% u rano dijagnosticiranim slučajevima), dok su žene imale niže stope prirodne remisije i pomak prema većoj prevalenciji, perzistenciji i težini bolesti nakon puberteta (187).

Parametri plućne funkcije također su se očekivano razlikovali među skupinama. Spirometrijski parametri bili su najviši u skupini zdravih ispitanika, a najniži u skupini ispitanika s aktivnom astmom (p=0,0001; p<0,0001; p=0,0101; Kruskal-Wallis test), iako razlike nisu bile klinički bitno različite (posebice za parametar FEV1/FVC koji je glavni marker opstruktivnih smetnji ventilacije).

Učestalost pozitivnog bronhodilatacijskog testa je bila veća od 0 samo u skupini s aktivnom astmom (16,0%; p=0,0008, hi-kvadrat test), usporedivo s pozitivnim metakolinskim testom (19,1%; p<0,0001, hi-kvadrat test).
Naime, remisija astme uz dugotrajnu odsutnost simptoma uključuje i stabilnu plućnu funkciju (kao što je forsirani ekspiracijski volumen ili FEV1, ≥ 80% predviđenog) koja traje 12 mjeseci ili dulje. Stoga je za očekivati da je plućna funkcija (FEV1, FVC, FEV1/FVC) bila bolja u bolesnika u remisiji bolesti, a učestalost pozitivnog brohodilatacijskog testa i metakolinskog testa veća u bolesnika s aktivnom astmom u odnosu na bolesnike u remisiji (122). Poznato je da visoka početna plućna funkcija (FEV1/FVC > 80%) i kraće trajanje bolesti snažno povećavaju šansu za razvoj remisije astme u adolescenata.

Naime, stope remisije astme u djece vrlo su varijabilne, ovisno o proučavanoj populaciji i usvojenoj definiciji remisije. Potpuna remisija astme (definirana kao odsutnost simptoma, odsutnost upotrebe inhalacijskih kortikosteroida, normalna funkcija pluća i odsutnost BHR-a) utvrđena je kod 22% djece s dijagnozom alergijske astme nakon prosječnog praćenja od 30 godina (10).

U naših ispitanika karakteristike astme su se značajno razlikovale po učestalosti između skupine u remisiji i skupine s aktivnom astmom. Alergijska astma je bila značajno učestalija u skupini u remisiji (94,8% prema 86%; p=0,0001, hi-kvadrat test). Kontinuirano i povremeno korištenje lijekova očekivano je bilo značajno učestalije u skupini s aktivnom astmom (0% prema 84% te 0% prema 16%; p<0,0001 te p=0,0016, hi-kvadrat test). Također je težina astme bila značajno različita, a u ispitanika s aktivnom astmom se kretala od povremene (84%) do umjerene (6%) odnosno umjereno teške (12%) (p<0,05, hi-kvadrat test).
Kod adolescenta s alergijskom astmom šansa za spontanu remisiju u pravilu je manja nego kod adolescenta s nealergijskom astmom, ali razlika nije apsolutna i ne može se pouzdano izraziti jednim postotkom za pojedinca.

U longitudinalnim istraživanjima odsutnost alergijske senzibilizacije, blaža astma, bolja plućna funkcija i manja bronhalna hiperreaktivnost bili su povezani s većom vjerojatnošću remisije do rane odrasle dobi, dok su alergijski rinitis, atopijski dermatitis i senzibilizacija na inhalacijske alergene bili povezani s perzistencijom astme (188).

U drugoj prospektivnoj kohorti djece s blagom do umjerenom perzistentnom astmom, senzibilizacija na inhalacijske alergene bila je značajan prediktor ishoda remisije u univarijatnoj analizi, dok su najbolji prediktori bili FEV1/FVC, bronhalna hiperreaktivnost i eozinofilija. Kombinacija uredne plućne funkcije, manje hiperreaktivnosti i nižeg broja eozinofila davala je više od 80% vjerojatnosti remisije u odrasloj dobi u odabranoj skupini. (187).

Iako naši rezultati ukazuju da je alergijski fenotip imao veću učestalost remisije, ne može se nedvojbeno zaključiti da je to dostatna karakteristika koja nosi statistički povoljniju prognozu. Naime, dobro kontrolirana alergijska astma s urednom plućnom funkcijom ima veću vjerojatnost za remisiju. Kod pojedinca su pluća funkcija, bronhalna hiperreaktivnost, upalni biomarkeri i težina bolesti korisniji za prognozu razvoja remisije nego sam alergijski status.

Parametar hsCRP se pokazao korisnim biomarkerom u procjeni različitih stupnjeva težine i kontrole astme. U našem radu, djeca s aktivnom astmom imala su nešto veću koncentraciju serumskog hsCRP-a u odnosu na djecu s remisijom astme, no razlika nije bila statistički značajna.
U studiji Kumar i sur. (2023.) u djece s nekontroliranom astmom uočene su više vrijednosti hsCRP u serumu, u odnosu na djecu s dobro kontroliranom astmom što upućuje na njegovu potencijalnu ulogu kao biomarkera kontrole astme (189).
Navratil i suradnici izvijestili su da je serumski hsCRP bio viši kod nekontroliranih astmatičnih pacijenata nego kod kontroliranih astmatičnih pacijenata (190).

U ovom istraživanju, utvrđena je viša razina ECP i eozinofila u skupini s aktivnom astmom u odnosu na zdrave i one u remisiji, ali nije statistički značajna. Naši rezultati u skladu su sa studijom Shah i sur. (2021.) prema kojoj je uočena povezanost između ECP-a i egzacerbacije astme, ali ne i funkcije pluća ili kontrole astme. Osjetljivost ECP-a bila je umjerena.
Koncentracije ECP-a u plazmi mogu biti koristan marker upale tipa 2 kod djece i mogu pomoći u identificiranju djece s najvećim rizikom od ponovljenih egzacerbacija. Međutim, dodatni markeri mogu biti potrebni kako bi se poboljšala osjetljivost (191).

Prema našem istraživanju utvrđena je značajno viša razina FeNO-a, iako u granicama normale u skupini s remisijom u odnosu na zdrave ispitanike i ispitanike s aktivnom astmom.

Jedan od razloga zašto djeca s aktivnom astmom imaju niže vrijednosti FeNO u odnosu na djecu u remisiji, koja ne uzimaju terapiju IKS, je možda i taj što liječenje IKS-om kod djece s aktivnom astmom potiskuje upalu dišnih putova i smanjuje FeNO.
Prema službenim smjernicama (192) prediktivne vrijednosti pojedinačnog mjerenja FENO-a u svrhu otkrivanja nekontrolirane astme pokazale su nedostatnu osjetljivost i specifičnost da bi se takav podatak koristio u navedenu svrhu što se može vidjeti i iz naših rezultata.

Nedostatak podataka o kontroli astme i pridržavanju liječenja ograničava mogućnost utvrđivanja odražava li povišeni FeNO neadekvatno liječenje, lošiju kontrolu bolesti ili stvarne patofiziološke razlike (3).

U našem istraživanju utvrđena je značajno viša razina IL-4 u skupini ispitanika s remisijom astme u odnosu na druge dvije skupine. Naša studija bila bi u skladu sa studijom Lama i sur. (2011.) koji su ispitali serumske razine IL-4 i IFN-γ kod osamdesetero djece (18 djece koja nisu primala steroide, 30 djece s astmom liječene steroidima i 32 zdrave kontrolne skupine). Serumska razina IL-4 bila je značajno viša u skupini astmatične djece koja nisu primala steroide u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima, a niža u skupini liječenoj steroidima, iako razina nije bila statistički značajna. Nasuprot tome, serumske razine IFN-γ bile su značajno niže i u skupini astmatične djece koja nisu primala steroide i u skupini liječenoj steroidima u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima. Rezultati ove studije ukazuju na to da bi serumska razina IL-4 mogla biti povišena u skladu sa sniženom razinom IFN-γ kod astme. Određivanje serumske razine IL-4 i IFN-γ može biti koristan alat za razumijevanje procesa bolesti kod astme (193).
Rezultati našeg istraživanja mogli bi se protumačiti uzimanjem IKS kod djece koja imaju aktivnu astmu, odnosno neuzimanjem protuupalne terapije kod djece koja imaju dijagnozu astme, ali su trenutno u remisiji.

Daher i sur. (1995.) uspoređivali su razine uIgE, IL-4, ukupnog sCD23 i specifičnog IgE za Dermatophagoides pteronyssinus u serumu 19. astmatične atopijske djece u dobi od 7 do 14 godina i u 13. djece kao kontrolne skupine odgovarajuće dobi. Serumske razine IL-4 bile su značajno više kod pacijenata s astmom u usporedbi s kontrolnom skupinom (133).

