



Središnja medicinska knjižnica

Navratil, Marta (2014) *Lokalni i sistemski biomarkeri upale u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/2165>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marta Navratil

**Lokalni i sistemski biomarkeri upale
u djece s kontroliranom i
nekontroliranom astmom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2014.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marta Navratil

**Lokalni i sistemski biomarkeri upale
u djece s kontroliranom i
nekontroliranom astmom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena u Dječjoj bolnici "Srebrnjak" u Zagrebu

Voditelji rada: doc. dr. sc. Mirjana Turkalj i prof. dr. sc. Davor Plavec

Zahvaljujem se mentorima doc. dr. sc. Mirjani Turkalj i prof. dr. sc. Davoru Plavecu na stručnom vodstvu i poticanju na rad; ravnatelju dr. sc. Bori Nogalu, prof. dr. sc. Slavici Dodig, med. lab. ing. Tonki Crnogorac i VMS Mariji Vodopiji i Danijeli Vrankić te ostalom osoblju Odjela za predškolsku i školsku dob, osoblju Odjela za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku i osoblju Odjela za plućnu funkciju Dječje bolnice Srebrnjak jer bez njih ovaj rad ne bi bio moguć.

Zahvaljujem se Ivani, Lovri i Giorgiju na prijateljskoj pomoći i podršci.

I na kraju, zahvaljujem ponajviše svojoj obitelji koja svemu daje smisao.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Astma u djece	2
1.1.1. Prevalencija astme u djece	2
1.1.2. Definicija astme.....	2
1.1.3. Etiologija astme.....	3
1.1.4. Patofiziologija astme	6
1.1.5. Postupci dijagnosticiranja astme	10
1.1.6. Diferencijalna dijagnoza astme	11
1.1.7. Fenotipovi i endotipovi astme	12
1.1.8. Podjela i kontrola astme	13
1.1.9. Egzacerbacija astme	16
1.1.10. Liječenje astme	16
1.2. Biomarkeri.....	19
1.2.1. Definicija biomarkera.....	19
1.2.2. Biomarkeri u astmi	19
2. HIPOTEZA	27
3. CILJEVI	29
3.1. Cilj rada.....	30
3.2. Doprinos i očekivana primjena istraživanja	30
4. ISPITANICI I METODE	31
4.1. Ispitanici	32
4.1.1. Kriteriji uključivanja	32
4.1.2. Kriteriji neuključivanja	33
4.2. Plan istraživanja i istraživačke metode	33
4.3. Metode.....	34
4.4. Parametri ishoda.....	39
4.5. Statističke metode	39
4.6. Određivanje veličine uzorka.....	40
4.7. Odobrenja i financiranje.....	41
4.7.1. Odobrenja	41
4.7.2. Financiranje.....	41
5. REZULTATI.....	42

5.1.	Karakteristike ispitivane populacije	43
5.1.1.	Karakteristike ispitanika podijeljenih u skupine prema stupnju kontrole astme	44
5.2.	Plućna funkcija u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom.....	46
5.3.	Drugi pokazatelji kontrole astme u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom	47
5.4.	Lokalni i sistemski biomarkeri upale u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom	47
5.1.	Dijagnostička vrijednost biomarkera upale u razlikovanju kontrolirane i nekontrolirane astme	52
5.2.	Povezanost biomarkera upale i simptoma bolesti (pojedinačnih simptoma i skupnog zbira simptoma) u skupini djece s nekontroliranom astmom.....	54
5.2.1.	Povezanost lokalnih biomarkera upale i učestalosti simptoma astme izraženoj prema skali Likertovog tipa u NA (N=53).....	54
5.2.2.	Povezanost sistemskih biomarkera upale i učestalosti simptoma astme izraženoj prema skali Likertovog tipa u NA (N=53).....	55
5.3.	Povezanost lokalnih i sistemskih biomarkera upale međusobno i s drugim pokazateljima aktivnosti bolesti (spirometrijski parametri, zbir simptoma, uporaba SABA, ACT, AQLQ, uIgE, egzacerbacija bolesti)	58
5.4.	Lokalni i sistemski biomarkeri upale kao prediktori egzacerbacije bolesti	65
6.	RASPRAVA.....	66
6.1.	Lokalni i sistemski biomarkeri upale u kontroliranoj i nekontroliranoj astmi	69
6.2.	Povezanost lokalnih i sistemskih biomarkera upale i učestalosti simptoma astme..	72
6.3.	Povezanost lokalnih i sistemskih biomarkera upale međusobno i s ostalim pokazateljima aktivnosti bolesti	75
6.4.	Lokalni i sistemski biomarkeri upale kao prediktori buduće egzacerbacije bolesti.	78
7.	ZAKLJUČCI.....	82
8.	SAŽETAK.....	85
9.	SUMMARY	87
10.	LITERATURA.....	89
11.	ŽIVOTOPIS	106
12.	PRILOZI.....	108

Popis slika

Slika 1. Rana i kasna faza alergijske reakcije.	9
Slika 2. Shematski prikaz uzorkovanja kondenzata izdaha (A) odnosno hlađenja i kondenziranja izdaha (B) (prilagođeno prema Montuschi i Barnes, 2002).	37
Slika 3. Termometar izdaha X-halo (Delmedica, Singapore).	38
Slika 4. Pojednostavljeni shematski prikaz termometra izdaha X – halo.	38
Slika 5. Koncentracija urata ($\mu\text{mol/L}$) u kondenzatu izdaha (KI) u skupini djece s kontroliranom astmom (KA) i nekontroliranom astmom (NA) ($Z=-7,3475$; $p\leq 0,0001$).	49
Slika 6. Vrijednost pH u kondenzatu izdaha (KI) u skupini djece s kontroliranom astmom (KA) i nekontroliranom astmom (NA) ($t=-3,0679$; $p=0,003$).	50
Slika 7. Vrijednosti TI-a ($^{\circ}\text{C}$) u skupini djece s kontroliranom astmom (KA) i nekontroliranom astmom (NA) ($t=2,4950$; $p=0,014$).	51
Slika 8. Prikaz ROC krivulje za koncentraciju urata u kondenzatu izdaha (KI) u razlikovanju kontrolirane i nekontrolirane astme.	52
Slika 9. Prikaz ROC krivulje za kombinaciju biomarkera koja se temelji na 2 varijable: urati u kondenzatu izdaha (KI) i Z-vrijednost apsolutnog broja monocita.	53
Slika 10. Povezanost između temperature izdahnutog zraka (TI) i učestalosti osjećaja napetosti u prsima ($r=0,4204$; $p=0,002$).	54
Slika 11. Povezanost između serumske koncentracije CRP-a velike osjetljivosti (hs-CRP)-a i učestalosti čišćenja grla ($r=0,4047$; $p=0,003$).	56
Slika 12. Povezanost između Z-vrijednosti apsolutnog broja monocita u diferencijalnoj krvnoj slici (DKS) i ukupnog zbira simptoma ($r=0,4262$; $p=0,015$).	56
Slika 13. Povezanost između Z-vrijednosti postotka bazofilnih granulocita u diferencijalnoj krvnoj slici (DKS) i učestalosti osjećaja težine u prsima ($r=-0,4585$; $p=0,001$).	57
Slika 14. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i pH vrijednosti KI ($r=0,379$; $p<0,0001$).	61
Slika 15. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i rezultata upitnika o kontroli astme (ACT) u svih astmatičara ($r=0,665$; $p<0,0001$).	61
Slika 16. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i rezultata upitnika o kvaliteti života (AQLQ) u svih astmatičara ($r=0,703$; $p<0,0001$).	62
Slika 17. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i ukupnog zbira simptoma u svih astmatičara ($r=-0,721$; $p<0,0001$).	62
Slika 18. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i frakcije izdahnutog dušičnog oksida ($F_{\text{E}}\text{NO}$) u nekontroliranih astmatičara ($r=0,3839$; $p=0,005$).	63

Slika 19. Povezanost vremenske udaljenosti zadnje egzacerbacije (PZE) i koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) u nekontroliranih astmatičara ($r=0,558$; $p<0,0001$).....	63
Slika 20. Povezanost između CRP-a velike osjetljivosti (hs-CRP) i temperature izdahnutog zraka (TI) u svih astmatičara ($r=0,445$; $p<0,0001$).	64

Popis tablica

Tablica 1. Podjela astme prema stupnju kontrole.	13
Tablica 2. Preporučeni parametri kontrole astme.....	14
Tablica 3. Ekvipotentne doze inhalacijskih kortikosteroida koji se rabe u liječenju astme u djece.	18
Tablica 4. Potencijalni biomarkeri upale u izdahu i kondenzatu izdaha (preuzeto iz 130).....	21
Tablica 5. Prednosti i nedostaci nekih metoda uzorkovanja bioloških uzoraka i upalnih biomarkera u astmi (preuzeto iz 75, 121).....	22
Tablica 6. Sistemski biomarkeri u astmi.	25
Tablica 7. Razlikovna učinkovitost prema vrijednostima površine ispod ROC-krivulje (AUC).	40
Tablica 8. Karakteristike ispitanika (N=103).....	43
Tablica 9. Karakteristike ispitanika prema stupnju kontrole astme (KA=kontrolirana astma, NA=nekontrolirana astma).....	45
Tablica 10. Usporedba parametara plućne funkcije prikazanih kao % očekivane vrijednosti u kontroliranoj astmi (KA) i nekontroliranoj astmi (NA).....	46
Tablica 11. Drugi pokazatelji kontrole bolesti u djece s kontroliranom (KA) i nekontroliranom astmom (NA).....	47
Tablica 12. Lokalni i sistemski biomarkeri u skupinama djece s kontroliranom (KA) i nekontroliranom (NA) astmom.	48
Tablica 13. Prediktori egzacerbacije astme: binarna logistička regresija.	65

Popis oznaka i kratica

- ACT - upitnik o kontroli astme (eng. *Asthma Control Test*);
- ADAM - gen iz obitelji transmembranskih cink-ovisnih metaloproteinaza (eng. *α disintegrin and metalloprotease*);
- APC - stanice za predočavanje antigena (eng. *Antigen Presenting Cells*);
- AQLQ - upitnik o kvaliteti života s astmom (eng. *Asthma Quality of Life Questionnaire*);
- ATS - Američko torakalno društvo (eng. *American Thoracic Society*);
- AUC - površina ispod krivulje (eng. *Area Under Curve*);
- BAL - bronhoalveolarni ispirak (eng. *BronchoAlveolar Lavage*);
- BD - bronhodilatator;
- BHR - bronhalna hiperreaktivnost;
- BM - biomarker;
- BMI - indeks tjelesne mase (eng. *Body Mass Index*);
- CAMP - program vođenja dječje astme (eng. *Childhood Asthma Management Program*);
- CD - razlikovno obilježje (eng. *Cluster of diferentiation*);
- CI - raspon pouzdanosti (eng. *confidence interval*);
- DA - dijagnostička točnost (eng. *diagnostic accuracy*);
- DKS - diferencijalna krvna slika;
- ECP - eozinofilni kationski protein (eng. *Eosinophil Cationic Protein*);
- ERS - Europsko respiratorno društvo (eng. *European Respiratory Society*);
- FcεRI - receptor visokog afiniteta za IgE (eng. *high-affinity IgE receptor*);
- FELF - tekućina koja oblaže dišne putove (eng. *Respiratory Extracellular Lining Fluid*);
- F_ENO - frakcija izdahnutog dušičnog oksida (eng. *Fractional Exhaled Nitric Oxide*);
- FEV₁ - forsirani ekspiracijski volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi (eng. *Forced Expiratory Volume in 1 second*);
- FVC - forsirani vitalni kapacitet;
- GC-MS - plinska kromatografija–masena spektrometrija (eng. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*);
- GERB - gastroezofagealna refluksna bolest;
- GINA - Globalna inicijativa za astmu (eng. *Global Initiative for Asthma*);
- GM-CSF - čimbenik poticanja granulocitnih i makrofagnih kolonija (eng. *Granulocyte - Macrophage Colony - Stimulating Factor*);
- HFA - potisni plin hidrofluoroalkan (eng. *hydrofluoroalkane*);
- hs-CRP - CRP velike osjetljivosti (eng. *high sensitivity C-Reactive Protein*);

H₂O₂ - vodikov peroksid;

ICON - Internacionalni konsenzus za pedijatrijsku astmu (eng. *International consensus on [ICON] pediatric asthma*);

ICS - inhalacijski kortikosteroidi (eng. *Inhalatory CorticoSteroids*);

Ig - imunoglobulin;

IL - intereleukin;

iNOS- inducibilna sintetaza dušikovog oksida (eng. *inducible isoform Nitric Oxide Synthase*);

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

ISAAC - Internacionalna studija o astmi i alergijama u djece (eng. *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*);

KA - kontrolirana astma;

KI - kondenzat izdaha;

LABA - dugodjelujući beta agonist (eng. *Long-Acting Beta agonist*);

LR - omjeri vjerojatnosti (eng. *Likelihood Ratio*);

LT - leukotrijen;

LTRA - leukotrijenski antagonist (eng. *LeukoTriene Receptor Antagonist*);

MEF25 - forsirani ekspiracijski protok pri 25% vitalnog kapaciteta;

MEF50 - forsirani ekspiracijski protok pri 50% vitalnog kapaciteta;

MEF75 - forsirani ekspiracijski protok pri 75% vitalnog kapaciteta;

MHC II - glavni kompleks tkivne podudarnosti (eng. *Major Histocompatibility Complex class II*);

NA - nekontrolirana astma;

NAEPP - Nacionalni program za edukaciju i prevenciju astme (eng. *National Asthma Education and Prevention Program*);

NPV - negativna prediktivna vrijednost (eng. *Negative predicitive value*);

OR - omjer šansi (eng. *Odds Ratio*);

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

PACT - Istraživanje o kontroli astme u djece (eng. *Pediatric Asthma Controller Trial*);

PGE2 - prostaglandin E2;

PPV - pozitivna prediktivna vrijednost (eng. *Positive predictive value*);

RANTES - kemokin kemoatraktant monocita, limfocita T, stanica ubojica, eozinofilnih i bazofilnih granulocita (eng. *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*);

PAF -faktor aktivacije trombocita (eng. *Platelet-Activating Factor*);

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

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (eng. *Reactive Oxygen Species*);

RSV - respiratorni sincicijski virus;

SABA - beta-2 agonist kratkog djelovanja (eng. *Short-Acting Beta Agonist*);

SD - standardna devijacija (eng. *standard deviation*);

SOD - superoksid dismutaza;

Th1 - pomoćnički T limociti 1 (eng. *T-helper 1*);

Th2 - pomoćnički T limociti 2 (eng. *T-helper 2*);

TCR - receptor limfocita T (eng. *T cell receptor*);

TGF- α - transformirajući faktor rasta α (eng. *Transforming Growth Factor- α*);

TI - temperatura izdahnutog zraka;

TIM - gen membranski protein povezan s Th2 fenotipom imunološkog odgovora (eng. *T-cell Immunoglobulin domain Mucin domain*);

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

Treg - regulacijske T-stanice;

sIgE - specifični imunoglobulin E;

SPINK5 - gen za inhibitor serin-peptidaze (eng. *Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 5*);

uIgE - ukupni imunoglobulin E;

VOC - hlapljivi organski spojevi (eng. *Volatile Organic Compounds*);

\bar{x} - aritmetička sredina.

1. UVOD

1.1. Astma u djece

1.1.1. Prevalencija astme u djece

Astma je najčešća kronična bolest u djece u gotovo svim industrijaliziranim zemljama svijeta (1). Najopsežnija epidemiološka studija o prevalenciji atopijskih bolesti i astme u djece je studija ISAAC (eng. *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) (2). U prvu fazu studije bilo je uključeno 56 zemalja i 156 centara širom svijeta s uključenih 304,796 djece u dobi od 6 do 7 godina i 463,801 dijete u dobi od 13 do 14 godina. Prema rezultatima ove studije, prevalencija piskanja u posljednjih 12 mjeseci u skupini djece u dobi od 13 do 14 godina je u rasponu od 2,1% do 32,2% u različitim populacijama, s najnižom prevalencijom u Indoneziji, Albaniji, Rumunjskoj i Grčkoj, a najvišom u Velikoj Britaniji, Novom Zelandu i Australiji. Prema navodima domaćih autora, prevalencija piskanja u posljednjih 12 mjeseci u školske djece u Zagrebu u dobi od 10 do 11 godina, iznosi 6,02% (3), u Primorsko-goranskoj županiji u djece u dobi od 6 do 7 godina prevalencija piskanja je 9,7%, a u djece u dobi od 13 do 14 godina 8,4% (4) dok je za djecu u Međimurskoj županiji, u dobi od 12 do 14 godina prevalencija 5,11% (5).

Dramatični porast incidencije i prevalencije astme u zadnjih nekoliko desetljeća postaje globalni problem (6). Zanimljiva su opažanja Beasleya i suradnika: 1. prevalencija astme je u porastu širom svijeta; 2. astma je uglavnom češća u Zapadnim zemljama nego u zemljama u razvoju; 3. astma je češća u zemljama engleskog govornog područja; 4. prevalencija astme je u porastu u zemljama u razvoju kako se one „vesterniziraju“ ili urbaniziraju; 5. prevalencija drugih alergijskih bolesti je također u porastu (7).

1.1.2. Definicija astme

Raznolikost prirodnog tijeka bolesti, kliničke slike i terapijskog odgovora, kako u djece tako i u odraslih, ukazuje da je astma zapravo sindrom, a ne jedinstvena bolest (6). Prema međunarodnim smjernicama astma je sindrom obilježen (1) kroničnom upalom dišnih putova u kojoj sudjeluju mnoge imunosne stanice (mastociti, eozinofilni granulociti i limfociti T); (2) pojavom simptoma poput bronhokonstrikcije, kašlja i pritiska u prsima, često noću ili pred jutro u preosjetljivih osoba; (3) smetnjama u protoku zraka koje su često reverzibilne te prođu spontano ili na terapiju; te (4) bronhalnom hiperreaktivnošću (BHR) (8).

1.1.3. Etiologija astme

Astma je multifaktorski uzrokovan sindrom na čiju pojavnost i kliničku sliku zajednički utječu različiti okolišni i genetski čimbenici. Najpoznatiji čimbenici rizika za astmu su genetska predispozicija, spol, bronhalna hiperreaktivnost, atopija, izloženost alergenima, infekcijama, te duhanskom dimu, pretilost i perinatalni čimbenici.

1.1.3.1. *Genetska predispozicija*

Nasljednu sklonost astmi nedvojbeno potvrđuju istraživanja provedena na blizancima i u obiteljima bolesnika s astmom (9-11). Nasljeđe u astmi ne slijedi klasičan mendelski model nasljeđivanja karakterističan za monogenske bolesti, što upućuje na činjenicu da je astma zapravo multigenetska bolest. Različiti geni u različitim pojedinaца dovode do istog fenotipa astme (lokusna heterogenost), dok je zajedničko djelovanje više gena u istog pojedinca nužno za očitovanje određenog fenotipa astme (oligensko ili poligensko nasljeđivanje) (12).

U svjetlu spoznaje astme kao sindroma, a ne jedne jединstvene bolesti, genetska istraživanja su bila usmjerena na nekoliko bitnih značajki astme: atopija, bronhalna hiperreaktivnost, stvaranje upalnih medijatora kao što su citokini, kemokini i faktori rasta te ravnoteža Th1 (pomoćnički T limfociti 1, eng. *T-helper 1*) i Th2 (pomoćnički T limfociti 2, eng. *T-helper 2*) imunosnog odgovora (13).

Iako je utvrđena povezanost povećane serumske koncentracije ukupnog imunoglobulina E (IgE) i bronhalne hiperreaktivnosti s kromosomom 5q31 (14), visokoafinitetnog receptora za IgE (FcεRI) i kromosoma 11q13 (15), bronhalne hiperreaktivnosti i atopije s genom za TNF-α (čimbenik nekroze tumora α, eng. *Tumor Necrosis Factor-α*) (16), te remodeliranja bronha i gena ADAM33 smještenog na kromosomu 20p (17), genetska predispozicija za pojavu astme još nije poznata.

1.1.3.2. *Bronhalna hiperreaktivnost*

Abnormalna i pretjerana reaktivnost dišnih putova na različite stimuluse ima centralnu ulogu u patofiziologiji astme. Pacijenti s BHR imaju veći rizik za nastanak astme, iako svi pacijenti s bronhalnom hiperreaktivnošću nemaju simptome astme (18). Populacijska studija učinjena u odraslih i djece je pokazala da je prevalencija astme dva do tri puta niža od prevalencije BHR (19). Ova opažanja sugeriraju da astma i BHR nisu identičan fenomen. Hiperreaktivnost dišnih putova je potrebna ali ne i dostatna za razvoj kliničke slike astme.

1.1.3.3. *Spol*

U dječjoj dobi astma je češća u dječaka s vrhuncem predominacije muškog spola u pubertetu (20). Nakon 20. godine astma je jednako zastupljena u oba spola da bi nakon 40. godine bila češća u žena. Povećana učestalost astme u dječaka može se objasniti većom učestalošću atopije u muškog spola (IgE-senzitizacija), užim dišnim putovima u dječaka u odnosu na djevojčice te razlici u percepciji simptoma između dječaka i djevojčica (21).

1.1.3.4. *Atopija i alergeni*

Atopija, odnosno genetska sklonost stvaranju visokih koncentracija protutijela klase IgE u kontaktu s alergenima iz okoliša, je najsnažniji potvrđeni čimbenik rizika za razvoj astme (22). Smatra se da čak 75-90% astme u dječjoj dobi ima atopijsku podlogu (23-24). Atopija se manifestira povećanom koncentracijom ukupnih (uIgE) i specifičnih (sIgE) IgE protutijela u serumu i pozitivnim odgovorom u kožnom ubodnom testu na niz standardiziranih inhalacijskih i/ili nutritivnih alergena. Izloženost alergenima je važan čimbenik rizika za razvoj alergijske preosjetljivosti, a u preosjetljivih osoba kontakt s alergenima dovodi do egzacerbacija astme i/ili perzistiranja simptoma bolesti (25).

Alergeni zatvorenih prostora su grinje iz kućne prašine, životinjski proteini kućnih ljubimaca (mačka, pas), žohari i gljivice. Najčešći alergeni zatvorenih prostora povezani s astmom su piroglifidne grinje *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras* i *Euroglyphus marinei*. Koncentracija grinja iznad 0,5 µg/g prašine dovoljna je da izazove preosjetljivost (26). Izloženost alergenima mačke i psa u ranom djetinjstvu može biti rizičan ali i protektivan čimbenik za razvoj astme u kasnijoj dobi (27-28).

Glavni alergeni vanjskih prostora povezani s astmom su peludi stabala, trava i korova. Njihova koncentracija varira ovisno o geografskoj širini i atmosferskim prilikama, a peludne se mape mijenjaju kao posljedica klimatskih i kulturoloških čimbenika i migracija stanovništva (29).

1.1.3.5. *Infekcije dišnih putova*

Podaci o povezanosti i utjecaju respiratornih infekcija na razvoj astme su proturječni. Infekcije respiratornim sincicijskim virusom (RSV) i virusom parainfluence u ranom djetinjstvu su važan čimbenik rizika za razvoj astme i alergije u kasnijoj dobi (30-31). Prospektivne studije su pokazale da će čak 40% djece s RSV potvrđenom infekcijom imati astmu ili simptome slične astmi kasnije u djetinjstvu (30). Suprotno tome, epidemiološke studije na skupini neselekcionirane djece jasno ukazuju da učestale respiratorne infekcije u

ranom djetinjstvu mogu smanjiti rizik za kasniji razvoj astme čak i u djece s pozitivnom obiteljskom anamnezom u pravcu atopije (32-35). Isto tako, česte blage respiratorne infekcije, pretežito gornjih dišnih putova u djece iz mnogočlanih obitelji i djece koja se rano uključuju u kolektiv, djeluju protektivno na kasniji razvoj astme, alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa (35-36).

Ova opažanja pokušao je objasniti Strachan 1989. godine tzv. „higijenskom teorijom“ (13). Visoki higijenski standardi, obitelji s manje djece, kasniji odlazak djece u jaslice, cijepljenje te promjena prehrambenih navika stvaraju „polusterilni“ okoliš te su djeca manje izložena virusnim i bakterijskim patogenima, posebice endotoksinu u ranom djetinjstvu (37-39). Endotoksin i druge komponente bakterijskog staničnog zida reagiraju sa stanicama za predočavanje antigena i potiču interleukinom 12 (IL-12) stimulirani signal za sazrijevanje naivnih T-stanica u smjeru fenotipa Th1. Stoga, zapadnjački stil života zbog nedostatne stimulacije limfocita Th1, dovodi do zadržavanja Th2 citokinskog profila (inače prisutnog *in utero*) te povećanog rizika za razvoj alergijske preosjetljivosti i astme (40).

1.1.3.6. Pretilost

Iako su prevalencija astme i pretilosti u stalnom porastu tijekom zadnjih desetljeća, njihova povezanost je, zbog metodoloških nedostataka provedenih studija, i dalje dvojben. (41). Neke studije ukazuju da pacijenti s povećanim indeksom tjelesne mase (BMI, eng. *Body Mass Index*) imaju veći rizik za razvoj astme (42-43). Rizik je veći za nealergijsku nego za alergijsku astmu (44). Povišen BMI može biti povezan i s težinom astme (45). U pretilih astmatičara nakon gubitka na tjelesnoj težini primijećeno je smanjenje subjektivnog osjećaja dispneje, poboljšanje spirometrijskih parametara, manja varijabilnost vršnog protoka zraka (PEF), manja potreba za beta-2 agonistima kratkog djelovanja i manje egzacerbacija astme (46).

1.1.3.7. Izloženost duhanskom dimu

Pasivno pušenje, prije svega pušenje majki koje su tijekom prve godine života u užem kontaktu s djecom, jedan je od najsnažnijih čimbenika rizika za rekurentni kašalj i piskanje (*wheezing*) u predškolske djece te povećava rizik nastanka astme za 37% (47). Duhanski dim povećava oksidativni stres i potiče upalu u dišnim putovima, a pušenje majke u trudnoći rezultira slabijim razvojem pluća u djeteta, što je čimbenik rizika za ponavljajuće piskanje u ranoj dobi (48). Izloženost duhanskom dimu ima i negativan utjecaj na težinu astme, a primijećen je i slabiji odgovor na protuupalnu terapiju (49-50).

1.1.3.8. Perinatalni čimbenici

Brojni perinatalni čimbenici kao što su prijevremeni porod, porod carskim rezom, dob majke i prehrana tijekom trudnoće, opseg glave pri porodu, novorođenačka žutica i upotreba antibiotika tijekom prve godine života povezuju se s razvojem astme u dječjoj dobi. Povećan uIgE u krvi pupkovine i pozitivna obiteljska anamneza u pravcu atopije su povezani s razvojem atopijske bolesti u djetinjstvu (51). Retrospektivne studije i metaanalize su pokazale da nedonoščad ima povećani rizik nastanka astme kasnije u djetinjstvu (52). Porod carskim rezom također povećava rizik za astmu u djece (53). Mediteranska prehrana u trudnoći smanjuje rizik za razvoj atopijskih bolesti i simptoma nalik astmi u dječjoj dobi (54). Prehrana bogata vitaminom D, antioksidansima i cinkom smanjuje rizika za razvoj *wheezinga* u ranom djetinjstvu (55-57), dok smanjeni unos vitamina E tijekom trudnoće povećava rizik za astmu u djece (57). Rizik za razvoj *wheezinga* tijekom prve godine života je veći kod djece majki mlađih od 30 godina (58).

Retrospektivna studija kohorte od 11,321 djece pokazala je da novorođenačka žutica također predstavlja rizični faktor za astmu u dječjoj dobi (59). Korist od prirodne prehrane dojenčadi jasno je dokazana i metaanalize nedvojbeno pokazuju zaštitni učinak dojenja od atopijskih bolesti, osobito u djece visokog rizika (djeca iz obitelji u kojima roditelji i/ili braća imaju neku alergijsku bolest) (60). Primjena ekstenzivno hidrolizirane dojenačke formule i izbjegavanje alergogene hrane (kravlje mlijeko, jaja, žitarice, orašasti plodovi) u dojenačkoj dobi, ne preveniraju razvoj astme (61).

1.1.3.9. Onečišćenje zraka

Onečišćivači zraka kao što su dušični oksidi, kiseli aerosoli, ozon i sumporni dioksid povezani su sa simptomima i pogoršanjem astme. Zagađivači okoliša mogu potaknuti bronhospazam, prolazno povećati BHR i alergijski odgovor te izazvati egzacerbaciju astme. Iako je astma češća u industrijaliziranim zemljama, malo je, ako ih uopće ima, dokaza da je onečišćenje zraka izravno odgovorno za porast prevalencije astme u ovim zemljama (62).

Zagađivači unutarnjeg prostora, kao što su dušični oksidi, ugljični monoksid, ugljični dioksid, sumporni dioksid, formaldehid i endotoksin, prema nekim studijama također mogu pridonijeti razvoju astme (63-64).

1.1.4. Patofiziologija astme

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

1.1.4.1. Upala dišnih putova

Upalna reakcija u astmi je posredovana brojnim stanicama i medijatorima upale. Medijatori su dio unutarstaničnog signalnog puta koji omogućuje stanicama dišnih putova komunikaciju dovodeći ili do sanacije upalne reakcije ili nastanka kronične upale s trajnim oštećenjem tkiva. Tri su vrste stanica ključne u alergijskoj upali: eozinofilni granulociti, mastociti i limfociti T odnosno Th2-stanice. Svaka od ovih stanica otpušta pohranjene upalne medijatore kao što su eozinofilni kationski protein (ECP, eng. *Eosinophil Cationic Protein*) iz eozinofilnih granulocita i histamin iz mastocita ili *de novo* stvorene upalne medijatore (leukotrijeni, prostaglandini) i citokine (interleukini). Upalna reakcija se odvija u dvije faze (65, Slika 1).

Nakon udisanja antigena, dendritične stanice, odnosno stanice za predočavanje antigena (APC, eng. *Antigen Presenting Cells*), predočuju limfocitima T antigen u sklopu molekula drugog razreda glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC-II, eng. *Major Histocompatibility Complex class II*). T-limfociti tipa CD4 prepoznaju antigene pomoću specifičnih T-receptora (TCR, eng. *T cell receptor*) te dolazi do diferencijacije i aktivacije Th limfocita (Slika 1). Subpopulacija pomagačkih limfocita T (Th2-limfociti) produkcijom citokina inducira sintezu protutijela IgE klase u limfocitima B, te aktiviraju eozinofilne granulocite koji podržavaju alergijsku upalu (66). Interleukini (IL) 4 i 13, koje luče aktivirani limfociti T, ključni su u indukciji Th2 imunološkog odgovora, sudjeluju u aktivaciji i proliferaciji limfocita B koji posljedično tome sintetiziraju IgE protutijela specifična za navedeni antigen. Pri ponovnom kontaktu s antigenom (sada alergenom) spajanje alergena i specifičnih IgE pričvršćenih na membrani mastocita, makrofaga i bazofilnih granulocita dovodi do pokretanja upalne alergijske reakcije.

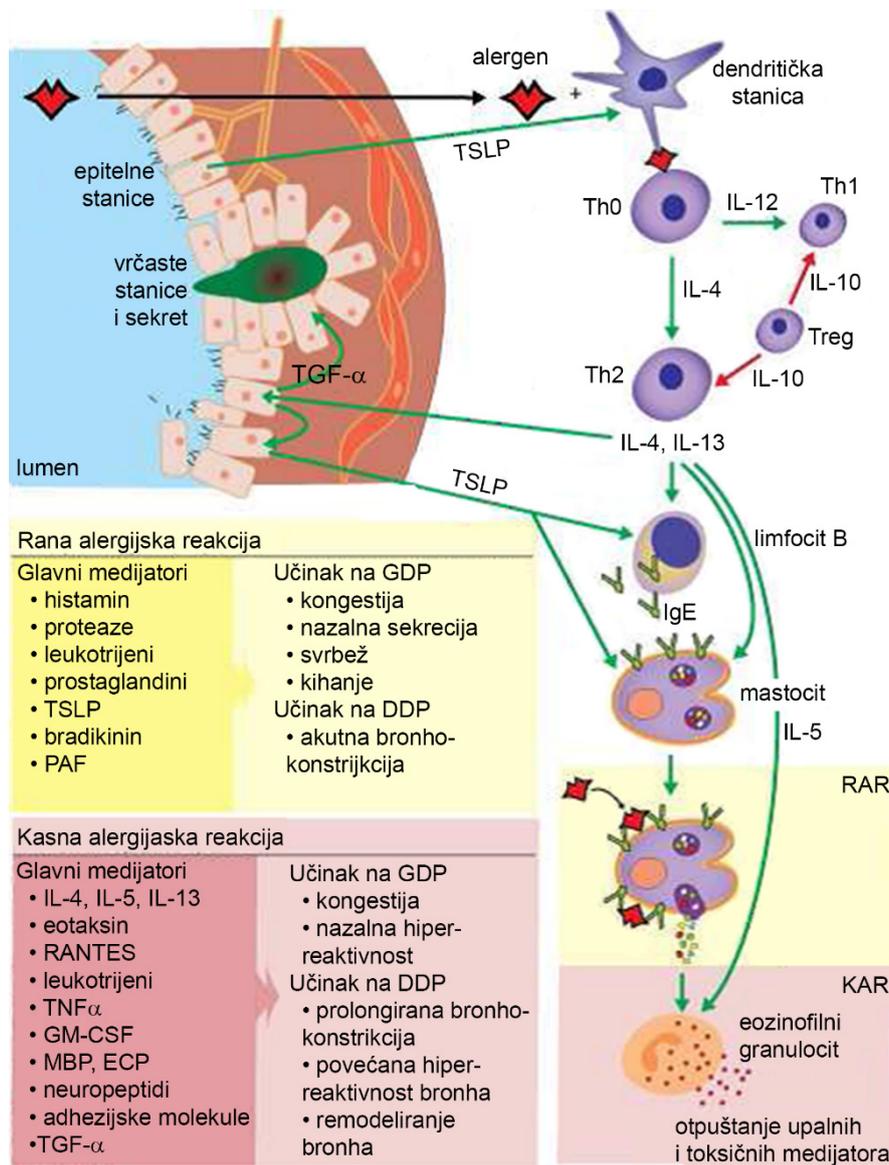
1.1.4.1.1. Rana faza IgE posredovane reakcije

Kada ponovno izlaganje alergenu dovodi do unakrsnog povezivanja najmanje dvije IgE molekule spojene na Fc receptore na membrani mastocita, makrofaga i bazofilnih granulocita u alergične osobe to izaziva rani ili neposredni alergijski odgovor koji karakteriziraju degranulacija ovih stanica i sekrecija niza medijatora kao što su histamin, triptaza, eikosanoidi, i rodovi molekula s reaktivnim kisikom (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*) te ekspresija adhezijskih molekula (67). Ovi medijatori izazivaju kontrakciju glatke muskulature bronha, vazodilataciju i povećanu propusnost krvnih žila tijekom prvih 4-6 sati nakon izlaganja alergenu. Također djeluju kemotaktički na neutrofilne, bazofilne i eozinofilne granulocite te monocite (68). Upalni medijatori aktiviraju i inducibilnu sintetazu dušičnog

oksida (iNOS, eng. *inducible isoform Nitric Oxide Synthase*) koja potiče oslobađanje dušičnog oksida (NO) primarno iz epitelnih stanica dišnih putova. Povećana količina NO je glavni kontributor upalnog procesa u astmi (69). Kisikovi radikali utječu na metabolizam NO-a (70).

1.1.4.1.2. Kasna faza IgE posredovane reakcije

Klasična kasna reakcija razvija se u oko 50% bolesnika 3-12 sati nakon izlaganja alergenu. Karakterizirana je trajnom bronhoopstrukcijom, hiperreaktivnošću bronha i remodeliranjem (71-72). Nekoliko sati nakon izlaganja alergenu TNF- α , kojeg oslobađaju aktivirani mastociti, stimulira ekspresiju vaskularnih adhezijskih molekula na endotelnim stanicama krvnih žila što, u konačnici, rezultira transendotelnom migracijom različitih upalnih stanica. Th2 citokini (IL-3, IL-5 i GM-SCF) omogućuju preživljavanje aktiviranih upalnih stanica u bronhalnom tkivu zahvaljujući reduciranoj apoptozi, ali i posreduju u remodeliranju bronha aktiviranjem rezidentnih stanica u ciljnom organu. IL-4 i IL-13 potiču epitelne stanice na proizvodnju transformirajućeg faktora rasta alfa (TGF- α , eng. *Transforming Growth Factor- α*). TGF- α putem autokrinog signalnog mehanizma dovodi do metaplazije sluznice i proliferacije fibroblasta (73). U isto vrijeme, sekrecija IL-5 od strane Th2 stanica dovodi do daljnje aktivacije i infiltracije eozinofilnih granulocita (74). Dakle, jednom uspostavljena alergijska reakcija može biti samoodrživa i može uzrokovati kroničnu bolest u genetski predisponiranog pojedinca.