U našem istraživanju utvrđena je značajno viša razina IL-5 u skupinama s astmom nego kod zdravih, s tim da je viša kod skupine s remisijom astme nego kod ispitanika s aktivnom astmom što bi također moglo biti uzrokovano neuzimanjem protuupalne terapije.
Prema istraživanju Wassermana i sur. (2012.) postojao je trend povećane proizvodnje IL-5 kod astmatičnih ispitanika u usporedbi s drugim skupinama ispitanika (zdravom skupinom i skupinom s remisijom astme), ali nije dosegao statističku značajnost (136).
Neville i sur. (2014.) došli su do rezultata da djeca u dobi od 10 godina imaju značajno više razine IL-5 (p=0,02) i IL-13 (p=0,05) kod perzistentnih astmatičara u usporedbi s astmatičarima u remisiji. Ova studija donijela je prijeko potrebno razumijevanje spontane remisije astme. U dobi od 10 godina citokini IL-5 i IL-13 značajno su viši u serumu djece koja će imati perzistentnu astmu u usporedbi s onima koja će ući u remisiju. Prema njihovim saznanjima ove razine citokina mogu pomoći u predviđanju koja će astmatična djeca 'prerasti' svoju astmu (12).

U našoj studiji utvrđena je značajno viša razina IL-13 u skupini zdravih ispitanika, dok nema razlike u vrijednostima kod ispitanika u remisiji i onih s aktivnom astmom.
Prema ranije navedenoj studiji vrijednosti IL-13 bila je značajno viša u serumu djece koja će imati perzistentnu astmu u usporedbi s onima koja će ući u remisiju (12).

U našoj studiji utvrđena je značajno viša razina IFN-γ u skupini s aktivnom astmom u odnosu na ispitanike s remisijom i zdravom skupinom.
Naše istraživanje razlikuje se od druge studije gdje nije bilo značajne razlike između astmatičara i kontrolnih ispitanika u smislu proizvodnje IFN-γ, ispitanici s remisijom astme pokazali su značajno smanjenje proizvodnje IFN-γ u usporedbi s bilo kojom drugom skupinom (136).
Međutim, naše istraživanje u skladu je s istraživanjem Geng i sur. (2024.) prema kojem je razina IL-4 i IFN-γ u skupini s aktivnom astmom bila značajno viša od one u kontrolnoj skupini ($p < 0,05$), a razine IL-4 i IFN-γ u skupini kliničke remisije nisu se značajno razlikovale od onih u kontrolnoj skupini ($p > 0,05$), što je također slično izvješćima koja sugeriraju da faktor INF-γ može igrati proupalnu ulogu u dječjoj astmi putem više putova (194).

U našoj studiji nije utvrđena značajna razlika u razini TNF-α među sve tri skupine.
S druge strane prema istraživanju Wassermana i sur. (2012). skupina s aktivnom astmom imala je povišenu razinu TNF-α u usporedbi s kontrolnom skupinom. U usporedbi sa skupinom

ispitanika s remisijom astme, skupina s aktivnom astmom imala je značajno viši TNF-α. Ispitanici s remisijom astme nisu se značajno razlikovali od kontrolne skupine u pogledu proizvodnje TNF-α (136).

U našem istraživanju utvrđena je viša razina vitamina A u skupini zdravih ispitanika u odnosu na ispitanike s astmom što je u skladu s drugim studijama koje pokazuju da je razina vitamina A u serumu kod djece s astmom značajno niža nego kod zdrave djece, te da postoji značajna korelacija između njegove koncentracije i težine astme (168,171,195). Neke druge studije nisu potvrdile značajnu povezanost između unosa vitamina A u djetinjstvu ili razine vitamina A u serumu i osjetljivosti na astmu (196).

Kod naših ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika u razini D vitamina u sve tri skupine te je bila prosječno snižena. El Gazzar i sur. (2016.) proveli su studiju na 30 pacijenata s astmom dijagnosticiranom i klasificiranom prema GINA smjernicama i 20 zdravih osoba. Serumski vitamin D mjeren je ELIS-om. Razina vitamina D bila je značajno niža u astmatičnoj skupini tijekom egzacerbacije u usporedbi s astmatičnom skupinom nakon remisije i kontrolnom skupinom, a ukupna razina IgE bila je značajno viša u astmatičnim skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom (23). U odnosu na našu studiju studija je rađena na odrasloj populaciji, drugom dijagnostičkom metodom i s manjim brojem ispitanika.

Također u drugom istraživanju razine vitamina D izmjerene su u 102 predškolske djece u dobi od 1. do 4. godine života s dijagnozom astme te 102 zdrave djece. Razina vitamina D u serumu bila je 22,64 (9,96) ng/ml u skupini s astmom i 32,11 (14,74) ng/ml u kontrolnoj skupini ($p = 0,001$). Ukupan broj egzacerbacija tijekom prethodne godine bio je značajno niži u skupini s dovoljno vitamina D u usporedbi sa skupinom s nedostatkom vitamina D ($p = 0,03$). Učestalost pacijenata s kontroliranom astmom bila je veća u skupini s dovoljnom količinom vitamina D u usporedbi sa skupinama s nedostatkom vitamina D ($p = 0,001$ i $p = 0,001$). Postojala je pozitivna korelacija između razine vitamina D u serumu i kontrole astme (25).

U istraživanju Freishtat i sur. (2010.) također je prevalencija insuficijencije i manjka vitamina D bila značajno veća među astmatičarima od 6 do 20 godina nego u kontrolnoj skupini (163). Jedna meta-analiza pokazala je da suplementacija vitaminom D ne može smanjiti egzacerbacije astme niti vrijednost FeNO, niti može poboljšati funkciju pluća i simptome astme (197).

Također Forno i sur. (2020.) otkrili su da kod djece s kroničnom astmom i niskim razinama vitamina D liječenje vitaminom D3 nije značajno produžilo vrijeme do teške egzacerbacije astme u usporedbi s placebom. Ishodi ne podržavaju upotrebu terapije vitaminom D za zaustavljanje teških egzacerbacija astme u ovoj populaciji pacijenata (198).
Prema Rosseru i sur. (2022.) liječenje vitaminom D (4000 IU/dan) nije pokazalo značajne učinke na ukupni IgE kod djece s perzistentnom astmom i niskim razinama vitamina D u usporedbi s placebo (199).
Prema sustavnom pregledu i meta-analizi koju su proveli Szymczak i sur. (2018.) trenutni dokazi ne podržavaju rutinsku upotrebu suplementacije vitaminom D kod djece s astmom. Svjetska organizacija za alergije potvrđuje da nedostaju dokazi koji bi potkrijepili tvrdnju da suplementacija vitaminom D može smanjiti vjerojatnost razvoja alergijskih bolesti kod djece (159).

Prema nekim studijama astmatični pacijenti pokazuju niže razine vitamina D nego zdravi ispitanici, neovisno o dobi, a ozbiljniji nedostatak vitamina D korelira s težinom astme, slabijom kontrolom astme i odgovorom na inhalacijske kortikosteroide. Niže razine vitamina D povećavaju broj egzacerbacija bolesti, rizik od razvoja astme i atopije te progresiju bolesti. Istovremeno, astmatični pacijenti s nedostatkom vitamina D imaju veće potrebe za IKS-om (200,201,202,203,204).

U našoj studiji vrijednost vitamina E viša je kod zdravih ispitanika nego kod ispitanika s astmom.
Zanimljivo je da u raznim studijama nije pronađena povezanost između antioksidativnih vitamina i astme (205,206).
Čini se da izoforme vitamina E igraju bitnu ulogu u imunitetu, alergijama i astmi.
Suplementacija s visokim udjelom α tokoferola smanjila je upalne markere i hiperreaktivnost dišnih putova te poboljšala parametre funkcije pluća, poput forsiranog ekspiracijskog volumena u 1 sekundi (FEV1), kod dobro kontroliranih alergijskih astmatičara (207).
Pearson i sur. (2004.) (208) nisu mogli pronaći nikakve prednosti ovog liječenja, uključujući njegov utjecaj na ishode astme ili potrebu za IKS-om, kao ni Rubin i sur. (2004.) (209).
S druge strane, pojedine studije pokazuju da nizak unos vitamina E pogoršava težinu astme kod astmatičara i dodatno smanjuje njihovu plućnu funkciju (210) .

Nisu važne samo razine vitamina ili suplementacije s jednim od njegovih oblika, već su važni i transportni mehanizmi unutar tijela. Čini se da su proteini za transport tokoferola ključni za ispravan razvoj imunološkog odgovora na alergene.

Zaključno možemo reći da su mnoge studije također izvijestile o smanjenim razinama vitamina D među zdravom djecom diljem svijeta, sa suprotnim rezultatima u vezi s potrebom za suplementacijom vitaminom D (211,212,213). Nedavni sustavni pregledi i meta-analize otkrili su varijabilne povezanosti između statusa vitamina D i upalnih biomarkera, uključujući IgE, eozinofile i FeNO (214).

Prema našoj studiji nije bilo sezonske razlike u razini vitamina A, D I E budući da su uzorci prikupljani tijekom cijele godine bez stroge sezonske kontrole. Ipak su razine D vitamina bile niže zimi i u proljeće, a više ljeti i na jesen, što odražava geografski položaj mjesta istraživanja.

Novost ove studije je uključivanje zajedničke procjene vitamina D, A i E i upalnih biomarkera (citokina, FeNO, ECP, hsCRP-a) u adolescentnoj populaciji pružajući dodata saznanja o patomehanizmu razvoja astme odnosno pojavi remisije. Međutim, uspoređujući adolescente s aktivnom astmom i one u remisiji astme, moramo napomenuti da ispitanici s remisijom astme imaju i dalje dijagnozu astme, ali nisu na protuupalnoj terapiji, što zahtijeva oprezno tumačenje rezultata.
Vjerujemo da će rezultati našeg istraživanja kao i buduća istraživanja iz istog područja, imati ulogu u budućim smjernicama kontrole i liječenja dječje astme.

Ograničenja studije

Ova studija ima pojedina ograničenja koja su mogla utjecati na ishode rezultata. Postojala je raznolikost u dijagnostičkim kriterijima i izboru metoda koje mogu utjecati na referentne vrijednosti pojedinih parametara. Ograničena je veličina uzoraka po pojedinim skupinama koja nije mogla dati statistički značajne rezultate. Dob djece bila je ciljano ograničena na adolescente. Uzorci su prikupljeni iz jedne etničke populacije i istog životnog podneblja sa sličnim načinom života, prehrane i boravka na otvorenom. Uzimanje protuupalne terapije kod djece s aktivnom astmom može utjecati na rezultate upalnih biomarkera, za razliku od skupine djece u remisiji koji nisu bili na terapiji.

Kako znamo da je astma multifaktorski uzrokovana te da na njezin nastanak, ali i kontrolu utječu okoliš, nasljeđe, ali i epigenetički čimbenici u ovoj studiji je dotaknut samo jedan segment šarolikosti same bolesti. Istraživanje ima i metodološke nedostatke zbog nemogućnosti zaključivanja uzročno-posljedične povezanosti vitamina i upalnih biomarkera sa stupnjem kontrole astme. Naime vitamini i upalni biomarkeri određivani su istovremeno kada i procjena kontrole bolesti te nemamo vremenski odmak od postavljene dijagnoze astme i utvrđivanja vrijednosti upalnih biomarkera koji su možda bili drugačiji kod djece koja su kasnije razvila remisiju. Potrebno je provesti longitudinalna istraživanja, s većim brojem ispitanika iz različitih geografskih područja.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati našeg istraživanja potvrđuju da su vrijednosti pojedinih citokina i vitamina više kod adolescenata s astmom, bilo da se radi o još uvijek aktivnoj astmi ili astmi u remisiji, u odnosu na zdrave adolescente.

Njihova povišena razina kod adolescenata s remisijom astme, ukazuje da čak i u razdoblju odsutnosti kliničkih simptoma bolesti ne prestaje nužno i proces upalnog odgovora značajnog za astmu.

Nalaz povišene razine IL-4 u ispitanika s astmom u remisiji važan je za razumijevanje imunološke podloge remisije. Naime, IL-4 jedan je od ključnih citokina Th2-imunološkog odgovora koji sudjeluje u razvoju alergijske upale pa njegova izraženost u remisiji astme može upućivati na to da se Th2-povezani imunološki mehanizmi ne smiruju s povlačenjem kliničkih simptoma. Stoga remisiju astme treba promatrati kao dinamično stanje u kojem klinička kontrola bolesti može biti prisutna unatoč imunološkim procesima karakterističnim za astmu.

Nije bilo statistički značajnih razlika u vrijednostima vitamina A, E i D između adolescenata s aktivnom astmom i onih s astmom u remisiji, iako je uočena razlika između zdrave djece koja su imala višu razinu A i E vitamina u odnosu na skupine s astmom što bi moglo ukazivati na njihovu ulogu u upalnoj aktivnosti astme.

Značajan je nalaz negativne povezanosti vitamina D i IFN-γ u skupini ispitanika s astmom u remisiji. Vitamin D ima protuupalni učinak pa pomaže u regulaciji upalnih procesa i imunološkog odgovora tijekom remisije astme. Budući da IFN-γ sudjeluje u regulaciji staničnog imuniteta, a kod astme u remisiji postoji i dalje prisutna upalna reakcija dolazi do porasta vrijednosti IFN-γ koji djeluje kao regulator i smiruje upalni odgovor te blokira razvoj Th2 limfocita što bi moglo ukazivati na mogućnost da vitamin D ima ulogu u moduliranju imunološke ravnoteže i tijekom razdoblja kliničke stabilnosti bolesti.

Rezultati pokazuju da remisija astme kod adolescenata nije vezana uz potpuni prestanak bioloških obilježja bolesti. Istodobna prisutnost pojedinih upalnih obilježja, povezanost vitamina s citokinima te povezanost pojedinih biomarkera s vjerojatnošću remisije ukazuju na to da je remisija rezultat složene interakcije imunoloških, upalnih i nutritivnih čimbenika. Pojedini parametri povezani s remisijom ne ponašaju se jednoznačno, što govori u prilog heterogenosti astme i složenosti procesa koji dovode do kliničkog smirivanja bolesti.

Rezultati djelomično podupiru postavljene hipoteze i pokazuju da se pojedini biomarkeri i vitamini mogu povezivati s različitim fazama astme, ali njihova uloga nije jednoznačna. Nalazi stoga ne podupiru jednostavan model prema kojem bi viša ili niža koncentracija pojedinog vitamina ili citokina sama po sebi određivala aktivnost bolesti ili nastanak remisije. Naime, rezultati upućuju na međusobno djelovanje više bioloških čimbenika koje treba promatrati u kontekstu ukupnog imunološkog profila samog djeteta.

Remisiju astme bi trebalo promatrati kao složen i dinamički proces koji se ne definira samo kao odsutnost kliničkih simptoma. Prisutnost pojedinih obilježja Th2 odgovora, promjene drugih imunoloških putova te povezanost statusa vitamina s upalnim biomarkerima ukazuju na mogućnost postojanja subkliničkih bioloških procesa i tijekom remisije. Identifikacija takvih procesa mogla bi biti važna za bolje razumijevanje trajanja remisije, rizika ponovne aktivacije bolesti i individualnih razlika u tijeku astme.

Potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se bolje spoznala uloga vitamina i određenih upalnih biomarkera u razvoju remisije astme kod djece. Buduća longitudinalna istraživanja trebala bi pratiti promjene vitamina i upalnih biomarkera kroz prijelaz iz aktivne astme u remisiju i eventualnu ponovnu aktivaciju astme. Takav pristup mogao bi pomoći u utvrđivanju razlikuju li biomarkeri samo različita klinička stanja ili doista sudjeluju u mehanizmima koji dovode do održavanja remisije. Dugoročno, bolje razumijevanje biološke podloge remisije moglo bi pridonijeti preciznijoj procjeni kontrole bolesti, individualizaciji liječenja i prepoznavanju djece s povećanim rizikom ponovne aktivacije astme.

7. LITERATURA

1. Bisgaard, H.; Szefler, S. Prevalence of asthma-like symptoms in young children. *Pediatr Pulmonol* **42**,723-8 (2007).

2. von Mutius, E. Gene-environment interactions in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 3-11 (2009).

3. Global initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Reference: http:/www.ginaasthma.org/, (2023).

4. Bel, E.H. Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med* **10**, 44-50 (2004).

5. Wenzel, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* **18**, 716-725 (2012).

6. To, T.; Gershon, A.; Wang, C.; Dell, S. & Cicutto, L. Persistence and remission in childhood asthma: a population-based asthma birth cohort study. *Arch Pediatr Adolesc Med* **161**, 1197-1204 (2007).

7. Westerhof, G.A.; Coumou, H.; de Nijs, S.B.; Weersink, E.J. & Bel, E.H. Clinical predictors of remission and persistence of adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 104-109 e103 (2018).

8. Vink, N.M.; Postma, D.S.; Schouten, J.P.; Rosmalen, J.G. & Boezen, H.M. Gender differences in asthma development and remission during transition through puberty: the TRacking Adolescents' Individual Lives Survey (TRAILS) study. *J Allergy Clin Immunol* **126**, 498-504 e491-496 (2010).

9. Van den Toorn, L.M.; Overbeek, S.E.; de Jongste, J.C.; *et al.* Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 2107-2113 (2001).

10. Vonk, J.M.; Postma, D.S.; Boezen, H.M.; *et al.* Childhood factors associated with asthma remission after 30 years follow up. *Thorax* **59**, 925-929 (2004).

11. Mochizuki, H.; Muramatsu, R.; Hagiwara, S.; *et al.* Relationship between bronchial hyperreactivity and asthma remission during adolescence. *Ann Allergy Asthma Immunol* **103**, 201-205 (2009).

12. Neville, D.; Patil, V.; Lau, L.; *et.al.* IL-5 and IL-13 are predictors of asthma remission; results from a birth cohort. *Eur Respir J* **42**, 1106 (2014).

13. Mitra, S.; Paul, S.; Roy, S.; *et al*. Exploring the immune-boosting functions of vitamins and minerals as nutritional food bioactive compounds: a comprehensive review. *Molecules* **27**, 555 (2022).

14. Zajac, D.; Wojciechowski, P. The Role of Vitamins in the Pathogenesis of Asthma. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 8574 (2023).

15. Samaha, H.M.; Elsaid, A.R.; NasrEldin, E. Vitamin D and markers of airway inflammation in asthma. *Egypt J Chest Dis Tuberc* **64**, 779-83 (2015).

16. Brehm, J.M.; Acosta-Pérez E.; Klein L.; *et al.* Vitamin D insufficiency and severe asthma exacerbations in Puerto Rican children. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 140-146 (2012).