Slika 1. Rana i kasna faza alergijske reakcije.

Upalne stanice i medijatori koji sudjeluju u ranoj i kasnoj fazi alergijske reakcije. DDP – donji dišni putovi; ECP – eozinofilni kationski protein; GDP – gornji dišni putovi; GM-CSF - čimbenik poticanja granulocitnih i makrofagnih kolonija; IgE – imunoglobulin E; IL – interleukin; KAR – kasna alergijska reakcija; MBP – glavni bazni protein; PAF – faktor aktivacije trombocita (eng. *Platelet-Activating Factor*); TGF- α - transformirajući faktor rasta α ; Th0 – pomoćnički limfociti 0; Th1 - pomoćnički T limfociti 1; Th2 - pomoćnički T limociti 2; Treg – regulacijske T-stanice; TNF α faktor tumorske nekroze α ; TSLP - (eng. *Thymic Stromal Lymphopietin*); RANTES - kemokin kemoatraktant monocita, limfocita T, stanica ubojica, eozinofilnih i bazofilnih granulocita (eng. *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*); RAR – rana alergijska reakcija; (preuzeto iz 75).

1.1.4.1.3. Kiseli i oksidativni stres

Kliničke studije su pokazale da zakiseljavanje tekućine koja oblaže dišne putove (FELF, eng. *Respiratory Extracellular Lining Fluid*) ima ulogu u patofiziologiji astme uzrokujući pojavu bronhokonstrikcije, povećanje viskoznosti sluzi, smanjene pokretljivosti cilija, razvoj upale, te u konačnici, oštećenje respiratornog epitela (76-79).

Oksidativni stres u astmi je uzrokovan inhalacijom alergena i otpuštanjem reaktivnih supstancija iz upalnih stanica (80). Dokaz o povećanom oksidativnom stresu u astmi su povećana koncentracija 8-izoprostana (produkt oksidirane arahidonske kiseline) u kondenzatu izdahnutog zraka (81) i povišeni etan (produkt peroksidacije masnih kiselina) u izdahnutom zraku astmatičara (82). Nadalje, niska razina antioksidanata u prehrani je povezana s većom prevalencijom astme (83). Povećani oksidativni stres je povezan s težinom bolesti, pojačava upalni odgovor i smanjuje odgovor na kortikosteroidnu terapiju.

1.1.4.2. Remodeliranje bronha

Remodeliranje bronha je proces koji dovodi do promjena u strukturi bronha što rezultira pojavom ireverzibilne opstrukcije bronha. Taj proces podrazumijeva hipertrofiju mišića, neoangiogenezu i povećanu prokrvljenost, kroničnu infiltraciju upalnim stanicama, hiperplaziju vrčastih stanica, depoziciju kolagena, zadebljanje bazalne membrane i smanjenje elastičnosti zida dišnih putova. Zadebljanje bazalne membrane korelira s težinom bolesti, kronicitetom i bronhalnom hiperreaktivnošću (84).

1.1.5. Postupci dijagnosticiranja astme

Dijagnoza astme u dječjoj dobi i dalje predstavlja izazov kliničarima zbog raznolikosti kliničke slike i nedostatka „zlatnog standarda“ (85-86). Dijagnoza se postavlja na temelju obiteljske anamneze, čimbenika rizika, opisa simptoma, dijagnostičkih testova i terapijskog odgovora (87).

Postupci dijagnosticiranja astme dječje dobi uključuju:

1. Povijest bolesti - anamnezu:

- a. osobnu anamnezu (kašalj, zviždanje u prsima, pritisak u prsima, posebno u naporu, noću ili u rano jutro, tijekom respiratornih infekcija, kašalj nakon smijeha/plača, izloženost hladnom zraku, učestalost i trajanje simptoma, sezonska odnosno cjelogodišnja pojava simptoma, dob pojave, progresija simptoma, postojanje simptoma drugih atopijskih bolesti, itd.),

- b. obiteljsku anamnezu (postojanje astme, alergijskog rinitisa, sinuitisa, nosnih polipa, cistične fibroze),
 - c. socijalnu anamnezu (opis stana ili kuće, grijanje, vlažnost, izloženost grinjama, plijesnima, kućnim ljubimcima, duhanskom dimu, stupanj edukacije roditelja, zaposlenost roditelja, itd.)
2. Klinički pregled treba uključivati opći status bolesnika uz obvezatan status gornjih i donjih dišnih putova te mjerenje vitalnih parametara (broj respiracija u minuti, frekvencija pulsa, saturacija krvi kisikom) (88).
 3. Laboratorijsku obradu: određivanje apsolutnog broja eozinofilnih granulocita u krvi, koncentraciju ukupnog i specifičnih IgE u serumu, te po mogućnosti određivanje biomarkera iz krvi i ostalih bioloških tekućina i tkiva (npr. određivanje koncentracije ECP-a u induciranom sputumu, bronhoalveolarnom ispirku, kondenzatu izdaha te ispirku nosne šupljine).
 4. Kožno alergološko testiranje (kožni prick [ubodni] test) (89).
 5. Ocjenu plućne funkcije: mjerenje vršnog ekspiratornog protoka (PEF, eng. *Peak Expiratory Flow*), spirometrija u djece starije od 4 godine, farmakodinamski test – postotak reverzibilnosti FEV₁ nakon primjene bronhodilatatora, te tjelesna pletizmografija (za mjerenje plućnog volumena i rezistencije u dišnim putovima) (90-91).
 6. Mjerenje dušičnog oksida u izdahu (F_ENO, eng. *Fractional exhaled NO*), što ga Američko torakalno društvo (ATS, eng. *American Thoracic Society*), te Europsko respiratorno društvo (ERS, eng. *European Respiratory Society*) preporučuju kao dodatnu dijagnostičku pretragu i važan parametar u praćenju oboljelih od astme, kao pokazatelja stupnja upale u dišnim putovima (92).
 7. Rendgenska snimka pluća (postero-anteriorna i lateralna) obično se preporuča u početnoj obradi djece koja imaju astmu, posebno ako su u egzacerbaciji bolesti, ili ako postoje diferencijalno-dijagnostičke dvojbe. Radiogram pluća svakako se preporučuje učiniti ako postoji dilema glede dijagnoze bolesti, primjerice sumnja na strano tijelo, bronhiolitis, cističnu fibrozu, itd (93).

1.1.6. Diferencijalna dijagnoza astme

U diferencijalnoj dijagnostici astme u djece potrebno je isključiti odnosno dokazati slijedeće bolesti: aspiraciju stranog tijela, cističnu fibrozu, strukturne abnormalnosti gornjih i donjih dišnih putova, imunodeficijencije; te bolesti koje su često pridružene astmi, npr.

gastroezofagealna refluksna bolest, alergijski rinitis/sinusitis, opstruktivnu apneju u snu, itd (94).

1.1.7. Fenotipovi i endotipovi astme

Fenotipovi, odnosno podtipovi astme, karakterizirani su određenim kliničkim i morfološkim obilježjima bolesti, i za razliku od endotipova astme, nisu izravno uvjetovani patofiziološkim mehanizmima bolesti. Endotipom se smatraju vrste astme koje obilježava molekularna heterogenost nastala kao posljedica različite imunopatogeneze i/ili terapijskog odgovora. Svaki endotip može obuhvaćati više fenotipova astme kao što i određeni fenotipovi mogu biti prisutni u više endotipova. Prepoznavanje određenih fenotipova i endotipova astme u djece važno je za odabir terapije i praćenje terapijskog učinka. Preklapanje pojedinih fenotipova astme, nedostatak specifičnih biomarkera, mijenjanje fenotipova tijekom rasta i razvoja djeteta, kao i neprepoznavanje dominantnog tipa upale, još uvijek onemogućava individualizirani pristup liječenju astme u djece (95).

Prema konsenzusu PRACTALL (eng. *Practicing Allergology*) o dječjoj astmi (prve međunarodno prihvaćene smjernice usredotočene samo na astmu u djece), dva kriterija, dob i pokretači astme, predstavljaju temelj fenotipizacije astme u djece. Dob je jedan od najsnažnijih određujućih čimbenika fenotipizacije astme u djece i uključuje patofiziologiju, izloženost okolišnim čimbenicima i prirodni tijek bolesti. Zbog različite prezentacije bolesti u različitoj dobi, potrebno je razmatranje u odvojenim dobnim skupinama:

- mala djeca (0-2 godine)
- predškolska djeca (2-6 godina)
- školska djeca (6-12 godina)
- adolescenti

Prema europskim smjernicama (85), temeljem dominantnog pokretača astme, u djece starije od 2 godine, predložena su 4 različita fenotipa astme: astma inducirana virusima, astma inducirana naporom, alergijska astma, te još nerazjašnjena astma (moguće uzrokovana različitim iritansima).

1.1.8. Podjela i kontrola astme

1.1.8.1. Podjela astme prema stupnju kontrole astme

Prema stupnju kontrole bolesti *Global Initiative for Asthma* (GINA) smjernice predlažu podjelu astme na kontroliranu, djelomično kontroliranu i nekontroliranu (8, Tablica 1).

Tablica 1. Podjela astme prema stupnju kontrole.

Svojstva	Kontrolirana	Djelomično kontrolirana (svako svojstvo/tjedno)*	Nekontrolirana
Dnevni simptomi	Nema (2x ili manje tjedno)	Više od 2x tjedno	
Ograničenje aktivnosti	Nema	Svako	
Noćni simptomi	Nema	Svaki	3 ili više svojstava djelomično kontrolirane tjedno**
Potreba za beta-2 agonistima kratkog djelovanja	Nema (2x ili manje tjedno)	Više od 2x tjedno	
Plućna funkcija (PEF ili FEV₁)	Normalna	<80%	
Egzacerbacije	Nema	1 ili više godišnje**	Tjedno***

FEV₁ - forsirani ekspiracijski volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi; PEF – vršni ekspiracijski protok.

* tjedan se odnosi bilo koji od zadnje kontrole

** potreba revizija terapije

*** u bilo kojem tjednu od zadnje kontrole

1.1.8.2. Kontrola astme (smjernice za djecu)

Preporučeni parametri za praćenje kontrole astme prema ATS/ERS smjernicama su: dani bez simptoma, potreba za beta-2 agonistima kratkog djelovanja (SABA), vrijednost forsiranog ekspiratornog volumena u 1. sekundi (FEV₁) prije i poslije primjene bronhodilatatora, egzacerbacije (unazad 1-4 tjedna), upitnik o kontroli astme (ACT, eng. *Asthma Control Test*), kvaliteta života, hiperreaktivnost dišnih putova, biomarkeri, nuspojave lijekova, upotreba kortikosteroida (CS), posjete liječniku (hitna ambulanta ili hospitalizacija), mortalitet zbog astme (96, Tablica 2).

Tablica 2. Preporučeni parametri kontrole astme.

	Osnovno	Poželjno	Neobavezno
Početne karakteristike na inicijalnoj viziti	- dani bez simptoma * - potreba za beta-2 agonistima kratkog djelovanja - pre BD FEV ₁ - post BD FEV ₁ - ACT upitnik - kvaliteta života	- dani bez simptoma/potreba za beta-2 agonistima kratkog djelovanja/PEF * - hiperreaktivnost dišnih putova - biomarkeri - nuspojave lijekova - egzacerbacije	- FEV ₁ na terapiji
Parametri procjene terapijskog uspjeha ... na trenutnoj kliničkoj viziti	- dani bez simptoma * - potreba za beta-2 agonistima kratkog djelovanja - ACT upitnik - egzacerbacije (unazad 1-4 tjedna)** - kvaliteta života	- FEV ₁ na terapiji - dani bez simptoma/potreba za beta-2 agonistima kratkog djelovanja/PEF * - upotreba kortikosteroida, posjete liječniku (hitna ambulanta ili hospitalizacija)	- biomarkeri - hiperreaktivnost dišnih putova - post BD FEV ₁
... na pojavu budućih rizika	- egzacerbacije (unazad 1-4 tjedna)** - post BD FEV ₁ - ACT - nuspojave lijekova - pre BD FEV ₁	- dani bez simptoma/potreba za beta-2 agonistima kratkog djelovanja/PEF * - upotreba kortikosteroida, posjete liječniku (hitna ambulanta ili hospitalizacija), mortalitet zbog astme - hiperreaktivnost dišnih putova - biomarkeri	

ACT – Asthma Control Test; BD – bronhodilatator; FEV₁ . forsirani ekspiracijski volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi; PEF – vršni ekspiracijski protok.

* ustanovljeno prema dnevniku astme;

**teške egzacerbacije su definirane kao događaji koji zahtijevaju primjenu sistemskih kortikosteroida ≥ 3 dana i/ili hospitalizaciju/posjetu hitnoj ambulanti zbog potrebe za sistemskim kortikosteroidima.

1.1.8.3. Dijagnostičke metode u praćenju aktivnosti (kontrole) astme

1.1.8.3.1. Spirometrija

Spirometrija je metoda kojom se mjeri kapacitet pluća i brzina protoka zraka kroz dišne putove. U retrospektivnoj studiji na 13,842 djece progresivno smanjenje egzacerbacija astme je bilo povezano s porastom forsiranog ekspiratornog volumena u 1. sekundi (FEV₁, eng. *Forced Expiratory Volume in 1 second*). FEV₁ je također bio neovisni prediktivni čimbenik egzacerbacija astme, te su djeca s FEV₁<60% imali dvostruko veću vjerojatnost da će imati astmatski napadaj u narednoj godini nego djeca s FEV₁>80% (97). Ne postoje kontrolirane studije slučajnog odabira koje bi pratile promjene FEV₁ s kontrolom astme, tako da je FEV₁

kao samostalni parametar slab marker postojeće upale u astmi (98). Ograničenje FEV₁ je također viđeno u studiji CAMP (*Childhood Asthma Management Program*) gdje je granični FEV₁ uključenih bolesnika bio >93%, dok je trećina tih bolesnika trebala sistemski kortikosteroid u narednih 6 mjeseci (99).

1.1.8.3.2. Subjektivni doživljaj simptoma astme: ACT/AQLQ

Simptomi astme su raznoliki i često specifični za pojedinog bolesnika. Glavni simptomi koji se pojavljuju u astmi su zaduha, kašalj, piskanje (*wheezing*), pritisak u prsištu. U svrhu objektiviziranja subjektivnog poimanja bolesti potrebna su validirana psihometrijska pomagala. Jedan od njih je i upitnik o kontroli astme (ACT), koji služi za procjenu kontrole astme. Taj test sadrži 5 - 7 pitanja (ovisno o dobi) koja ispunjavaju bolesnik i roditelji (za dob 4-11 godina). Napravljen je u svrhu otkrivanja djece s neadekvatno kontroliranom astmom, na što upućuje zbroj bodova manji od 19. Test je validiran u studiji učinjenoj na 244 bolesnika (100).

Znatno opsežniji su različiti upitnici o kvaliteti života koji daju značajno opsežniji uvid o subjektivnom doživljaju bolesti sveukupno te po pojedinim domenama. Jedan od takvih upitnika koji ocjenjuje za bolest vezanu kvalitetu života je upitnik autorice Elizabeth F. Juniper (AQLQ, eng. *Asthma Quality of Life Questionnaire*) koji je sastavljen kako bi odredio veličinu problema koje djeca u dobi od 7. do 17. godine imaju zbog astme. On uključuje 32 stavke iz 4 domene (simptomi, ograničenja aktivnosti, okolišni čimbenici i emocionalna funkcija) (101). Zbog činjenice da često roditelji imaju krivu percepciju o kvaliteti života djece, djecu astmatičare važno je pitati o njihovom doživljaju simptoma. Naime, studija je pokazala da je 21% roditelja opisalo da je astma u njihove djece dobro kontrolirana, iako je njihovo dijete imalo egzacerbaciju astme u zadnja 3 mjeseca (102). Studija koja je primijenila AQLQ pokazala je da astmatičari s hiperreaktivnošću bronha na metakolin imaju značajno smanjenu kvalitetu života u odnosu na astmatičare koji nisu odgovorili na bronhalnu provokaciju metakolinom (103).

1.1.8.3.3. Ukupni IgE

Alergija je usko povezana s astmom u djece. U studiji 216 djece, preosjetljivost na barem jedan alergen je dokazana u 88,2% ispitanika. Intenzitet alergijske preosjetljivosti nije bio povezan s težinom astme. Ukupni IgE je bio značajno povećan u djece liječene kortikosteroidima i one koja su hospitalizirana zbog astme. Ti rezultati ukazuju da visoka koncentracija uIgE može biti povezana s teškom astmom u djece (104). U studiji 190 bolesnika s alergijskom astmom logaritam koncentracije uIgE-a bio je značajno viši u

ispitanika s nekontroliranom astmom. Koncentracija uIgE-a je ostala povećana usprkos terapiji inhalacijskim kortikosteroidima (ICS, eng. *Inhalatory Corticosteroids*) i to u dozi značajno višoj u usporedbi s dozom ICS-a u terapiji ispitanika s dobro kontroliranom astmom. Nadalje, logaritam uIgE-a je bio povezan s povećanim brojem eozinofilnih granulocita u krvi i smanjenim vrijednostima FEV₁ ali samo u skupini nekontroliranih astmatičara (105).

1.1.9. Egzacerbacija astme

Egzacerbacija astme podrazumijeva akutnu ili subakutnu epizodu progresivnog pogoršanja simptoma bolesti udruženu s opstrukcijom dišnih putova (106). Egzacerbacije mogu varirati od sasvim blagog, kratkotrajnog pogoršanja popraćenog podražajnim kašljem i blagom zaduhom pa sve do vrlo teškog, po život opasnog stanja (8).

1.1.10. Liječenje astme

U liječenju astme u djece u našoj zemlji primjenjuju se GINA smjernice, PRACTALL-ove smjernice te smjernice Internacionalnog konsenzusa za pedijatrijsku astmu (eng. *International consensus on [ICON] pediatric asthma*) (8, 85, 106). Prema smjernicama, u liječenju astme u djece preporučuje se tzv. holistički (cjeloviti) pristup koji uključuje implementaciju svih bitnih komponenata liječenja kako bi se postigla dobra ili potpuna kontrola bolesti. Holistički pristup liječenju astme u djece uključuje: edukaciju djece i roditelja, prepoznavanje i izbjegavanje okidača, primjenu odgovarajućih lijekova, prepoznavanje bolesnika podobnih za liječenje alergen-specifičnom imunoterapijom (106). Odabir odgovarajućeg liječenja ovisi o težini bolesti (povremena astma, blaga, umjerena i teška trajna astma), stupnju reverzibilnosti, aktivnosti bolesti (egzacerbacije povezane s virusnim infekcijama, izloženosti alergenima ili tjelovježbom) i dobi pojave bolesti (dojenačka, dječja ili odrasla dob) (9).

1.1.10.1. Edukacija i praćenje

Edukacija bolesnika s astmom, odnosno roditelja djece s astmom, provodi se putem tzv. astma škola i škola disanja. Bolesnik treba dobiti što više obavijesti o različitim aspektima svoje bolesti: uzroku bolesti, načinima izbjegavanja pokretača alergijske reakcije, načinu i tijeku pojave simptoma, prepoznavanju simptoma i procjeni njihove težine, odabiru lijekova, načinu pravilne primjene lijekova i procjeni njihova učinka (8, 85).

1.1.10.2. Prepoznavanje i izbjegavanje okidača

Obzirom da je u dječjoj dobi najčešće alergijska astma potrebno je svakom djetetu učiniti alergološku obradu radi identifikacije alergena na koje je dijete senzibilizirano te prema tome savjetovati prilagođavanje mjera kontrole okoliša, izbjegavanje alergena, prilagoditi terapiju te planirati praćenje bolesnika. Prema podacima iz literature mjere izbjegavanja nekih alergena (alergeni epitela i dlake mačke, psa, hrčka, konja) mogu biti korisne u prevenciji simptoma bolesti i nastanku senzibilizacije (107). Broj grinja u kući može se smanjiti pojačanim higijenskim mjerama (uključujući redovito pranje posteljine i odjeće u vrućoj vodi, korištenje nepropusnih prekrivača za madrace), održavanjem manje vlažnosti provjetravanjem prostorija ili primjenom skupljača vlage (108). Također je potrebno i izbjegavati nespecifične pokretače kao što su duhanski dim, onečišćivači zraka, stres i infekcije.

1.1.10.3. Farmakoterapija astme u djece

Cilj liječenja astme je kontrola simptoma i prevencija egzacerbacija uz minimum nuspojava primijenjenih lijekova (8). Farmakoterapija astme temelji se na spoznaji da je opstrukcija dišnih putova u astmi uzrokovana spazmom bronhalnih mišića uz različiti stupanj upale dišnih putova, edem, pojačanu sekreciju sluzi i infiltraciju upalnim stanicama. Stoga razlikujemo dvije skupine lijekova: simptomatski lijekovi (*reliever medications*), kojima se liječi akutni napadaj bronhoopstrukcije, i osnovni lijekovi (*controller medications*) koji djeluju na alergijsku upalu u dišnim putovima i sprječavaju egzacerbacije bolesti. Prvu skupinu lijekova čine: beta 2-agonisti kratkog djelovanja i ostali bronhodilatatori, a u nas najčešće primjenjivani lijek je salbutamol. Osnovni lijekovi su: inhalacijski kortikosteroidi (ICS, eng. *Inhalatory CorticoSteroids*), antagonisti leukotrijenskih receptora (LTRA, eng. *LeukoTriene Receptor Antagonist*) i beta-2 agonisti dugog djelovanja (LABA, eng. *Long-Acting Beta agonist*) (8, 85).

ICS značajno smanjuju simptome astme, potrebu za primjenom beta-2-agonista kratkog djelovanja, poboljšavaju plućnu funkciju, smanjuju učestalost i težinu egzacerbacija, kao i potrebu za hospitalizacijom zbog pogoršanja astme (109). Većina djece s blagom astmom dobro je kontrolirana niskim dozama ICS-a (Tablica 3). Srednje visokim dnevnim dozama ICS-a smatraju se doze koje su dvostruko više od niskih doza, a visokim dozama ICS-a četverostruko više od niskih doza. Izuzetak su triamcinolon i flunizolid, za koje se trostruko više doze od niskih doza smatraju visokim dozama.

Tablica 3. Ekvipotentne doze inhalacijskih kortikosteroida koji se rabe u liječenju astme u djece.

Lijek	Niske dnevne doze (μg)
beklometazon-dipropionat (HFA)	100
Budezonid	100
budezonid (preko raspršivača)	250
Ciklezonid	80
flunizolid (HFA)	160
flutikazon proprionat	100
mometazon furoat	100
triamcinolon acetonid	400

HFA - potisni plin hidrofluoroalkan (eng. *hydrofluoroalkane*).

Nakon što je postignuta kontrola astme u bolesnika, dozu ICS-a potrebno je postupno snižavati, do najnižih učinkovitih doza. Optimalnu djelotvornu dozu potrebno je odrediti individualno za pojedinog bolesnika misleći pri tome na njihove potencijalne lokalne (orofaringealna kandidijaza, disfonija, kašalj zbog iritacije gornjih dišnih putova) i sistemske nuspojave (adrenalna supresija, osteoporoza, katarakta, pojava modrica po koži) (8).

U našoj zemlji od lijekova iz skupine leukotrijenskih antagonista (LTRA) u liječenju astme u djece primjenjuje se montelukast. Montelukast je dokazano djelotvoran u kontroli simptoma astme, poboljšanju plućne funkcije, prevenciji egzacerbacija i hospitalizacija zbog astme (110-111). U odnosu na ICS LTRA je nešto lošiji lijek u kontroli astme, iako u pojedinim bolesnika ima isti ako ne i djelotvorniji učinak (112-113). LTRA se rabi kao dodatna terapija ICS-u, pri čemu se može primjenjivati niža doza ICS-a, ali se pokazao manje djelotvornim u usporedbi s beta-2-agonistom dugog djelovanja (LABA) (114).

Beta-2 agonisti dugog djelovanja, salmeterol i formeterol, u liječenju astme u djece primjenjuju se samo u fiksnim kombinacijama s ICS-om i to u liječenju težih stupnjeva astme u djece starije od 5 godina. Kombinacijsko liječenje ICS+LABA ima bolji učinak na kontrolu astme nego povišenje doze ICS-a (115-116).

Imunoterapija specifična za alergen (SIT) provodi se primjenom rastućih doza alergenskog ekstrakta u svrhu induciranja trajne kliničke tolerancije u bolesnika koji su na isti alergen specifično senzibilizirani. Danas se provodi na dva osnovna načina: davanjem alergenskog ekstrakta ispod kože (supkutana imunoterapija) ili pod jezik (sublingvalna imunoterapija). Dokazana je klinička djelotvornost SIT-a u djece s alergijskom astmom i/ili alergijskim rinitisom/rinokonjunktivitisom, koja su alergična na grinje, pelud stabala, trava ili korova te mačje dlake, posebno ako su djeca monosenzibilizirana na neki od navedenih alergena (117).

1.2. Biomarkeri

1.2.1. Definicija biomarkera

Biomarker je molekula iz krvi ili ostalih bioloških tekućina i tkiva koja se može objektivno mjeriti u svrhu otkrivanja normalnih i patoloških procesa, te ispitivanja odgovora na terapijsku intervenciju. Biomarkeri su od neprocjenjive koristi u otkrivanju bolesti, stupnjevanju težine i aktivnosti bolesti, postavljanju prognoze bolesti, te procjeni i praćenju kliničkog odgovora na liječenje. Validirani biomarkeri su od velike važnosti i u ranim kliničkim istraživanjima gdje služe kao dokaz mehanizma djelovanja novog lijeka (118). Karakteristike idealnog biomarkera su sljedeće (119):

- a. klinička važnost: biomarker ima sposobnost da prati promjene patološkog procesa i/ili terapijske intervencije u relativno kratkom vremenskom periodu,
- b. osjetljivost i specifičnost za određenu intervenciju,
- c. pouzdanost i reproducibilnost laboratorijskog testa kojim se biomarker mjeri,
- d. jednostavnost uzorkovanja bioloških uzoraka (neinvazivne ili seminivazivne tehnike) i jednostavnost mjerenja biomarkera što omogućuje široku primjenu.

1.2.2. Biomarkeri u astmi

Funkcionalni plućni testovi i simptomi bolesti slabo odražavaju upalna zbivanja u dišnim putovima (120). Upravo zbog tog nedostatka tradicionalnih parametara kontrole astme pojavila se potreba za razvijanjem novog načina detekcije lokalnoga patološkog procesa u dišnim putovima. Smatra se da svaka biološka tvar uključena u upalnu kaskadu može biti biomarker upale u astmi.

Karakteristike idealnog biomarkera u dječjoj astmi uvelike su uvjetovane osobitostima dječje populacije, u smislu poštenog uzorkovanja materijala za određivanja biomarkera, ali i složene patofiziologije i fenotipizacije dječje astme. Validacijski kriteriji za biomarker se definiraju prema svrsi za koju je biomarker namijenjen te se trebaju standardizirati, u konkretnoj populaciji sa sljedećim ciljevima (121):

- a) dobivanje bioloških uzoraka na jednostavan i neinvazivan način,
- b) uporaba osjetljivih, specifičnih i reproducibilnih metoda za određivanje biomarkera,
- c) referentne vrijednosti staničnih i humoralnih biomarkera u različitim biološkim uzorcima za sve pedijatrijske dobne skupine,

- d) identifikacija idealnog biomarkera koji bi razlikovao eozinofilnu alergijsku upalu od drugih tipova bronhalne upale,
- e) određivanje profila biomarkera koji bi pomogli u otkrivanju ključnog patomehanizma (upala, oksidativni stres, remodeliranje) u akutnoj egzacerbaciji astme kao i u asimptomatskoj fazi kronične upale dišnih putova,
- f) određivanje uloge sistemske upale,
- g) povezanosti različitih biomarkera s kliničkim parametrima i njihova dijagnostička uspješnost,
- h) pronalaženje alata za praćenje bolesti i procjenu terapijskog odgovora,
- i) predviđanje kliničkog tijeka upale i prognoze bolesti.

Zadatak je istraživača razviti reproducibilnu, osjetljivu i specifičnu metodu detekcije upale u dišnim putovima s konačnim ciljem pronalaženja idealnog neinvazivnog biomarkera s najboljim dijagnostičkim i prognostičkim potencijalom.

1.2.2.1. Metodologija uzorkovanja bioloških uzoraka za analizu biomarkera upale u dječjoj astmi

Biološki uzorci za analizu upalnih biomarkera mogu se dobivati invazivnim, minimalno invazivnim i neinvazivnim metodama. Prema stupnju invazivnosti dobivanja bioloških uzoraka u praćenju i liječenju bolesti dišnih putova razlikuju se sljedeći uzorci, od najinvazivnijih prema najpoštednijima: bronhalni/nazalni bioptat, bronhoalveolarni ispirak (BAL, eng. *BronchoAlveolar Lavage*), bronhalni/nazalni obrisak, krv, sputum, kondenzat izdaha, izdahnuti plinovi, mokraća.

Podaci dobivani analizom upalnih biomarkera iz seruma i mokraće, prije odražavaju sistemska upala nego upalu lociranu u dišnim putovima čime je smanjena osjetljivost i specifičnost dobivenih podataka. Lokalnu upalu u astmi najbolje predstavljaju biomarkeri iz velikih (>2 mm unutarnji promjer) i malih (<2 mm unutarnji promjer) dišnih putova dobiveni invazivnim tehnikama (bronhalni bioptat, bronhoalveolarni ispirak, bronhalni obrisak), laboratorijski i vremenski zahtjevnim tehnikama (inducirani sputum) ili neinvazivnim, poštednim tehnikama (kondenzat izdaha, izdahnuti plinovi) (122).

Inducirani sputum je poštednija metoda dobivanja intraluminalnog bronhalnog sadržaja od biopsije bronha i BAL-a te stoga prihvatljivija u dječjoj populaciji. Sputum se može inducirati pomoću hipertonične (4,5%) otopine u djece starije od 6 godina (123) no uspješnost uzrokovanja varira od 68-100% (124). Centrifugiranjem uzorka moguće je analizirati topive biomarkere u nadtalogu te stanice u sedimentu. Određivanjem broja eozinofilnih granulocita

može se potvrditi egzacerbacija astme u djece ili potvrditi postojanje teške perzistentne astme. U nadtalogu je moguće mjeriti brojne upalne biomarkere (granulocitne proteine, proteaze, citokine, kemokine i eikosanoide) no zbog nestandardiziranosti analize njihova je usporedba otežana (75). Metoda je tehnički i vremenski vrlo zahtjevna (oko 3 h). Nadalje, postoji značajan rizik od bronhospazma (8%) i pojačanja upalne reakcije koja može trajati i do 24 h (125). Inducirani sputum odražava promjene u velikim dišnim putovima, podložan je kontaminaciji iz gornjih dišnih putova i usne šupljine, a reproducibilnost rezultata ne zadovoljava analitičke kriterije. Stoga, inducirani sputum nije prihvatljiva metoda za rutinsku primjenu u dječjoj dobi.

Uzorkovanje kondenzata izdahnutog zraka je novija, potpuno neinvazivna metoda za izravnu procjenu upale u dišnim putovima u stvarnom vremenu. Metoda je jednostavna i visoko reproducibilna, (126) a rezultati analize KI reflektiraju promjene primijećene drugim invazivnim metodama (127-129). Izdah se sastoji od plinovite faze s hlapljivim spojevima (npr. NO, CO) i tekuće faze u kojoj se mogu mjeriti upalni biomarkeri topivi u vodi. Još uvijek nije poznato podrijetlo sadržaja kondenzata izdaha, kao niti točan mehanizam njegova nastanka. Ipak, čini se da vrtloženje zraka tijekom disanja ima važnu ulogu u nastanku aerosola (130). Sadržaj kondenzata izdaha je danas područje intenzivnog istraživanja. U Tablici 4 prikazani su potencijalni biomarkeri upale u izdahu i kondenzatu izdaha (131).

Tablica 4. Potencijalni biomarkeri upale u izdahu i kondenzatu izdaha (preuzeto iz 130).

Izdah	Kondenzat izdaha
NO	Adenozin
CO	Amonijak
Etan	H ₂ O ₂
Pentan	interleukini (npr. 1, 4, 6, 8), IFN γ
hlapljivi ugljikovodici	endotelin-1
hlapljivi organski pojevi	pH
	8-izoprostani
	aldehidi
	nitriti, nitrati, nitrozotoli, nitrotirozin
	leukotrijeni, prostaglandini
	Glutation

CO – ugljikov monoksid; H₂O₂ – vodikov peroksid; IFN γ – interferon gama; NO – dušični oksid.

Metode određivanja za većinu sastojaka kondenzata uglavnom su komercijalno dostupne, manje ili više zadovoljavajuće imunokemijske metode, dok se za neke biomarkere, primjerice 8-izoprostane, preporuča primjena plinske kromatografije–masene spektrometrije, (GC-MS, eng. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) kao mnogo pouzdanije metode. Usprkos analitičkim problemima koji se odražavaju na apsolutne vrijednosti biomarkera u kondenzatu izdaha, relativne razlike između skupina oboljelih i zdravih ispitanika upućuju, međutim, na kliničko značenje određivanja markera upale i drugih spojeva u ovom uzorku.

U Tablici 5 su prikazani prednosti i nedostaci nekih metoda uzorkovanja bioloških uzoraka i upalnih biomarkera u astmi.

Tablica 5. Prednosti i nedostaci nekih metoda uzorkovanja bioloških uzoraka i upalnih biomarkera u astmi (preuzeto iz 75, 121).

Biomarker	Prednosti	Nedostaci
Biopsija tkiva	izravno mjerenje upale u dišnih putova	vrlo invazivna i vremenski zahtjevna metoda, nedostatna povezanosti između upalnih stanica i simptoma, zahtjeva visoku stručnost
Inducirani ispuštam	manje invazivna metoda od biopsije tkiva, pouzdan pokazatelj upale u dišnim putovima	vrlo neugodan proces, limitiran na djecu iznad 8 godina, zahtjeva stručnost, problemi s ponovljivošću
Izdahnuti NO	neinvazivna, jednostavna i standardizirana metoda, izravan rezultat, mogućnost praćenja protuupalne terapije, lokalni biomarker, mogućnost serijskog praćenja	skupa oprema i skupo održavanje, nije specifičan za astmu niti za eozinofilnu upalu
KI – pH i proteini (upalni i neupalni markeri)	neinvazivna metoda, mogućnost određivanja brojnih biomarkera, mogućnost fenotipizacije astme, mogućnost serijskog praćenja, lokalni biomarker, standardizirano uzorkovanje	tehnika uzorkovanja utječe na proteine u uzorku, problematična ponovljivost, kontaminacija slinom, nedokazana klinička značajnost, nedostatak referentnih vrijednosti po dobnim skupinama, skupa oprema nestandardizirani uzorak
Serumski proteini	minimalno invazivna metoda, mogućnost određivanja brojnih biomarkera, mogućnost fenotipiziranja, standardizirane metode, mogućnost serijskog praćenja, ponovljivost	slabo reflektira promjene u dišnim putovima - sistemski markeri, nedokazana klinička značajnost, nedostatak referentnih vrijednost po dobnim skupinama
Metaboliti u ruinu	neinvazivna metoda, brojni biomarkeri, fenotipiziranje, standardizirano uzorkovanje, doba osjetljivost i specifičnost	nedokazana klinička značajnost, skupa i slabo dostupna oprema

1.2.2.2. Lokalni biomarkeri upale

1.2.2.2.1. Frakcionirani izdahnuti NO (F_ENO)

Frakcionirani izdahnuti dušični oksid, F_ENO (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. Prethodne studije su pokazale da se povećane vrijednosti F_ENO-a u astmatičara smanjuju bilo nakon peroralne ili inhalacijske primjene kortikosteroida (CS) i dostižu vrijednosti kao u zdravih ispitanika (132-133). Povezanost s eozinofilnim granulocitima opisana je u radovima gdje je F_ENO pozitivno korelirao s apsolutnim brojem perifernih eozinofilnih granulocita (134). U odraslih ispitanika, F_ENO je korelirao s brojem eozinofilnih granulocita u sputumu te s hiperreaktivnošću na metakolin (135). F_ENO je povezan s bronhalnom hiperreaktivnošću i u odraslih i u djece, a pokazuje slabu povezanost s izoliranim spirometrijskim vrijednostima ili akutnim promjenama u FEV₁ (136), iako su povezanosti primijećene u nekim studijama (137). Postoji i značajna povezanost F_ENO-a s uporabom beta-2 agonista kratkog djelovanja i simptomima astme.