17. Kummaraganti, S.; Gaude, G.S. Prevalence of Vitamin D deficiency in patient with acute exacerbation of bronchial asthma: A one-year hospital based cross-sectional study. *Indian J Health Sci BiomedRes* **12**, 132-8 (2019).

18. Pfeffer, P.E. & Hawrylowicz, C.M. Vitamin D in Asthma: Mechanisms of Action and Considerations for Clinical Trials. *Chest* **153**, 1229-1239 (2018).

19. Menon, B.; Nima, G.; Dogra, V.; Mittal, A.; Kaur, C.; Mittal, U. Evaluation of Vitamin D in bronchial asthma and the effect of Vitamin D supplementation on asthma severity and control: A randomised control trial. *Eur Respir J* **44**, 4049 (2014).

20. Tachimoto, H.; Mezawa, H.; Segawa, T.; *et al.* Improved control of childhood asthma with low-dose, short-term vitamin D supplementation: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy* **71**, 1001-1009 (2016).

21. Kaaviyaa, A.T.; Krishna, V.; Arunprasath, T.S. & Ramanan, P.V. Vitamin D Deficiency as a Factor Influencing Asthma Control in Children. *Indian Pediatr* **55**, 969-971 (2018).

22. Yusuff, J.O.; Biliaminu, S.A.; Akande, A.A. Relationship between Serum 25-Hydroxy Vitamin D and Severity of Asthmatic Attack in Children. *West Afr J Med.* **39**, 286-290 (2022).

23. El Gazzar, A.G.; Essawy, T.S.; Awaad, A.H.; *et al.* Evaluation of serum vitamin D and IgE in patients with bronchial asthma. *Egypt J Bronchol* **10,** 113–116 (2016).

24. Gupta, A.; Bush, A.; Hawrylowicz, C. & Saglani, S. Vitamin D and asthma in children. *Paediatr Respir Rev* **13**, 236-243 (2012).

25. Turkeli, A.; Ayaz, O.; Uncu, A.; *et al.* Effects of vitamin D levels on asthma control and severity in pre-school children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **20**, 26-36 (2016).

26. Andrino, D.; Moy, J.; Gaynes, B.I. Serum Vitamin A, zinc and visual function in children with moderate to severe persistent asthma. *J Asthma* **56**, 1198-1203 (2019).

27. Talaei, M.; Hughes D.A.; Mahmoud, O.; *et al.* Dietary intake of vitamin A, lung function and incident asthma in childhood. *Eur Respir J* **58**, 2004407 (2021).

28. Bou Ghanem, E.N.; Clark S.; Du, X.; *et al.* The alpha-tocopherol form of vitamin E reverses age-associated susceptibility to streptococcus pneumoniae lung infection by modulating pulmonary neutrophil recruitment. *J Immunol* **194**, 1090-1099 (2015).

29. Schock, B.C.; Young, I.; Brown V.; *et al.* Antioxidants and oxidative stress in BAL fluid of atopic asthmatic children. *Pediatr Res* **53**, 375-381 (2003).

30. Hernandez, M.L.; Wagner, J.G.; Kala A.; *et al.* Vitamin E, gamma-tocopherol, reduces airway neutrophil recruitment after inhaled endotoxin challenge in rats and in healthy volunteers. *Free Radic Biol Med* **60**, 56-62 (2013).

31. Lavere, P.F.; Phillips, K.M.; Hanania, N.A.; Adrish, M. Established and emerging asthma biomarkers with a focus on biologic trials: a narrative review. *J Pers Med* **15**, 370 (2025).

32. Koh, Y.Y.; Kang, H. & Kim, C.K. Ratio of serum eosinophil cationic protein/blood eosinophil counts in children with asthma: comparison between acute exacerbation and clinical remission. *Allergy Asthma Proc* **24**, 269-274 (2003).

33. Ko, A.R.; Kim, Y.H.; Sol, I.S.; Kim M.J.; *et al*. High-sensitivity C-Reactive Protein Can Reflect Small Airway Obstruction in Childhood Asthma. *Yonsei Med J* **57**, 690-697 (2016).

34. Global burden of disease study 2021 (GBD 2021) Reference: https://ghdx.healthdata.org/gbd-2021

35. Zhou, W.; Tang, J. Prevalence and risk factors for childhood asthma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pediatr* **25**, 50 (2025).

36. Topalušić, I.; Stipić Marković, A.; Artuković, M.; *et al.* Divergent Trends in the Prevalence of Children's Asthma, Rhinitis and Atopic Dermatitis and Environmental Influences in the Urban Setting of Zagreb, Croatia. *Children* **9**, 1788 (2022).

37. Banac, S.; Tomulić, K.L.; Ahel, V.; *et al.* Prevalence of asthma and allergic disease in Croatian children is increasing: survey study. *CMJ* **45**, 721-6 (2004).

38. Munivrana, H.; Vorko A.J.; Munivrana, S.; *et al*. The prevalence of allergic diseases among Croatian school children according to the ISSAAC Phase One questionnaire. *Med Sci Monit* **13**, 505-9 (2007).

39. Willemsen, G.; van Beijsterveldt, T.C.E.M.; van Baal, C.G.C.M.; *et al*. Heritability of self-reported asthma and allergy: a study in adult Dutch twins, siblings and parents. Twin Res Hum Genet **11**, 132–42 (2008).

40. Stikker, B.S.; Hendriks, R.W.; Stadhouders, R. Decoding the genetic and epigenetic basis of asthma. *Allergy* **78**, 940-956 (2023).

41. Tavendale, R.; Macgregor, D.F.; Mukhopadhyay S.; *et al*. A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications. *J Allergy Clin Immunol* **121**, 860–3 (2008).

42. Ferreira, M.A.; Jansen, R.; Willemsen, G.; *et al*. Gene-based analysis of regulatory variants identifies four putative novel asthma risk genes related to nucleotide synthesis and signaling. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 1148-1157 (2017).

43. Qiu, J. Epigenetics: unfinished symphony. Nature **441**, 143–5 (2006).

44. Rakyan, V.K.; Down, T.A.; Balding, D.J.; Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet* **12**, 529-541 (2011).

45. Soliai, M.M.; Kato, A.; Helling, B.A.; *et al*. Multi-omics colocalization with genome-wide association studies reveals a context-specific genetic mechanism at a childhood onset asthma risk locus. *Genome Med* **13**,157 (2021).

46. Gallagher, M.D.; Chen-Plotkin, A.S. The post-GWAS era: from association to function. *Am J Hum Genet* **102**, 717-730 (2018).

47. Stein, R.T.; Holberg, C.J.; Sherrill, D.; *et al*. Influence of parental smoking on respiratory symptoms during the first decade of life: the Tucson Children's Respiratory Study. *Am J Epidemiol* **149**, 1030–7 (1999).

48. Lv, N.; Xiao, L.; Ma, J. Dietary pattern and asthma: a systematic review and meta-analysis. *J Asthma Allergy* **7**, 105–121 (2014).

49. Calatayud-Sáez, F.M.; Calatayud Moscoso Del Prado, B.; Gallego Fernández-Pacheco J.G.; *et al*. Mediterranean diet and childhood asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)* **44**, 99–105 (2016).

50. Rodrigues, M.; de Castro, Mendes, F.; Delgado, L. Diet and Asthma: A Narrative Review. *Appl. Sci* **13**, 6398 (2023).

51. Willers, S.M.; Devereux, G.; Craig, L.C.; *et al*. Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax* **62**, 773–9 (2007).

52. Bergmann, R.L.; Diepgen, T.L.; Kuss, O.; *et al*. Breastfeeding duration is a risk factor for atopic eczema. *Clin Exp Allergy* **32**, 205–9 (2002).

53. Sears, M.R.; Greene, J.M.; Willan, A.R.; *et al*. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet* **360**, 901–7 (2002).

54. Kull, I.; Almqvist, C.; Lilja, G.; *et al*. Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 755–60 (2004).

55. Schaub, B.; Lauener, R.; von Mutius, E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 969–77 (2006).

56. Goldberg, S.; Israeli, E.; Schwartz, S.; *et al*. Asthma prevalence, family size, and birth order. *Chest* **131**, 1747–52 (2007).

57. Zar, H.J.; Cacho, F.; Kootbodien, T.; *et al*. Early-life respiratory syncytial virus disease and long-term respiratory health. *Lancet Respir. Med*. **12**, 810–821 (2024).

58. Melen, E.; Zar, H.J.; Siroux, V.; *et al*. Asthma Inception: Epidemiologic risk factors and natural history across the life course. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **210**, 737–754 (2024).

59. Makrinioti, H.; Hasegawa, K.; Lakoumentas, J.; *et al.* The role of respiratory syncytial virus- and rhinovirus-induced bronchiolitis in recurrent wheeze and asthma: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Allergy Immunol* **33**, 13741 (2022).

60. Gern, J.E.; Brooks, G.D.; Meyer, P.; *et al*. Bidirectional interactions between viral respiratory illnesses and cytokine responses in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 72–8 (2006).

61. Oddy, W.H.; de Klerk, N.H.; Sly, P.D.; *et al.* The effects of respiratory infections, atopy, and breastfeeding on childhood asthma. *Eur Respir J* **19**, 899–905 (2002).