F_ENO nije specifičan za astmu te može biti povećan u alergijskom rinitisu, bolestima paranazalnih sinusa i infekcijama gornjih dišnih putova, tako da se njegova povećana vrijednost ne može promatrati jednoznačno.

1.2.2.2.2. pH i urati u kondenzatu izdaha (KI)

Određivanje biomarkera u kondenzatu izdaha je koristan i minimalno invazivan način procjene upale u dišnim putovima bolesnika s astmom (138). Vrijednosti brojnih biomarkera upale (pH, leukotrijeni, prostaglandini, citokini, kemokini) i oksidativnog stresa (superoksid dismutaza [SOD], 8-izoprostani, željezo/feritin, nitrati/nitriti, NO, aldehidi i glutation) razlikuju se u kondenzatu izdaha astmatičara u odnosu na zdrave ispitanike (121, 131). U nizu biomarkera koje je moguće određivati u KI, najbolje je istražena pH-vrijednost koja reflektira kiselost ili alkalnost otopine koja oblaže dišne putove (FELF). Jedna od prednosti analize pH u odnosu na ostale markere je stabilnost pH u zdravih ispitanika u rasponu od 7,5 do 7,7. Vrijednost pH KI-a djece s astmom nalazi se u kiselijem području nego u zdrave djece (139). Nadalje, pH vrijednost u bolesnika s umjerenom astmom je u kiselijem području u odnosu na vrijednosti u bolesnika s blagom astmom (140). Egzacerbacijom astme pH KI-a se značajno smanjuje na vrijednosti 5,5 do 6,0. U Huntovoj studiji bolesnici s akutnom astmom su imali niže vrijednosti pH KI-a (126) u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu djece sa stabilnom astmom, a vrijednosti su se normalizirale tijekom kortikosteroidne terapije. No, treba biti

svjestan činjenice da se apsolutne vrijednosti pH kondenzata izdaha u različitim istraživanjima ne mogu uspoređivati zbog različitih predanalitičkih postupaka, koji još uvijek nisu standardizirani. Moguća je usporedba samo onih rezultata dobivenih jednakim postupcima.

Mokraćna kiselina (acidum uricum, $C_5H_4N_4O_3$) je končani proizvod metabolizma purina. Nastaje iz ksantina i hipoksantina djelovanjem enzima ksantin oksidaze. Kod fiziološkog pH ($pH > 7$) nalazi se u obliku urata. Istraživanja provedena na kulturi stanica potvrđuju da se u dišnim putovima urati lokalno sintetiziraju. Urati predstavljaju glavni antioksidans u sekretu gornjih dišnih putova (141). Antioksidativni učinak urati ostvaruju direktnim hvatanjem slobodnih radikala ili stvaranjem stabilnih kompleksa sa ionima prijelaznih metala, kao što je željezo, te tako sprečavajući askorbat oksidaciju i lipidnu peroksidaciju. Njihova je koncentracija značajno smanjena u KI djece u egzacerbaciji astme (142).

Imajući u vidu da pH KI-a odražava trenutnu kiselost tekućine koja oblaže dišne putove, a koncentracija urata predstavlja antioksidans u tekućini koja oblaže dišne putove, određivanje tih markera moglo bi pomoći u procjeni akutne upale u dišnim putovima.

1.2.2.2.3. Temperatura izdahnutog zraka (TI)

Mjerenje temperature izdahnutog zraka predstavlja novi, neinvazivni biomarker lokalne upale u dišnim putovima (143). Temperatura izdahnutog zraka je povišena u nekontroliranih astmatičara ($34,9 \pm 0,8^\circ C$) u odnosu na dobro kontrolirane astmatičare ($33,7 \pm 0,8^\circ C$) i zdrave ispitanike ($33,2 \pm 0,2^\circ C$) (144). Temperatura izdahnutog zraka raste za vrijeme egzacerbacije virusno inducirane astme (145). Naporom uzrokovana bronhoopstrukcija (pad FEV_1) kolerira s porastom temperature izdahnutog zraka u astmatičara (146).

1.2.2.1. *Sistemske biomarkere upale*

Sistemske biomarkere upale iz periferne krvi i urina prije reflektiraju sistemske upale nego upalu lociranu u dišnim putovima (121,147). Neki od sistemskih biomarkera koji su povezani s astmom prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Sistemske biomarkere u astmi.

Sistemske biomarker	Referenca
eozinofilni granulociti iz periferne krvi	148, 149, 150, 151
ECP	150, 151, 152, 153, 154, 155, 156
EPO	154
IgE	156, 157
Eotaksin	155, 159
TARC	160
MCP-4	161
IL-4, IL-5, IL-13	152, 162, 163
Periostin	164, 165, 166
hs-CRP	167, 168, 169, 170, 171, 172
urinarni LTE₄	173, 174

ECP – eozinofilni kationski protein; EPO – eozinofilna peroksidaza; hs-CRP – CRP velike osjetljivosti; IgE – imunoglobulin E, IL – interleukin; LTR4 – leukotrijen 4; MCP-4 – eng. *Monocyte Chemotactic Protein-4*; TARC – eng. *Thymus and Activation Regulated Chemokine*.

1.2.2.1.1. Eozinofilni kationski protein (ECP) u serumu

ECP je biomarker, koji zbog aktivacije odnosno degranulacije tkivnih eozinofilnih granulocita, dospijeva u cirkulaciju. Serumska koncentracija ECP-a je povećana u astmatičara tijekom akutne egzacerbacije u odnosu na bolesnike s astmom u remisiji (151). ECP kolerira s eozinofilnom upalom dišnih putova, ali ne i s bronhalnom hiperreaktivnošću. Također se pokazao korisnim u procjeni težine astme, suradljivosti s uzimanjem protuupalne terapije i kao alat koji govori kada smanjiti dozu inhalacijskih kortikosteroida (156). Ipak, ECP nije specifičan za astmu niti za eozinofilnu upalu. Studije u pedijatrijskih pacijenata su pokazale da je koncentracija ECP-a povećana i u djece s cističnom fibrozom i virusnim bronhiolitisom (175).

1.2.2.1.2. Serumski C-reaktivni protein velike osjetljivosti

Serumski C-reaktivni protein velike osjetljivosti, hs-CRP (eng. *high sensitivity C-Reactive Protein*, CRP velike osjetljivosti) je marker sistemske upale niskog stupnja (eng. *low-grade systemic inflammation*) u različitim stanjima kao što su ateroskleroza (176), šećerna bolest, debljina (177). Smatra se da može biti korisno dijagnostičko sredstvo u otkrivanju sistemske upale u astmi (178). Povećana koncentracija hs-CRP-a povezana je s bronhalnom hiperreaktivnošću i respiratornim oštećenjima (167). Također je pokazano da je povećana koncentracija hs-CRP-a povezana s respiratornim simptomima u bolesnika s nealergijskom astmom, ali ne i u bolesnika s alergijskom astmom (168). Takemura je predložio da se hs-

CRP može koristiti kao dobar pokazatelj lokalne upale dišnih putova u bolesnika bez ICS (eng. *inhalatory corticosteroids*, inhalacijski kortikosteroidi) u terapiji (169). Također je poznato da je serumska koncentracija hs-CRP-a signifikantno veća u astmatičara, kako onih u akutnom napadaju tako i onih u kroničnoj fazi bolesti, za razliku od zdravih ispitanika (170). Nedavne spoznaje predlažu da se hs-CRP koristi kao osjetljiv marker teške astme (171). Prethodnim istraživanjem i mi smo pokazali da je u djece s nekontroliranom astmom koncentracija serumskog hs-CRP-a veća u odnosu na djecu s kontroliranom astmom (172).

1.2.2.1.3. Diferencijalna krvna slika (DKS)

Broj eozinofilnih granulocita u perifernoj krvi kolerira s težinom astme i bronhalnom hiperreaktivnošću. Tijekom egzacerbacije bolesti dolazi do porasta broja cirkulirajućih eozinofilnih granulocita, a kortikosteroidna terapija smanjuje njihov broj u cirkulaciji (150). Lewis i suradnici su istraživali povezanost apsolutnog broja eozinofilnih granulocita, neutrofilnih granulocita, bazofilnih granulocita, monocita i limfocita i pojavnost kroničnih respiratornih simptoma, atopije, razine plućne funkcije i bronhalne hiperreaktivnosti u odraslih. Povećan broj monocita je bio povezan s pojavom noćne dispneje, trajnim kašljem, smanjenim FEV₁. Povećani broj bazofilnih granulocita je bio povezan s piskanjem (*wheezing*), noćnom dispnejom, astmom, smanjenim vrijednostima FEV₁, pojačanom bronhalnom hiperreaktivnošću i povećanom razinom ukupnog IgE. Povećan broj neutrofilnih granulocita je bio povezan s noćnom dispnejom, dispnejom u naporu, astmom i sniženim FEV₁. Također je broj eozinofilnih granulocita povezan s povećanom vjerojatnošću za pojavu piskanja, noćne zaduhe, zaduhe u naporu, trajnog kašlja i astme. Povećan broj eozinofilnih granulocita je također neovisni prediktivni čimbenik atopije, sniženog FEV₁, povećane reaktivnosti dišnih putova i povećanog IgE-a (179).

2. HIPOTEZA

Rezimirajući podatke navedene u Uvodu, znanstvena i stručna utemeljenost našeg istraživanja ogleda se u sljedećem:

1. Praćenje upalnih promjena u dišnim putovima presudno je za procjenu kontrole i liječenje astme.
2. Iako se zadnjih 15-tak godina intenzivno traga za idealnim biomarkerom lokalne upale u dišnim putovima, idealan pokazatelj kontrole astme još nije identificiran.
3. Dosadašnji rezultati o povezanosti simptoma astme i upale nisu pokazali jednoznačne rezultate.

Cilj je istraživanja potvrditi ili opovrgnuti postavljenu hipotezu:

1. Vrijednosti upalnih biomarkera statistički se značajno razlikuju u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom.
2. Kombinirajući lokalne i sistemske biomarkere upale moguće je razlikovati nekontroliranu od kontrolirane astme.
3. Vrijednosti upalnih biomarkera povezane su sa simptomima bolesti.

3. CILJEVI

3.1. Cilj rada

Opći ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

- a. usporediti vrijednosti lokalnih i sistemskih upalnih biomarkera u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom,
- b. odrediti dijagnostičku vrijednost upalnih biomarkera u procjeni kontrole bolesti,
- c. utvrditi kombinaciju upalnih biomarkera koja najbolje razlikuje kontroliranu od nekontrolirane astme,
- d. istražiti povezanost upalnih biomarkera sa simptomima bolesti (pojedinačnim simptomima i skupnim zbirom simptoma).

Specifični ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

- a. istražiti povezanost upalnih biomarkera s drugim pokazateljima aktivnosti bolesti (ACT, AQLQ, spirometrija, ukupni IgE, uporaba SABA),
- b. odrediti dijagnostičku vrijednost upalnih biomarkera u predviđanju egzacerbacije bolesti,
- c. utvrditi kombinaciju upalnih biomarkera koja predstavlja najbolji prediktivni model za egzacerbaciju astme.

3.2. Doprinos i očekivana primjena istraživanja

Ovo istraživanje doprinosi boljem razumijevanju uloge upalnih biomarkera u dječjoj astmi. Naglasak je na istraživanju povezanosti biomarkera lokalne i sistemske upale i subjektivnih simptoma astme o čemu su podaci u stručnoj literaturi manjkavi. Od znanstvenog doprinosa je i utvrditi dijagnostičku vrijednost upalnih biomarkera u procjeni kontrole dječje astme kao i predviđanju egzacerbacije bolesti. Procijeniti koji upalni biomarkeri bi se mogli rabiti u rutinskoj dijagnostici i praćenju astme u djece.

4. ISPITANICI I METODE

Ovo istraživanje predstavlja prospektivnu, opservacijsku, usporednu studiju kohorte paralelnih skupina djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom. Dijagnoza astme postavljena je na temelju GINA i ATS/ERS smjernica (8, 180). Istraživanje je provedeno u razdoblju od lipnja 2011. godine do lipnja 2013. godine, u skladu s etičkim načelima (uz odobrenje Etičkog povjerenstva DB Srebrnjak i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu).

4.1. Ispitanici

Ispitanici, djeca i adolescenti (6-18 godina) s postavljenom dijagnozom astme unazad najmanje godinu dana, razvrstani su u dvije skupine:

- I. skupina: djeca s kontroliranom astmom (kontrolirana astma prema GINA smjernicama, 8), N= 50.
- II. skupina: djeca s nekontroliranom astmom (nekontrolirana i djelomično kontrolirana astma prema GINA smjernicama, 8), N=53.

4.1.1. Kriteriji uključivanja

Kriteriji uključivanja u I. skupini bili su dijagnoza astme (podatak o postojanju simptoma astme i prethodno pozitivnom Ventolinskom ili metakolinskom testu) uz kriterije za kontroliranu astmu prema GINA smjernicama (8): izostanak dnevnih simptoma ili prisutnost dnevnih simptoma manje od 2x tjedno, bez ograničenja aktivnosti, izostanak noćnih simptoma, bez potrebe za beta-2 agonista kratkog djelovanja ili potreba za istima manje od 2xtjedno, normalna plućna funkcija, izostanak egzacerbacija.

Kriteriji uključivanja u II. skupinu bili su dijagnoza astme (podatak o postojanju simptoma astme i prethodno pozitivnom Ventolinskom ili metakolinskom testu) uz kriterije prema GINA smjernicama (8): prisutnost dnevnih simptoma više od 2x tjedno, ograničenjem aktivnosti, prisutnošću noćnih simptoma, upotrebom beta-2 agonista kratkog djelovanja više od 2xtjedno, PEF <80% predviđenog ili osobnog maksimuma i pojavom egzacerbacije bolesti 1 ili više godišnje).

Sudjelovali su samo ispitanici čiji su roditelji ili zakonski skrbnici potpisali informirani pristanak i koji nisu imali niti jedan od kriterija neuključivanja.

4.1.2. Kriteriji neuključivanja

Kriteriji neuključivanja za obje ispitivane skupine djece su bili jednaki: popratne bolesti - druge plućne bolesti, GERB, šećerna bolest, sustavne bolesti vezivnog tkiva, tumori, zatim preuhranjenost-pretilost (BMI>85. centile za spol i dob) (181), preboljena infekcija dišnih putova četiri tjedna prije početka istraživanja te druga stanja koja bi potencijalno mogla utjecati na rezultate dijagnostičkih testova. GERB je isključen u djece s kontroliranom astmom na temelju anamnestičkih podataka, a u djece s nekontroliranom astmom na temelju urednog nalaza 24 h pH-metrije jednaka tijekom uobičajenog praćenja i liječenja bolesnika (182). Osim navedenog u ispitivanje i analizu nisu uključena niti djeca koja su pokazivala nesuradnju pri izvođenju dijagnostičkih testova (spirometrija) ili su odustali na vlastiti zahtjev (djeteta i/ili roditelja).

4.2. *Plan istraživanja i istraživačke metode*

U radu je provedena prospektivna, opservacijska, usporedna studija kohorte paralelnih skupina djece s kontroliranom (KA) i nekontroliranom (NA) s ciljem usporedbe lokalnih i sistemskih biomarkera upale u ispitanika s KA i NA, ispitivanja povezanosti biomarkera sa simptomima astme te određivanja dijagnostičke vrijednosti biomarkera u procjeni kontrole bolesti i predviđanja buduće egzacerbacije. Istraživanje je provedeno u Dječjoj bolnici Srebrnjak u periodu od lipnja 2011. do svibnja 2013. godine u dvije faze.

U prvoj fazi istraživanja, ispitanicima su uzeti anamnestički podaci (učestalost simptoma unazad 2 tjedna, egzacerbacije unazad godinu dana, upotreba beta-2 agonista kratkog djelovanja, terapija, nuspojave), učinjen je klinički pregled, spirometrija, bronhodilatacijski test. Ispitanici su ispunili ACT upitnik i upitnik kvalitete života Na temelju procjene dva iskusna kliničara iz područja dječje astme (M.T. i M.N.), dobivenih anamnestičkih podataka, kliničkog pregleda i plućne funkcije, ispitanici su podijeljeni u 2 skupine ovisno u stupnju kontrole astme (KA i NA). Uključivanje bolesnika je trajalo dok obje grupe nisu imale najmanje 50 ispitanika. Nakon uključivanja ispitanicima je učinjeno mjerenje F_ENO-a, sakupljanje kondenzata izdaha, mjerenje temperature izdahnutog zraka i venepunkcija za čije su rezultate kliničari koji su procjenjivali kontrolu bolesti bili slijepi. Tijekom istraživanja ispitanici su koristili terapiju odgovarajuću stupnju kontrole astme u skladu s GINA smjernicama (8).

U drugoj fazi istraživanja, uvidom u elektronsku povijest bolesti, ili telefonskim kontaktom s ispitanikom odnosno skrbnikom, utvrđeno je koliko je ispitanika imalo egzacerbaciju bolesti u periodu od 6 mjeseci nakon uključivanja u istraživanje.

4.3. Metode

Anamneza je uključivala sljedeće podatke: učestalost simptoma astme unazad 2 tjedna, vrijednosti PEF-a, redovitost uzimanja terapije, egzacerbacije unazad godinu dana, hospitalizacije zbog astme unazad godinu dana). Analizirani su sljedeći simptomi: napetost u prsima, otežano disanje, hripanje, kašalj, težina u prsima, potreba za čišćenjem grla, poteškoće s izdisanjem ili udisanjem zraka, buđenje ujutro sa simptomima astme, naprezanje prilikom disanja, buđenje noću zbog astme, nemogućnost da se zbog astme bolesnik dobro naspava, borba da dođe do zraka. Učestalost pojedinih simptoma unazad 2 tjedna procjenjivana je na skali Likertova tipa od 1 do 7: 1=nikada, 2=vrlo rijetko, 3=rijetko, 4=ponekad, 5=često, 6=vrlo često, 7=stalno. Obzirom na složenost definiranja egzacerbacije astme u dječjoj dobi (ATS/ERS), u ovom istraživanju egzacerbacija astme podrazumijeva: pogoršanje simptoma, pogoršanje spirometrijskih vrijednosti (odnosno PEF-a) i povećanu potrebu za beta-2 agonistima kratkog djelovanja.

Upitnik o kontroli astme (ACT test) – za procjenu kontrole astme upotrebljeni su upitnik 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 (Asthma Control Test [ACT] (183, 184). Prema podacima iz literature, za oba testa bodovni zbir od 19 i niže otkriva nekontroliranu astmu u zadnja 4 tjedna (185). 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. Pri davanju odgovara na prva četiri pitanja roditelj može pomagati djetetu, ali mu ne smije sugerirati odgovore. ACT se sastoji od pet pitanja koja vrlo pouzdano diskriminiraju bolesnike s obzirom na razinu plućne funkcije i ukupnu kontrolu bolesti (broj bodova 5-25) te na svih pet pitanja odgovaraju djeca.

Upitnik kvalitete života AQLQ upitnik - preveden na hrvatski jezik, uz dopuštenje autorice Elizabeth Juniper. Upitnik sadrži 32 pitanja iz 4 domene: simptomi, ograničenja aktivnosti, okolišni čimbenici i emocionalno funkcioniranje. Odgovori iz svake domene i ukupni zbir su

stupnjevani na skali od 1-7 gdje „1“ označava stalnu prisutnost, a „7“ potpuni izostanak. Ukupni zbir je zbroj bodova svih odgovora podijeljen s brojem pitanja (186).

Klinički pregled - vitalni znakovi, pregled glave, vrata, toraksa, a po potrebi i ostalih dijelova tijela u skladu s pravilima kliničke propedeutike.

Laboratorijska mjerenja

U uzorcima periferne krvi dobivenim venepunkcijom analizirani su sljedeći parametri: DKS, hs-CRP, ECP te ukupni i specifični IgE. DKS je određivan morfološkom analizom krvnog razmaza. Koncentracija ECP-a u serumu određivana fluoroimunokemijskom metodom na trodimenzionalnom celuloznom nosaču (UniCAP, Phadia, Upssala, Švedska). Koncentracija hs-CRP-a određivana je imunoturbidimetrijskom metodom na selektivnom automatskom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan). Koncentracija ukupnog IgE određivana je enzim imunokemijskom metodom na mikročesticama (MEIA, Abbott). Koncentracija specifičnog IgE određivala se fluoroimunokemijskom metodom (UniCAP, Pharmacia).

U uzorcima kondenzatna izdaha analizirana je katalitička aktivnost α -amilaze kako bi se isključilo zagađenje slinom, pH vrijednost i koncentracija urata. Aspiracijska kapilara za vrijeme aspiracije uzorka bila je uronjena tik do dna posudice s kondenzatom. Aktivnost α -amilaze određena je standardiziranom kontinuiranom fotometrijskom metodom (IFCC, 37 °C, HEPES pufer, Na-klorid, Ca-klorid, EPS-G7-PNP, α -glukozidaza), na automatskom selektivnom analizatoru AU 400 Beckman Coulter (Njemačka). pH vrijednosti kondenzata izdaha određivane su pomoću analizatora Ecosys II (Eschweiler GmbH & Co. KG, Kiel, Njemačka). Koncentracija urata određivana je enzimatskom metodom na automatskom selektivnom analizatoru AU 400 Beckman Coulter (Njemačka), uz primjenu reagensa istog proizvođača. Kako su se vrijednosti urata pri mjerenju negativnih uzoraka (fiziološkom otopinom [3 mL] ispran kondenzor u čašicu za uzorkovanje) kretale u rasponu od 4-10 $\mu\text{mol/L}$ izmjerene su vrijednosti umanjene za 10 $\mu\text{mol/L}$ s time da su negativne vrijednosti računane kao 0 $\mu\text{mol/L}$.

Spirometrija

Spirometrija je mjerena na kompjutoriziranom spirometru (Ganzhorn, Njemačka) prema standardima ATS/ERS (187). Analizirani su: FVC – forsirani vitalni kapacitet; FEV₁ – volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi; PEF – vršni ekspiratorni protok zraka; MEF₇₅ -

maksimalni protok zraka u izdahu pri 75% FVC-a; MEF₅₀ - maksimalni protok zraka u izdahu pri 50% FVC-a; MEF₂₅ - maksimalni protok zraka u izdahu pri 25% FVC-a. Rezultati spirometrije su prikazani kao postotci predviđenih vrijednosti prema Austrijskim normama koje su najprimjerenije za našu populaciju djece (188), a koje se koriste u Dječjoj bolnici Srebrnjak u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

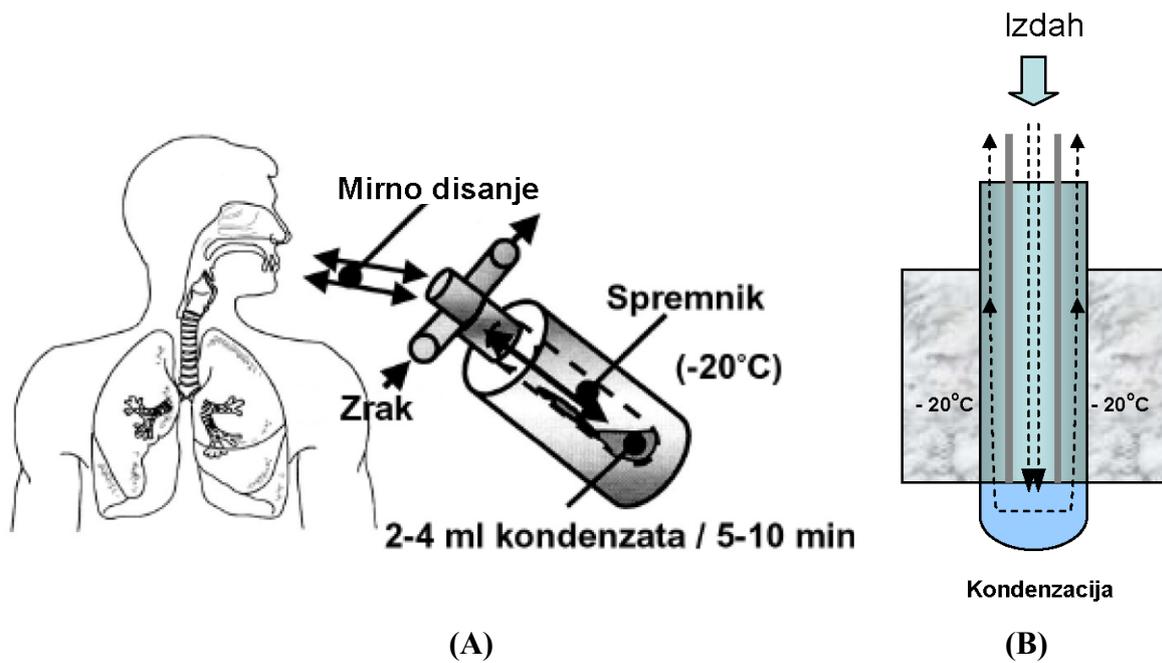
Mjerenje izdahnutog NO

Otpušteni NO prezentira se brzinom izdahnutog NO (vNO), a izračunava se kao umnožak NO koncentracije u nL/L i brzine ekspiratornog protoka izražene u L/min: $vNO(nL/min) = NO(nL/L) \times \text{brzina protoka (L/min)}$. Mjerenje izdahnutog NO učinjeno je po preporukama ATS/ERS (189) na aparatu NiOX (Aerocrine, Švedska) te izraženo u ppb-ima (dijelova na milijardu). Za djecu od 6. do 12. godine vrijednosti ispod 5 su niske, normalne vrijednosti su u rasponu od 5 do 15, visoke od 16 do 25, a vrlo visoke iznad 25. Za djecu i adolescente od 12. do 18. godine vrijednosti ispod 5 su niske, normalne vrijednosti su u rasponu od 5 do 25, visoke od 26 do 35, a vrlo visoke iznad 35 (190).

Kondenzat izdaha

Kondenzat izdaha je prikupljan spontanom disanjem tijekom 15 minuta prema preporuci radnih skupina ATS/ERS (191), korištenjem EcoScreen kondenzora (Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Njemačka). Princip stvaranja kondenzata je ovaj. Ispitanik mirno diše preko usnika kroz cijev u kojoj su odvojeni udahnuti i izdahnuti zrak (slika 2A). Nakon toga zraka prolazni kroz ohlađenu cijev, lamelarni kondenzor, čija je temperatura 0°C do -20°C ovisno o načinu hlađenja. Aerosol i ostali neplinoviti sastojci se kondenziraju na unutrašnjoj stijenci lamelarnog kondenzatora i kapljice padaju u posudu za prikupljanje uzoraka (slika 2B). Za vrijeme skupljanja od 15 minuta prikupi se od 2 do 4 mL kondenzata.

Uzorci kondenzata izdaha su odmah nakon prikupljanja deaerizirani korištenjem inertnog plina argona. Vrijednosti pH kondenzatna izdaha i koncentracija urata određivane su neposredno nakon uzrokovanja (metodologija opisana ranije u tekstu).



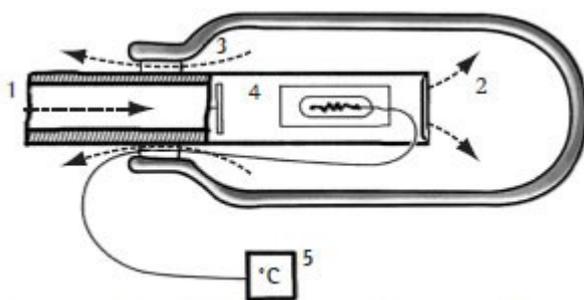
Slika 2. Shematski prikaz uzorkovanja kondenzata izdaha (A) odnosno hlađenja i kondenziranja izdaha (B) (prilagođeno prema Montuschi i Barnes, 2002).

Mjerenje temperature izdaha (TIZ)

TIZ je izmjeren pomoću termometra izdaha X-halo (Delmedica, Singapore) (Slika 3). Ispitanici mirno dišu udišući na nos i izdišući na usta u spremnik. Mjerenje traje između 1-5 minuta odnosno dok temperatura u spremniku ne dosegne plateau (192). Shema načela mjerenja TIZ-a prikazana je na Slici 4.



Slika 3. Termometar izdaha X-halo (Delmedica, Singapore).



Pojednostavljeni shematski prikaz termometra izdaha X – halo – 1: zrak se izdiše u usnik s ventilom; 2: zrak ulazi u spremnik; 3: zrak izlazi iz uređaja; 4. bakrena cijev - metalno srce; i 5: temperatura se bilježi dok se ne stabilizira.

Slika 4. Pojednostavljeni shematski prikaz termometra izdaha X – halo.

4.4. Parametri ishoda

U ovom istraživanju pojam biomarker se odnosio na slijedeće pokazatelje sistemske odnosno lokalne upale: serumski hs-CRP, DKS, serumski ECP; F_ENO, pH i urati u KI te TI.

Primarni ishodi istraživanja su kvantitativna razlika lokalnih i sistemskih biomarkera izražena kao aritmetička sredina odnosno medijan između grupe s nekontroliranom i grupe s kontroliranom astmom.

Sekundarni ciljevi su korelacije između simptoma astme i upalnih parametara, korelacije između pokazatelja aktivnosti astme i biomarkera te dijagnostička vrijednost biomarkera u razlikovanju nekontrolirane i kontrolirane astme i predviđanju egzacerbacije bolesti.

4.5. Statističke metode

Pohrana podataka i priprema za statističku analizu učinjena je u programu Microsoft Excel 2013 (Microsoft, SAD), a statistička obrada podataka u programima za statističku obradu STATISTICA (version 10, StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD), MedCalc (version 12, MedCalc Software, Mariakerke, Belgija) i SPSS (version 15.1; SPSS, Chicago).

Korištena je deskriptivna statistika s obzirom na dob, spol, BMI, atopijski status, terapiju, podatak o prošloj i budućoj egzacerbaciji u periodu praćenja od 6 mjeseci. Primjenom Kolmogorov-Smirnovljevog testa analizirana je distribucija podataka. Varijable s normalnom distribucijom opisane su aritmetičkom sredinom (\bar{x}) i standardnom devijacijom (SD), a varijable s asimetričnom distribucijom medijanom (M) i interkvartilnim rasponom (IQR). Razlike u distribuciji kvalitativnih varijabli utvrđene su χ^2 testom, dok su se za testiranje razlika kvantitativnih varijabli, s obzirom na distribuciju, koristili parametrijski t-test ili neparametrijski Mann-Whitney U-test. Za analize povezanosti i predikcije kvantitativne varijable bez normalne raspodjele prethodno su normalizirane.

Kako bi se utvrdila povezanost pojedinih varijabli, provela se linearna regresijska analiza, univarijantna i multivarijantna analiza. Za kategorijske varijable korištena je logistička regresijska analiza. Multivarijantna diskriminacijska analiza je korištena kako bi se utvrdila najbolja kombinacija biomarkera, temeljem najmanjeg broja pretraga, za najtočniju informaciju o kontroli astme. Kako bi se ocijenila vrijednost pojedinog biomarkera ili kombinacije biomarkera u razlikovanju kontrolirane i nekontrolirane astme, korištena je ROC (eng. *Receiver Operating Characteristic Curve*) krivulja te je izračunata vrijednost površine ispod krivulje AUC (eng. *Area Under Curve*), osjetljivost, specifičnost, pozitivna (PPV) i negativna prediktivna vrijednost (NPV), dijagnostička točnost (DA) i omjeri vjerojatnosti

(LR) (za sve je parametre izračunat i 95%-tni raspon pouzdanosti - CI). Na apscisi ROC-krivulje prikazani su podatci 1-specifičnost, a na ordinati osjetljivost testa. Valjanost je označena s najvećom površinom ispod krivulje, koja podrazumijeva najveću osjetljivost i najveću specifičnost odnosno najveću diskriminacijsku snagu za određenu točku razlučivanja (*cut off*). Idealan test imao bi površinu ispod krivulje 1,0 što znači da takav test uopće ne bi imao ni lažno pozitivnih ni lažno negativnih rezultata. Dogovoreni okvirni sustav vrednovanja dijagnostičke točnosti podrazumijeva sljedeće vrijednosti za AUC (Tablica 7):

Tablica 7. Razlikovna učinkovitost prema vrijednostima površine ispod ROC-krivulje (AUC).

AUC	Razlikovna učinkovitost
0,50 do 0,60	nedovoljno dobra
0,61 do 0,70	dovoljno dobra
0,71 do 0,80	dobra
0,81 do 0,97	vrlo dobra
0,97 do 1,00	izvrsna

AUC – površina ispod krivulje (eng. *Area Under Curve*).

Za identifikaciju prediktora buduće egzacerbacije bolesti korištena je binarna logistička regresija i rezultati su predstavljeni kao omjer šansi (OR, eng. *Odds Ratio*) uz 95%-tni raspon pouzdanosti (CI) i p-vrijednost.

Kao statistički značajna za sve je testove korištena razina značajnosti $p \leq 0,05$.

4.6. Određivanje veličine uzorka

Korištenjem podataka dobivenih u prethodno provedenom istraživanju (172), hs-CRP u ispitanika s nekontroliranom astmom je \bar{x} (SD); 0,83 (0,91) mg/L, a u ispitanika s kontroliranom astmom \bar{x} (SD); 0,33 (0,22) mg/L. Omjer skupina je 1:1, snaga testa (*power*) 90%, uz $\alpha=0,05$. Prema navedenim podacima, minimalni uzorak za je 74 ispitanika (37 ispitanika po skupini; OpenEpi, version 3.01). U ispitivanje je uključeno 103 djece, što je 28% više od potrebnog uzorka.

Korištenjem podataka iz literature (142), KI urata u djece sa stabilnom astmom je \bar{x} (SD); 72 (43,1) $\mu\text{mol/L}$, a u djece tijekom egzacerbacije astme \bar{x} (SD); 18,7 (10,6) $\mu\text{mol/L}$. Omjer skupina je 1:1, snaga testa (*power*) 90%, uz $\alpha=0,05$. Prema navedenim podacima, minimalni

uzorak je 16 ispitanika (8 ispitanika po skupini; OpenEpi, version 3.01). U ispitivanje je uključeno 103 djece, što je 85% više od potrebnog uzorka.

4.7. *Odobrenja i financiranje*

Istraživanje je u cijelosti provedeno u Dječjoj bolnici Srebrnjak (Referentni centar Ministarstva zdravstva za kliničku alergologiju djece), Srebrnjak 100, u Zagrebu.

4.7.1. Odobrenja

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Dječje bolnice Srebrnjak. Da bi dijete sudjelovalo u istraživanju, barem jedan od roditelja ili zakonskih skrbnika, trebao je potpisati informirani pristanak.

4.7.2. Financiranje

Disertacija je izrađena u okviru znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, broj. 277-0000000-3436 (naslov projekta: *Usporedba učinaka dva načina vođenja terapije astme u djece 12-18 godina*).

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike ispitivane populacije

Karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje prikazane su u Tablici 8. U istraživanje je bilo uključeno 103 djece s astmom, 78 (75,7%) dječaka i 25 (24,3%) djevojčica u dobi od 6-18 godina prosječne (\pm SD) dobi 11,7 \pm 3,2 godine. 54 (52,4%) ispitanika je imalo dokazanu senzibilizaciju *in vivo* i/ili *in vitro* testovima na više alergena iz standardne palete alergena (*Dermatophagoides (Der) pteronyssinus*, *Der farinae*, *epitel mačke i psa*, *breza*, *lijeska*, *pelud trava*, *crni pelin*, *ambrozija*, *Cladosporium* i *Alternaria*). 31 (30,1%) ispitanik je imao dokazanu senzibilizaciju na samo jedan specifični alergen, dok 18 (17,5%) ispitanika nije imalo dokazanu senzibilizaciju niti na jedan specifični alergen iz standardne palete. Među senzibiliziranima, 82 (79,6%) ispitanika je za vrijeme trajanja istraživanja bilo izloženo specifičnom alergenu/alergenima. Za vrijeme istraživanja 17 (16,5%) ispitanika je bilo na terapiji salbutamolom po potrebi, 30 (29,15%) ispitanika je bilo na terapiji inhalacijskim kortikosteroidom (ICS), 7 (6,8%) na terapiji montelukastom (LTRA), 5 (4,8%) na terapiji inhalacijskim kortikosteroidom i montelukastom (ICS + LTRA), 42 (40,8%) ispitanika bilo je na kombinacijskoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom i dugodjelujućim beta-2 agonistom (ICS + LABA), dok su 2 (1,9%) ispitanika bila na terapiji kombinacijskim pripravkom i montelukastom (ICS + LABA + LTRA).

Tablica 8. Karakteristike ispitanika (N=103).

Spol, muški, broj (%)	78 (75,7)
Dob, \bar{x} (SD) [raspon], god.	11,7 (3,2) [6-18]
BMI, \bar{x} (SD), kgm ⁻²	18,7 (2,5)
Atopijski status, broj (%)	
Bez dokazane senzibilizacije	18 (17,5)
Monosenzibilizirani	31 (30,1)
Polisenzibilizirani	54 (52,4)
Sezona, broj (%)	82 (79,6)
Trenutna terapija astme, broj (%)	
Salbutamol pp	17 (16,5)
ICS	30 (29,1)
LTRA	7 (6,8)
ICS + LABA	42 (40,8)
ICS + LTRA	5 (4,8)
ICS + LABA + LTRA	2 (1,9)

BMI – indeks tjelesne mase; ICS - inhalacijski kortikosteroidi; LABA - dugodjelujući beta-2 agonisti; LTRA – antagonisti leukotrijena; SD = standardna devijacija; \bar{x} = aritmetička sredina.

5.1.1. Karakteristike ispitanika podijeljenih u skupine prema stupnju kontrole astme

Karakteristike ispitanika prema skupinama su prikazane u Tablici 9. Među djecom s kontroliranom astmom (KA) i nekontroliranom astmom (NA) nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli u odnosu na spol ($\chi^2=0,273$; $df=1$; $p=0,601$), dob ($t=0,268$; $p=0,789$), BMI ($t=-0,979$; $p=0,330$), BMI izražen u percentilima za spol i dob ($t=-1,833$; $p=0,069$), atopijski status ($\chi^2=2,277$; $df=2$; $p=0,320$), sezonu (izloženost specifičnom alergenu/alergenima) ($\chi^2=2,385$; $df=2$; $p=0,303$) i terapiju (salbutamol pp; ICS; LTRA; ICS+LABA; ICS+LTRA; ICS+LABA+LTRA; $\chi^2=0,02$; $df=1$; $p=0,893$; $\chi^2=1,09$; $df=1$; $p=0,296$; $\chi^2=0,1$; $df=1$; $p=0,755$; $\chi^2=1,85$; $df=1$; $p=0,174$; $\chi^2=0,28$; $df=1$; $p=0,599$; $\chi^2=1,92$; $df=1$; $p=0,165$). Utvrđena je statistički značajna razlika među skupinama u odnosu na pojavnost prošle egzacerbacije (unazad godinu dana) i buduće egzacerbacije (u periodu praćenja od 6 mjeseci) ($\chi^2=69,64$; $df=1$; $p<0,0001$; $\chi^2=10,01$; $df=1$; $p=0,002$) te potrebu za salbutamolom ($\chi^2=49,73$; $df=1$; $p<0,0001$).

Tablica 9. Karakteristike ispitanika prema stupnju kontrole astme (KA=kontrolirana astma, NA=nekontrolirana astma).

	KA (N=50)	NA (N=53)
Spol, muški, broj (%)	39 (78)	39 (73,6)
Dob, \bar{x} (SD), god.	11,6 (2,9)	11,8 (3,5)
Raspon	6-18	6-18
BMI, \bar{x} (SD), kgm ⁻²	18,9 (2,3)	18,4 (2,6)
Raspon	14,7 – 25	13 – 25,3
Atopijski status, broj (%)		
Bez senzibilizacije	7 (14)	11 (20,75)
Monosenzibilizirani	13 (26)	18 (33,96)
Polisenzibilizirani	30 (60)	24 (45,3)
Sezona, broj (%)	41 (82)	41 (77,36)
Trenutna terapija astme, broj (%)		
Salbutamol pp	8 (16)	9 (16,9)
ICS	19 (38)	15 (20,7)
LTRA	3 (6)	4 (7,5)
ICS + LABA	17 (34)	25 (47,2)
ICS + LTRA	3 (6)	2 (3,8)
ICS + LABA + LTRA	0 (0)	2 (3,8)
Potreba za salbutamolom*	5 (10)	42 (79,25)
Prošla egzacerbacija, broj (%)**	0	43 (81,1)
Buduća egzacerbacija, broj (%)***	3 (6)	16 (30,2)

BMI – indeks tjelesne mase; ICS - inhalacijski kortikosteroidi; LABA - dugodjelujući beta-2 agonisti; LTRA – antagonisti leukotrijena; SD = standardna devijacija; \bar{x} = aritmetička sredina.

* $\chi^2=49,73$; df=1; $p \leq 0,0001$

** $\chi^2=69,64$; df=1; $p \leq 0,0001$

*** $\chi^2=10,01$; df=1; $p=0,002$

5.2. Plućna funkcija u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom

Djeca s kontroliranom i nekontroliranom astmom su se statistički značajno razlikovala prema sljedećim parametrima plućne funkcije: FEV₁ (Z=-2,7021; p=0,007), Tiffeneau-Pinelli indeksu FEV₁/FVC (Z=-2,5998; p=0,009), MEF₂₅ (t=-4,0573; p≤0,0001), MEF₅₀ (t=-2,4421; p=0,001), MEF₇₅ (t=-2,8149, p=0,006), PEF (t=-2,0482, p=0,043) (Tablica 10). Od 19-ero djece koja su imala egzacerbaciju bolesti tijekom perioda praćenja od 6 mjeseci, 10 (52,6%) je imalo FEV₁ >90% u vrijeme uključivanja u istraživanje.

Tablica 10. Usporedba parametara plućne funkcije prikazanih kao % očekivane vrijednosti u kontroliranoj astmi (KA) i nekontroliranoj astmi (NA).

	KA (N=50)	NA (N=53)	Statistička značajnost
FEV ₁ , medijan (IQR), % očekivane vrijednosti	96,5 (19)	92 (19)	Z=-2,7021; p=0,007
Raspon	73-119	52-117	
FVC, \bar{x} (SD), % očekivane vrijednosti	92,2 (9,9)	89,9 (14,1)	t=-0,9392; p=0,349
Raspon	75-118	64-125	
FEV ₁ /FVC, medijan (IQR), % očekivane vrijednosti	85 (9)	80 (12)	Z=-2,5998; p=0,009
Raspon	67-97	62-96	
MEF ₂₅ , \bar{x} (SD), % očekivane vrijednosti	93 (29,2)	70,6 (27)	t=-4,0573; p≤0,0001
Raspon	54-194	25-143	
MEF ₅₀ , \bar{x} (SD), % očekivane vrijednosti	90,8 (19,7)	75,6 (23,4)	t=-2,4421; p=0,001
Raspon	51-129	26-132	
MEF ₇₅ , \bar{x} (SD), % očekivane vrijednosti	96,5 (18)	83,6 (20)	t=-2,8149; p=0,006
Raspon	47-137	36-130	
PEF, \bar{x} (SD), % očekivane vrijednosti	96,2 (16,1)	89,5 (17,2)	t=-2,0482; p=0,043
Raspon	63-141	41-128	

FEV₁ - forsirani ekspiracijski volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi; FVC - forsirani vitalni kapacitet; IQR = interkvartilni raspon; MEF₂₅ - forsirani ekspiracijski protok pri 25% vitalnog kapaciteta; MEF₅₀ - forsirani ekspiracijski protok pri 50% vitalnog kapaciteta; MEF₇₅ - forsirani ekspiracijski protok pri 75% vitalnog kapaciteta; PEF - vršni ekspiracijski protok; SD = standardna devijacija; \bar{x} = aritmetička sredina.

Komparacija između skupina je učinjena – Studentovim t-testom (t – vrijednost) za varijable s normalnom distribucijom ili Mann-Whitney U-testom za varijable sa asimetričnom distribucijom (Z - vrijednost).

5.3. *Drugi pokazatelji kontrole astme u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom*

Djeca s kontroliranom i nekontroliranom astmom su se statistički značajno razlikovala prema rezultatima C-ACT i ACT upitnika ($Z=-5,6697$; $p\leq 0,0001$; $Z=-5,8630$; $p\leq 0,0001$), kvaliteti života ($Z=-8,4429$; $p\leq 0,0001$) i ukupnom zbiru simptoma ($Z=8,1592$; $p\leq 0,0001$), Tablica 11.

Tablica 11. Drugi pokazatelji kontrole bolesti u djece s kontroliranom (KA) i nekontroliranom astmom (NA).

	KA (N=50)	NA (N=53)	Statistička značajnost
ulgE, medijan (IQR), kU/L	226,5 (285)	407 (474)	$Z=1,2834$; $p=0,12$
Raspon	28,2-2019	4,34-2809	
C-ACT, median (IQR), zbroj	N=26, 25 (3)	N=30, 18 (3)	$Z=-5,6697$; $p\leq 0,0001$
Raspon	21-27	10-26	
ACT, median (IQR), broj	N=24, 25 (1)	N=23, 18 (3)	$Z=-5,8630$; $p\leq 0,0001$
Raspon	21-25	15-20	
AQLQ, medijan (IQR), zbroj	7 (0,2)	5,5 (0,8)	$Z=-8,4429$; $p\leq 0,0001$
Raspon	5,8-7	2,8-6,9	
Zbir simptoma, medijan (IQR), broj	1(0,3)	2,8 (0,6)	$Z=8,1592$; $p\leq 0,0001$
Raspon	1-2,3	1-5,6	

ACT - Asthma Control Test; AQLQ - upitnik o kvaliteti života s astmom; C-ACT – Childhood Asthma Control Test; IQR = interkvartilni raspon.

Komparacija između skupina je učinjena Studentovim t-testom za varijable s normalnom distribucijom (t-vrijednost) ili Mann-Whitney U-testom za varijable s asimetričnom distribucijom (Z-vrijednost).

5.4. *Lokalni i sistemski biomarkeri upale u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom*

Rezultati mjerenja lokalnih i sistemskih biomarkera za skupinu djece s nekontroliranom i kontroliranom astmom su prikazani u Tablici 12. U skupini djece s kontroliranom astmom uočena je statistički značajno veća koncentracija urata u kondenzatu izdaha (Slika 5) i pH vrijednost kondenzata izdaha (Slika 6) u odnosu na skupinu djece s nekontroliranom astmom ($Z=-7,3475$; $p\leq 0,0001$; $t=-3,0679$; $p=0,003$). TI je bila statistički značajno veća u skupini djece s nekontroliranom astmom ($t=2,4950$; $p=0,014$; Slika 7). Koncentracija serumskog hs-CRP-a je bila veća u nekontroliranoj astmi, ali ne statistički značajno ($Z=0,4190$; $p=0,675$). Skupine se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na vrijednosti F_{ENO-a} , koncentraciju serumskog ECP-a, te rezultate diferencijalne krvne slike vezano uz pojedine subpopulacije leukocita ($p>0,05$ za sve usporedbe). Uspoređujući skupine prema povećanim

vrijednostima serumskog ECP-a i F_ENO-a (iznad granice normale za dob) također nije bilo statistički značajne razlike između skupina ($\chi^2=0,310$; $df=1$; $p=0,577$; $\chi^2=4,511$; $df=2$; $p=0,104$).

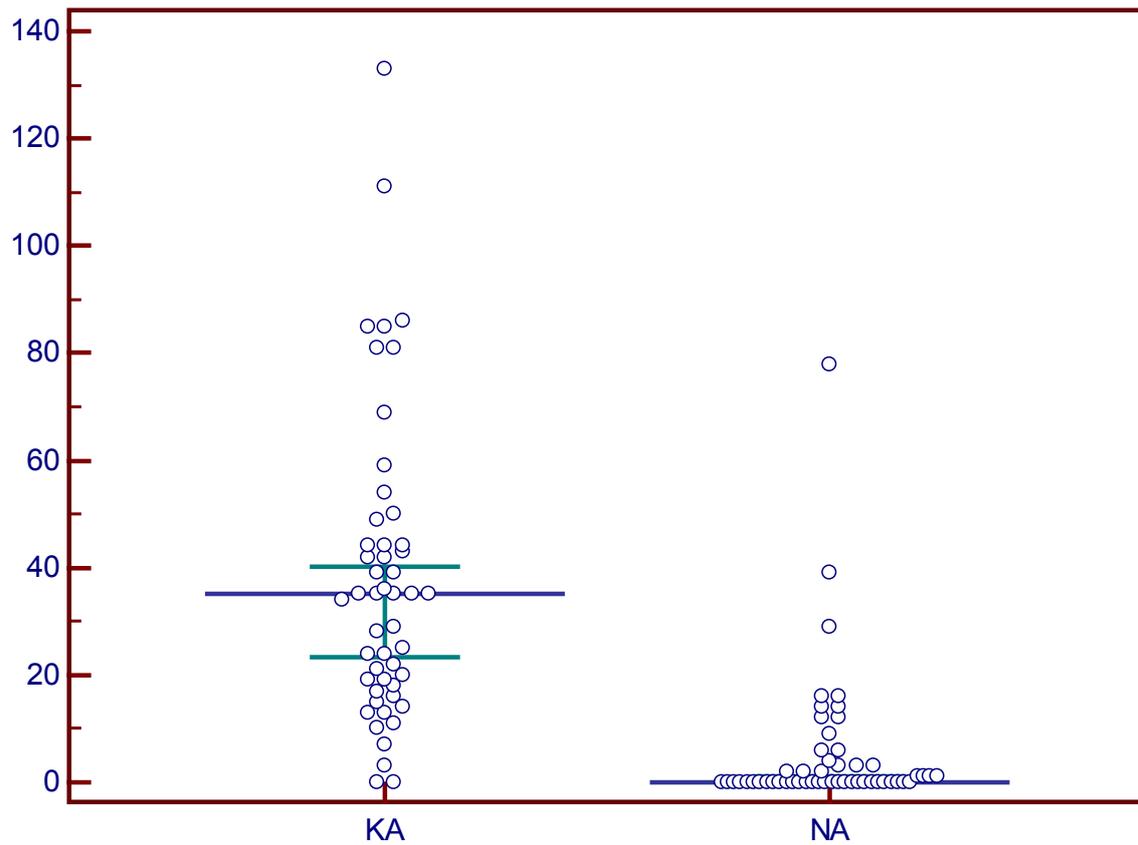
Tablica 12. Lokalni i sistemski biomarkeri u skupinama djece s kontroliranom (KA) i nekontroliranom (NA) astmom.

	KA (N=50)	NA (N=53)	Statistička značajnost
F _E NO, medijan (IQR), ppb	21 (23)	22 (25)	Z=0,9337; p=0,351
Raspon	6-163	5-98	
KI urati, medijan (IQR), $\mu\text{mol/L}$	37,9 (26)	0 (3)	Z=-7,3475; p \leq 0,0001
Raspon	0-133	0-78	
KI pH, \bar{x} (SD),	7,33 (0,16)	7,23 (0,17)	t=-3,0679; p=0,003
Raspon	7,0-7,77	7,0-7,82	
TI, \bar{x} (SD), °C	33,9 (0,6)	34,26 (0,83)	t=2,4950; p=0,014
Raspon	32,8-35	32,59-36,43	
hs-CRP, medijan (IQR), mg/L	0,39 (0,73)	0,5 (0,78)	Z=0,4190; p=0,675
Raspon	0,1-2,1	0,09-2,0	
ECP, medijan, (IQR), ng/mL	15,7 (16,8)	17,6 (11,4)	Z=0,9172; p=0,359
Raspon	2,7-91,9	3,7-101	
Leukociti, \bar{x} (SD), $\times 10^9/\text{L}\dagger$	6,83 (1,83)	7,32 (1,96)	t=1,2118; p=0,228
Neutrofili, \bar{x} (SD), $\times 10^9/\text{L}\dagger$	3,47 (1,24)	3,72 (1,63)	t=0,8730; p=0,385 t=0,0007; p=0,999
Limfociti, medijan (IQR) $\times 10^9/\text{L}\dagger$	2,395 (0,63)	2,57 (0,74)	Z=1,4517; p=0,147 Z=0,1551; p=0,877
Monociti, medijan (IQR), $\times 10^9/\text{L}\dagger$	0,565 (0,22)	0,63 (0,2)	Z=1,4055; p=0,159 Z=0,1584; p=0,874
Eozinofili, \bar{x} (SD), $\times 10^9/\text{L}\dagger$	0,36 (0,25)	0,40 (0,29)	t=1,1276; p=0,262 t=0,8532; p=0,396
Bazofili, medijan (IQR), $\times 10^9/\text{L}\dagger$	0,037 (0,03)	0,032 (0,02)	Z=-1,0591; p=0,289 Z=-1,0954; p=0,273

ECP - eozinofilni kationski protein; F_ENO - frakcija izdahnutog dušičnog oksida; hs-CRP - CRP velike osjetljivosti; IQR = interkvartilni raspon; KI – kondenzat izdaha; TI – temperatura izdahnutog zraka; SD = standardna devijacija; \bar{x} = aritmetička sredina.

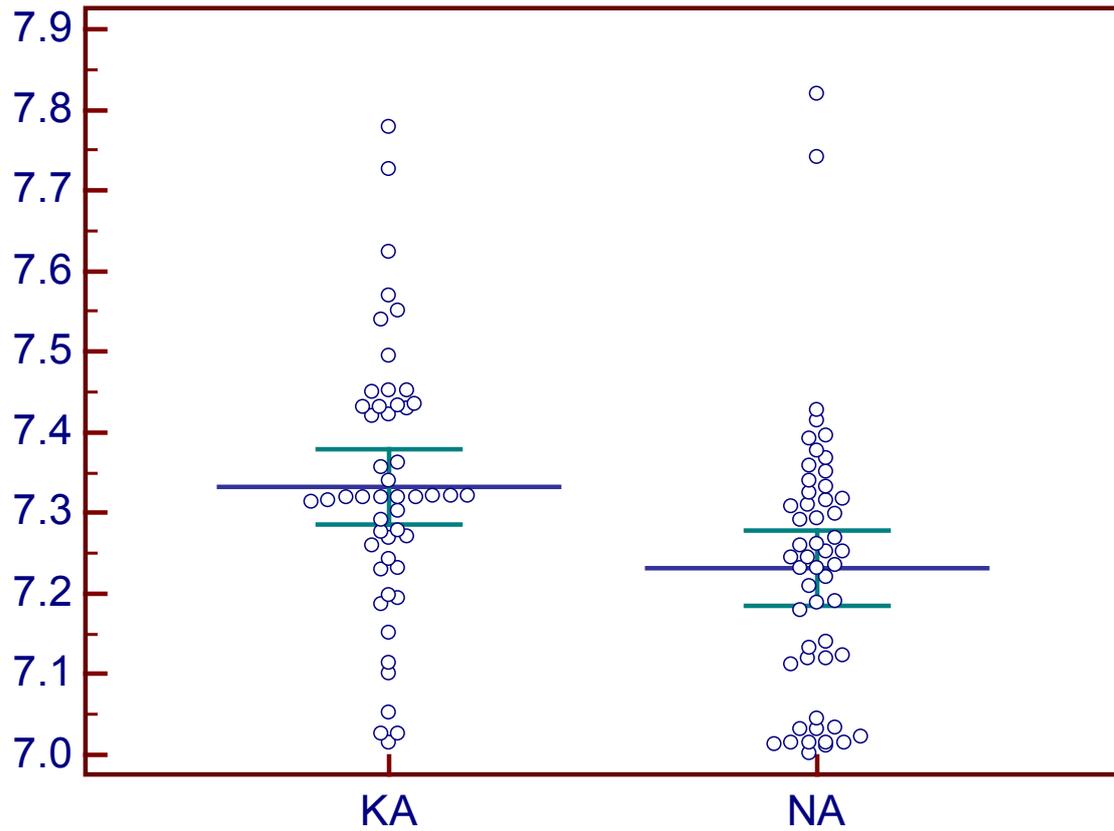
Komparacija između skupina je učinjena Studentovim t-testom za varijable s normalnom distribucijom (t-vrijednost) ili Mann-Whitney U-testom za varijable s asimetričnom distribucijom (Z-vrijednost).

†Komparacija između skupina je učinjena i za Z-vrijednost apsolutnog i relativnog broja leukocita u DKS $p>0,05$ za sve.



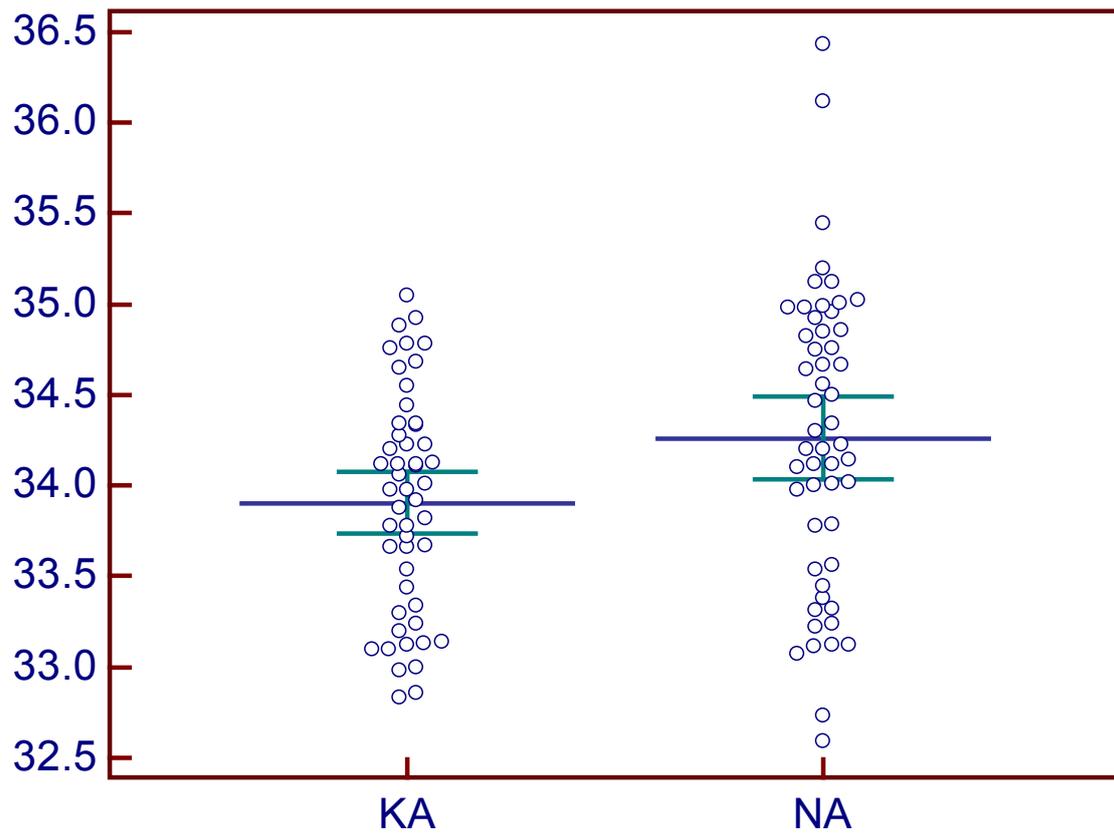
Slika 5. Koncentracija urata ($\mu\text{mol/L}$) u kondenzatu izdaha (KI) u skupini djece s kontroliranom astmom (KA) i nekontroliranom astmom (NA) ($Z=-7,3475$; $p\leq 0,0001$).

Plava vodoravna linija označava medijan, a dvije kraće vodoravne zelene linije označavaju 95%-tni interval pouzdanosti.



Slika 6. Vrijednost pH u kondenzatu izdaha (KI) u skupini djece s kontroliranom astmom (KA) i nekontroliranom astmom (NA) ($t=-3,0679$; $p=0,003$).

Plava vodoravna linija označava medijan, a dvije kraće vodoravne zelene linije označavaju 95%-tni interval pouzdanosti.

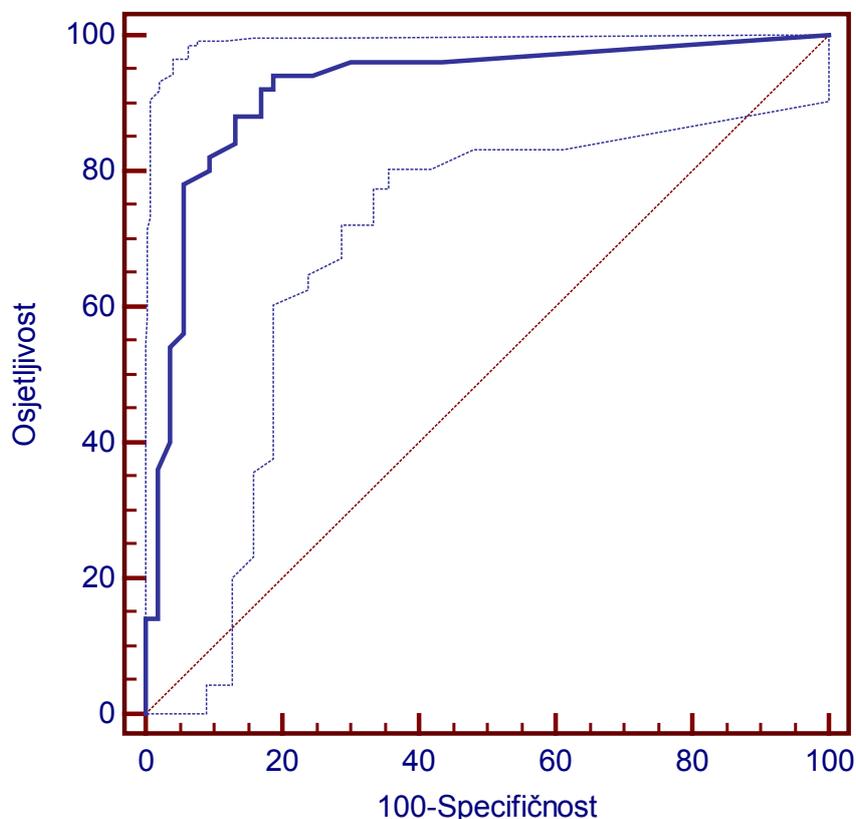


Slika 7. Vrijednosti TI-a (°C) u skupini djece s kontroliranom astmom (KA) i nekontroliranom astmom (NA) ($t=2,4950$; $p=0,014$).

Plava vodoravna linija označava medijan, a dvije kraće vodoravne zelene linije označavaju 95%-tni interval pouzdanosti.

5.1. Dijagnostička vrijednost biomarkera upale u razlikovanju kontrolirane i nekontrolirane astme

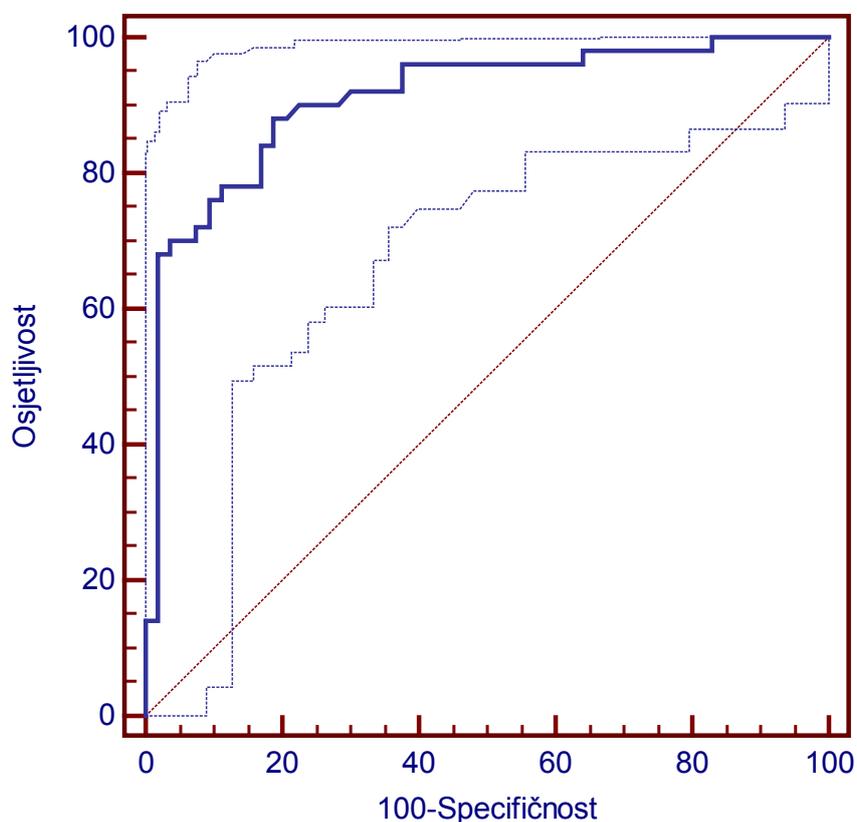
Diskriminantna analiza je pokazala da su urati u KI najbolji samostalni parametar u razlikovanju kontrolirane i nekontrolirane astme ($F=57,899$; $p<0,0001$) uz dijagnostičku točnost od 79,6%. Analiza ROC krivulje (Slika 8) pokazuje vrlo dobru razlikovnu učinkovitost uz AUC od 0,920 (95% CI, 0,850 -0,965) uz osjetljivost od 94,0% (95%-tni CI, 83,5–98,7%), specifičnost od 81,13% (95% CI, 68,0–90,6%), PPV 82,5% (95% CI, 70,0–91,3%), NPV 93,5% (95% CI, 82,1–98,6%), LR za dijagnozu kod pozitivnog testa 4,98 (95% CI, 2,8–8,7), LR za dijagnozu kod negativnog testa 0,074 (95% CI, 0,02–0,2) te točku razlučivanja (*cut off*) $>6 \mu\text{mol/L}$.



Slika 8. Prikaz ROC krivulje za koncentraciju urata u kondenzatu izdaha (KI) u razlikovanju kontrolirane i nekontrolirane astme.

pH vrijednost KI i TI-a kao samostalni parametri pokazali su nešto lošiju dijagnostičku točnost u razlikovanju dvije skupine ispitanika (64,1% [$F=9,412$, $p<0,0028$] i 60,2% [$F=6,2253$, $p<0,0142$]).

Diskriminacijskom je analizom upalnih biomarkera utvrđen najbolji statistički značajni model za razlikovanje kontrolirane i nekontrolirane astme (svojtvena (eigen) vrijednost=0,6480; kanonički koeficijent korelacije=0,6271; Willksova lambda=0,6068; $\chi^2=49,959$; $df=2$; $p<0,0001$), dijagnostičke točnosti 83,5%, a koji je uključio 2 varijable: urati u KI i Z-vrijednost apsolutnog broja monocita. Analiza ROC krivulje (Slika 9) navedenog modela pokazala je vrlo dobru razlikovnu učinkovitost uz AUC od 0,909 (95% CI, 0,836-0,957), osjetljivost od 88% (95% CI, 75,7–95,5%), specifičnost od 81,13% (95% CI, 68,0–90,6%), PPV 81,5% (95% CI, 68,6–90,7%), NPV 87,8% (95% CI, 75,2–95,4%), LR za dijagnozu kod pozitivnog testa 4,66 (95% CI, 2,6–8,2), LR za dijagnozu kod negativnog testa 0,15 (95% CI, 0,07–0,3).



Slika 9. Prikaz ROC krivulje za kombinaciju biomarkera koja se temelji na 2 varijable: urati u kondenzatu izdaha (KI) i Z-vrijednost apsolutnog broja monocita.

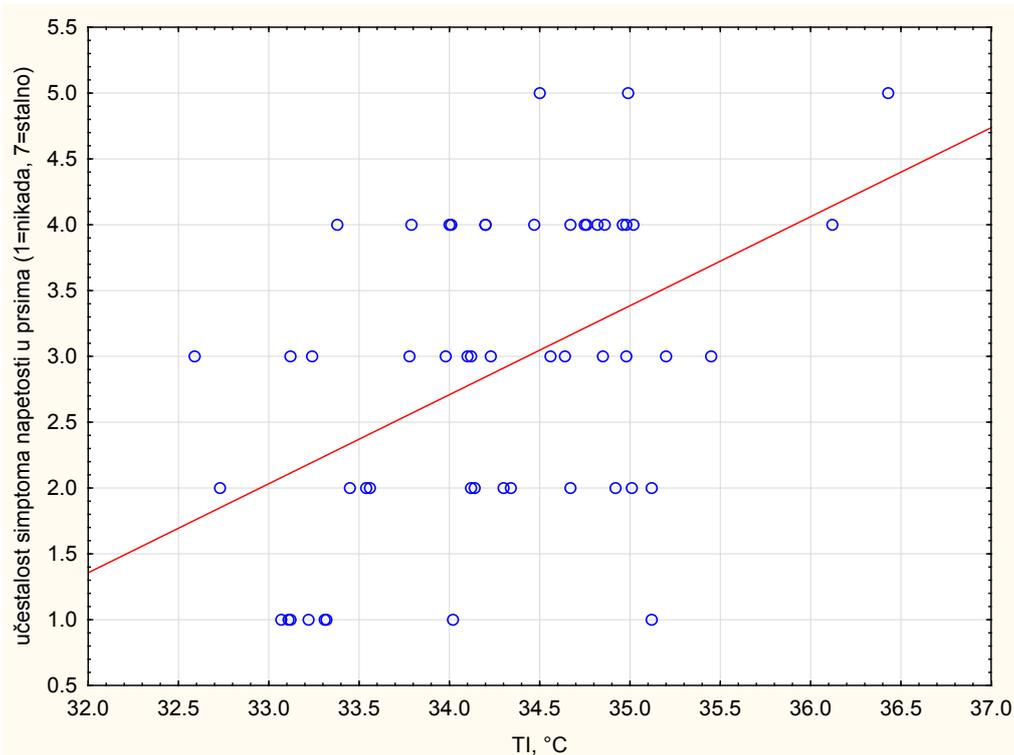
5.2. Povezanost biomarkera upale i simptoma bolesti (pojedinačnih simptoma i skupnog zbira simptoma) u skupini djece s nekontroliranom astmom

5.2.1. Povezanost lokalnih biomarkera upale i učestalosti simptoma astme izraženoj prema skali Likertovog tipa u NA (N=53)

Nije utvrđena statistički značajna povezanost vrijednosti pH u KI i koncentracije urata u KI s učestalošću simptoma astme.

Vrijednost FENO-a je bila proporcionalno povezana s učestalošću buđenja ujutro sa simptomima astme ($r=0,2066$; $p=0,036$).

Utvrđena je statistički značajna proporcionalna povezanost TI s učestalošću simptoma napetosti u prsima ($r=0,4204$; $p=0,002$, Slika 10), otežanog disanja ($r=0,2812$; $p=0,041$), buđenja sa simptomima astme ($r=0,3018$; $p=0,028$), naprezanja pri disanju ($r=0,3171$; $p=0,021$), ometanja da se pacijent naspava ($r=0,3016$; $p=0,028$) i ukupnim zbirom simptoma ($r=0,3215$, $p=0,019$).



Slika 10. Povezanost između temperature izdahnutog zraka (TI) i učestalosti osjećaja napetosti u prsima ($r=0,4204$; $p=0,002$).

5.2.2. Povezanost sistemskih biomarkera upale i učestalosti simptoma astme izraženoj prema skali Likertovog tipa u NA (N=53)

Serumski ECP je bio statistički značajno obrnuto proporcionalno povezan s učestalošću kašlja ($r=-0,3319$; $p=0,015$), osjećaja težine u prsima ($r=-0,3479$; $p=0,011$), naprezanja pri disanju ($r=-0,3082$; $p=0,025$) i buđenja noću zbog astme ($r=-0,3169$; $p=0,021$).