62. Lepretre, F.; Gras, D.; Chanez, P.; Duez, C. Natural killer cells in the lung: Potential role in asthma and virus-induced exacerbation? *Eur Respir Rev* **32**, 230036 (2023).

63. Liu, S.; Lin, Z.; Zhou, J.; *et al*. Distinct Airway Microbiome and Metabolite Profiles in Eosinophilic and Neutrophilic Asthma. *J. Asthma Allergy* **18**, 1003–1022 (2025).

64. García de la Fuente, A.; Arismendi, E.; Pascal, M.; Picado, C. Asthma, Infections and Immunodeficiency. *J. Respir* **5,** 20 (2025).

65. Simpson, A.; Custovic, A. Pets and the development of allergic sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep* **5**, 212–20 (2005).

66. Almqvist, C.; Egmar, A.C.; Hedlin, G.; *et al.* Direct and indirect exposure to pets —risk of sensitization and asthma at 4 years in a birth cohort. *Clin Exp Allergy* **33**, 1190–7 (2003).

67. de Marco, R.; Locatelli, F.; Sunyer, J.; *et al*. Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 68–74 (2000).

68. Nicolai. T.; Illi, S.; Tenborg, J.; *et al.* Puberty and prognosis of asthma and bronchial hyper-reactivity. *Pediatr Allergy Immunol* **12**, 142–8 (2001).

69. Peters, U.; Dixon, A.E.; Forno, E. Obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 1169–1179 (2018).

70. Deng, X.; Ma, J.; Yuan, Y.; *et al*. Association between overweight or obesity and the risk for childhood asthma and wheeze: an updated meta-analysis on 18 articles and 73 252 children. *Pediatr Obes* **14,** e12532 (2019).

71. Han, X.; Krempski, J.W.; Nadeau, K. Advances and novel developments in mechanisms of allergic inflammation. *Allergy* **75**, 3100-3111 (2020).

72. Kuruvilla, M.E.; Lee, F.E.-H.; Lee, G.B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol* **56**, 219–233 (2019).

73. Ford, M.L.; Reza, M.I.; Ruwanpathirana, A.; Sathish, V.; Britt, R.D. Integrative Roles of Pro-Inflammatory Cytokines on Airway Smooth Muscle Structure and Function in Asthma. *Immunol Rev* **330**, e70007 (2025).

74. Liu, M.C.; Hubbard, W.C.; Proud, D.; *et al.* Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am Rev Respir Dis* **144**, 51-8 (1991).

75. Zhu, Z.; Homer, R.J.; Wang, Z.; *et al*. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* **103**, 779-88 (1999).

76. Stewart, A.G.; Tomlinson, P.R.; Fernandes, D.J.; *et al.* Tumor necrosis factor alpha modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**, 110-9 (1995).

77. Brannan, J.D.; Lougheed, M.D. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. *Front Physiol* **3**, 460 (2012).

78. Chapman, D.G.; Irvin, C.G. Mechanisms of Airway Hyperresponsiveness in Asthma: The Past, Present and Yet to Come. *Clin Exp Allergy* **45**, 706-19 (2015).

79. Kudo, M.; Ishigatsubo, Y.; Aoki, I. Pathology of asthma. *Front Microbiol* **4**, 263 (2013).

80. Limb, S.L.; Brown, K.C.; Wood, R.A.; Wise, R.A.; *et al*. Irreversible lung function deficits in young adults with a history of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 1213-9 (2005).

81. Doeing, D.C.; Solway, J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol (1985)* **114**, 834-43 (2013).

82. V Cohn, L.; Elias, J.A.; Chupp, G.L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* **22**, 789–815 (2004).

83. Reza, M.I.; Ambhore, N.S. Inflammation in Asthma: Mechanistic Insights and the Role of Biologics in Therapeutic Frontiers. *Biomedicines* **13**, 1342 (2025).

84. Xie, C.; Yang, J.; Gul, A.; *et al*. Immunologic Aspects of Asthma: From Molecular Mechanisms to Disease Pathophysiology and Clinical Translation. *Front Immunol* **15**, 1478624 (2024).

85. Dahlin, J.S.; Maurer, M.; Metcalfe, D.D. The ingenious mast cell: contemporary insights into mast cell behavior and function. *Allergy* **77**, 83-99 (2022).

86. Katsoulis-Dimitriou, K.; Kotrba, J.; Voss, M.; *et al.* Mast cell functions linking innate sensing to adaptive immunity. *Cells* **9**, 2538 (2020).

87. Boyce, J.A. Mast cells: beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 24–32 (2003).

88. Brightling, C.E.; Bradding, P.; Symon, F.A.; *et al*. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* **346**, 1699–1705 (2002).

89. McBrien, C.N.; Menzies-Gow, A. The biology of eosinophils and their role in asthma. *Front Med* **4**, 93 (2017).

90. Choi, Y.; Le Pham, D.; Lee, D.-H.; Lee, S.-H.; Kim, S.-H.; Park, H.-S. Biological function of eosinophil extracellular traps in patients with severe eosinophilic asthma. *Exp Mol Med* **50**, 1–8 (2018).

91. Williams, T.J. The eosinophil enigma. *J Clin Invest* **113,** 507–9 (2004).

92. Hussain, M.; Liu, G. Eosinophilic Asthma: Pathophysiology and Therapeutic Horizons. *Cells* **13**, 384 (2024).

93. Nair, P.; Surette, M.G.; Virchow, J.C. Neutrophilic asthma: Misconception or misnomer? *Lancet Respir Med* **9**, 441–443 (2021).

94. Mincham, K.T.; Bruno, N.; Singanayagam, A.; Snelgrove, R.J. Our evolving view of neutrophils in defining the pathology of chronic lung disease. *Immunology* **164**, 701–721 (2021).

95. Fahy, J.V.; Kim, K.W.; Liu, J.; Boushey, H.A. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* **95**, 843–52 (1995).

96. Menzies-Gow, A.; Wechsler, M.E.; Brightling, C.E. Unmet need in severe, uncontrolled asthma: Can anti-TSLP therapy with tezepelumab provide a valuable new treatment option? *Respir Res* **21**, 268 (2020).

97. Kuipers, H.; Lambrecht, B.N. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol* **16**, 702–8 (2004).

98. Schuijs, M.J.; Hammad; H., Lambrecht, B.N. Professional and 'Amateur' Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity. *Trends Immunol* **40**, 22–34 (2019).

99. Hasegawa, H.; Matsumoto, T. Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo. *Front Immunol* **9**, 350 (2018).

100. Semitekolou, M.; Morianos, I.; Banos, A.; *et al.* Dendritic cells conditioned by activin A-induced regulatory T cells exhibit enhanced tolerogenic properties and protect against experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 671–684 (2018).

101. Peters-Golden, M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 3–7 (2004).

102. Britt, R.D. Jr.; Ruwanpathirana, A.; Ford, M. L.; & Lewis, B. W. Macrophages orchestrate airway inflammation, remodeling, and resolution in asthma. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 10451 (2023).

103. Franklin, R.A. Fibroblasts and macrophages: Collaborators in tissue homeostasis. *Immunological Reviews* **302**, 86-103 (2021).

104. Etich, M.; Koch, R., Wagener, F.; Zaucke, M.; Fabri, B. Brachvogel. Gene expression profiling of the extracellular matrix signature in macrophages of different activation status: Relevance for skin wound healing. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 5086 (2019).

105. Polito, A.J.; Proud, D. Epithelia cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **102**, 714–8 (1998).

106. Celebi, S.Z.; Ozdel, O.B.; Cerci, P.; *et al*. Epithelial barrier hypothesis: effect of the external exposome on the microbiome and epithelial barriers in allergic disease. *Allergy* **77**, 1418–1449 (2022).

107. Russell, R.J.; Boulet, L-P.; Brightling, C.E.; *et al*. The airway epithelium: an orchestrator of inflammation, a key structural barrier and a therapeutic target in severe asthma. *Eur Respir J* **63**, 2301397 (2024).

108. Kuruvilla, M.E.; Lee, F.E.; Lee, G.B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **56**, 219–233 (2019).

109. Luo, W.; Hu, J.; Xu, X.; Dong, J. Distinct Spatial and Temporal Roles for Th1, Th2, and Th17 Cells in Asthma. *Frontiers in Immunology* **13**, 974066 (2022).

110. Steinke, J.W.; Lawrence, M.G.; Teague, W.G.; *et al*. Bronchoalveolar Lavage Cytokine Patterns in Children With Severe Neutrophilic and Paucigranulocytic Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **147**, 686–693 (2021).

111. Wechsler, M.E.; Scelo, G.; Larenas-Linnemann, D.E.S., *et al*. Association Between T2-Related Comorbidities and Effectiveness of Biologics in Severe Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **209**, 262–272 (2024).

112. Habib, N.; Asghar Pasha, M.; Tang, D.D. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells* **11**, 2764 (2022).

113. Heinzerling, L.; Mari, A.; Bergmann, K.C.; *et al*. The skin prick test – European standards. *Clin Transl Allergy* **3**, 3 (2013).

114. Lo, D.K.; Beardsmore, C.S.; Roland, D.; *et al.* Lung function and asthma control in school-age children managed in UK primary care: a cohort study. *Thorax* **75,** 101–107 (2020).