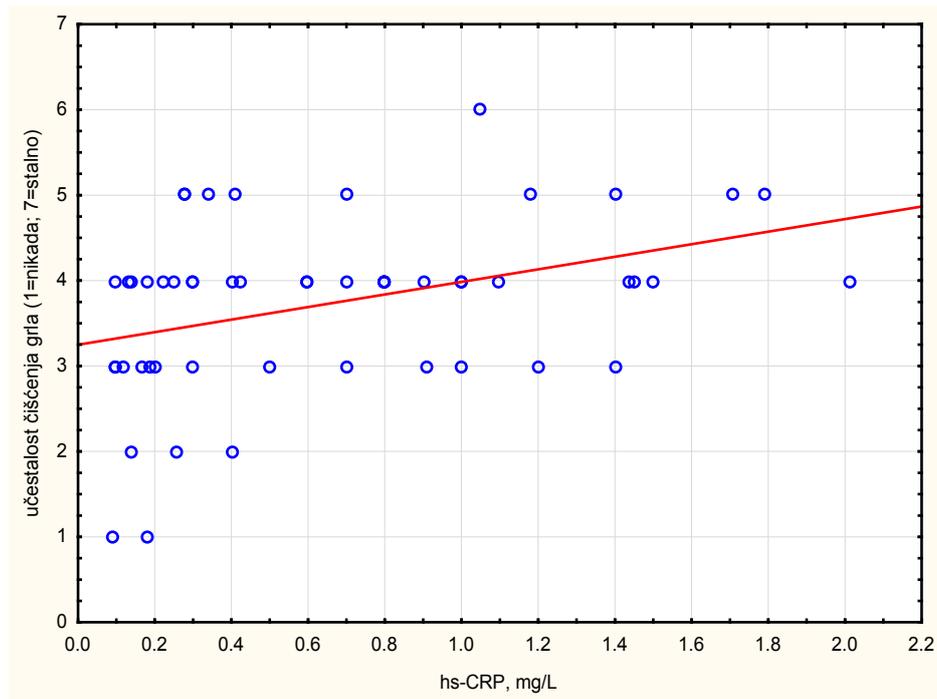
Utvrđena je statistički značajna proporcionalna povezanost koncentracije serumskog hs-CRP-a s učestalošću osjećaja otežanog disanja ($r=0,3259$; $p=0,017$), hripanja u prsima ($r=0,3174$; $p=0,021$), kašlja ($r=0,3683$; $p=0,007$), čišćenja grla ($r=0,4047$; $p=0,003$, Slika 11), buđenja sa simptomima astme ($r=0,2928$; $p=0,033$), naprezanja pri disanju ($r=0,2921$; $p=0,034$), buđenja noću zbog astme ($r=0,3062$; $p=0,026$), ometanja da se pacijent naspava ($r=0,3684$; $p=0,007$), borbe da dođe do zraka ($r=0,3259$; $p=0,045$) i ukupnim zbirom simptoma ($r=0,3789$; $p=0,005$).

Utvrđena je statistički značajna proporcionalna povezanost Z-vrijednosti apsolutnog broja leukocita s učestalošću osjećaja napetosti u prsima ($r=0,2815$; $p=0,041$), kašlja ($r=0,3432$; $p=0,012$) i ukupnim zbirom simptoma ($r=0,3868$; $p=0,004$).

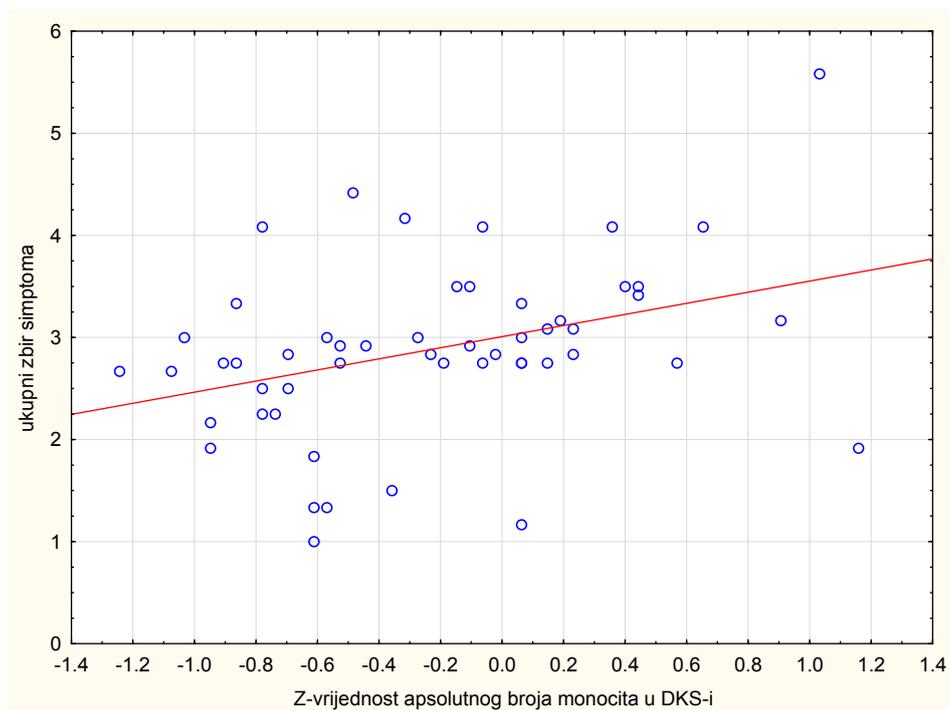
Utvrđena je statistički značajna proporcionalna povezanost Z-vrijednosti apsolutnog broja neutrofilnih granulocita s učestalošću kašlja ($r=0,3182$; $p=0,202$).

Z-vrijednost apsolutnog broja monocita je bila statistički značajno proporcionalno povezana s učestalošću otežanog disanja ($r=0,2928$; $p=0,033$), hripanja u prsima ($r=0,2942$; $p=0,033$), težine u prsima ($r=0,2799$; $p=0,042$), buđenja sa simptomima astme ($r=0,3459$; $p=0,011$), naprezanja pri disanju ($r=0,4262$; $p=0,001$), buđenja noću ($r=0,4197$; $p=0,002$), borbe da dođe do zraka ($r=0,2849$; $p=0,039$) i ukupnim zbirom simptoma ($r=0,4262$; $p=0,015$, Slika 12).

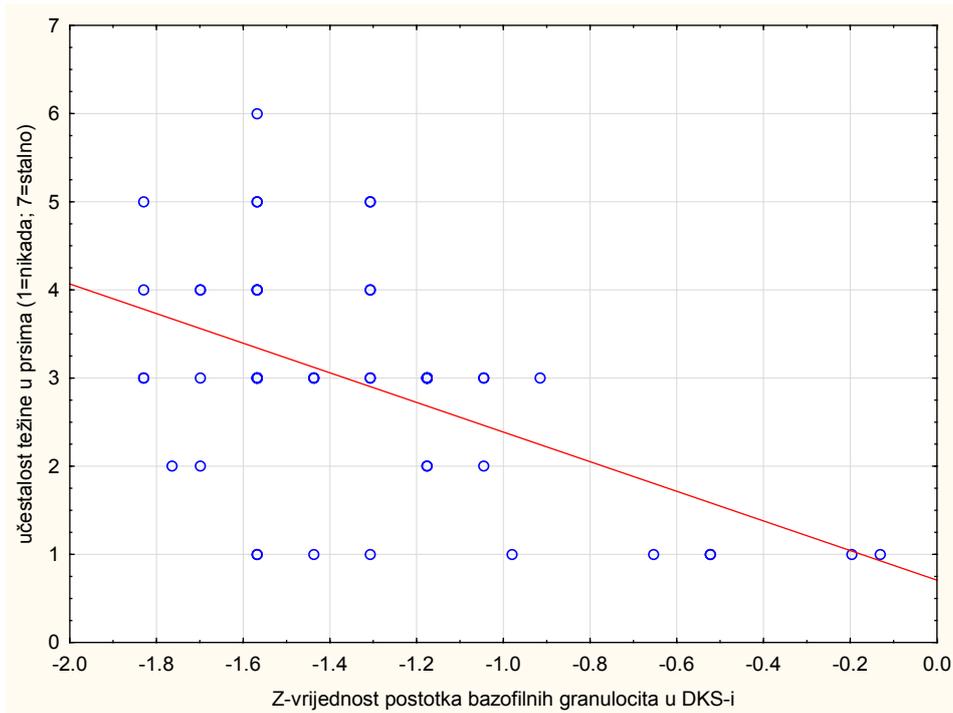
Z-vrijednost postotka bazofilnih granulocita u DKS-i je bila u statistički značajnoj negativnoj korelaciji s učestalošću simptoma napetosti u prsima ($r=-0,3427$; $p=0,012$), učestalosti kašlja ($r=-0,3509$; $p=0,010$), osjećaja težine u prsima ($r=-0,4585$; $p=0,001$, Slika 13), učestalosti buđenja sa simptomima astme ($r=-0,3384$; $p=0,013$), naprezanja pri disanju ($r=-0,3172$; $p=0,021$), buđenja noću ($r=-0,4127$; $p=0,002$), ometanja da se pacijent naspava ($r=-0,3279$; $p=0,016$) i ukupnim zbirom simptoma ($r=-0,3029$; $p=0,027$). Utvrđena je statistički značajna obrnuto proporcionalna povezanost Z-vrijednosti apsolutnog broja bazofilnih granulocita s učestalošću simptoma napetosti u prsima ($r=-0,3236$; $p=0,018$), kašlja ($r=-0,2776$; $p=0,044$), težine u prsima ($r=-0,3955$; $p=0,003$) i buđenja noću ($r=-0,3128$; $p=0,023$).



Slika 11. Povezanost između serumske koncentracije CRP-a velike osjetljivosti (hs-CRP)-a i učestalosti čišćenja grla ($r=0,4047$; $p=0,003$).



Slika 12. Povezanost između Z-vrijednosti apsolutnog broja monocita u diferencijalnoj krvnoj slici (DKS) i ukupnog zbira simptoma ($r=0,4262$; $p=0,015$).



Slika 13. Povezanost između Z-vrijednosti postotka bazofilnih granulocita u diferencijalnoj krvnoj slici (DKS-i) i učestalosti osjećaja težine u prsima ($r=-0,4585$; $p=0,001$).

5.3. Povezanost lokalnih i sistemskih biomarkera upale međusobno i s drugim pokazateljima aktivnosti bolesti (spirometrijski parametri, zbir simptoma, uporaba SABA, ACT, AQLQ, uIgE, egzacerbacija bolesti)

Utvrđena je statistički značajna proporcionalna povezanost razine F_ENO-a s koncentracijom urata u KI ($r=0,3839$; $p=0,005$) i obrnuto proporcionalna povezanost s PEF-om ($r=-0,286$; $p=0,038$) u NA te obrnuto proporcionalna povezanost s pH u KI ($r=-0,229$; $p=0,0196$) u svih astmatičara.

pH vrijednost KI je bila statistički značajno proporcionalno povezana s ACT-om ($r=0,258$; $p=0,009$), AQLQ ($r=0,287$; $p=0,0033$), koncentracijom urata u KI ($r=0,379$; $p<0,0001$, Slika 14), i obrnuto proporcionalno sa zbirom simptoma ($r=-0,307$; $p=0,016$), potrebom za salbutamolom ($r=-0,259$; $p=0,008$), i F_ENO-om ($r=-0,229$; $p=0,0196$).

Koncentracija urata u KI je bila statistički značajno proporcionalno povezana s vrijednošću pH u KI ($r=0,379$; $p<0,0001$, Slika 14), Z-vrijednošću apsolutnog broja bazofilnih neutrofila ($r=0,216$; $p=0,028$), FEV₁ ($r=0,225$; $p=0,022$), ACT-om ($r=0,665$; $p<0,0001$, Slika 15) AQLQ ($r=0,703$, $p<0,0001$, Slika 16), a obrnuto proporcionalno s TI ($r=-0,220$; $p=0,025$), potrebom za salbutamolom ($r=-0,538$; $p<0,0001$) i zbirom simptoma ($r=-0,722$; $p<0,0001$, Slika 17). U NA, koncentracija urata u KI je bila statistički značajno povezana s F_ENO-om ($r=0,3839$; $p=0,005$, Slika 18) i vremenskom udaljenošću zadnje egzacerbacije (PZE) ($r=0,558$; $p<0,0001$, Slika 19).

TI statistički je bila značajno proporcionalno povezana s potrebom za salbutamolom ($r=0,293$; $p=0,003$) a obrnuto proporcionalno povezana s ACT-om ($r=-0,365$; $p=0,007$) i AQLQ ($r=-0,372$; $P=0,006$) u svih astmatičara, i sa zbirom simptoma ($r=0,409$; $p=0,002$) u NA.

U univarijantnoj regresijskoj analizi serumski ECP je bio statistički značajno proporcionalno povezan s F_ENO-om ($r=0,379$; $p<0,0001$), a obrnuto proporcionalno s ACT-om ($r=-0,365$; $p=0,007$).

Serumski hs-CRP je bio statistički značajno proporcionalno povezan sa zbirom simptoma ($r=0,395$; $p=0,003$), potrebom za salbutamolom ($r=0,240$; $p=0,014$), TI ($r=0,445$, $p<0,0001$, Slika 20), a obrnuto proporcionalno s FEV₁ ($r=-0,366$, $p=0,007$), post FEV₁/FVC ($r=-0,201$, $p=0,044$), ACT-om ($r=-0,316$, $p=0,021$) i AQLQ ($r=-0,373$, $p=0,006$).

Z-vrijednost apsolutnog broja leukocita je bila statistički značajno proporcionalno povezana s hs-CRP-om ($r=0,228$; $p=0,021$), ECP-om ($r=0,215$; $p=0,029$) i zbirom simptoma ($r=0,248$; $p=0,012$), a obrnuto proporcionalno povezana sa spirometrijskim parametrima FEV₁/FVC ($r=-0,249$; $p=0,011$), MEF₂₅ ($r=-0,200$; $p=0,042$), ACT-om ($r=-0,212$; $p=0,0318$) i AQLQ ($r=-0,250$; $p=0,011$). U NA utvrđena je statistički značajna proporcionalna povezanost Z-

vrijednosti apsolutnog broja leukocita s hs-CRP-om ($r=0,307$; $p=0,025$) i zbirom simptoma ($r=0,387$; $p=0,004$), te obrnuto proporcionalna povezanost s FEV₁ ($r=-0,301$; $p=0,029$), FEV₁/FVC ($r=-0,310$; $p=0,024$), MEF₂₅ ($r=-0,308$; $p=0,025$), MEF₅₀ ($r=-0,334$; $p=0,015$), MEF₇₅ ($r=-0,365$; $p=0,0072$), ACT-om ($r=-0,355$; $p=0,009$) i AQLQ ($r=-0,338$; $p=0,013$).

Utvrđena je statistički značajna proporcionalna povezanost Z-vrijednosti apsolutnog broja neutrofilnih granulocita s hs-CRP-om ($r=0,204$; $p=0,039$) i zbirom simptoma ($r=0,216$; $p=0,029$), a obrnuto proporcionalna povezanost s FEV₁/FVC ($r=-0,195$; $p=0,048$) i AQLQ ($r=-0,222$; $p=0,024$).

Z-vrijednost postotka neutrofilnih granulocita u DKS-i je bila obrnuto proporcionalno povezana s post FEV₁ ($r=-0,394$; $p=0,004$) i post FEV₁/FVC ($r=-0,347$; $p=0,012$) u NA. Z-vrijednost apsolutnog broja neutrofilnih granulocita je bila proporcionalno povezana sa zbirom simptoma ($r=0,321$; $p=0,019$) i obrnuto proporcionalno povezana s post FEV₁/FVC ($r=-0,300$; $p=0,031$) i AQLQ ($r=-0,312$; $p=0,023$) u NA.

Z-vrijednost postotka limfocita u DKS-i bila je obrnuto proporcionalno povezana s hs-CRP-om ($r=-0,240$; $p=0,014$). Z-vrijednost postotka limfocita u DKS-i bila je proporcionalno povezana s post FEV₁ ($r=0,349$; $p=0,011$) i post FEV₁/FVC ($r=0,351$; $p=0,011$) u NA. Z-vrijednost apsolutnog broja limfocita bila je obrnuto proporcionalno povezana s MEF₂₅ ($r=-0,231$; $p=0,019$). Z-vrijednost apsolutnog broja limfocita bila je proporcionalno povezana s post FVC ($r=0,278$, $p=0,046$) i obrnuto proporcionalno povezana s MEF₂₅ ($r=-0,300$; $p=0,029$) u NA.

Z-vrijednost postotka monocita u DKS-i bila je proporcionalno povezana s hs-CRP-om ($r=0,268$; $p=0,006$) i TI ($r=0,352$; $p=0,0003$), a obrnuto proporcionalno povezana s razinom uIgE ($r=-0,218$; $p=0,027$). Z-vrijednost postotka monocita u DKS-i bila je proporcionalno povezana s FEV₁/FVC ($r=0,283$; $p=0,040$), MEF₂₅ ($r=0,320$; $p=0,019$), MEF₅₀ ($r=0,301$; $p=0,029$) i obrnuto proporcionalno povezana s uIgE ($r=-0,359$; $p=0,008$) u NA. Z-vrijednost apsolutnog broja monocita bila je proporcionalno povezana s hs-CRP-om ($r=0,401$; $p<0,0001$), TI ($r=0,265$; $p=0,007$), zbirom simptoma ($r=0,199$; $p=0,043$) i obrnuto proporcionalno povezana s FEV₁ ($r=-0,205$; $p=0,038$) i ACT-om ($r=-0,222$; $p=0,025$). Z-vrijednost apsolutnog broja monocita bila je proporcionalno povezana s hs-CRP-om ($r=0,339$; $p=0,013$) i zbirom simptoma ($r=0,426$; $p=0,002$), a obrnuto proporcionalno povezana s FEV₁ ($r=-0,316$, $p=0,021$), post FEV₁/FVC ($r=-0,314$; $p=0,023$), ACT-om ($r=-0,309$; $p=0,024$) i AQLQ ($r=-0,300$; $p=0,029$) u NA.

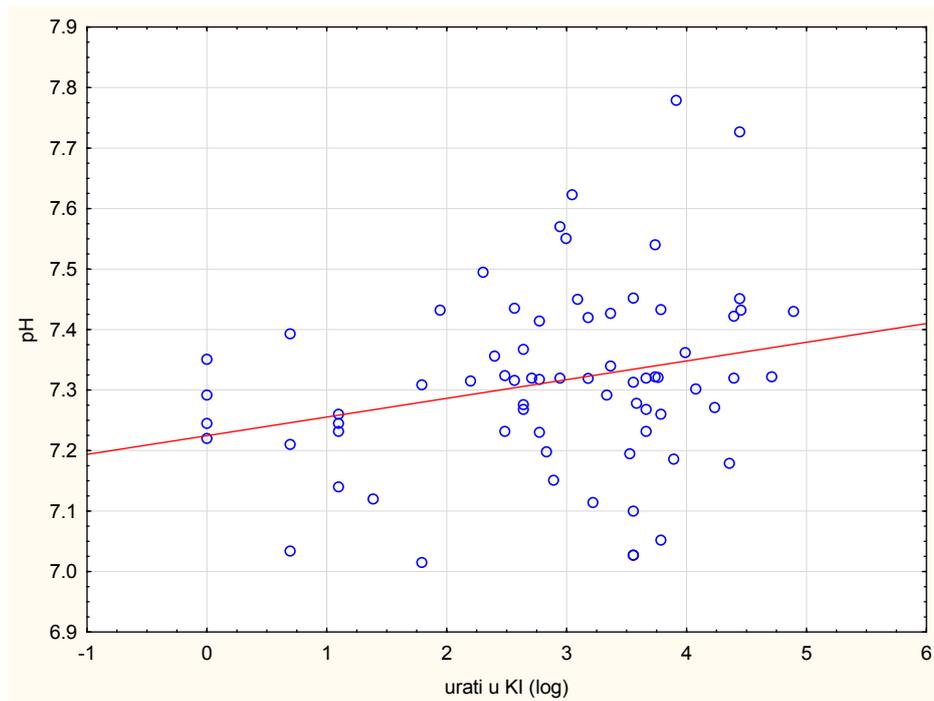
Z-vrijednost postotka eozinofilnih granulocita u DKS-i bila je statistički značajno proporcionalno povezana s F_ENO-om ($r=0,256$; $p=0,008$), ECP-om ($r=0,584$; $p<0,0001$) i

razinom uIgE ($r=0,325$; $p=0,001$). Z-vrijednost apsolutnog broja eozinofilnih granulocita bila je statistički značajno proporcionalno povezana s FeNO-om ($r=0,241$; $p=0,014$), ECP-om ($r=0,584$; $p<0,0001$) i razinom uIgE ($r=0,344$; $p=0,0004$). U NA Z-vrijednost postotka eozinofilnih granulocita u DKS-i bila je proporcionalno povezana s ECP-om ($r=0,569$; $p<0,0001$) i uIgE ($r=0,371$; $p=0,006$) a Z vrijednost apsolutnog broja eozinofilnih granulocita bila je proporcionalno povezana s ECP-om ($r=0,602$; $p<0,0001$) i uIgE ($r=0,3516$; $p=0,009$).

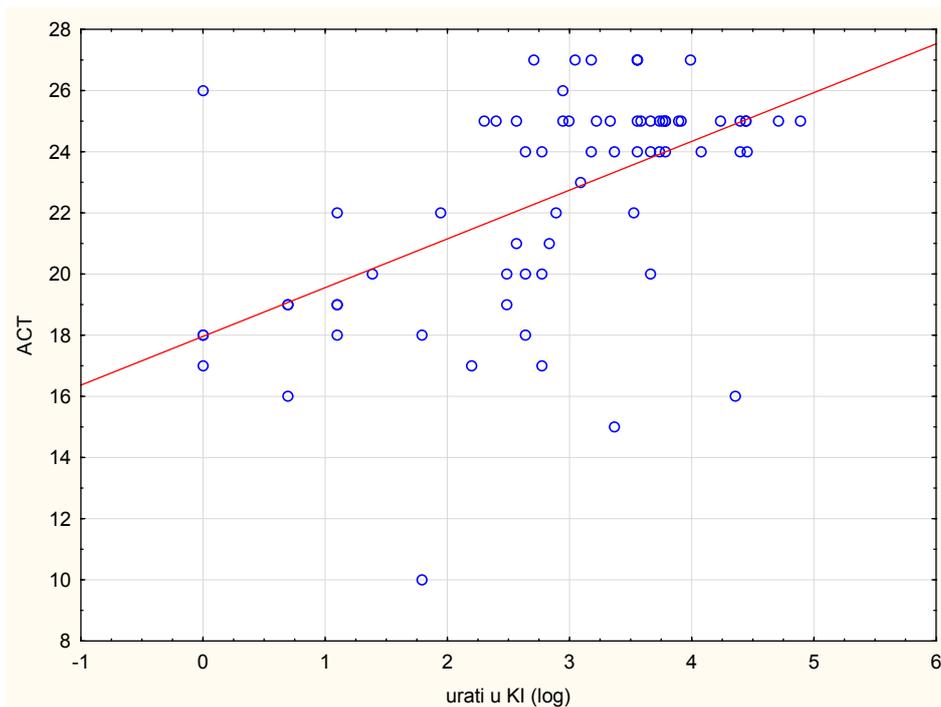
Z-vrijednost postotka bazofilnih granulocita u DKS-i bila je proporcionalno povezana s ECP-om ($r=0,276$; $p=0,045$) i post FEV₁/FVC ($r=0,369$; $p=0,007$), a obrnuto proporcionalno s potrebom za salbutamolom ($r=-0,323$; $p=0,019$) i zbirom simptoma ($r=-0,303$; $p=0,027$) u NA. Z-vrijednost postotka bazofilnih granulocita u DKS-i bila je statistički značajno proporcionalno povezana s FEV₁/FVC ($r=0,194$; $p=0,049$), AQLQ ($r=0,200$; $p=0,042$), a obrnuto proporcionalno povezana s hs-CRP-om ($r=-0,219$; $p=0,026$), potrebom za salbutamolom ($r=-0,234$; $p=0,018$), TI ($r=-0,195$; $p=0,049$) i zbirom simptoma ($r=-0,236$; $p=0,016$).

Z-vrijednost apsolutnog broja bazofilnih granulocita bila je statistički značajno proporcionalno povezana s ECP-om ($r=0,251$; $p=0,010$), koncentracijom urata u KI ($r=0,216$; $p=0,028$) i razinom uIgE ($r=0,217$; $p=0,028$), a obrnuto proporcionalno povezana s potrebom za salbutamolom ($r=-0,232$; $p=0,018$) i zbirom simptoma ($r=-0,213$; $p=0,031$).

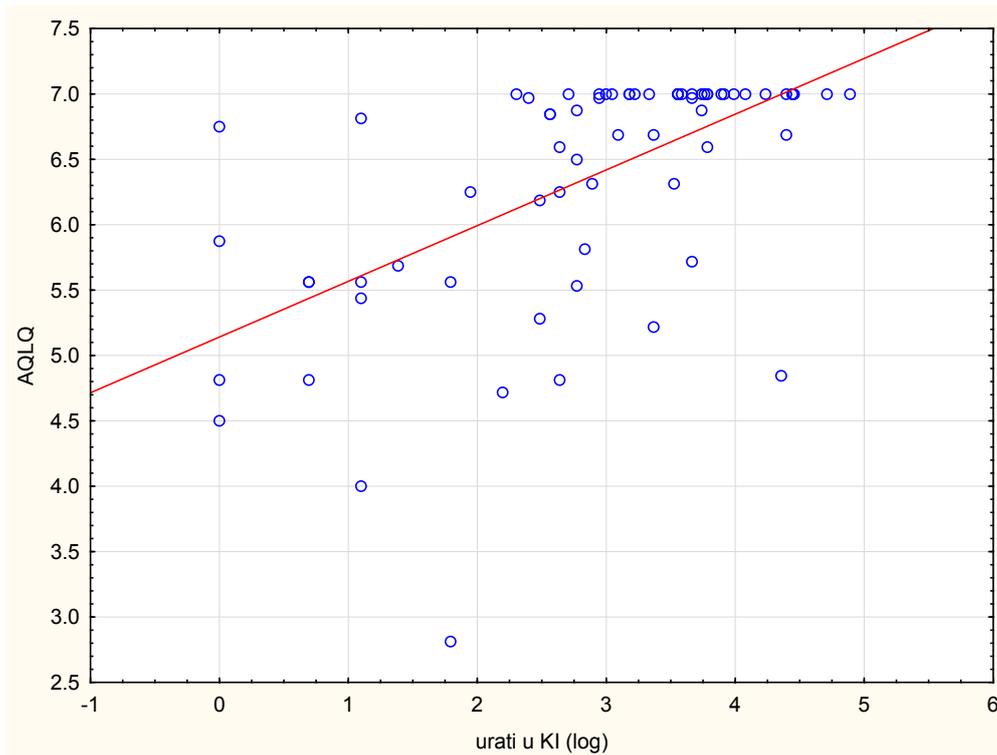
Z-vrijednost apsolutnog broja bazofilnih granulocita bila je statistički značajno proporcionalno povezana s ECP-om ($r=0,353$; $p=0,009$) i uIgE ($r=0,342$, $p=0,012$) i obrnuto proporcionalno povezana s potrebom za salbutamolom ($r=-0,348$; $p=0,011$) u NA.



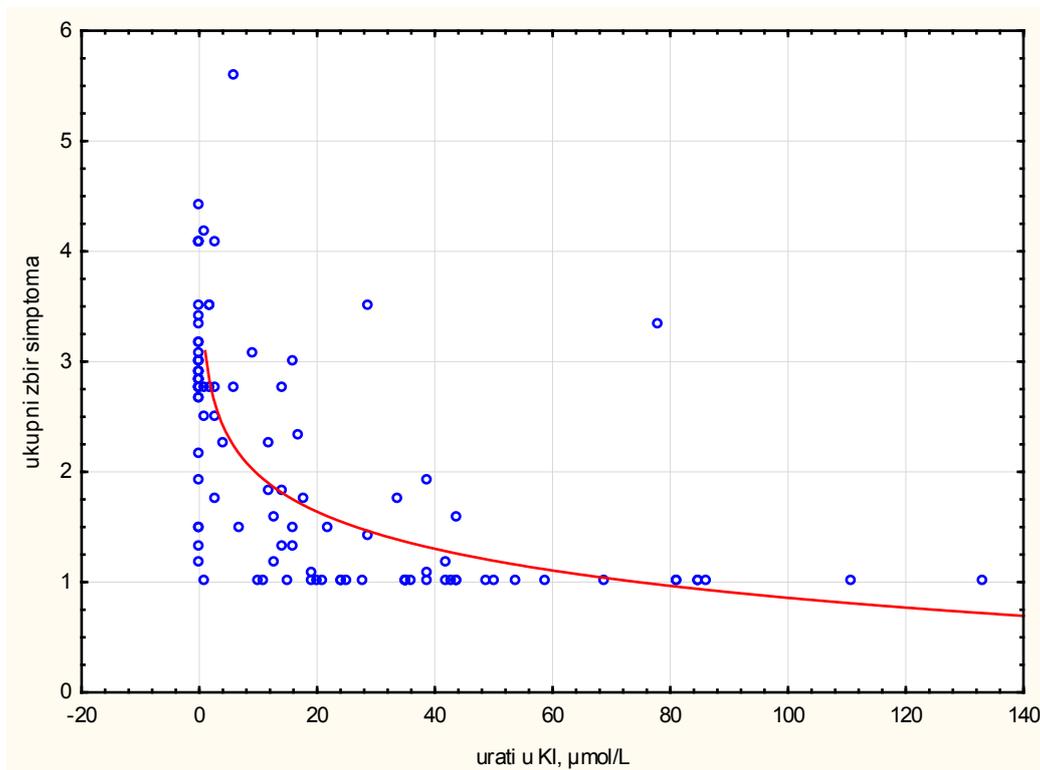
Slika 14. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i pH vrijednosti KI ($r=0,379$; $p<0,0001$).



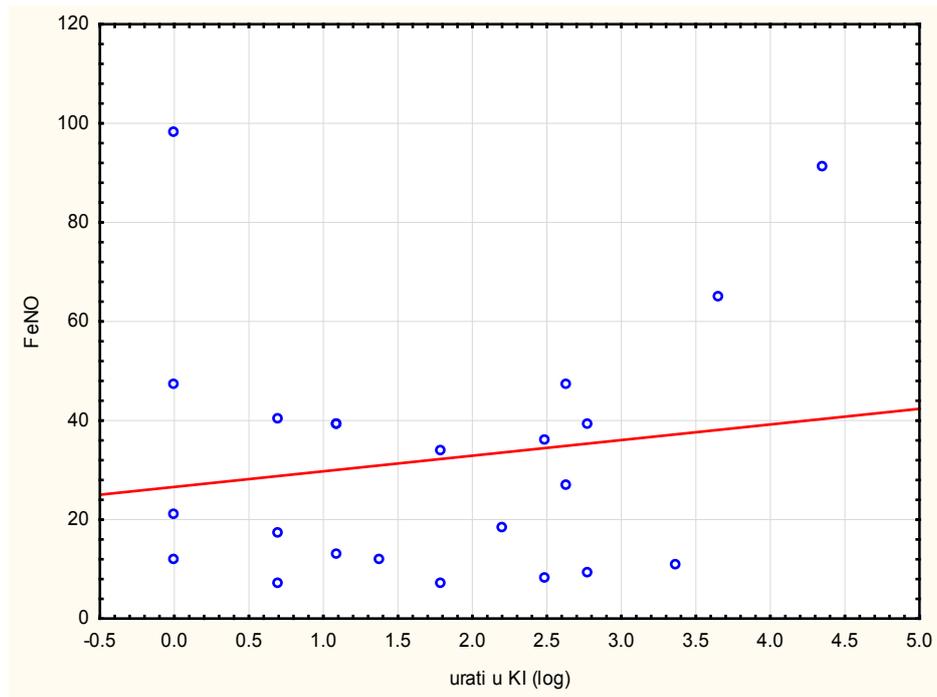
Slika 15. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i rezultata upitnika o kontroli astme (ACT) u svih astmatičara ($r=0,665$; $p<0,0001$).



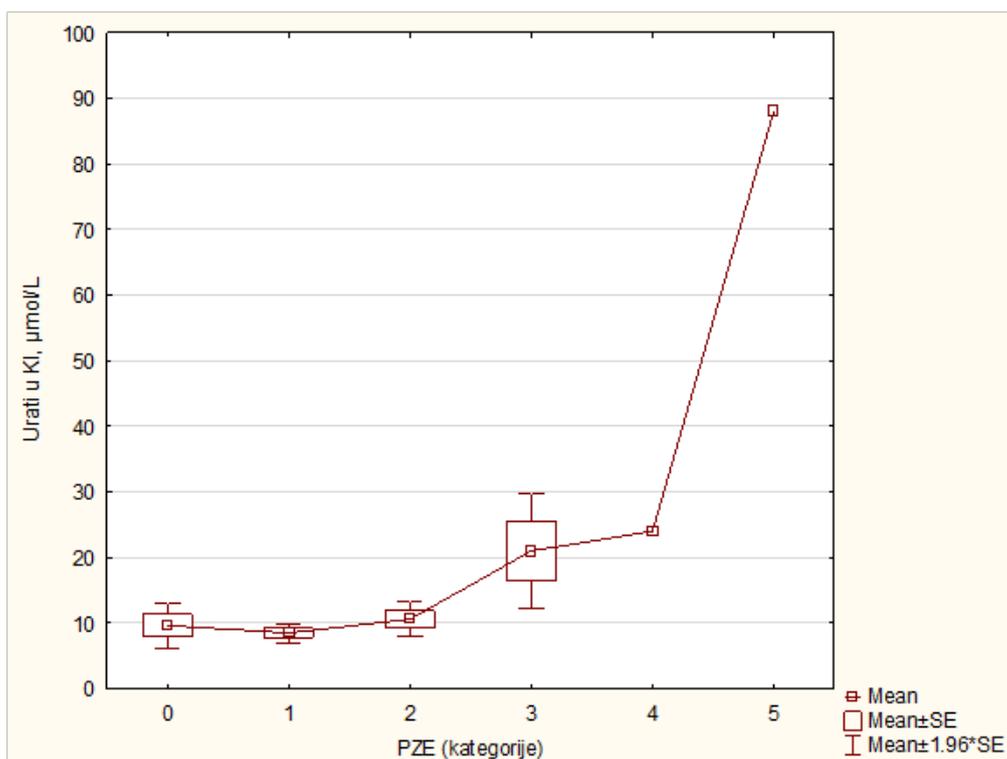
Slika 16. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i rezultata upitnika o kvaliteti života (AQLQ) u svih astmatičara ($r=0,703$; $p<0,0001$).



Slika 17. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i ukupnog zbira simptoma u svih astmatičara ($r=-0,721$; $p<0,0001$).

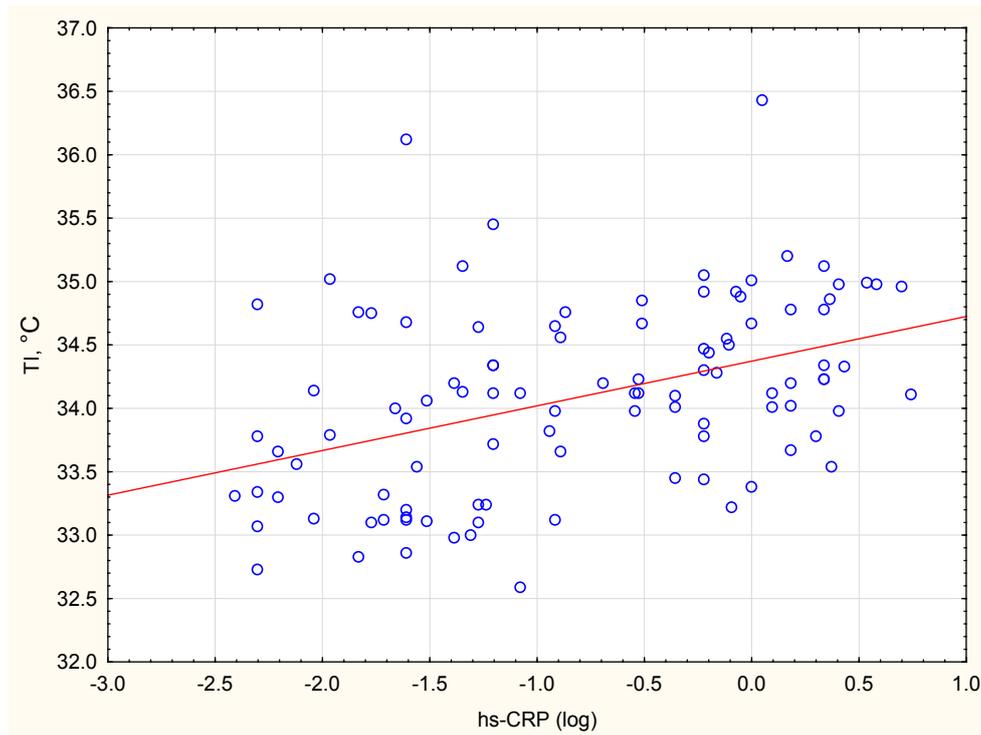


Slika 18. Povezanost između koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) i frakcije izdahnutog dušičnog oksida ($F_{E}NO$) u nekontroliranih astmatičara ($r=0,3839$; $p=0,005$).



Slika 19. Povezanost vremenske udaljenosti zadnje egzacerbacije (PZE) i koncentracije urata u kondenzatu izdaha (KI) u nekontroliranih astmatičara ($r=0,558$; $p<0,0001$).

0-bez egzacerbacija, 1-egzacerbacija prije < 1 mjesec; 2-egzacerbacija prije 1-3 mjeseca; 3-egzacerbacija prije 3-6 mjeseci; 4-egzacerbacija 6-12 mjeseci; 5-egzacerbacija prije >12 mjeseci;



Slika 20. Povezanost između CRP-a velike osjetljivosti (hs-CRP) i temperature izdahnutog zraka (TI) u svih astmatičara ($r=0,445$; $p<0,0001$).

5.4. Lokalni i sistemski biomarkeri upale kao prediktori egzacerbacije bolesti

Povezanost između biomarkera upale i egzacerbacije bolesti bila je analizirana modelom binarne logističke regresije s egzacerbacijom bolesti kao zavisnom varijablom (0=ne; da=1) i upalnim biomarkerima kao nezavisnim varijablama (prediktorima). Model koji je uključio sve upalne sistemske i lokalne biomarkere bolesti ($\chi^2=13,9$; $df=11$; $p=0,238$) objašnjava između 12,6 i 20,5% varijance. Od razmatranih biomarkera, niti jedan nije bio statistički značajan kao prediktor egzacerbacije bolesti, s tim da je uočena vrlo visoka varijabilnost pojedinih subpopulacija stanica periferne krvi (Tablica 13).

Tablica 13. Prediktori egzacerbacije astme: binarna logistička regresija.

	OR (95% CI)	p-vrijednost
KI peh	0,07 (0,0 – 1,99)	0,118
KI durati	0,97 (0,94 – 1,0)	0,075
TI	0,51 (0,2 - 1,31)	0,163
ECP	1,00 (0,96 – 1,03)	0,872
F_ENO	1,01 (0,99 - 1,04)	0,347
hs-CRP	2,05 (0,57 – 7,30)	0,269
Leukociti	6,78 (0,0 – 2593484)	0,770
Neutrofili	0,18 (0,0 – 76512)	0,798
Limfociti	0,16 (0,0 – 63298)	0,783
Monociti	0,18 (0,0 – 103183)	0,802
Eozinofili	0,55 (0,0 – 351551)	0,929

CI - interval pouzdanosti (eng. *confidence interval*); ; ECP – eozinofilni kationski protein; F_ENO - frakcija izdahnutog dušičnog oksida; hs-CRP – CRP velike osjetljivosti; KI – kondenzat izdaha; OR - omjer šansi (eng. *odds ratio*); TI temperatura izdahnutog zraka.

6. RASPRAVA

Istraživanje je trebalo usporediti vrijednosti lokalnih (F_{eNO} , pH i urati iz KI, TI) i sistemskih (hs-CRP, ECP, DKS) biomarkera upale u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom, ispitati povezanost biomarkera upale sa simptomima bolesti i drugim pokazateljima aktivnosti bolesti te odrediti dijagnostičku vrijednost biomarkera u razlikovanju kontrolirane i nekontrolirane astme i predviđanju egzacerbacije bolesti. Naši rezultati ukazuju na moguću vrijednost neinvazivnih biomarkera upale, kiselog i oksidativnog stresa kao dodatnih parametara u praćenju kontrole dječje astme. Utvrđena je povezanost lokalnih i sistemskih biomarkera upale sa simptomima bolesti i drugim pokazateljima aktivnosti bolesti. Urati u KI su najbolji samostalni parametar u predviđanju kontrole dječje astme.

Astma je kronična bolest koja se danas može uspješno liječiti. Ciljevi uspješnog liječenja astme obuhvaćaju: kontrolu simptoma, normalnu aktivnost uključujući i fizički napor, normalnu plućnu funkciju, prevenciju egzacerbacija, minimum nuspojava lijekova i prevenciju smrtnih ishoda zbog astme (8). Iako su se naše spoznaje o različitim aspektima astme u djece značajno proširile posljednjih godina, još je velik postotak djece nedostavno kontroliran i liječen (193-194). Međunarodne smjernice nalažu da astma mora biti kategorizirana pri svakom posjetu liječniku kao kontrolirana, djelomično kontrolirana ili nekontrolirana astma te liječena u skladu sa stupnjem kontrole (8). Slaba kontrola astme povezana je s nekontinuiranim liječenjem, nerazumijevanjem uzroka astme, negativnim stavom prema bolesti, strahom od primjene inhalacijskih kortikosteroida, pretjeranim korištenjem bronhodilatatora i s nedostatnim liječenjem astme i pridruženih bolesti kao što je alergijski rinitis, kronični rinosinusitis i gastroezofagealni refluks. Kategorizacija astme prema stupnju kontrole oslanja se uvelike na simptome bolesti koje bolesnik sam navodi, no znajući da kronični bolesnici često podcjenjuju težinu svog stanja, pri procjeni kontrole astme uz liječnikovu procjenu potrebni su i objektivni pokazatelji bolesnikova stanja (195). Smjernice za liječenje astme predlažu brojne objektivne metode za procjenu kontrole bolesti no u svakodnevnoj praksi najčešće se upotrebljavaju standardizirani upitnici, upitnici kvalitete života, spirometrijska mjerenja i mjerenje izdahnutog NO-a. Kombinacija objektivnih pokazatelja kontrole bolesti razlikuje se od smjernica do smjernica, a primijećeno je i često neslaganje između pojedinih parametara kontrole bolesti (195). Nadalje, dobivanje objektivnih mjerenja, u dječjoj dobi, uvelike otežava i specifičnost same populacije (lošija suradnja bolesnika pri izvođenju pretraga te invazivnost pretraga kao dodatni značajni etički i morbiditetni problem).

Astma je kronična upalna bolest te se danas smatra da je praćenje upalnih zbivanja u dišnim putovima presudno za procjenu kontrole i liječenje astme. Tradicionalni pokazatelji kontrole astme (simptomi i spirometrija) slabo odražavaju upalna zbivanja u ciljnom organu (8, 119) zbog čega znanstvena i stručna zajednica intenzivno traga za novim idealnim biomarkerom lokalne upale u dišnim putovima koji bi zadovoljio sve karakteristike idealnog pokazatelja kontrole bolesti u specifičnoj populaciji: visoka (izuzetno visoka) osjetljivost, specifičnost i dijagnostička točnost, potreba za minimalnom (bez) suradnjom bolesnika, minimalna (bez) invazivnost, minimalna (bez) šansa za komplikacije, ponovljivost, niska (bez) interferencija s egzogenim i endogenom čimbenicima, niski troškovi (121). Usprkos intenzivnom traganju za idealnim biomarkerom lokalne upale u dišnim putovima, idealan pokazatelj kontrole astme u djece još nije identificiran.

6.1. Lokalni i sistemski biomarkeri upale u kontroliranoj i nekontroliranoj astmi

U našem istraživanju, djeca s nekontroliranom astmom su imala statistički značajno manje vrijednosti pH kondenzata izdaha i koncentraciju urata u kondenzatu izdaha te veću temperaturu izdahnutog zraka u odnosu na djecu s kontroliranom astmom. Obzirom da je razlika u vrijednostima navedenih biomarkera upale između skupine djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom bila statistički značajna, zaključujemo da je hipoteza istraživanja potvrđena. Upravo ovi rezultati istraživanja koji pokazuju da se neinvazivni biomarkeri dobiveni iz izdaha, odnosno kondenzata izdaha statistički značajno razlikuju između kontrolirane i nekontrolirane astme predstavljaju dobar temelj za daljnja istraživanja na području praćenja kontrole dječje astme zbog svoje jednostavnosti, neškodljivosti i dobre ponovljivosti.

Postoje brojni dokazi da, osim upale, u patogenezi astme značajnu ulogu imaju kiseli i oksidativni stres (76, 140, 196). Kiseli stres podrazumijeva izraženo (ekscesivno) i nekontrolirano zakiseljavanje tekućine koja oblaže dišne putove uzrokovano poremećajem homeostatskih regulacijskih mehanizama. Određivanje pH vrijednosti kondenzata izdaha (KI) omogućuje neinvazivno praćenje promjena kiselosti tekućine koja oblaže dišne putove. Postojanje kiselog stresa u odraslih bolesnika s blagom astmom dokazano je u nekoliko istraživanja (126, 139, 140, 197). Istraživanja učinjena u dječjoj populaciji također su pokazala da se vrijednost pH u kondenzatu izdaha djece s astmom nalazi u kiselijem području nego u zdrave djece (139), te da je pH pomaknut u kiselije područje tijekom akutnog astmatskog napadaja (126, 198). Kostikas i sur. su prvi uočili vrijednost određivanja pH vrijednosti kondenzata izdaha u procjeni kontrole astme. U skladu s našim rezultatima, u njihovom radu odrasli astmatičari s nekontroliranom i djelomično kontroliranom astmom imali su niže vrijednosti pH kondenzata izdaha u odnosu na dobro kontrolirane (medijan 7,14 i 7,25, prema 7,44) (199). Moguće je da endogena acidifikacija putem već opisanih patomehanizama (mikrovaskularna eksudacija, pojačano stvaranje sluzi, dušičnog oksida, hiperreaktivnosti dišnih putova, bronhokonstrikcije, kašlja [76]) dovodi do gubitka kontrole astme što se objektivno mjeri pomakom pH vrijednosti KI-a u kiselije područje. U već spomenutom radu (199), ROC analiza je pokazala da vrijednosti $F_{ENO}>30$ ppb imaju $PPV>90\%$ (AUC 0,790), a vrijednosti $pH\ KI \leq 7,20$ imaju $PPV>85\%$ (AUC 0,791) za razlikovanje nepotpuno kontrolirane astme od kontrolirane. Vrijednosti $F_{ENO-a}>30$ ppb i/ili $pH\ KI \leq 7,20$ ukazuju na nepotpuno kontroliranu astmu u 88,3% pacijenata. Međutim, dijagnostička vrijednost oba biomarkera, samostalno ili u kombinaciji, je bila lošija u odnosu na kliničku procjenu i rezultat ACT-a u prepoznavanju nekontrolirane astme (199). Isto tako,

u nedavnom istraživanju provedenom na 64-ero djece astmatičarima u dobi od 6-11 godina viđeno je da je ACT bolji parametar u otkrivanju djece sa nekontroliranom astmom od $F_{E}NO$ -a s osjetljivošću 69% i specifičnošću 77% (200). Ovi rezultati još jednom potvrđuju nezamjenjivost simptoma bolesti i kliničke procjene u praćenju astme.

Oksidativni stres i upala su usko povezani (201). Oksidativni stres u astmi je uzrokovan inhalacijom alergena i otpuštanjem reaktivnih supstanci iz upalnih stanica (80). Tekućina koja oblaže dišni sustav sadrži brojne antioksidacijske spojeve, proteine (albumin, transferin, laktoferin, ceruloplazmin) i enzime (superoksid dismutaza [SOD], glutation-reduktaza, glutation-peroksidaza, katalaza). Od niskomolekularnih antioksidativnih spojeva najzastupljeniji su glutation i urati, a zatim askorbinska kiselina i vitamin E (202). Niska koncentracija urata u kondenzatu izdaha nekontroliranih astmatičara vjerojatno odražava oksidativno-antioksidativni poremećaj u plućnom tkivu. Dodig i sur. su nedavno pokazali da je koncentracija urata u KI značajno veća u bolesnika s kontroliranom astmom u odnosu na zdrave ispitanike i bolesnike s akutnom egzacerbacijom astme (142). Moguće je da u bolesnika s astmom u odnosu na zdrave ispitanike postoji povećani antioksidativni potencijal (koncentracija urata), koji se iscrpljuje tijekom egzacerbacije astme odnosno gubitkom kontrole astme, a za rezultate spomenutog istraživanja, dvojbena je i utjecaj protuupalne terapije.

Izraženija lokalna upala u djece s nekontroliranom astmom je pokazana većom vrijednošću TI-a u odnosu na kontrolirane astmatičare. Ova opažanja su u skladu s rezultatima Garcíe i suradnika (144) koji su također pokazali povišenu TI u nekontroliranih astmatičara u odnosu na dobro kontrolirane astmatičare i zdrave ispitanike. Dvije skupine autora su zabilježile značajno veću temperaturu izdaha u astmatičara u odnosu na zdrave ispitanike te njenu povezanost s biomarkerom upale i oksidativnog stresa $F_{E}NO$ -om (203-204). Ova opažanja su objašnjena činjenicom da je u astmatičara povišen protok krvi kroz sluznicu dišnih putova kao posljedica hiperemije i hiperperfuzije u tijeku upalne reakcije. Povećana prokrvljenost bronhalnih krvnih žila i povećan dotok krvi uzrokuju povećano oslobađanje topline kroz stjenku bronha. Stoga je TI predložena kao novi neinvazivni biomarker protoka krvi i upale u dišnim putovima astmatičara. Naši rezultati su u skladu s ovim opažanjima te govore u prilog porasta lokalne upale pri gubitku kontrole astme.

Hs-CRP se pokazao korisnim biomarkerom u procjeni različitih stupnjeva težine i kontrole astme (205). U našem radu, djeca s nekontroliranom astmom imala su veću koncentraciju serumskog hs-CRP-a u odnosu na djecu s kontroliranom astmom, no razlika nije bila statistički značajna. Prethodnim istraživanjem pokazali smo statistički značajnu razliku u

koncentraciji hs-CRP-a između skupina djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom koja je objašnjena jačom sistemskom upalom u nekontroliranih astmatičara (172).

U ovom istraživanju, nije utvrđena statistički značajna razlika u razini F_ENO-a, DKS-i i koncentraciji ECP-a između dviju skupina djece astmatičara. Naši rezultati su u proturječnosti s rezultatima druge skupine autora koja je pokazala da su serumski ECP i eozinofilni granulociti u perifernoj krvi osjetljivi markeri u procjeni kontrole astme (206). Objašnjenje možemo tražiti u različitom dizajnu studija kao i pretpostavci da se uzroci nekontrolirane astme razlikuju u svojoj patofiziologiji u različitim fenotipovima astme. Naime, osim eozinofilne upale koja se mjeri povišenom vrijednošću ECP-a, F_ENO-a i eozinofilnih granulocita u perifernoj krvi, postoje i druge vrste upale (npr. neutrofilna, miješana, paucigranulocitna, ...) odgovorne za gubitak kontrole astme u različitim fenotipovima (207). Isto tako, primijenjena terapija u različitim fenotipovima astme ima različiti učinak na kliničku sliku ali i različiti učinak na biomarkere upale (208). Prema službenim smjernicama (190) prediktivne vrijednosti pojedinačnog mjerenja F_ENO-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.

Među biomarkerima upale, koncentracija urata u KI je kao samostalan parametar, pokazala statistički značajnu najbolju točnost predviđanja kontrole bolesti (79,6%). Prema našim rezultatima, KI urati bi mogli biti koristan biomarker kontrolirane astme s visokom NPV od 93,5% za točku razlučivanja (*cut-off*) >6 μmol/L. Obzirom na neuvjerljivu percepciju simptoma u bolesnika s astmom, za svakodnevnu kliničku praksu korisnije je imati biomarker nekontrolirane astme (209). Promjenom točke razlučivanja (*cut-off*) na <17 μmol/L dobivamo NPV od 92,9% i PPV od 82% za nekontroliranu astmu.

Kombinacija lokalnih i sistemskih biomarkera upale u razlikovanju kontrolirane od nekontrolirane astme je pokazala zadovoljavajuće dijagnostičke karakteristike (dijagnostička točnost 83,5%), iako bez značajnije razlike u odnosu na samostalni parametar urata iz KI u razlikovanju ove dvije skupine astmatičara. Upravo ovaj rezultat koji pokazuje visoku dijagnostičku vrijednost biomarkera upale/oksidativnog stresa dobivenog neinvazivnom metodom kondenzata izdaha izdvaja kondenzat izdaha zbog svoje neškodljivosti, dobre ponovljivosti i jednostavnosti izvedbe (prikladan za sve dobne skupine, može se uzimati u svjesnih, spontanodišućih bolesnika, novorođenčadi, bolesnika na strojno potpomognutoj ventilaciji) metodom izbora u dijagnostici i praćenju dječje astme. Prednost metode je i u mogućnosti istovremene analize većeg broja različitih biomarkera koji reprezentiraju višeslojni karakter astme kao sindroma koji se ogleda kroz različite oblike alergijske lokalne i

sistemske upale, kiselog i oksidativnog stresa, neurohumoralne kontrole, interakcije s okolišem, infektivnim čimbenicima te osnovnim endogenim karakteristikama pojedinca (210-216). Najveći nedostaci kondenzata izdaha potječu još uvijek od nedovoljne standardizacije (uzorkovanja, postava, standardnog izbora biomarkera) (217-218), nepostojanja jasne povezanosti s mjestom nastanka u dišnom sustavu, nedovoljno istražene problematike vezane uz različite respiratorne i sistemske bolesti (dijagnostika, praćenje, utjecaj terapijskih intervencija, dobna uvjetovanost) te pojave kontradiktornih rezultata vezanih uz neke od biomarkera (216, 219). Za očekivati je, da će nakon potrebnih postupaka optimiziranja i standardizacije, kondenzat izdaha postati metoda izbora u dijagnostici i praćenju plućnih bolesti kako u djece tako i odraslih bolesnika.

Zaključno, rezultati istraživanja pokazuju da neinvazivni biomarkeri upale, kiselog i oksidativnog stresa mogu naći svoje mjesto kao dodatni dijagnostički alat u procjeni kontrole astme. Iako biomarkeri razmatrani u ovom istraživanju nisu specifični za astmu i mogu odražavati i druge bolesti i stanja u pojedinog bolesnika (pretilost, upalne bolesti vezivnog tkiva, maligne bolesti, GERB), pretpostavljamo da bi se serijskim određivanjem biomarkera i kontrole bolesti dobilo potpunije rezultate o stvarnoj vrijednosti upalnih biomarkera u dječjoj astmi.

6.2. Povezanost lokalnih i sistemskih biomarkera upale i učestalosti simptoma astme

U našem istraživanju utvrđena je povezanost između temperature izdaha i učestalosti simptoma napetosti u prsima, serumske koncentracije hs-CRP-a i učestalosti čišćenja grla, Z-vrijednosti apsolutnog broja monocita i učestalosti naprezanja pri disanju, buđenja noću zbog astme i ukupnog zbira simptoma, te Z-vrijednosti postotka bazofilnih granulocita u diferencijalnoj krvnoj slici i učestalosti osjećaja težine u prsima i buđenja noću zbog astme. Ovime je hipoteza istraživanja o povezanosti biomarkera upale i simptoma astme potvrđena.

Astma je kronična upalna bolest dišnih putova i smatra se da su trajna lokalna i sistemska upala uključene u razvoj simptoma. Simptomi bolesti posljedica su složene aktivacijske petlje koja uključuje stimulaciju okrajina osjetih živaca, prijenos i neuralnu integraciju, interpretaciju od strane moždane kore, i na kraju, prepoznavanje i verbalno opisivanje od strane bolesnika (220). Simptomi astme su glavni uzrok posjeta liječniku i čine temelj u procjeni kontrole astme. Percepcija simptoma razlikuje se od bolesnika do bolesnika. Iako je u mnogim dosadašnjim studijama razmatrana indirektna povezanost simptoma i upale dišnih putova, direktna povezanost simptoma i upale do sada nije istražena (221).

U dječjoj populaciji, pri razmatranju povezanosti upale i simptoma bolesti, najčešće korišten marker upale dišnih putova je $FeNO$. Prema CAMP studiji, vrijednosti $FeNO$ -a su bile povećane u djece s prisutnim noćnim simptomima barem jednom tjedno ili u djece koja su trebala beta-2 agoniste kratkog djelovanja barem jednom tjedno (222). U istraživanju Spergela i sur. u skupini djece astmatičara, utvrđena je povezanost mjesečnog zbira simptoma s $FeNO$ -om dok FEV_1 i $FeNO$ nisu bili povezani (223). Prema našim rezultatima razina $FeNO$ -a je pokazala slabu povezanost s učestalošću buđenja ujutro sa simptomima astme.

Nadalje, TI je bila srednje dobro povezana s učestalošću napetosti u prsima i naprežanja pri disanju u NA te zbirom simptoma u svih astmatičara.

Nedavno istraživanje provedeno u Finskoj na 10 zdravih ispitanika i 26 astmatičara je pokazalo povezanost povišenih vrijednosti markera oksidativnog stresa 8-izoprostana i jakog subjektivnog kašlja izraženog prema vrijednostima upitnika *Leicester Cough Questionnaire* (224). Smatra se da kisikovi radikali podražavaju i aktiviraju senzorna C-vlakna te na taj način potiču kašalj. Zanimljivi su rezultati jedne prospektivne studije kohorte 630 djece praćene od rođenja do 8. godine života s ciljem istraživanja povezanosti pH vrijednosti KI i simptoma koji upućuju na astmu. Rezultati istraživanja su pokazali da nije bilo statističke značajne razlike u pH vrijednosti KI između djece s astmom i neastmatičara. Niži pH KI su imala djeca s trenutno prisutnim *wheezingom* za razliku od skupine djece bez wheezinga. Učestalost i težina wheezinga te terapija nisu bili povezani s pH KI. Također nije nađena povezanost između pH vrijednosti KI i plućne funkcije (FEV_1), BHR (odgovor na metakolinski test) i upale ($FeNO$) (225). U našem istraživanju utvrđena je statistički značajna obrnuto proporcionalna povezanost zbira simptoma s pH vrijednošću KI i koncentracijom urata u KI. Dakle, djeca sa simptomima imala su pH vrijednost KI u kiselijem području kao i nižu koncentraciju antioksidansa.

Serumski ECP je bio statistički značajno obrnuto proporcionalno povezan s učestalošću kašlja, osjećaja težine u prsima, naprežanja pri disanju i buđenja noću zbog astme. U istraživanju Oughourlia i sur. istražena je povezanost ECP-a i slijedećih simptoma astme: *wheezinga*, kroničnog kašlja, napetosti u prsima, noćnih simptoma i nedostatka zraka. Iako nije nađena statistički značajna povezanost, razina ECP-a je bila značajno viša u pacijenata koji su bili simptomatični (226). Povišena vrijednost serumskog ECP-a ukazuje na prisustvo sistemske eozinofilne upale (207) te kolerira sa zbirom simptoma, brojem eozinofilnim granulocitima u perifernoj krvi i padom vrijednosti PEF-a u senzibiliziranih astmatičara (227). Izloženost alergenu dovodi do porasta serumske vrijednosti ECP-a u preosjetljivih bolesnika (228), dok terapija ICS-om snižava vrijednost serumskog ECP-a i broj eozinofila u perifernoj

krvi (229). Obzirom da je povezanost nađena u skupini nekontroliranih astmatičara gdje je 83% bolesnika bilo na terapiji ICS-om vjerujemo da je negativna korelacija između ECP-a i simptoma bolesti posljedica utjecaja protuupalne terapije.

U prijašnjim studijama viđena je i povezanost povećane koncentracije hs-CRP-a s respiratornim simptomima u bolesnika s nealergijskom astmom (168). U skladu s tim rezultatima, u našem istraživanju, utvrđena je statistički značajna proporcionalna povezanost koncentracije serumskog hs-CRP-a s učestalošću osjećaja otežanog disanja, hripanja u prsima, kašlja, čišćenja grla, buđenja sa simptomima astme, naprezanja pri disanju, buđenja noću zbog astme, ometanja da se pacijent naspava, borbe da se dođe do zraka i ukupnim zbirom simptoma.

Lewis i suradnici su istraživali povezanost stanica periferne krvi i učestalosti kroničnih respiratornih simptoma, atopije, plućne funkcije i BHR u odraslih. Periferna monocitoza je bila povezana s povećanim rizikom pojavnosti noćne dispneje, kroničnog kašlja i sniženog FEV₁. Periferna neutrofilija je bila neovisno povezana s rizikom pojavnosti noćne dispneje, dispneje u naporu, astme (prošle ili trenutne) i sniženog FEV₁. Viđen je značajno povišen neovisni rizik pojave *wheezinga*, noćne dispneje, dispneje u naporu, kroničnog kašlja i astme s perifernom eozinofilijom. Povećan broj eozinofilnih granulocita je također bio i neovisni prediktivni čimbenik atopije, sniženog FEV₁, BHR i povišenog IgE. Neutrofilni granulociti su bili značajno povezani s dijagnosticiranom astmom u starijoj dobi. Periferna neutrofilija je povezana s BHR neovisno u prisutnosti atopije (179). Povezanost markera serumske upale i simptoma astme je viđena i u randomiziranoj studiji učinjenoj na 33 djece astmatičara gdje je nakon ukidanja terapije ICS-om 71% djece postalo simptomatsko i imalo značajno povišene vrijednosti serumskog ECP-a i broja eozinofilnih granulocita u perifernoj krvi (230). Prema našim rezultatima, Z-vrijednost apsolutnog broja leukocita je bila umjereno povezana s učestalošću ometanja da se pacijent naspava. Z-vrijednost apsolutnog broja monocita je bila umjereno povezana s učestalošću naprezanja pri disanju, buđenja noću i ukupnim zbirom simptoma. Z vrijednost apsolutnog broja bazofilnih granulocita je umjereno povezana s osjećajem težine u prsima, a Z vrijednost postotka bazofilnih granulocita u DKS-i je umjereno povezana s učestalošću osjećaja težine u prsima, naprezanja pri disanju i buđenja noću zbog astme.

Iz navedenog možemo zaključiti da rezultati istraživanja o povezanosti upale i simptoma astme nisu jednoznačni. Interpretacija je otežana različitom metodologijom korištenom u znanstvenim istraživanjima kao i uporabom različitih biomarkera upale u heterogenoj skupini astmatičara. Većina studija ipak ukazuje na činjenicu da je upala u simptomatičnih

astmatičara jače izražena. Potrebne su nove, posebno dizajnirane studije koje bi ispitale direktnu povezanost simptoma astme i upale.

6.3. Povezanost lokalnih i sistemskih biomarkera upale međusobno i s ostalim pokazateljima aktivnosti bolesti

U radu smo dokazali povezanost pH vrijednosti KI s koncentracijom urata u KI i razinom FE_{NO}-a te sljedećim pokazateljima aktivnosti bolesti: ACT-om, AQLQ, zbirom simptoma i potrebom za salbutamolom. Eksperimentalna studija učinjena na štakorima je pokazala da zakiseljavanje tekućine koja oblaže dišne putove dovodi do pojačane lokalne proizvodnje slobodnih kisikovih radikala (231) ukazujući time na uzročno-posljedičnu povezanost kiselog i oksidativnog stresa. U prospektivnoj studiji Kostikas i sur. su dokazali značajnu povezanost kiselog (pH vrijednost KI) i oksidativnog (H₂O₂ i 8-izoprostan u KI) stresa u odraslih bolesnika s astmom na terapiji kortikosteroidima (140). Istraživanjem je potvrđena hipoteza o povezanosti endogene acidifikacije dišnih putova (pH KI) i upale (upalne stanice iz inducirano g sputuma) te primijećeno da vrijednost pH kondenzata izdaha utječe na stupanj oksidativnog stresa i NO metabolizam (nitrati/nitriti) (140). U skladu s navedenim, i u našem radu je viđena nezavisna povezanost markera kiselog (pH vrijednost KI) i oksidativnog stresa (urati u KI), dok Zhao i suradnici, u svojem radu to nisu uspjeli dokazati (197). Objašnjenje ovih rezultata nalazimo u pretpostavci da se patofiziologija nekontrolirane astme u djece i odraslih može razlikovati, kao i u činjenici da je kiseli stres u istraživanju Kostikasa i Zhaoa mjeran različitim markerima. Povezanost pH KI i navedenih markera kontrole astme nesumnjivo upućuje na vrijednost određivanja pH kondenzata izdaha kao dodatnog parametra u procjeni kontrole bolesti.

U našem istraživanju utvrđena je značajna umjerena do jaka povezanost koncentracije urata u KI sa sljedećim pokazateljima aktivnosti bolesti: FEV₁, ACT-om, AQLQ, potrebom za salbutamolom i zbirom simptoma. Povezanost markera oksidativnog stresa i kontrole astme je viđena i u istraživanju Trischlera i sur. gdje je utvrđena povezanost između alveolarne frakcije vodikovog peroksida (H₂O₂) u KI i ACT-a. Djeca s lošijom kontrolom astme su imala višu koncentraciju H₂O₂ u alveolarnoj frakciji (232). Nadalje, prema našim rezultatima u nekontroliranoj astmi urati u KI su bili u pozitivnoj korelaciji s vremenskom udaljenošću zadnje egzacerbacije što podržava hipotezu o antioksidativnom učinku urata u astmi. U tijeku egzacerbacije astme vjerojatno dolazi do trošenja urata koji ostvaruju svoj antioksidativni učinak direktnim hvatanjem slobodnih radikala.

U već spomenutom radu Kostikas i sur. su pokazali da u bolesnika s umjerenom astmom postoji povezanost vrijednosti pH, broja eozinofilnih granulocita u iskašljaju i koncentracije nitrata odnosno nitrita, te smatraju da vrijednosti koreliraju s oksidacijskim stresom (140). Značajna povezanost oksidativnog stresa i NO metabolizma je utvrđena u radu Ueno i suradnika gdje je utvrđena povezanost razine H_2O_2 i razine nitrita/nitrata u kondenzatu izdaha astmatičara (138). U skladu s njihovim opažanjima su i naši rezultati iz kojih je vidljiva pozitivna korelacija urata u KI-a i razine $FeNO$ -a u NA što podržava hipotezu o povezanosti eozinofilne upale, NO metabolizma i oksidativnog stresa. Naposljetku to bi moglo značiti da su kiseli i oksidativni stres u astmi uzročno-posljedično povezani te se nameće pretpostavka o patomehanizmu astme kao inicijalno staničnom procesu koji dovodi do oksidativnog stresa, stvaranja NO i kiselog stresa u konačnici.

Utvrđena je blaga do umjereno jaka povezanost TI sa sljedećim pokazateljima aktivnosti bolesti: potrebom za salbutamolom, ACT-om, AQLQ i zbirom simptoma u NA što se uvelike razlikuje od rezultata Hamillija i suradnika koji nisu dokazali povezanost TI i drugih pokazatelja aktivnosti bolesti (233). Za razliku od dvije ranije skupine istraživača nije pronađena povezanost TI s $FeNO$ -om (202-203).

Uloga sistemskih biomarkera upale u astmi je slabo istražena. Utvrđeno je da je serumska koncentracija ECP-a statistički značajno viša u astmatičara tijekom akutne egzacerbacije u odnosu na bolesnike s astmom u remisiji (156) te da je serumski ECP u pozitivnoj korelaciji sa stupnjem opstrukcije dišnih putova za vrijeme egzacerbacije bolesti (151). Prema našim rezultatima, utvrđena je proporcionalna povezanost ECP-a i koncentracije urata u KI što upućuje na povezanost eozinofilne upale i oksidativnog stresa u nekontroliranoj astmi. Nadalje, ECP je bio statistički značajno obrnuto proporcionalno povezan s ACT-om kao jednim od pokazatelja aktivnosti bolesti, dok povezanost s FEV_1 nismo uspjeli dokazati.

Utvrđeno je da je serumski hs-CRP povišen u nekontroliranoj astmi i značajno povezan s težinom astme, potrebom za salbutamolom i akutnom egzacerbacijom astme (172, 205). U istraživanju smo pokazali povezanost hs-CRP-a i drugih pokazatelja aktivnosti bolesti, tj. zbira simptoma, potrebe za salbutamolom, spirometrijskih parametara (FEV_1 , post FEV_1/FVC), ACT-a i AQLQ. Prvi je put, prema podacima dostupne literature, utvrđena statistički značajna povezanost serumskog hs-CRP-a i TI kao markera lokalne upale. Niski post FEV_1/FVC je predložen kao marker remodeliranja bronha (234) i njegova negativna povezanost s hs-CRP-om utvrđena u našem istraživanju može upućivati na povezanost sistemske upale i remodeliranja bronha. Nedavno istraživanje Konradsena i sur. je pokazalo da je u bolesnika s teškom astmom povišen serumski YXL-40 protein koji proporcionalno

korelira s $F_{E}NO$ -om, brojem neutrofilnih granulocita u perifernoj krvi i zadebljanjem bronhalne stjenke, također ukazujući na povezanost sistemske upale i remodeliranja bronha (235). Hipotetski rečeno, sistemska upala u astmi je povezana s trenutnom upalom dišnih putova (mjerenom TI i FEV_1), ali i sa dugodjelujućim plućnim oštećenjem mjerenim niskim post FEV_1/FVC . Naši su rezultati u skladu s nedavno objavljenim radovima u kojima je također utvrđena povezanost lokalne i sistemske upale u astmi (169, 236) što upućuje na vrijednost određivanja serumskog hs-CRP-a u praćenju lokalnih zbivanja u astmi. Međutim, ima i proturječnih dokaza. U svom radu, Ramirez i sur. nisu dokazali povezanost hs-CRP-a i drugih pokazatelja aktivnosti bolesti (237).

U našem istraživanju, sistemska leukocitoza je bila u pozitivnoj korelaciji sa zbirom simptoma te negativnoj s FEV_1 , ACT-om i AQLQ. Periferna neutrofilija je također bila u pozitivnoj korelaciji sa zbirom simptoma i negativnoj s FEV_1 i AQLQ. Periferna monocitoza je bila u pozitivnoj korelaciji sa zbirom simptoma i negativnoj s FEV_1 , ACT-om i AQLQ. Povezanost neutrofilnih granulocita u perifernoj krvi i pogoršanja astme viđena je i u studiji Asmana i suradnika gdje su bolesnici s kasnom alergijskom reakcijom, 18 h nakon provokacije s alergenom, imali 1,4 puta veću koncentraciju neutrofilnih granulocita u perifernoj krvi nego prije provokacije (238). Smith i suradnici (239) su pokazali da je za sistemska upala niskog stupnja (eng. *low-grade systemic inflammation*), kakva je prisutna i u astmi, karakterističan povišen apsolutni broj neutrofilnih granulocita i monocita, stoga je povezanost ovih stanica sa simptomima i pokazateljima aktivnosti astme očekivana. Obzirom da je, u našem istraživanju, nađena povezanost simptoma bolesti i biomarkera neozinofilne upale (skupine se nisu razlikovale u odnosu na eozinofilne biomarkeri bolesti, terapiju ICS-om niti izloženost alergenu), za pretpostaviti je u da u patogenezi nekontrolirane astme u djece ulogu imaju infekcije ili superantigeni (240-241). Periferna bazofilija je bila u negativnoj korelaciji s potrebom za salbutamolom, zbirom simptoma i TI. Objašnjene ovih korelacija možemo naći u pretpostavci da u tijeku pogoršanja astme dolazi do mobilizacije bazofilnih granulocita u ciljni organ (pluća) te se njihov apsolutni broj na periferiji smanjuje (242).

Prema našim rezultatima, postoji povezanost između sistemske upale i lokalne upale u dišnim putovima. Hipotetski rečeno, uzroci nekontrolirane astme u djece razlikuju se u svojoj patofiziologiji (atopija, neadekvatna terapija ICS-om, infekcije, superantigeni) u različitim fenotipovima astme.

6.4. Lokalni i sistemski biomarkeri upale kao prediktori buduće egzacerbacije bolesti

U našem radu, niti jedan razmatrani biomarker lokalne i sistemske upale nije se izdvojio kao statistički značajni prediktor buduće egzacerbacije.