115. Hallstrand, T.S.; Leuppi, J.D.; Joos, G.; *et al*. ERS technical standard on bronchial challenge testing: pathophysiology and methodology of indirect airway challenge testing. *Eur Respir J* **52**, 1801033 (2018).

116. Woo, S.; Lee, J.; Kim, H.; *et al.* Utility of fractional exhaled nitric oxide (F_ENO) measurements in diagnosing asthma. *Respir Med* **106**, 1103–1109 (2012).

117. Morgan, W.J.; Stern, D.A.; Sherrill, D.L. *et al*. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 1253–1258 (2005).

118. Schatz, M.; Rosenwasser, L. The Allergic Asthma Phenotype. *J Allergy Clin Immunol Pract* **2**, 645–8 (2014).

119. Harb, H.; Raedler, D.; Ballenberger, N.; Bock, A.; Kesper, D.A.; Renz, H.; Schaub, B. Childhood allergic asthma is associated with increased IL-13 and FOXP3 histone acetylation. *J Allergy Clin Immunol* **136**, 200–202 (2015).

120. van den Toorn, L.M.; Overbeek, S.E.; Prins, J.B.; Hoogsteden, H.C.; de Jongste, J.C. Asthma remission: does it exist? *Curr Opin Pulm Med* **9**, 15–20 (2003).

121. Menzies-Gow, A.; Bafadhel, M.; Busse, W.W.; *et al*. An expert consensus framework for asthma remission as a treatment goal. *J Allergy Clin Immunol* **145**, 757–765 (2020).

122. Thomas, D.; McDonald, V.M.; Pavord, I.D.; Gibson, P.G. Asthma remission: what is it and how can it be achieved? *Eur Respir J* **60**, 2102583 (2022).

123. Blaiss, M.; Oppenheimer, J.; Corbett, M.; *et al.* Consensus of an American college of allergy, asthma, and immunology, American academy of allergy. Asthma Immunol. and American Thoracic Society workgroup on definition of clinical remission in asthma on treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* **131**, 782–785 (2023).

124. Bondi, B.; Bagnasco, D.; Braido, F. Modifying the course of asthma: mechanisms and strategies for clinical remission. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **26**, 52-58 (2026).

125. Cojocaru, E.; Arcana, R.I.; Radu, S.; Trofor, A.C.; Cojocaru, C. Challenges and Opportunities in Achieving Asthma Remission. *J Clin Med* **14**, 2835 (2025).

126. Burgess, J.A.; Matheson, M.C.; Gurrin, L.C.; Byrnes, G.B.; Adams, K.S.; Wharton, C.L.; *et al.* Factors influencing asthma remission: a longitudinal study from childhood to middle age. *Thorax* **66**, 508–13 (2011).

127. Andersson, M.; Hedelman, L.; Bjerg, A.; *et al.* Remission and persistence of asthma followed from 7 to 19 years of age. *Pediatrics* **132**, 435–42 (2013).

128. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource; Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, (2016).

129. Lavere, P.F.; Phillips, K.M.; Hanania, N.A.; Adrish, M. Established and Emerging Asthma Biomarkers with a Focus on Biologic Trials: A Narrative Review. *J Pers Med* **15**, 370-394 (2025).

130. Coffman, R.L.; Ohara, J.; Bond, M.W.; Carty, J.; Zlotnik, A.; Paul, W.E. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* **136**, 4538–4541 (1986).

131. Pawankar, R.; Okuda, M.; Yssel, H.; Okumura, K.; Ra, C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest* **99**, 1492–1499 (1997).

132. Dabbagh, K.; Takeyama, K.; Lee, H.M.; Ueki, I.F.; Lausier, J.A.; Nadel, J.A. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* **162**, 6233–6237 (1999).

133. Daher, S.; Santos, L.M.; Sole, D.; De Lima, M.G.; Naspitz, C.K.; Musatti, C.C. Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children. *J Invest Allergol Clin Immunol* **5**, 251–254 (1995).

134. Weltman, J.K.; Karim, A.S. IL -5: biology and potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 491-496 (2000).

135. Mahanty, S.; Nutman, T.B . The biology of interleukin-5 and its receptor. *Cancer Invest* **11**, 624-634 (1993).

136. Wasserman, S.; Nair, P.; Snider, D.; et al. Local and systemic immunological parameters associated with remission of asthma symptoms in children. *Allergy Asthma Clin Immunol* **8**, 16 (2012).

137. Wynn, T.A. IL-13 Effector functions. Annu Rev Immunol **21**, 425–56 (2003).

138. Wen, T.; Besse, J.A.; Mingler, M.K.; Fulkerson, P.C.; Rothenberg, M.E. Eosinophil adoptive transfer system to directly evaluate pulmonary eosinophil trafficking in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 6067–72 (2013).

139. Cai, F.; Hornauer, H.; Peng, K.; Schofield, C.A.; Scheerens, H.; Morimoto, A.M. Bioanalytical challenges and improved detection of circulating levels of IL-13. *Bioanalysis* **8**, 323–32 (2016).

140. Du, J.; Wu, H.; Wu, Y. MiR-98-5p may be a Biomarker for Screening Bronchial Asthma in Children by Targeting IL-13. *Clin Lab* **65**, 3 (2019).

141. Busse, W.W.; Wechsler, M.E. Targeting asthma remission as the next step. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract* **12**, 1587–1596 (2024).

142. McDowell, P.J.; Heaney, L.G.; Bradley, J.M.; Donnelly, S.C.; Ennis, M.; *et al*. Clinical remission in severe asthma with biologic therapy: UK Severe Asthma Registry. *Eur. Respir. J* **62**, 2300819 (2023).

143. Thomas, P.S. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma**.** *Immunol Cell Biol* **79**, 132-140 (2001).

144. Koh, Y.Y.; Kang, H.; Nah, K.M.; Kim, C.K. Absence of association of peripheral blood eosinophilia or increased eosinophil cationic protein with bronchial hyperresponsiveness during asthma remission. *Ann Allergy Asthma Immunol* **91**, 297-302 (2003).

145. Gundel, R.H.; Letts, L.G.; Gleich, G.J. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. *J Clin Invest* **87**, 1470-1471 (1991).

146. Wolthers, O.D.; Heuck C. Impact of age and administration regimens on the suppressive effect of inhaled glucocorticoids on eosinophil markers in children with asthma. *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology* **17**, 45-51 (2004).

147. Bartoli, M.L.; Bacci, E.; Carnevali, S.; *et al.* Clinical assessment of asthma severity partially corresponds to sputum eosinophilic airway inflammation. *Respir Med* **98**, 184-193 (2004).

148. Rifai, N.; Tracy, R.P.; Ridker, P.M. Clinical efficacy of an automated highsensitivity C-reactive protein assay. Clin Chem **45**, 2136–2141 (1999).

149. Gabay, C.; Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* **340**, 448–454 (1999).

150. Deraz, T.E.; Kamel, T.B.; El-Kerdany, T.A.; El-Ghazoly, H.M. High-sensitivity C reactive protein as a biomarker for grading of childhood asthma in relation to clinical classification, induced sputum cellularity, and spirometry. *Pediatr Pulmonol* **47**, 220–225 (2012).

151. Olafsdottir, I.S.; Gislason, T.; Thjodleifsson, B.; Olafsson, I.; Gislason, D.; *et al*. C reactive protein levels are increased in non-allergic but not allergic asthma: a multicentre epidemiological study. *Thorax* **60**, 451–454 (2005).

152. Szefler, S.J.; Wenzel, S.; Brown, R.; Erzurum, S.C.; Fahy, J.V.; Hamilton, R.G.; *et al*. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* **129**, 9–23 (2012).

153. Korevaar, D.A.; Westerhof, G.A.; Wang, J.; Cohen, J.F.; Spijker, R.; *et al*. Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med* **3**, 290–300 (2015).

154. Berry, M.; Shaw, D.; Green, R.; Brightling, C.; Wardlaw, A.; Pavord, I. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy* **35**, 1175–9 (2005).

155. Fritsch, M.; Uxa, S.; Horak, F.Jr.; *et al.* Exhaled nitric oxide in the management of childhood asthma: a prospective 6-months study. *Pediatric Pulmonology* **41**, 855–862 (2006).

156. Dweik, R.A.; Boggs, P.B.; Erzurum, S.C.; Irvin, C.G.; Leigh, M.W.; Lundberg, J.O.; *et al.* An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Resp Crit Care Med* **184**, 602–15 (2011).

157. Hall, S.C.; Agrawal, D.K. Vitamin D and bronchial asthma: An overview of data from the past 5 years. *Clin Ther* **39**, 917–929 (2017).

158. Maguire, J.L.; Birken, C.S.; Loeb, M.B.; *et al.* DO IT trial: Vitamin D outcomes and interventions in toddlers-A TARGet Kids! randomized controlled trial. *BMC Pediatr.* **14**, 37 (2014).

159. Szymczak, I.; Pawliczak, R. Can vitamin D help in achieving asthma control? Vitamin D "revisited": An updated insight. *Adv Respir Med* **86**, 103–109 (2018).

160. Rosser, F.J.; Han, Y.Y.; Forno, E.; *et al.* Effect of vitamin D supplementation on total and allergen-specific IgE in children with asthma and low vitamin D levels. *J Allergy Clin Immunol* **149**, 440–444 (2022).