Prema smjernicama *National Asthma Education and Prevention Program* (NAEPP) procjena težine i kontrole astme uključuje 2 domene: (1) pogoršanje, što podrazumijeva vrednovanje učestalosti i intenziteta simptoma; i (2) rizik, što podrazumijeva vjerojatnost buduće egzacerbacije astme (22). Prema CAMP studiji 30% djece s trajnom astmom na terapiji ICS-om ipak imaju 1 ili više egzacerbacija astme godišnje (243). U PACT (eng. *Pediatric Asthma Controller Trial*) istraživanju, tijekom 48 tjedana praćenja, čak je 39% djece na terapiji flutikazonom 2 puta dnevno po 100 µg imalo barem jednu egzacerbaciju astme koja je zahtijevala primjenu oralnih kortikosteroida (244). Analiza induciranog sputuma tijekom egzacerbacije astme je pokazala raznovrsnost prirode egzacerbacije astme u djece. Među uzorcima su se razlikovali: uzorci s povećanim brojem neutrofilnih granulocita uz nešto eozinofilnih granulocita, uzorci s povećanim brojem eozinofilnih i neutrofilnih granulocita te uzorci bez povećanog broja neutrofilnih i eozinofilnih granulocita (245-246). Neutrofilni granulociti su dominantne stanice u većini egzacerbacija astme te se pretpostavlja da su takvi bolesnici manje osjetljivi na terapiju ICS-om (247) što vjerojatno ima značajnu ulogu u patogenezi egzacerbacija.

Iako su simptomi astme i egzacerbacija astme usko povezani, njihovi prediktori se u djece razlikuju (248). Djeca s prisutnim simptomima astme imaju veći rizik za posjet hitnim službama, hospitalizaciju zbog astme ili potrebu za sistemskim kortikosteroidima. Čimbenici povezani s teškom egzacerbacijom astme su: mlađa dob, posjet hitnoj službi ili hospitalizacija zbog astme u prošloj godini, potreba za oralnim kortikosteroidima u zadnja 3 mjeseca, snižena vrijednost FEV₁/FVC, niža provokacijska doza metakolina koja izaziva 20%-tni pad FEV₁ i viši log₁₀ broja eozinofilnih granulocita (248). Najsnažniji čimbenik povezan s budućom egzacerbacijom astme je prošla egzacerbacija (249-250). Poznato je da djeca koja imaju velik rizik za egzacerbaciju astme ne moraju imati veću prisutnost simptoma astme prije egzacerbacije (251). Prema CAMP studiji 14% ispitanika nije imalo trajne simptome astme tijekom 4 godine istraživanja, a ipak je imalo jednu ili više teških egzacerbacija astme (248). Mjerenje plućne funkcije slabo odražava stupanj upale u dišnim putovima što je također viđeno u CAMP studiji gdje je granični FEV₁ uključenih bolesnika bio >93%, a trećina bolesnika je ipak zahtijevala sistemski kortikosteroid u narednih 6 mjeseci (99). Prema našim rezultatima, 52,6% djece s egzacerbacijom astme je imalo FEV₁ >90%.

Uloga spirometrijskih parametara i $F_{E}NO$ -a u predviđanju egzacerbacije bolesti viđena je i u prospektivnoj studiji provedenoj u odraslih astmatičara gdje se 91% egzacerbacija javilo u onih astmatičara čija je vrijednost $FEV_1 \leq 76\%$ predviđene vrijednosti i 59% egzacerbacija u onih čija je vrijednost $F_{E}NO$ bila ≥ 28 ppb. Kombinacija vrijednosti $F_{E}NO$ -a ≥ 28 ppb i $FEV_1 \leq 76\%$ predviđene vrijednosti je otkrila 13 stabilnih astmatičara s 85%-tnom vjerojatnošću buduće egzacerbacije astme, dok 9 astmatičara s $F_{E}NO < 28$ ppb i $FEV_1 > 76\%$ nije imalo rizik buduće egzacerbacije (252). Prema Satou i suradnicima kombinacija rezultata ACT-a ≤ 23 i $FEV_1 \leq 91,8\%$ ima 85%-tnu vjerojatnost predviđanja buduće egzacerbacije astme (253).

U istraživanju Keskina i sur. izdahnuti 8-izoprostan (biomarker oksidativnog stresa) je bio značajno niži u djece koja su imala manje od 4 egzacerbacije astme godišnje u odnosu na djecu s više od 4 egzacerbacije astme godišnje. Nije utvrđena povezanost između izdahnutog 8-izoprostana i kontrole astme te ACT-a (254).

Mogućnost predviđanja egzacerbacije astme pomoću neinvazivnih biomarkera upale je utvrđena i u istraživanju Robroeksa i sur. Od 40-oro djece astmatičara koja su prospektivno praćena tijekom godine dana, 16 je razvilo egzacerbaciju astme. Kombinacijom 7 izdahnutih hlapljivih organskih spojeva (VOC, eng. *Volatile Organic Compounds*) bilo je moguće razlikovati skupinu djece s egzacerbacijom bolesti od skupine djece bez egzacerbacije s točnošću od 91% (osjetljivost 79%, specifičnost 100%). $F_{E}NO$ i plućna funkcija nisu bili statistički značajni prediktori buduće egzacerbacije (255).

Interpretirajući dobivene rezultate, postavlja se pitanje zašto se ispitivani upalni biomarkeri nisu pokazali statistički značajnim prediktorima egzacerbacije bolesti, što je u suprotnosti s hipotezom istraživanja, odnosno rezultatima istraživanja koja su dokazala njihovu važnost u patogenezi i procjeni kontrole dječje astme. Na ovo pitanje ima više odgovora koji se međusobno ne isključuju. U dostupnoj međunarodnoj literaturi, vrlo je malo radova iz područja praćenja alergijske upale u djece, osobito prospektivnih istraživanja, koja bi bila usmjerena na odabir biomarkera lokalne i sistemske upale u svrhu procjenjivanja kontrole astme te predviđanja pogoršanja bolesti. Domaća literatura također oskudijeva rezultatima iz ovog područja, jer se u Hrvatskoj analiza izdaha i analiza kondenzata izdaha u djece provode samo u Dječjoj bolnici Srebrnjak. Prvi mogući odgovor je da bi veći broj ispitanika možda dao statistički značajnu razinu. Takav se odgovor obično koristi kao „izgovor“ za izostanak statističke značajnosti. Ono što treba reći jest da je za kliničku primjenu važno imati primjetljivu razliku i na malom broju ispitanika. Drugi mogući odgovor je da ispitivani biomarkeri uistinu nisu značajni čimbenici u prognozi daljeg tijeka bolesti odnosno predviđanja egzacerbacije bolesti. Već je pokazano da sistemski biomarkeri odražavaju

sistemsku upalu, a slabije upalu u ciljnom organu. Isto tako, na ispitivane biomarkere utječu i druge bolesti i stanja osim astme. Vjerojatno je istina najbliže takvom odgovoru, a to je da ispitivani upalni biomarkeri nisu specifični za astmu, te jednokratno mjerenje istih ne može dati informaciju o stvarnoj aktivnosti bolesti u realnom vremenu. Mišljenja smo da bi praćenjem dinamike biomarkera dobili potpunije rezultate o upalnim zbivanjima u astmi te na taj način mogli predvidjeti egzacerbaciju bolesti.

Zaključno, simptomi bolesti i plućna funkcija kao samostalni parametri su nedostatni u procjeni kontrole bolesti i rizika buduće egzacerbacije astme. Cilj istraživača je otkriti neinvazivne biomarkere upale s dobrim potencijalom predviđanja egzacerbacije bolesti.

Naši rezultati ukazuju na vrijednost lokalnih i sistemskih biomarkera u procjeni kontrole dječje astme. Pokazana je povezanost simptoma astme, kao jednog od temeljnih pokazatelja kontrole bolesti, s biomarkerima upale, kao i povezanost upalnih biomarkera s drugim pokazateljima kontrole dječje astme. Određivanje upalnih biomarkera iz bioloških uzoraka dobivenih neinvazivnim ili minimalno invazivnim metodama od posebnog je interesa u dječjoj astmi zbog specifičnosti same populacije. Stoga je za očekivati je da će rezultati našeg istraživanja i istraživanja drugih znanstvenika na području upalnih biomarkera naći svoje mjesto u budućim smjernicama kontrole i liječenja dječje astme.

Svjesni smo sljedećih nedostataka našeg istraživanja: kontrola astme i biomarkeri upale nisu serijski određivani; postoje broji čimbenici koji mogu utjecati na rezultate istraživanja, kao što su: spol, dob, BMI, atopijski status, fizička aktivnost, prehrana, izloženost pasivnom pušenju; nedovoljna osjetljivost metode određivanja koncentracije urata u KI-a kao i nedostatak podataka o vrijednosti drugih sistemskih i lokalnih markera upale i oksidativnog stresa. Ovo istraživanje ima i metodološke nedostatke koji ne dopuštaju donošenje zaključaka o uzročno-posljedičnoj povezanosti upalnih biomarkera i stupnja kontrole astme odnosno simptoma astme. Prije svega, upalni su biomarkeri određivani istovremeno kada i procjena kontrole bolesti, te je stoga nemoguće odrediti vremenski slijed. Takvom je dizajnu inherentna sklonost sustavnim pogreškama, kako u odabiru sudionika, tako i u procjeni izloženosti i ishoda. Budući da su ispitanici bili izabrani temeljem prigodnog uzorka, ne može se s velikom pouzdanošću tvrditi da je uzorak djece astmatičara u ovoj studiji reprezentativan za čitavu populaciju djece astmatičara u Hrvatskoj.

Naposljetku, cilj istraživača i dalje je usmjeren k pronalaženju idealnog biomarkera kontrole dječje astme sa svim karakteristikama navedenim u uvodnom izlaganju. Da bi se preciznije ispitala vrijednost određivanja pojedinih biomarkera u dječjoj astmi, potrebno je provesti

longitudinalna istraživanja, s većim brojem ispitanika različitog stupnja i težine astme, te serijskim određivanjem biomarkera i kontrole bolesti, kako bi se razjasnio temporalni slijed navedenih povezanosti.

7. ZAKLJUČCI

1. Djeca s nekontroliranom astmom imala su statistički značajno manju koncentraciju urata u kondenzatu izdaha u odnosu na djecu s kontroliranom astmom (Slika 5).
2. Djeca s nekontroliranom astmom imala su statistički značajno manju pH vrijednost kondenzata izdaha u odnosu na djecu s kontroliranom astmom (Slika 6).
3. Djeca s nekontroliranom astmom imala su statistički značajno veću temperaturu izdaha u odnosu na djecu s kontroliranom astmom (Slika 7).
4. Koncentracija urata u kondenzatu izdaha je bila najbolji samostalni parametar u razlikovanju kontrolirane i nekontrolirane astme s dijagnostičkom točnošću od 79,6% ($F=57,899$; $p \leq 0,0001$, Slika 8).
5. Diskriminacijskom je analizom upalnih biomarkera utvrđen najbolji statistički značajni model za razlikovanje kontrolirane i nekontrolirane astme (svojevrsna (eigen) vrijednost=0,6480; kanonički koeficijent korelacije=0,6271; Willksova lambda=0,6068; $\chi^2=49,959$; $df=2$; $p < 0,0001$), dijagnostičke točnosti 83,5%, a koji je uključio 2 varijable: urati u KI i Z-vrijednost apsolutnog broja monocita. Analiza ROC krivulje (Slika 9) navedenog modela pokazala je vrlo dobru razlikovnu učinkovitost uz AUC od 0,909 (95% CI, 0,836-0,957), osjetljivost od 88% (95% CI, 75,7–95,5%), specifičnost od 81,13% (95% CI, 68,0–90,6%), PPV 81,5% (95% CI, 68,6–90,7%), NPV 87,8% (95% CI, 75,2–95,4%), LR za dijagnozu kod pozitivnog testa 4,66 (95% CI, 2,6–8,2), LR za dijagnozu kod negativnog testa 0,15 (95% CI, 0,07–0,3).
6. Utvrđena je statistički značajna umjerena povezanost temperature izdaha i učestalosti simptoma napetosti u prsima ($r=0,420$; $p=0,002$, Slika 10).
7. Utvrđena je statistički značajna umjerena povezanost serumske koncentracije hs-CRP-a i učestalosti čišćenja grla ($r=0,405$; $p=0,003$, Slika 11) u nekontroliranih astmatičara.
8. Utvrđena je statistički značajna umjerena povezanost Z-vrijednosti apsolutnog broja monocita i učestalosti naprezanja pri disanju ($r=0,426$; $p=0,001$), buđenja noću zbog astme ($r=0,420$; $p=0,002$) i ukupnog zbira simptoma ($r=0,426$; $p=0,015$, Slika 12) u nekontroliranih astmatičara.
9. Utvrđena je statistički značajna umjerena povezanost Z-vrijednosti postotka bazofilnih granulocita u diferencijalnoj krvnoj slici i učestalosti osjećaja težine u prsima ($r=-0,459$; $p=0,001$, Slika 13) i buđenja noću zbog astme ($r=-0,413$; $p=0,002$).
10. Utvrđena je statistički značajna slaba povezanost koncentracije urata u KI s FEV₁ ($r=0,225$, $p=0,022$), umjerena povezanost s ACT-om ($r=0,665$; $p < 0,0001$, Slika 15) i potrebom za salbutamolom ($r=-0,538$; $p < 0,0001$) te visoka povezanost s AQLQ

($r=0,703$, $p<0,0001$, Slika 16) i ukupnim zbirom simptoma ($r=-0,722$; $p<0,0001$, Slika 17).

11. Utvrđena je statistički značajna povezanost koncentracije urata u KI s vremenskom udaljenošću zadnje egzacerbacije ($r=0,558$; $p<0,0001$, Slika 19) i $F_{E}NO$ -om ($r=0,558$, $p\leq 0,0001$; $r=0,3839$; $p=0,005$) u nekontroliranih astmatičara, te povezanost s pH u KI ($r=0,379$; $p\leq 0,0001$) i TI ($r=-0,220$; $p=0,025$) u svih astmatičara.
12. Utvrđena je statistički značajna umjerena povezanost serumskog hs-CRP-a i temperature izdaha ($r=0,445$, $p<0,0001$, Slika 20) i blaga do umjerena povezanost sa slijedećima pokazateljima aktivnosti bolesti: zbirom simptoma, potrebom za salbutamolom, FEV_1 , post FEV_1/FVC , ACT i AQLQ.
13. Modelom binarne logističke regresije nije dokazana povezanost između biomarkera upale i egzacerbacije bolesti.

8. SAŽETAK

UVOD: Obzirom na manjkavosti tradicionalnih parametara kontrole i težine astme, zadnjih 15-tak godina istraživanja su usmjerena k pronalaženju neinvazivnih biomarkera (BM-a) upale u dišnim putovima.

CILJEVI: 1. usporediti različite upalne BM-e u djece s kontroliranom i nekontroliranom astmom, 2. ispitati povezanost BM-a upale međusobno i s drugim pokazateljima aktivnosti bolesti (simptomi, plućna funkcija, potreba za salbutamolom, egzacerbacije, upitnik o kontroli astme [ACT], kvaliteta života [AQLQ]).

MATERIJALI I METODE: Opservacijska usporedna studija kohorte paralelnih skupina uključila je 103 djece (dob 6-18 godina) s kontroliranom ([KA], n=50) i nekontroliranom ([NA], n=53) astmom. Mjerena je plućna funkcija i slijedeći BM-i: eozinofilni kationski protein (ECP), C-reaktivni protein velike osjetljivosti (hs-CRP), kompletna krvna slika, izdahnuti NO (F_{ENO}), pH i urati u kondenzatu izdaha (KI) i temperatura izdaha (TI).

REZULTATI: Koncentracija urata u KI, pH vrijednost KI i TI su se statistički značajno razlikovale između skupina (NA vs. KA: urati u KI, medijan [IQR], $\mu\text{mol/L}$; 0 [3] vs 37,9 [26], $p \leq 0,0001$; pH u KI, srednja vrijednost [SD], 7,2 [0,17] vs. 7,33 [0,16], $p=0,002$; TI srednja vrijednost [SD], $^{\circ}\text{C}$; 34,26 [0,83], vs 33,90 [0,60], $p=0,014$). Diskriminantna analiza je pokazala da su urati u KI najbolji samostalni parametar u razlikovanju kontrolirane od nekontrolirane astme ($F=57,899$; $p \leq 0,0001$) uz dijagnostičku točnost 79,6%. Serumski hs-CRP je bio značajno proporcionalno povezan sa zbirom simptoma potrebom za salbutamolom, TI ($r=0,395$, $p=0,003$; $r=0,240$, $p=0,014$; $r=0,445$, $p \leq 0,0001$) i obrnuto proporcionalno s FEV_1 ($r=-0,366$, $p=0,007$). Urati u KI su bili statistički značajno proporcionalno povezani s vremenskom udaljenošću zadnje egzacerbacije (PZE) i F_{ENO} -om ($r=0,558$, $p \leq 0,0001$; $r=0,3839$; $p=0,005$) u NA, i pH u KI ($r=0,379$; $p \leq 0,0001$), TI ($r=-0,220$; $p=0,025$), FEV_1 ($r=0,225$, $p=0,022$), ACT-om ($r=0,665$; $p \leq 0,0001$), AQLQ ($r=0,703$, $p \leq 0,0001$), potrebom za salbutamolom ($r=-0,538$; $p \leq 0,0001$) i zbirom simptoma ($r=-0,722$; $p \leq 0,0001$) u svih astmatičara.

ZAKLJUČAK: Urati u KI su najbolji samostalni parametar u predviđanju kontrole astme. Rezultati ukazuju na moguću vrijednost neinvazivnih BM-a lokalne i sistemske upale kao dodatnih parametara u praćenju kontrole dječje astme.

Ključne riječi: astma, biomarkeri, djeca, upala, simptomi

9. SUMMARY

BACKGROUND: Over last 15 years there has been increasing interest in the non-invasive assessment of airway inflammation in addition to traditional parameters of asthma control and severity.

AIMS: 1) to compare different inflammatory biomarkers (BMs) in children with controlled and uncontrolled asthma, 2) to investigate their relationship with each other and with other clinical indices of asthma control (symptoms, lung function, *prn* salbutamol use, exacerbations, asthma control test [ACT], quality of life [AQLQ]).

MATERIALS AND METHODS: This prospective, observational, parallel-cohort study comprised 103 consecutive patients (age 6-18 years) with controlled ([CA], n=50) and uncontrolled ([UA], n=53) asthma. Measured lung function and BMs included: spirometry, eosinophilic cationic protein (ECP), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), blood counts with differentials, exhaled NO (F_ENO), pH and urates in EBC, and exhaled breath temperature (EBT).

RESULTS: EBC urates, EBC pH and EBT showed statistically significant differences between groups (UA vs. CA: EBC urates, median [IQR], $\mu\text{mol/L}$; 0 [3] vs 37,9 [26], $p\leq 0,0001$; EBC pH, mean [SD], 7,2 [0,17] vs. 7,33 [0,16], $p=0,002$; EBT mean [SD], $^{\circ}\text{C}$; 34,26 [0,83], vs 33,90 [0,60], $p=0,014$). Discriminant analysis depicted EBC urates as the best single significant predictor of asthma control ($F=57,899$; $p\leq 0,0001$) with a 79,6% diagnostic accuracy. Serum hs-CRP significantly positively correlated with symptom score, *prn* salbutamol use, and EBT ($r=0,395$, $p=0,003$; $r=0,240$, $p=0,014$; $r=0,445$, $p\leq 0,0001$; respectively) and inversely with FEV₁ ($r=-0,366$, $p=0,007$). EBC urates showed significant association with time from last exacerbation (TLE) and F_ENO ($r=0,558$, $p\leq 0,0001$; $r=0,3839$; $p=0,005$, respectively) in UA, and EBC pH ($r=0,379$; $p\leq 0,0001$), EBT ($r=-0,220$; $p=0,025$), FEV₁ (as % predicted) ($r=0,225$, $p=0,022$), ACT ($r=0,665$; $p\leq 0,0001$), AQLQ ($r=0,703$, $p\leq 0,0001$), *prn* salbutamol use ($r=-0,538$; $p\leq 0,0001$), and symptom score ($r=-0,722$; $p\leq 0,0001$) in all asthmatics.

CONCLUSION: EBC urates were the best single predictor of asthma control. Our results provide the evidence supporting the potential utility of a panel of non-invasive BMs of local and systemic inflammation, as additional tools for monitoring childhood asthma.

Key words: asthma, biomarkers, children, inflammation, symptoms

10.LITERATURA

1. Bisgaard H, Szeffler S. Prevalence of asthma-like symptoms in young children. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:723-8.
2. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998;12:315-35.
3. Pevec B, Stipić-Marković A, Radulović-Pevec M, Čvorišćec B, Čustović A. Prevalence of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema symptoms in school population of Zagreb, Croatia. XXIII Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2004; Abstract book, str. 264.
4. Banac S, Lah Tomulić K, Ahel V, Rožmanić V, Šimundić N, Zubović S, et al. Prevalence of asthma and allergic disease in Croatian children is increasing: survey study. *CMJ* 2004;45:721-6.
5. Munivrana H, Vorko-Jovic A, Munivrana S, Kursar M, Medlobi-Gluhak M, Vlahek P. The prevalence of allergic diseases among Croatian school children according to the ISAAC Phase One questionnaire. *Med Sci Monit* 2007;13:505-9.
6. Lemanske RF Jr, Busse WW. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:502-19.
7. Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:466-72.
8. Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI). Global strategy for asthma management and prevention. Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI): Bethesda. Revised 2006. available 2007, December 29: <http://www.ginasthma.org/Guidelineitem.asp>
9. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, et al. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet* 2003;35:258-63.
10. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002;418:426-30.
11. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Salmikangas J, Mäkelä S, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 2004;304:300-4.
12. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:976-83.
13. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
14. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994;264:1152-6.
15. Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WO, Hopkin JM. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* 1994;7:125-9.
16. Ivković-Jureković I. HLA antigeni i mikrosatelitni lokusi vezani uz čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- α) u djece s atopijskom astmom (disertacija) 2005, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

17. Cookson W. A new gene for asthma. Would you ADAM and Eve it? *Trends in Genet* 2003;19:169-72.
18. Toelle BG, Peat JK, Salome CM, Mellis CM, Woolcock AJ. Toward a definition of asthma for epidemiology. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:633-7.
19. Weiss ST, Speizer FE. Epidemiology and natural history. In: *Bronchial Asthma Mechanisms and Therapeutics*, izd. 3, Weiss EB, Stein M (Eds), Boston, Little, Brown, 1993, str. 15.
20. Weiss ST, Gold DR. Gender differences in asthma. *Pediatr Pulmonol* 1995;19:153-5.
21. Sennhauser FH, Kühni CE. Prevalence of respiratory symptoms in Swiss children: is bronchial asthma really more prevalent in boys? *Pediatr Pulmonol* 1995;19:161-6.
22. National Asthma Education and Prevention Program: Expert panel report II: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute (NIH publication no. 97-4051), Bethesda, MD 1997.
23. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 1999;54:268-72.
24. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood: a prospective study. *N Eng J Med* 1990;323:502-7.
25. Gold DR. Environmental tobacco smoke, indoor allergens and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 2000;108:643-51.
26. Platts-Mills TA. How environment affects patients with allergic disease: indoor allergens and asthma. *Ann Allergy* 1994;72:381-4.
27. Kerkhof M, Wijga AH, Brunekreef B, Smit HA, de Jongste JC, Aalberse RC, Hoekstra MO, Gerritsen J, Postma DS. Effects of pets on asthma development up to 8 years of age: the PIAMA study. *Allergy* 2009;64:1202-8.
28. Carlsten C, Brauer M, Dimich-Ward H, Dybuncio A, Becker AB, Chan-Yeung M. Combined exposure to dog and indoor pollution: incident asthma in a high-risk birth cohort. *Eur Respir J* 2011;37:324-30.
29. D'amato G, Spieksma FT, Liccardi G, Jager S, Russo M, Kontou-Filli K, et al. Pollen-related allergy in Europe. *Allergy* 1998;53:567-78.
30. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1501-7.
31. Gern JE, Busse WW. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nat Rev Immunol* 2002;2:132-8.
32. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-5.
33. Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792-6.
34. Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U, MAS Group. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001;322:390-5.

35. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000;343:538-43.
36. de Meer G, Janssen NA, Brunekreef B. Early childhood environment related to microbial exposure and the occurrence of atopic disease at school age. *Allergy* 2005;60:619-25.
37. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, I sur. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. ALEX Study Team. *Lancet* 2001;358:1129-33.
38. Vercelli D. Learning from discrepancies: CD14 polymorphisms, atopy and the endotoxin switch. *Clin Exp Allergy* 2003;33:153-5.
39. Semic-Jusufagić A, Simpson A, Čustović A. Environmental exposures, genetic predisposition and allergic diseases: one size never fits all. *Allergy* 2006;61:397-9.
40. Larché M, Robinson D, Kay B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:450-63.
41. Ford ES. The epidemiology of obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:897-909.
42. Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:661-6.
43. Shore SA, Fredberg JJ. Obesity, smooth muscle, and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:925-7.
44. Chen Y, Dales R, Jiang Y. The association between obesity and asthma is stronger in nonallergic than allergic adults. *Chest* 2006;130:890.
45. Taylor B, Mannino D, Brown C, Crocker D, Twum-Baah N, Holguin F. Body mass index and asthma severity in the National Asthma Survey. *Thorax* 2008;63:14-20.
46. Stenius-Aarniala B, Poussa T, Kvarnström J, Grönlund EL, Ylikahri M, Mustajoki P. Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study. *BMJ* 2000;320:827.
47. Wang L, Pinkerton KE. Detrimental effects of tobacco smoke exposure during development on postnatal lung function and asthma. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008;84:54-60.
48. Cohen RT, Raby BA, Van Steen K, Fuhlbrigge AL, Celedón JC, Rosner BA, Strunk RC, Zeiger RS, Weiss ST; Childhood Asthma Management Program Research Group. In utero smoke exposure and impaired response to inhaled corticosteroids in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:491-7.
49. Evans D, Levison MJ, Feldman CH, Clark NM, Wasilewski Y, Levin B, Mellins RB. The impact of passive smoking on emergency room visits of urban children with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:567-72.
50. Weitzman M, Gortmaker S, Walker DK, Sobol A. Maternal smoking and childhood asthma. *Pediatrics* 1990;85:505-11.
51. Halken S. Early sensitisation and development of allergic airway disease - risk factors and predictors. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:128-34.
52. Jaakkola JJ, Ahmed P, Ieromnimon A, Goepfert P, Laiou E, Quansah R, Jaakkola MS. Preterm delivery and asthma: a systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:823-30.

53. Tollånes MC, Moster D, Daltveit AK, Irgens LM. Cesarean section and risk of severe childhood asthma: a population-based cohort study. *J Pediatr* 2008;153:112.
54. Chatzi L, Torrent M, Romieu I, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Vioque J, Kogevinas M, Sunyer J. Mediterranean diet in pregnancy is protective for wheeze and atopy in childhood. *Thorax* 2008;63:507.
55. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Helms PJ, Seaton A, Weiss ST. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr* 2007;85:853.
56. Litonjua AA, Rifas-Shiman SL, Ly NP, Tantisira KG, Rich-Edwards JW, Camargo CA Jr, Weiss ST, Gillman MW, Gold DR. Maternal antioxidant intake in pregnancy and wheezing illnesses in children at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* 2006;84:903.
57. Devereux G, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Harbour PJ, Helms PJ, Seaton A. Low maternal vitamin E intake during pregnancy is associated with asthma in 5-year-old children. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:499.
58. Martinez FD, Wright AL, Holberg CJ, Morgan WJ, Taussig LM. Maternal age as a risk factor for wheezing lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1992;136:1258.
59. von Mutius E. Neonatal jaundice is a risk factor for childhood asthma: a retrospective cohort study. Ku MS, Sun HL, Sheu JN, Lee HS, Yang SF, Lue KH. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:623-8.
60. Kull I, Melen E, Alm J, Hallberg J, Svartengren M, van Hage M, Pershagen G, Wickman M, Bergström A. Breast-feeding in relation to asthma, lung function, and sensitization in young schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:1013-9.
61. von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pittroff B, Laubereau B, Gröbl A, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; German Infant Nutritional Intervention Study Group. Certain hydrolyzed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three-year results of the German Infant Nutritional Intervention Study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:718-25.
62. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:9-19.
63. Woodcock A, Čustović A. Role of the indoor environment in determining the severity of asthma. *Thorax* 1998;53:47-51.
64. Jones AP. Asthma and the home environment. *J Asthma* 2000;37:103-24.
65. Bousquet J, Jefery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. State of the art. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-45.
66. Holt PG. The role of airway dendritic cell populations in regulation of Tcell responses to inhaled antigens: Atopic asthma as paradigm. *J Aerosol Med* 2004;15; 161-8.
67. Rosenwasser L. New insights into the pathophysiology of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 2007;28:10-15.
68. O'Byrne P, Persson CG, Church MK. Cellular and mediator mechanisms of the early phase response. *Allergy*. London 2001, Mosby str. 325-36.
69. Pijnenburg MW, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review. *Clin Exp Allergy* 2008;38:246-59.

70. Ghosh S, Erzurum SC. *Biochim Biophys Acta*. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology 2011;1810:1008-16.
71. Jeffery P, Haahtela T. Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one-airway condition. *BMC Pulmonary Medicine* 2006;6:5.
72. Boulet LP, Gauvreau G, Boulay ME, O'Byrne P, Cockcroft DW. The allergen bronchoprovocation model: an important tool for the investigation of new asthma anti-inflammatory therapies. *Allergy* 2007;62:1101-10.
73. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1233-44.
74. Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001;108:65-71.
75. Diamant Z, Boot JD, Mantzouranis E, Flohr R, Sterk PJ, Gerth van Wijk R. Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2010;23:6:468-81.
76. Ricciardolo FLM, Gaston B, Hunt J. Acid stress in the pathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:610-9.
77. Luk CK, Dulfano MJ. Effect of pH, viscosity and ionic-strength changes on ciliary beating frequency of human bronchial explants. *Clin Sci* 1983;64:449-51.
78. Holma B, Hegg PO. pH- and protein-dependent buffer capacity and viscosity of respiratory mucus: their interrelationships and influence on health. *Sci Total Environ* 1989;84:71-82.
79. Holma B, Lindgren M, Andersen JM. pH effects on ciliomotility and morphology of respiratory mucosa. *Arch Environ Health* 1977;32:216-26.
80. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 2006;111:476-94.
81. Montuschi P, Ciabattini G, Corradi M, et al. Increased 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensates of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:216-20.
82. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1450-4.
83. Barnes PJ. Reactive oxygen species in asthma. *Eur Respir Rev* 2000;10:240-3.
84. Brown RH, Pearse DB, Pyrgos G, Liu MC, Togias A, Permutt S. The structural basis of airways hyperresponsiveness in asthma. *J Appl Physiol* 2006;101:30.
85. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M i sur. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008;63:5-34.
86. King CS, Moores LK. Clinical Asthma Syndromes and Important Asthma Mimics *Respir Care* 2008;53:568-80.
87. Gold MS, Kemp AS. Atopic disease in childhood. *Med J Aust* 2005;182:298-304.
88. Killian KJ, Watson R, Otis J, St Amand TA, O'Byrne PM. Symptom perception during acute bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:490-6.
89. Wood RA. Skin testing: making the most of every prick. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;88:347-9.
90. Spahn JD, Chipps BE. Office-based objective measures in childhood asthma. *J Pediatr* 2006;148:11-15.
91. Nair SJ, Daigle KL, DeCuir P, Lapin CD, Schramm CM. The influence of pulmonary function testing on the management of asthma in children. *J Pediatr* 2005;147:797-801.

92. Strunk RC, Szeffler SJ, Philips BR, i sur. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:883-92.
93. Lemaske RF Jr, Green CG. Asthma in infancy and childhood. U Middleton E.Jr, Reed CE, Ellis EF, i sur. Izdavači: Allergy: principles and practice, izd. 5., St.Louis 1998, Mosby, str.877.
94. Saglani S, Nicholson AG, Scallan M, Balfour-Lynn I, Rosenthal M, Payne DN et al. Investigation of young children with severe recurrent wheeze: any clinical benefit? *Eur Respir J* 2006;27:29–35.
95. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF Jr, Wardlaw AJ, Wenzel SE, Greenberger PA. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:355-60.
96. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, et al; American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Control and Exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180: 59-99.
97. Fuhlbrigge AL, Kitch BT, Paltiel AD, Kuntz KM, Neumann PJ, Dockery DW, Weiss ST. FEV₁ is associated with risk of asthma attacks in a pediatric population. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:61–7.
98. Brand PL, Roorda RJ. Usefulness of monitoring lung function in asthma. *Arch Dis Child* 2003;88:1021–5.
99. Kitch BT, Paltiel AD, Kuntz KM, Dockery DW, Schouten JP, Weiss ST, Fuhlbrigge AL. A single measure of FEV₁ is associated with risk of asthma attacks in long-term follow-up. *Chest* 2004;126:1875–82.
100. Liu AH, Zeiger RS, Welch M, et al. Development and validation of a patient- based measure of asthma control in children (Childhood ACT). Presented at the Annual Meeting of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology (ACAAI), Anaheim, California, 4–9 November 2005. Abstract no. 35.
101. Juniper EF, Thompson AK, Ferrie PJ, Roberts JN. Development and validation of the mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *Clin Exp Allergy* 2000;30:132-40.
102. Hyland ME, Stahl E. Asthma treatment needs: a comparison of patients' and health care professionals' perceptions. *Clin Ther* 2004;26:2141–52.
103. Porsbjerg C. Airway hyperresponsiveness: the usefulness of airway hyperresponsiveness testing in epidemiology, in diagnosing asthma and in the assessment of asthma severity. Abstract- Nordic PhD Thesis. *The Clinical Respiratory Journal* 2007.
104. Siroux V, Orszczyn MP, Paty E, Kauffmann F, Pison C, Vervloet D, Pin I. Relationships of allergic sensitization, total immunoglobulin E and blood eosinophils to asthma severity in children of the EGEA Study. *Clin Exp Allergy* 2003;33:746-51.
105. Maneechotesuwan K, Sujaritwongsanon P, Suthamsmai T. IgE production in allergic asthmatic patients with different asthma control status. *J Med Assoc Thai* 2010;93:71-8.
106. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Lemanske R, Le Souef P, Mäkelä M, Roberts G, Wong G, Zar H, Akdis CA, Bacharier LB, Baraldi E, van Bever HP,

- de Blic J, Boner A, Burks W, Casale TB, Castro-Rodriguez JA, Chen YZ, El-Gamal YM, Everard ML, Frischer T, Geller M, Gereda J, Goh DY, Guilbert TW, Hedlin G, Heymann PW, Hong SJ, Hossny EM, Huang JL, Jackson DJ, de Jongste JC, Kalayci O, Ait-Khaled N, Kling S, Kuna P, Lau S, Ledford DK, Lee SI, Liu AH, Lockey RF, Lødrup-Carlsen K, Lötvall J, Morikawa A, Nieto A, Paramesh H, Pawankar R, Pohunek P, Pongracic J, Price D, Robertson C, Rosario N, Rossenwasser LJ, Sly PD, Stein R, Stick S, Szeffler S, Taussig LM, Valovirta E, Vichyanond P, Wallace D, Weinberg E, Wennergren G, Wildhaber J, Zeiger RS. International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy* 2012;67:976-97.
107. Eggleston PA. Improving indoor environments: reducing allergen exposures. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:122-6.
108. Gold MS, Kemp AS. Atopic disease in childhood. *Med J Aust* 2005;182:298-304.
109. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N Engl J Med* 1995;332:868-75.
110. Lipworth BJ. Leukotriene-receptor antagonists. *Lancet* 1999;353:57-62.
111. Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* 1999;340:197-206.
112. Price D, Musgrave SD, Shepstone L, Hillyer EV, Sims EJ, Gilbert RF, Juniper EF, Ayres JG, Kemp L, Blyth A, Wilson EC, Wolfe S, Freeman D, Mugford HM, Murdoch J, Harvey I. Leukotriene antagonists as first-line or add-on asthma-controller therapy. *N Engl J Med* 2011;364:1695-707.
113. Garcia Garcia ML, Wahn U, Gilles L, Swern A, Tozzi CA, Polos P. Montelukast, compared with fluticasone, for control of asthma among 6- to 14-year-old patients with mild asthma: the MOSAIC study. *Pediatrics* 2005;116:360-9.
114. Ram FS, Cates CJ, Ducharme FM. Long-acting beta2-agonists versus antileukotrienes as add-on therapy to inhaled corticosteroids for chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;25;(1):CD003137.
115. Woolcock A, Lundback B, Ringdal N, Jacques LA. Comparison of addition of salmeterol to inhaled steroids with doubling of the dose of inhaled steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1481-8.
116. Ducharme FM, Ni Chroinin M, Greenstone I, Lasserson TJ. Addition of long-acting beta2-agonists to inhaled steroids versus higher dose inhaled steroids in adults and children with persistent asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD005533.
117. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:558-62.
118. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95.
119. Lesko LJ, Atkinson AJ. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annul Rev Pharmacol and Toxicol* 2001;41:347-66.
120. Büyükoztürk S, Gelincik AA, Genç S, Koçak H, Oneriyidogan Y, Erden S, Dal M, Colakoglu B. Acute Phase Reactants in Allergic Airway Disease. *Tohoku J Exp Med* 2004; 204:209-213.
121. Dodig s, Richter D, Zrinski-Topić R. Inflammatory markers in childhood asthma. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:587-99.