161. Jolliffe, D.A.; Greenberg, L.; Hooper, R.L.; *et al.* Vitamin D supplementation to prevent asthma exacerbations: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir Med* **5**, 881–890 (2017).

162. Jaura, J.; Kelsberg, G.; Safranek, S. Does vitamin D supplementation reduce asthma exacerbations? *J Fam Pract* **69**, 0–6 (2020).

163. Freishtat, R.J; Iqbal, S.F.; Pillai, D.K.; Klein, C.; Ryan, L.M.; Benton, A.S.; *et al*. High prevalence of vitamin D deficiency among inner-city African American youth with asthma in Washington, DC. *J Pediatr* **156**, 948-52 (2010).

164. Brehm, J.M.; Celedon, J.C.; Soto-Quiros, M.E.; Avila, L.; Hunninghake, G.M.; *et al*. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med* **179**, 765–71 (2009).

165. Tibrewal, C.; Modi, N.S.; Bajoria P,S.; Dave, P.A.; Rohit, R.K.; Patel, P.; Gandi, S.K.; *et al.* Therapeutic Potential of Vitamin D in Management of Asthma: A Literature Review. *Cureus* **15**, e41956 (2023).

166. Wiedermann, U.; Chen, X.J.; Enerbäck, L.; Hanson, L.A.; Kahu, H.; Dahlgren, U. I. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scandinavian Journal of Immunology* **44**, 578–584 (1996),

167. Mora, J. R.; Iwata, M.; von Andrian, U.H. Vitamin Effects on the Immune System: Vitamins A and D Take Centre Stage. *Nature Reviews. Immunology* **8**, 685–698 (2008).

168. Marquez, H. A.; Chen, F. Retinoic Acid Signaling and Development of the Respiratory System. *Sub-Cellular Biochemistry* **95**, 151–174 (2020).

169. Liu, L. Clinical Efficacy of Vitamin A Adjuvant Therapy in Children With Bronchial Asthma and Its Effect on Serum Inflammatory Factors and T Lymphocyte Levels. *Maternal and Child Health in China* **38**, 1014–1019 (2023).

170. Gong, Y. Application of Vitamin A in the Treatment of Bronchial Asthma in Children and Its Effect on Inflammatory Factors. *Pharmacy in Northern China* **22**, 26–29 (2025).

171. Bai, Y. J.; Dai, R.J. Serum Levels of Vitamin A and 25-Hydroxyvitamin D3 (25OHD3) as Reflectors of Pulmonary Function and Quality of Life (QOL) in Children With Stable Asthma: A Case-Control Study. *Medicine* **97**, e9830 (2018).

172. Cook-Mills, J.M.; McCary, C.A. Isoforms of Vitamin E Differentially Regulate Inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **10**, 348–366 (2010).

173. Uauy, R.; Hoffman, D.R.; Birch, E.E.; Birch, D.G.; Jameson, D.M.; Tyson, J. Safety and efficacy of omega-3 fatty acids in the nutrition of very low birth weight infants: soy oil and marine oil supplementation of formula. *J Pediatr* **124**, 612–620 (1994).

174. Cook-Mills, J.M.; Abdala-Valencia, H.; Hartert, T. Two faces of vitamin E in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 279–284 (2013).

175. Kumar, R.; Ferrie, R.P.; Balmert, L.C.; Kienzl, M.; Rifas-Shiman, S.L.; *et al.* Associations of α- and γ-tocopherol during early life with lung function in childhood. *J Allergy Clin Immunol* **146**, 1349–1357 (2020).

176. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* **136**, 225-43 (1987).

177. Nathan, R.A.; Sorkness, C.A.; Kosinski, M.; Schatz, M.; Li, J.T.; Marcus, P.; *et al*. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 59-65 (2004).

178. Liu, A.H.; Zeiger, R.; Sorkness, C.; Mahr, T.; Ostrom, N.; *et al*. Development and cross-sectional validation of the Childhood Asthma Control Test. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 817–825 (2007).

179. Graham, B.L.; Steenbruggen, I.; Miller, M.R.; Barjaktarevic, I.Z.; Cooper, B.G.; *et al*. Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **200**, e70–e88 (2019).

180. Forche, G.; Harnoncourt, K.; Stadlober, E. Neue spirometrische Bezugswerte für Kinder, Jugendliche und Erwachsene. *Öst Ärzteztg* **43**, 15-6 (1998).

181. Pellegrino, R.; Viegi, G.; Brusasco, V.; *et al*. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* **26**, 948–68 (2005).

182. Dweik, R.A.; Boggs, P.B.; Erzurum, S.C.; Irvin, C.G.; *et al*., on behalf of American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. *Am. J .Respir. Crit. Care Med* **184**, 602–615 (2011).

183. Hallstrand, T.S.; Leuppi, J.D.; Joos, G.; Hall, G.L.; *et al*. American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS) Bronchoprovocation Testing Task Force. ERS technical standard on bronchial challenge testing: pathophysiology and methodology of indirect airway challenge testing. *Eur Respir J* **52,** 1801033 (2018).

184. Test Definition: 25HDN 25-Hydroxyvitamin D2 and D3, Serum. Mayo Clinic Laboratories. Reference: https://www.mayocliniclabs.com/testcatalog/overview/83670 (2024).

185. Amrein, K.; Scherkl, M.; Hoffmann, M.; Neuwersch-Sommeregger, S.; *et al.* Vitamin D deficiency 2.0: An update on the current status worldwide. *Eur. J. Clin. Nutr* **74**, 1498–1513 (2020).

186. Bilezikian, J.P.; Formenti, A.M.; Adler, R.A.; Binkley, N.; *et al.* Vitamin D: Dosing, levels, form, and route of administration: Does one approach fit all? *Rev. Endocr. Metab. Disord* **22**, 1201–1218 (2021).

187. Wang, A.L.; Datta, S.; Weiss, S.T.; Tantisira, K.G. Remission of persistent childhood asthma: Early predictors of adult outcomes. *J Allergy Clin Immunol* **143**, 1752-1759 (2019).

188. Heldin, J.; Malinovschi, A.; Johannessen, A.; *et al.* Clinical remission of asthma and allergic rhinitis-in a longitudinal population study. *J Asthma Allergy* **15**, 1569-1578 (2022).

189. Kumar, A.; Jat, K.R.; Sankar, J.; Lakshmy, R.; *et al.* Role of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in assessment of asthma control in children**.** *J Asthma* **60**, 1466-1473 (2023).

190. Navratil, M.; Plavec, D.; Dodig, S.; Jelcic, Z.; *et al*. Markers of systemic and lung inflammation in childhood asthma. *J Asthma* **46**, 822–828 (2009).

191. Shah, S.; Grunwell, J.; Mohammad, A. Performance of Eosinophil Cationic Protein as a Biomarker in Asthmatic Children. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **9**, 2761-2769 (2021).

192. Dweik, R.A.; Boggs, P.B.; Erzurum, S.C.; Irvin, C.G; *et al*. American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med* **8**, 602–615 (2011).

193. Lama, M.; Chaudhuri, T.; Nayak, C.; & Chatterjee, M. Increased interleukin-4 and decreased interferon-γ levels in serum of children with asthma. *Cytokine* **55**, 335–338 (2011).

194. Geng, L.; Xiao, R.; Chang, K. Changes and correlation of serum levels of interleukins 33, 15, 4, and interferon γ in children with bronchial asthma at different periods. *Postepy Dermatol Alergol* **41**, 473-478 (2024).

195. Shi, M.; Li, J. "Correlation Between Vitamin A25-Hydroxyvitamin D3 and Lung Function in Children With Asthma of Different Control Degrees." *Maternal and Child Health in China* **37**, 3700–3703 (2022).

196. Hu, J.; Sang, J.; Hao, F.; Liu, L. "Association Between Vitamin A and Asthma: A Meta-Analysis With Trial Sequential Analysis." *Frontiers in Pharmacology* **14**: 1100002 (2023).

197. Luo, J.; Liu, D.; Liu, C.T. Can vitamin D supplementation in addition to asthma controllers improve clinical outcomes in patients with asthma?: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* **94**, e2185 (2015).

198. Forno, E.; Bacharier, L.B.; Phipatanakul, W.; *et al.* Effect of vitamin D3 supplementation on severe asthma exacerbations in children with asthma and low vitamin D levels: The VDKA randomized clinical trial. *JAMA* **324**, 752–760 (2020).

199. Rosser, F.J.; Han, Y.Y.; Forno, E.; *et al*. Effect of vitamin D supplementation on total and allergen-specific IgE in children with asthma and low vitamin D levels. *J Allergy Clin Immunol* **149**, 440–444 (2022).

200. Bener, A.; Ehlayel, M.; Bener, H.; Hamid, Q. The Impact of Vitamin D Deficiency on Asthma, Allergic Rhinitis and Wheezing in Children: An Emerging Public Health Problem. *J. Fam. Community Med* **21**, 154–161 (2014).

201. Bose, S.; Breysse, P.N.; McCormack, M.C.; Hansel, N.N.; Rusher, R.R.; Matsui, E.; Peng, R.; Curtin-Brosnan, J.; Diette, G.B. Outdoor Exposure and Vitamin D Levels in Urban Children with Asthma. *Nutr. J* **12**, 81 (2013).

202. Brehm, J.M.; Acosta-Pérez, E.; Klei, L.; Roeder, K.; Barmada, M.; Boutaoui, N.; Forno, E.; Kelly, R.; Paul, K.; Sylvia, J.; *et al*. Vitamin D Insufficiency and Severe Asthma Exacerbations in Puerto Rican Children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **186**, 140–146 (2012).

203. Hatami, G.; Ghasemi, K.; Motamed, N.; Firoozbakht, S.; Movahed, A.; Farrokhi, S. Relationship between Vitamin D and Childhood Asthma: A Case–Control Study. *Iran J Pediatr* **24**, 710–714 (2014).

204. Szentpetery, S.E.; Han, Y.-Y.; Brehm, J.M.; Acosta-Pérez, E.; Forno, E.; Boutaoui, N.; Canino, G.; Alcorn, J.F.; Celedón, J.C. Vitamin D Insufficiency, Plasma Cytokines, and Severe Asthma Exacerbations in School-Aged Children. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract* **6**, 289–291 (2018).

205. Gao, J.; Gao, X.; Li, W.; Zhu, Y.; Thompson, P.J. Observational Studies on the Effect of Dietary Antioxidants on Asthma: A Meta-Analysis. *Respirology* **13**, 528–536 (2008).

206. Lee, S.-Y.; Kim, B.-S.; Kwon, S.-O.; Oh, S.-Y.; Shin, H.L.; Jung, Y.-H.; Lee, E.; Yang, S.-I.; Kim, H.Y.; Seo, J.-H.; *et al*. Modification of Additive Effect between Vitamins and ETS on Childhood Asthma Risk According to GSTP1 Polymorphism: A Cross -Sectional Study. *BMC Pulm. Med* **15**, 125 (2015).

207. Ghaffari, J.; Hossaini, R.F.; Khalilian, A.; Nahanmoghadam, N.; Salehifar, E.; Rafatpanah, H. Vitamin E Supplementation, Lung Functions and Clinical Manifestations in Children with Moderate Asthma: A Randomized Double Blind Placebo- Controlled Trial. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol* **13**, 98-103 (2014).

208. Pearson, P.J.K.; Lewis, S.A.; Britton, J.; Fogarty, A. Vitamin E Supplements in Asthma: A Parallel Group Randomised Placebo Controlled Trial. *Thorax* **59**, 652–656 (2004).

209. Rubin, R.N.; Navon, L.; Cassano, P.A. Relationship of Serum Antioxidants to Asthma Prevalence in Youth. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **169**, 393–398 (2004).

210. Allen, S.; Britton, J.R.; Leonardi-Bee, J.A. Association between Antioxidant Vitamins and Asthma Outcome Measures: Systematic Review and Meta-Analysis. *Thorax* **64**, 610–619 (2009).

211. Chlebna-Sokół, D.; Konstantynowicz, J.; Abramowicz, P.; Kulik-Rechberger, B.; Niedziela, M.; Obuchowicz, A.; Ziora, K.; KaralusGach, J.; Golec, J.; Michałus, I.; *et al.* Evidence of a significant vitamin D deficiency among 9–13-year-old Polish children: Results of a multicentre study. *Eur. J. Nutr* **58**, 2029–2036 (2019).

212. Shaka, M.F.; Kabthymer, R.H.; Meshesha, M.D.; Borde, M.T. Vitamin D deficiency among apparently healthy children and children with common medical illnesses in Sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *Ann. Med. Surg* **75**, 103403 (2022).

213. Li, H.-A.; Zou, S.-Q.; Li, B.-T.; Wang, T.; Ma, Z.-C.; Luo, Q.; Huang, X.-Y.; Fan, L.-C.; Xiang, W. Serum vitamin D status among healthy children in Hainan, South China: A multi-center analysis of 10,262 children. *Transl. Pediatr* **11**, 1010–1017 (2022).

214. El Abd, A.; Dasari, H.; Dodin, P.; Trottier, H.; Ducharme, M.F. The effects of vitamin D supplementation on inflammatory biomarkers in patients with asthma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front. Immunol* **15**, 1335968 (2024).

8. ŽIVOTOPIS

Ivana Jerković rođena je 12.02.1976. u Splitu gdje je završila osnovnu školu i Opću gimnaziju Vladimir Nazor. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2001. godine. Obvezni staž obavila je u KBC Zagreb, a stručni ispit za liječnike položila je 2003. godine. Nakon toga radila je kao liječnik obiteljske medicine, a zatim kao sekundarac u NPB "Dr. Ivan Barbot" u Popovači. Specijalizaciju iz pedijatrije započela je 2006. godine. Program specijalističkog usavršavanja provela je u KBC “Sestre milosrdnice” i KBC Zagreb te je 2010. godine položila specijalistički ispit. Tijekom specijalizacije završila je dvogodišnji poslijediplomski studij “Klinička pedijatrija” u KBC Zagreb. Nakon položenog specijalističkog ispita radila je u pedijatrijskim ambulantama u sklopu primarne zdravstvene zaštite, a od 2013. godine zaposlena je kao specijalist pedijatar u Dječjoj bolnici Srebrnjak. Subspecijalistički ispit iz Pedijatrijske alergologije i kliničke imunologije položila je 2018. godine. Od 2023. godine voditeljica je Odjela hitnog bolničkog prijema s dnevnom bolnicom Dječje bolnice Srebrnjak. Sudjelovala je na brojnim stručnim i znanstvenim, domaćim i međunarodnim skupovima.
Članica je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog pedijatrijskog društva, Sekcije za alergologiju i kliničku imunologiju i Europskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju (EAACI).

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

1. Lovrić, M.; Banić, I.; Časni, K.; Šunić, Iva.; Jerković, I.; Turkalj, M. Outdoor Environmental Risk Factors for Paediatric Ragweed. *Children* **13**, 1366 (2026).
2. Munivrana Škvorc, H.; Džajić, A.; Jerković, I.; Mrkić Kobal, I. Isolated NK cell immunodeficiency as a cause of recurrent herpes simplex virus infections in a child: a case report. *Paediatr Croat* **70,** 75 (2026).
3. Šimić, A.; Ban Viskić, A.; Marić, I.; Jurić, M.; Jerković, I.; Erceg, D.; Mrkić, I.; Munivrana Škvorc, H.; Turkalj, M. Hymenoptera venom anaphylaxis in children. *Paediatr Croat* **70**, 72 (2026).
4. Jurić, M.; Mrkić Kobal, I.; Miletić Gospić, A.; Marić, I.; Jerković, I.; Munivrana Škvorc, H.; Turkalj, M. Food oral immunotherapy for egg allergy: experience from the croatian referral centre for paediatric allergy. *Allergy* **80**, 212 (2025).
5. Dujmović Plečko, D.; Jurić, M.; Jerković, I.; Turkalj, M. Alergija na jaje - prepreka za cijepljenje? *Paediatr Croat* **68**, 30 (2024).
6. Munivrana Škvorc, H.; Anzić, S.A.; Jerković, I.; Mrkić Kobal, I.; Škvorc, M. Sensitization to inhaled allergens in children with allergic rhinitis. *Sestrinski glasnik* **29,** 19-22 (2024).
7. Šoprun, R.; Munivrana Škvorc, H.; Vučemilović, I.; Jerković, I.; Škvorc, M. Uloga medicinske sestre u edukaciji djeteta oboljelog od astme. *Sestrinski glasnik* **29,** 23-27 (2024).
8. Miletić Gospić, A.; Turkalj, M.; Jurić, M.; Drinković, V.; Vlašić Lončarić, Ž.; Vodopija, M.; Jerković, I.; Erceg, D. Real-life effectiveness and safety of oral food immunotherapy in children. *Allergy* **78**, 304 (2024).
9. Jerković, I.; Turkalj, M. Alergija na cjepivo – izgovor za necijepljenje? *Liječnički vjesnik* **146,** 61-67 (2024).
10. Mrkić Kobal, I.; Plavec, D.; Vlašić Lončarić, Ž.; Jerković, I.; Turkalj, M. Atopic March or Atopic Multimorbidity—Overview of Current Research, *Medicina* **60,** 21-32 (2023).
11. Anzić, S.A.; Munivrana Škvorc, H.; Jerković, I.; Škvorc, M.; Munivrana, Š. Učestalost alergijskog rinitisa i drugih alergijskih i autoimunosnih bolesti u djece s IgA imunodeficijencijom. *Liječnički vjesnik* **145**, 144 (2023).

12. Anzić, S.A.; Munivrana Škvorc, H.; Jerković, I.; Markov Glavaš, D.; Carević, I.; Škvorc, M. Korelacija između frakcijske koncentracije izdahnutog dušikovog oksida, nazalnog dušikovog oksida i atopije kod alergijskog rinitisa i astme. *Liječnički vjesnik* **145,** 139-140 (2023).
13. Munivrana Škvorc, H.; Anzić, S.A.; Jerković, I.; Mrkić Kobal, I.; Škvorc, M. Allergic Rhinitis and Other Allergic and Autoimmune Disorders in Children with IgA Deficiency. *Scholars journal of applied medical sciences* **11,** 1174-1177 (2023).