122. Wadsworth S, Sin D, Dorscheid D. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. *J Asthma Allergy* 2011;4:77-86.
123. Wilson N, Bridge P, Spanevello A, Silverman M. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax* 2000;55:768-74.
124. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur Respir J* 2000;16:1008-15.
125. Fahy JV, Boushey HA, Lazarus SC, Mauger EA, Cherniack RM, Chinchilli VM, et al. Safety and reproducibility of sputum induction in asthmatic subjects in multicenter study. *Am Respir Crit Care Med* 2001;163:1470-5.
126. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA, Gaston B. Endogenous airway acidification: implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:694-9.
127. Arias-Diaz J, Vara E, Torres-Melero J, Garcia C, Baki W, Ramirez-Armengol JA, Balibrea JL. Nitrite/nitrate and cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. *Cancer* 1994;74:1546-51.
128. Pheng LH, Francoeure C, Denis M. The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation* 1995;19:599-610.
129. Kanazawa H, Shoji S, Yamada M, Fujii T, Kawaguchi T, Kudoh S, Hirata K, Yoshikawa J. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:624-9.
130. Fairchild CI, Stamfer JF. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc J* 1987;48:948-9.
131. Čepelak I, Dodig S. Neinvazivni postupci u dijagnostici i praćenju upale dišnih putova: kondenzat izdaha. *Biochemia medica* 2005; 3-4; 57-63.
132. Baraldi E, Azzolin NM, Zanconato S, Dario C, Zacchello F. Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *J Pediatrics* 1997;131: 381-95.
133. Lanz MJ, Leung DY, White CW. Comparison of exhaled nitric oxide to spirometry during emergency treatment of asthma exacerbations with glucocorticosteroids in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:161-4.
134. Silvestri M, Spallaross D, Franova Yourukova V, Battistini E, Fregonese B, Rossi GA. Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood eosinophilia in atopic children with mild-intermittent asthma. *Eur Respir J* 1999;13: 321-6.
135. Jakakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998;53:91-5.
136. Wildhaber JH, Hall GL, Stick SM. Measurements of exhaled nitric oxide with the single breath technique and positive expiratory pressure in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:74-8.
137. Artlich A, Hagenah JU, Jonas S, Shrens P, Gortner. Exhaled nitric oxide in childhood asthma. *Eur J Pediatr* 1996;155:698-701.
138. Ueno T, Kataoka M, Hirano A, Iio K, Tanimoto Y, Kanehiro A, Okada C, Soda R, Takahashi K, Tanimoto M. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology* 2008;13:654-63.

139. Carraro S, Folesani G, Corradi M, Zanconato S, Gaston B, Baraldi E: Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asthmatic children. *Allergy* 2005;60:476–81.
140. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S: pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1364–70.
141. Peden DB, Hohman R, Brown ME, Mason RT, Berkebile C, Fales HM, and Kaliner MA. Urid acid is a major antioxidant in human nasal airways secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7638-42.
142. Dodig S, Čepelak I, Vlašić Ž, Zrinski TR, Banović S. Urates in Exhaled Breath Condensate of Children with Asthma. *Lab Medicine* 2010;12:728-30.
143. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Faster rise of exhaled breath temperature in asthma: a novel marker of airway inflammation? *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:181-4.
144. García G, Bergna M, Uribe E, Yañez A, Soriano JB. Increased exhaled breath temperature in subjects with uncontrolled asthma. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013;17:969-72.
145. Xepapadaki P, Xatziioannou A, Chatzicharalambous M, Makrinioti H, Papadopoulos NG. Exhaled breath temperature increases during mild exacerbations in children with virus-induced asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153:70-4.
146. Peroni DG, Chinellato I, Piazza M, Zardini F, Bodini A, Olivieri F, Boner AL, Piacentini GL. Exhaled breath temperature and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol* 2012;47:240-4.
147. Verrills NM, Irwin JA, He XY, Wood LG, Powell H, Simpson JL, McDonald VM, Sim A, Gibson PG. Am J Respir Identification of novel diagnostic biomarkers for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Crit Care Med* 2011 15;183:1633-43.
148. Horn BR, Robin ED, Theodore J, Van-Kessel TA. Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N Engl J Med* 1975;292:1152–5.
149. Ulrik CS, Frederiksen J. Mortality and markers of risk of asthma death among 1,075 outpatients with asthma. *Chest* 1995;108:10–5.
150. Snell N, Newbold P. The clinical utility of biomarkers in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:222-35.
151. Koh YY, Kang H, Kim CK. Ratio of serum eosinophil cationic protein/blood eosinophil counts in children with asthma: comparison between acute exacerbation and clinical remission. *Allergy Asthma Proc* 2003;24:269-74.
152. Peona V, De Amici M, Quaglini S, et al. Serum eosinophilic cationic protein: is there a role in respiratory disorders? *J Asthma* 2010;47:131–4. 32.
153. Vatrella A, Ponticiello A, Parrella R. Serum eosinophil cationic protein (ECP) as a marker of disease activity and treatment efficacy in seasonal asthma. *Allergy* 1996;51:547–55.
154. Nielsen LP, Peterson CG, Dahl R. Serum eosinophil granule proteins predict asthma risk in allergic rhinitis. *Allergy* 2009;64:733–7.
155. Hoffmann HJ, Nielsen LP, Harving H, et al. Asthmatics able to step down from inhaled corticosteroid treatment without loss of asthma control have low serum eotaxin/CCL11. *Clin Respir J* 2008;2:149–57.
156. Koh GC, Shek LP, Goh DY, Van Bever H, Koh DS. Eosinophil cationic protein: is it useful in asthma? A systematic review. *Respir Med* 2007;101:696-705.

157. Kerstjens HA, Schouten JP, Brand PL, et al. Importance of total serum IgE for improvement in airways hyperresponsiveness with inhaled corticosteroids in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. The Dutch CNSLD Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:360–8.
158. Ahmad Al Obaidi AH, Mohamed Al Samarai AG, Yahya Al Samarai AK, et al. The predictive value of IgE as biomarker in asthma. *J Asthma* 2008;45:654–63.
159. Jahnz-Róyk K, Plusa T, Mierzejewska J. Eotaxin in serum of patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease: relationship with eosinophil cationic protein and lung function. *Mediat Inflamm* 2000;9:175–9.
160. Venge P. Monitoring the allergic inflammation. *Allergy*. 2004;59(1):26–32. Sugawara N, Yamashita T, Ote Y, et al. TARC in allergic disease. *Allergy* 2002;57:180–1.
161. Kalayci O, Sonna LA, Woodruff PG, Camargo CA Jr, Luster AD, Lilly CM. Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4; CCL-13): a biomarker of asthma. *J Asthma* 2004;41:27-33.
162. ten Hacken NH, Oosterhoff Y, Kauffman HF, et al. Elevated serum interferon-gamma in atopic asthma correlates with increased airways responsiveness and circadian peak expiratory flow variation. *Eur Respir J* 1998;11:312–6.
163. Koopmans JG, Lutter R, Jansen HM, van der Zee JS. Adding salmeterol to an inhaled corticosteroid reduces allergen-induced serum IL-5 and peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1007–113.
164. Jia G, Erickson RW, Choy DF, et al. Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma (BOBCAT) study group. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:647–65.
165. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* 2011;365:1088–98.
166. Hanania NA, Wenzel S, Rosén K, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:804–11.
167. Kony S, Zureik M, Driss F, Neukirch C, Leynaert B, Neukirch F. Association of bronchial hyperresponsiveness and lung function with C-reactive protein (CRP): a population based study. *Thorax* 2004;59:892-6.
168. Ólafsdóttir IS, Gislason T, Thjodleifsson B, Olafsson Í, Gislason D, Jögi R, Janson C. C reactive protein levels are increased in non-allergic but not allergic asthma: a multicentre epidemiological study. *Thorax* 2005;60:451-4.
169. Takemura M, Matsumoto H, Niimi A, Ueda T, Matsuoka H, Yamaguchi M, Jinnai M, Muro S, Hirai T, Ito Y, Nakamura T, Mio T, Chin K, Mishima M. High sensitivity C-reactive protein in asthma. *Eur Respir J* 2006;27:908-12.
170. Qian FH, Zhang Q, Zhou LF, Liu H, Huang M, Zhang XL, Yin KS. High-sensitivity C-reactive protein: A predicative marker in severe asthma. *Respirology* 2008;13:664-9.
171. Fujita M, Ueki S, Ito W, Chiba T, Takeda M, Saito N, Kayaba H, Chihara J. C-reactive protein levels in the serum of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;99:48-53.
172. Navratil M, Plavec D, Dodig S, Jelčić Ž, Nogalo B, Erceg D, Turkalj M. Markers of systemic and lung inflammation in childhood asthma. *J Asthma* 2009;46:822-8.

173. Daffern PJ, Muilenburg D, Hugli TE, et al. Association of urinary leukotriene E4 excretion during aspirin challenges with severity of respiratory responses. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:559–64.
174. Diamant Z, Timmers MC, van der Veen H, et al. The effect of MK-0591, a novel 5-lipoxygenase activating protein inhibitor, on leukotriene biosynthesis and allergen-induced airway responses in asthmatic subjects in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:42–51.
175. Dosanjh A, Gamst A, Phillipson J, Broughton A. Elevated serum eosinophil cationic protein levels in cystic fibrosis, pediatric asthma, and bronchiolitis. *Pediatr Asthma Allergy Immunol* 1996;10:169–73.
176. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286:327-34.
177. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-Reactive Protein Levels in Overweight and Obese Adults. *JAMA* 1999;282:2131-5.
178. Sävykoski T, Harju T, Paldanius M, Kuitunen H, Bloigu A, Wahlström E, Ryttilä P, Kinnula V, Saikku P, Leinonen M. Chlamydia pneumoniae Infection and Inflammation in Adults with Asthma. *Respiration* 2004;71:120-5.
179. Lewis SA, Pavord ID, Stringer JR, Knox AJ, Weiss ST, Britton JR. The Relation Between Peripheral Blood Leukocyte Counts and Respiratory Symptoms, Atopy, Lung Function, and Airway Responsiveness in Adults. *Chest* 2001;119:105-14.
180. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225-43.
181. Butte NF, Garza C, de Onis M. Evaluation of the feasibility of international growth standards for school-aged children and adolescents. *Journal of Nutrition* 2007; 137;153-7.
182. Vandenplas Y, Rudolph CD, Di Lorenzo C, Hassall E, Liptak G, Mazur L, Sondheimer J, Staiano A, Thomson M, Veereman-Wauters G, Wenzl TG, North American Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition. Pediatric gastroesophageal reflux clinical practice guidelines: joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (NASPGHAN) and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49(4):498.
183. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, Murray JJ, Pendergraft TB. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:59-65.
184. Liu AH, Zeiger R, Sorkness C, Mahr T, Ostrom N, Burgess S, Rosenzweig JC, Manjunath R. Development and cross-sectional validation of the Childhood Asthma Control Test. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:817–825.
185. Schatz M, Mosen DM, Kosinski M, et al. Validity of the Asthma Control Test completed at home. *Am J Manag Care* 2007; 13:661–667.
186. Juniper EF, Guyatt GH, Epstein RS, Ferrie PJ, Jaeschke R, Hiller TK. Evaluation of impairment of health related quality of life in asthma: development of a questionnaire for use in clinical trials. *Thorax* 1992; 47: 76–83.
187. American Thoracic Society. Standardization of spirometry, 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1107-1136.

188. Forche G, Harnoncourt K, Stadlober E. Neue spirometrische Bezugswerte für Kinder, Jugendliche und Erwachsene. *Öst Ärztezg* 1998;43:15-6.
189. American Thoracic Society/European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:912-930.
190. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, Olin AC, Plummer AL, Taylor DR. 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* 2011;8:602–615.
191. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. On behalf of the ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26:523-548.
192. Popov TA, Kralimarkova T, Tzachev C, Dimitrov V, Mun KK, Gill J. Exhaled breath temperature measurement made easy. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20:200-1.
193. Rabe KF, Vermeire PA, Soriano JB, Maier WC. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. *Eur Respir J* 2000 Nov;16(5):802-7.
194. Szeffler SJ. Advancing asthma care: the glass is only half full! *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:485-94.
195. Green RJ, Klein M, Becker P, Halkas A, Lewis H, Kitchin O, Moodley T, Masekela R. Disagreement among common measures of asthma control in children. *Chest* 2013;143:117-22.
196. Riedl MA, Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:49-56.
197. Zhao JJ, Shimizu Y, Dobashi K, Kawata T, Ovo A, Yanagitani N, Kaira K, Utsugi M, Hisada T, Ishizuka T, Mori M. The relation between oxidative stress and acid stress in adult patients with mild asthma. *J Investig Allergol Clin Immunolog* 2008;18(1):41-5.
198. Brunetti L, Francavilla R, Tesse R, Strippoli A, Polimeno L, Loforese A, Miniello VL, Armenio L. Exhaled breath condensate pH measurement in children with asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:422-7.
199. Kostikas K, Papaioannou AI, Tanou K, Giouleka P, Koutsokera A, Minas M, Papiris S, Gourgoulis KI, Taylor DR, Loukides S. Exhaled NO and exhaled breath condensate pH in the evaluation of asthma control. *Respir Med* 2011;105:526-32.
200. Yavuz ST, Civelek E, Sahiner UM, Buyuktiryaki AB, Tuncer A, Karabulut E, Sekerel BE. Identifying uncontrolled asthma in children with the childhood asthma control test or exhaled nitric oxide measurement. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012;109:36-40.
201. Bowler RP. Oxidative stress in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;4:116-22.
202. Panus PC, Burgess B, Freeman BA. Characterisation of cultured alveolar epithelial cell xanthine dehydrogenase/oxidase. *Biochem Biophys Acta* 1991;1091:303-9.

203. Piacentini GL, Bodini A, Zerman L, Costella S, Zanolla L, Peroni DG, Boner AL. Relationship between exhaled air temperature and exhaled nitric oxide in childhood asthma. *Eur Respir J* 2002;20:108-11.
204. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Faster rise of exhaled breath temperature in asthma: a novel marker of airway inflammation? *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:181-4.
205. Deraz TE, Kamel TB, El-Kerdany TA, El-Ghazoly HM. 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* 2012;47:220-5.
206. Zedan M, Settin A, El-Chennawi F, El-Desouky T, Nasef N, Fouda A. Eosinophilic cationic protein: is it useful in assessing control of childhood asthma? *East Mediterr Health J* 2010;16:1045-9.
207. Diamant Z, Tufvesson E, Bjermer L. Which biomarkers are effective for identifying Th2-driven inflammation in asthma? *Curr Allergy Asthma Rep* 2013;13:477-86.
208. Zedan M, Attia G, Zedan MM, Osman A, Abo-Elkheir N, Maysara N, Barakat T, Gamil N. Clinical asthma phenotypes and therapeutic responses. *ISRN Pediatr* 2013 31;2013:824781.
209. Janssens T, Verleden G, De Peuter S, Van Diest I, Van den Bergh O. Inaccurate perception of asthma symptoms: a cognitive-affective framework and implications for asthma treatment. *Clin Psychol Rev* 2009;29:317-27.
210. Liu L, Poon R, Chen L, Frescura AM, Montuschi P, Ciabattini G, Wheeler A, Dales R. Acute effects of air pollution on pulmonary function, airway inflammation, and oxidative stress in asthmatic children. *Environ Health Perspect* 2009;117:668-74.
211. Epton MJ, Dawson RD, Brooks WM, Kingham S, Aberkane T, Cavanagh JA, Frampton CM, Hewitt T, Cook JM, McLeod S, McCartin F, Trought K, Brown L. The effect of ambient air pollution on respiratory health of school children: a panel study. *Environ Health* 2008;7:16.
212. Barreto M, Villa MP, Olita C, Martella S, Ciabattini G, Montuschi P. 8-Isoprostane in exhaled breath condensate and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children and adolescents. *Chest* 2009;135:66-73.
213. Matsunaga K. The utility of exhaled breath condensate analysis for asthma management. *Rinsho Byori* 2007;55:375-80.
214. Kostikas K, Koutsokera A, Papiris S, Gourgoulis KI, Loukides S. Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice. *Clin Exp Allergy* 2008;38:557-65.
215. Loukides S, Kontogianni K, Hillas G, Horvath I. Exhaled breath condensate in asthma: from bench to bedside. *Curr Med Chem* 2011;18:1432-43.
216. Koutsokera A, Loukides S, Gourgoulis KI, Kostikas K. Biomarkers in the exhaled breath condensate of healthy adults: mapping the path towards reference values. *Curr Med Chem* 2008;15:620-30.
217. Dodig S, Cepelak I, Plavec D, Vlasić Z, Nogalo B, Turkalj M. The effect of gas standardisation on exhaled breath condensate pH and PCO₂. *Eur Respir J* 2007;30:185-7.
218. Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ, Kester AD, Vernooy JH, Suykerbuyk J, Teunissen J, Heynens J, Hendriks HJ, Jöbsis Q, Dompeling E. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 2006;28:1036-41.

219. Nicolau NC, Lowe LA, Murray CS, Woodcock A, Simpson A, Čustović A. Exhaled breath condensate pH and childhood asthma: unselected birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:254-9.
220. Banzett RB, Dempsey JA, O'Donnell DE, Wamboldt MZ. Symptom perception and respiratory sensation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1178–82.
221. Tillie-Leblond I, Montani D, Crestani B, de Bilic J, Humbert M, Tunon-de-Lara M, Magnan A, Roche N, Ostinelli J, Chanez O. Relation between inflammation and symptoms in asthma. *Allergy* 2009;64:354-67.
222. Covar RA, Szeffler SJ, Martin RJ, Sundstrom DA, Silkoff PE, Murphy J, Young DA, Spahn JD. Relations between exhaled nitric oxide and measures of disease activity among children with mild-to-moderate asthma. *J Pediatr* 2003;142:469–75.
223. Spergel JM, Fogg MI, Bokszczanin-Knosala A. Correlation of exhaled nitric oxide, spirometry and asthma symptoms. *J Asthma* 2005;42:879–83.
224. Koskela HO, Purokivi MK, Nieminen RM, Moilanen E. Asthmatic cough and airway oxidative stress. *Respir Physiol Neurobiol* 2012;181:346-50.
225. Nicolaou NC, Lowe LA, Murray CS, Woodcock A, Simpson A, Custovic A. Exhaled breath condensate pH and childhood asthma: unselected birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:254-9.
226. Oughourli A, Michelis M, Selvaggi T, Sailon A. Serum Eosinophil cationic protein (ECP) elevation correlates with asthma symptoms and reduced FEV₁ in an outpatient screening population. *Allergy Clin Immunol* 2004;113:172.
227. Hoffmann HJ, Nielsen LP, Harving H, et al. Asthmatics able to step down from inhaled corticosteroid treatment without loss of asthma control have low serum eotaxin/CCL11. *Clin Respir J* 2008;2:149–57.
228. de Blay F, Krieger P, Spirlet F, Moreau L, Duvernelle C, Kassel O, Kopferschmitt MC, Gasser B, Demangeat C, Pauli G, Frossard N. Repeated inhalation of low doses of cat allergen that do not induce clinical symptoms increases bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein levels. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120:158-65.
229. Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. Markers of allergic inflammation in peripheral blood of children with asthma after treatment with inhaled triamcinolone acetonide. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87:319–26.
230. Lonkvist K, Hellman C, Lundahl J, Hallden G, Hedlin G. Eosinophil markers in blood, serum, and urine for monitoring the clinical course in childhood asthma: impact of budesonide treatment and withdrawal. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:812–7.
231. Effros RM, Murphy C, Hacker A, Schapira RM, Bongard R. Reduction and uptake of methylene blue from rat air spaces. *J Appl Physiol* 1994;77:1460-5.
232. Trischler J, Merkel N, Könitzer S, Müller CM, Unverzagt S, Lex C. Fractionated breath condensate sampling: H₂O₂ concentrations of the alveolar fraction may be related to asthma control in children. *Respir Res* 2012;13:14.
233. Hamill LM, Ferris KCA, Kapande KM, McConaghy LA, Shields MD. Is exhaled breath temperature the new asthma inflammometer *Arch Dis Child* 2012;97:29-30.
234. Eun Jin Chae, Tae-Bum Kim, You Sook Cho, Chan-Sun Park, Joon Beom Seo, Namkug Kim, Hee-Bom Moon. Airway Measurement for Airway Remodeling Defined by Post-

- Bronchodilator FEV₁/FVC in Asthma: Investigation Using Inspiration-Expiration Computed Tomography. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011;3:111–7.
235. Konradsen JR, James A, Nordlund B, Reinius LE, Söderhäll C, Melén E, Wheelock A, Lödrup Carlsen KC, Lidegran M, Verhoek M, Boot RG, Dahlén B, Dahlén SE, Hedlin G. The chitinase-like protein YKL-40: A possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013 Apr 26. pii: S0091-6749(13)00422-3. doi: 10.1016/j.jaci.2013.03.003. [Epub ahead of print].
236. Soferman R, Glatstein M, Sivan Y, Weisman Y. HsCRP levels: Measurement of airway inflammation in asthmatic children. *Pediatr Int* 2008;50:12-6.
237. Ramirez D, Patel P, Casillas A, Cotelingam J, Boggs P, Bahna SL. Assessment of high-sensitivity C-reactive protein as a marker of airway inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104:485-9.
238. Asman B, Strand V, Bylin G, Bergström K. Peripheral neutrophils after allergic asthmatic reactions. *Int J Clin Lab Res* 1997, 27:185-8.
239. Smith BJ, Lightfoot SA, Lerner MR, Denson KD, Morgan DL, Hanas JS, BronzeMS, Postier RG, Brackett DJ. Induction of cardiovascular pathology in a novel model of low-grade chronic inflammation. *Cardiovasc Pathol* 2009; 18:1–10.
240. Hogg JC. Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 2):S26-8.
241. Huvenne W, Hellings PW, Bachert C. Role of staphylococcal superantigens in airway disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;161:304-14.
242. Gibbs BF. Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. *Clin Exp Med* 2005;5:43-49.
243. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group. *N Engl J Med* 2000;343:1054–63.
244. Sorkness CA, Lemanske RF, Jr, Mauger DT, Boehmer SJ, Chinchilli VM, Martinez FD, Strunk RC, Szeffler SJ, Zeiger RS, Bacharier LB, et al. Long-term comparison of 3 controller regimens for mild-moderate persistent childhood asthma: the Pediatric Asthma Controller Trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:64–72.
245. Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:769–74.
246. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006;11:54–61.
247. Barnes PJ. New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1055–62.
248. Wu AC, Tantisira K, Li L, Schuemann B, Weiss ST, Fuhlbrigge AL. Predictors of Symptoms are Different from Predictors of Severe Exacerbations from Asthma in Children. *Chest* 2011;140:100-7.
249. Fuhlbrigge AL, Kitch BT, Paltiel AD, Kuntz KM, Neumann PJ, Dockery DW, Weiss ST. FEV₁ is associated with risk of asthma attacks in a pediatric population. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:61–7.
250. Covar RA, Szeffler SJ, Zeiger RS, Sorkness CA, Moss M, Mauger DT, Boehmer SJ, Strunk RC, Martinez FD, Taussig LM. Factors associated with asthma exacerbations during a long-

- term clinical trial of controller medications in children. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:741-7.
251. Galant SP, Morphey T, Amaro S, Liao O. Current asthma guidelines may not identify young children who have experienced significant morbidity. *Pediatrics* 2006;117:1038–45.
252. Gelb AF, Flynn Taylor C, Shinar CM, Gutierrez C, Zamel N. Role of spirometry and exhaled nitric oxide to predict exacerbations in treated asthmatics. *Chest* 2006;129:1492-9.
253. Sato R, Tomita K, Sano H, Ichihashi H, Yamagata S, Sano A, Yamagata T, Miyara T, Iwanaga T, Muraki M, Tohda Y. The strategy for predicting future exacerbation of asthma using a combination of the Asthma Control Test and lung function test. *J Asthma* 2009;46:677-82.
254. Keskin O, Balaban S, Keskin M, Kucukosmanoglu E, Gogebakan B, Ozkars MY, Kul S, Bayram H, Coskun Y. Relationship between exhaled leukotriene and 8-isoprostane levels and asthma severity, asthma control level, and asthma control test score. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012 Dec 18. pii: S0301-0546(12)00277-7. doi: 10.1016/j.aller.2012.09.003. [Epub ahead of print].
255. Robroeks CM, van Berkel JJ, Jöbsis Q, van Schooten FJ, Dallinga JW, Wouters EF, Dompeling E. Exhaled volatile organic compounds predict exacerbations of childhood asthma in a one year prospective study. *Eur Respir J* 2013;42:98-106.

11. ŽIVOTOPIS

Marta Navratil rođena je u Požegi 29. prosinca 1979. godine gdje je završila osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Godine 1998. upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirala 2004. godine. Obavezni staž obavila je u KBC Zagreb, a stručni ispit za liječnike položila je 2006. godine. Nakon toga radila je kao suistraživač u Odjelu za kliničku farmakologiju Sveučilišne bolnice Vuk Vrhovac u Zagrebu. Specijalizaciju iz pedijatrije započela je 1. travnja 2007. godine u Dječjoj bolnici Srebrnjak te uspješno položila specijalistički ispit 4. travnja 2011. godine. Zaposlena je kao odjelni liječnik pedijatar u Dječjoj bolnici Srebrnjak na Odjelu za alergologiju i pulmologiju predškolske i školske dobi.

U svrhu znanstvene i stručne edukacije pristupnica je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima, a uspješno je završila i radionicu iz primarnih imunodeficijencija (2010. godine), Poslijediplomski studij „Klinička pedijatrija“ (2008 – 2009. godine). Članica je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za alergologiju, Hrvatskog društva za pedijatrijsku alergologiju, Hrvatskog društva za dječju kardiologiju i reumatologiju, Europskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju (EAACI) i Europskog društva za imunodeficijencije (ESID). Objavila je 4 rada u indeksiranim časopisima, a od toga su 2 rada citirana u Current Contents-u te 6 kongresnih sažetka.

12.PRILOZI

1. Upitnik o kontroli astme u djece od 4-11 godina (eng. *Childhood Asthma Control Test*)
2. Upitnik o kontroli astme u djece od 12 godina i više i odraslih (eng. *Asthma Control Test*)
3. Upitnik kvalitete života (eng. *Asthma Quality of Life Questionnaire*)

Kako ispuniti Upitnik o kontroli dječje astme

- 1. korak** Neka vaše dijete odgovori na prva četiri pitanja (1 do 4).
Ukoliko je djetetu potrebna pomoć pri čitanju i razumijevanju pitanja, možete mu pomoći, ali pustite dijete da odabere odgovor. Odgovorite sami na preostala tri pitanja (5 do 7), a da pritom odgovori vašeg djeteta ne utječu na vaše odgovore. Nema točnih ili netočnih odgovora.
- 2. korak** Upišite broj svakog odgovora u desni kvadratić.
- 3. korak** Zbrojite rezultate iz svih kvadratića kako biste izračunali ukupni rezultat.
- 4. korak** Odnosite upitnik liječniku kako biste razgovarali o ukupnom rezultatu vašeg djeteta.



Što znači rezultat mog djeteta?

- 19 ili manje** Ukoliko je rezultat vašeg djeteta 19 ili manje, to može biti znak da njegova astma nije pod kontrolom onoliko dobro koliko je to moguće. Naručite se kod liječnika vašeg djeteta kako biste raspravili rezultat Upitnika o kontroli dječje astme, te ga upitajte treba li mijenjati plan liječenja astme.
- Raspitajte se kod liječnika vašeg djeteta o svakodnevnom dugoročnom uzimanju lijekova koji mogu pomoći u kontroli upale i stezanja dišnih putova, dvama glavnim uzrocima simptoma astme. Velikom broju djece može biti potrebno svakodnevno liječenje obaju uzroka kako bi se postigla optimalna kontrola astme.
- Ukoliko je rezultat vašeg djeteta 20 ili više, njegova astma je vjerojatno pod kontrolom. Postoje drugi čimbenici koje liječnik vašeg djeteta može razmotriti kada procjenjuje kontrolu astme, te biste se trebali naručiti kod liječnika kako biste raspravili o tome. Astma je nepredvidiva. Simptomi astme vašeg djeteta mogu se činiti blagima ili nepostojećima, ali se mogu pogoršati bilo kad.
- Neka vaše dijete redovito ispunjava Upitnik o kontroli dječje astme, bez obzira koliko se dobro osjećalo. Također neka nastavi redovito posjećivati liječnika kako biste osigurali da se njegova astma liječi onoliko dobro koliko je to moguće.

Neka vaše dijete odgovori na ova pitanja.

1. Kako se danas osjećaš obzirom na tvoju astmu?

REZULTAT

Vrlo loše <input type="radio"/> 0	Loše <input type="radio"/> 1	Dobro <input type="radio"/> 2	Vrlo dobro <input type="radio"/> 3	<input type="radio"/>
-----------------------------------	------------------------------	-------------------------------	------------------------------------	-----------------------

2. Koliko ti astma otežava trčanje, vježbanje ili bavljenje sportom?

Mnogo mi otežava, ne mogu činiti ono što želim. <input type="radio"/> 0	Otežava mi ne sviđa mi se. <input type="radio"/> 1	Malo mi otežava, ali je u redu. <input type="radio"/> 2	Ne otežava mi. <input type="radio"/> 3	<input type="radio"/>
---	--	---	--	-----------------------

3. Kašljaš li zbog astme?

Da, stalno. <input type="radio"/> 0	Da, često. <input type="radio"/> 1	Da, ponekad. <input type="radio"/> 2	Ne, nikad. <input type="radio"/> 3	<input type="radio"/>
-------------------------------------	------------------------------------	--------------------------------------	------------------------------------	-----------------------

4. Budiš li se noću zbog astme?

Da, stalno. <input type="radio"/> 0	Da, često. <input type="radio"/> 1	Da, ponekad. <input type="radio"/> 2	Ne, nikad. <input type="radio"/> 3	<input type="radio"/>
-------------------------------------	------------------------------------	--------------------------------------	------------------------------------	-----------------------

Molimo Vas da na sljedeća pitanja odgovorite sami.

5. U protekla 4 tjedna, koliko je dana vaše dijete danju imalo bilo kakve simptome astme?

5 Nije uopće 4 1-3 dana 3 4-10 dana 2 11-18 dana 1 19-24 dana 0 Svakođnevno

6. U protekla 4 tjedna, koliko je dana vaše dijete danju imalo "sviranje" u prsima zbog astme?

5 Nije uopće 4 1-3 dana 3 4-10 dana 2 11-18 dana 1 19-24 dana 0 Svakođnevno

7. U protekla 4 tjedna, koliko se noći vaše dijete budilo zbog astme?

5 Nije uopće 4 1-3 dana 3 4-10 dana 2 11-18 dana 1 19-24 dana 0 Svakođnevno

ZBROJ

Upitnik o kontroli **astme** (ACT™)

KONTROLA ASTME
Saznajite stupanj
kontrole Vaše astme

Asthma Control Test™ is a trademark of QualityMetric
Incorporated ©2002

**Saznajite broj bodova
za svoju astmu**



Broj bodova: 25 - POTPUNA KONTROLA

Imali ste **POTPUNU KONTROLU** astme u protekla 4 tjedna. Niste imali simptome, niti Vas je astma ograničavala u svakodnevnim aktivnostima. Posjetite liječnika ako Vam se zdravstveno stanje promijeni.

Broj bodova: 20 - 24 - DOBRA KONTROLA

Možda ste imali **KONTROLU** astme u protekla 4 tjedna, ali niste imali **POTPUNU KONTROLU**. Vaš liječnik bi Vam mogao pomoći da postignete **POTPUNU KONTROLU**.

Broj bodova: manje od 20 - NEPOTPUNA KONTROLA

Možda **NISTE IMALI KONTROLU** astme u protekla 4 tjedna. Vaš liječnik bi Vam mogao preporučiti što da učinite kako biste povećali kontrolu astme.



Upitnik o kontroli astme (ACT™)



BODOVI

Ovaj upitnik može pomoći osobama koje imaju astmu (osobe od 12 godina i starije) u procjeni kontrole astme.

Molimo Vas da zaokružite odgovarajući broj bodova za svako pitanje. Upitnik ima ukupno 5 pitanja.

Izračunajte ukupni broj bodova Upitnika o kontroli astme tako da zbrojite bodove za svaki odgovor. Nemojte zaboraviti pokazati ovaj rezultat svom liječniku.

Okrenite ovu stranicu i pročitajte što znači rezultat koji ste dobili.

Saznajte broj bodova za svoju astmu

1. korak: Zaokružite broj bodova za svako pitanje i upišite ga u kućicu s desne strane. Molimo Vas da odgovorite što iskrenije. To će pomoći Vašem liječniku u razgovoru o Vašoj astmi.

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

Stalno	1	Vrlo često	2	Ponekad	3	Rijetko	4	Nikada	5
--------	---	------------	---	---------	---	---------	---	--------	---

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

Više od jednom dnevno	1	Jednom dnevno	2	3 do 6 puta tjedno	3	Jednom ili dvaput tjedno	4	Nikada	5
-----------------------	---	---------------	---	--------------------	---	--------------------------	---	--------	---

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

4 ili više noći tjedno	1	2-3 noći tjedno	2	Jednom tjedno	3	Jednom ili dvaput tjedno	4	Nikada	5
------------------------	---	-----------------	---	---------------	---	--------------------------	---	--------	---

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

3 ili više puta dnevno	1	1 ili 2 puta dnevno	2	2 ili 3 puta tjedno	3	Jednom tjedno ili rjeđe	4	Nikada	5
------------------------	---	---------------------	---	---------------------	---	-------------------------	---	--------	---

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

Izvan kontrole	1	Pod slabom kontrolom	2	Donekle pod kontrolom	3	Pod dobrom kontrolom	4	Potpuno pod kontrolom	5
----------------	---	----------------------	---	-----------------------	---	----------------------	---	-----------------------	---

UKUPNO

2. korak: Zbrojite bodove da dobijete ukupan broj bodova.
3. korak: Okrenite ovu stranicu i pročitajte što znači rezultat koji ste dobili.

UPITNIK O KVALITETI ŽIVOTA S ASTMOM (AQLQ)

UPITNIK ZA PACIJENTA (SELF-ADMINISTERED) CROATIAN VERSION

© 2003
QOL TECHNOLOGIES Ltd.



Za daljnje informacije:

Elizabeth Juniper, MCSP, MSc
Professor
20 Marcuse Fields
Bosham, West Sussex
PO18 8NA, England
Telephone: +44 1243 572124
Fax: +44 1243 573680
E-mail: juniper@qoltech.co.uk
Web: <http://www.qoltech.co.uk>

This translation has been made possible
through a grant from PHARMACIA
Translated by MAPI RESEARCH INSTITUTE
Senior Translators: Prof. Luka Kovacic &
Sanja Kusec

© Upitnik AQLQ zaštićen je autorskim pravima te se ne smije mijenjati,
prodavati (na papiru ili u elektroničkom obliku), prevoditi ili prilagođavati za
neki drugi medij bez dopuštenja Elizabeth Juniper.

OŽUJAK 2003.

AKTIVNOSTI

Sjetite se načina na koji Vas astma ograničava u životu. Posebno nas zanima kojim se aktivnostima još uvijek bavite, ali u kojima Vas astma ograničava. Možda Vas astma ograničava zbog toga što se rjeđe bavite tim aktivnostima ili ih obavljate ne tako dobro kao prije ili zbog toga što manje u njima uživate. To trebaju biti aktivnosti kojima se često bavite i koje su Vam važne u svakodnevnom životu. To također trebaju biti aktivnosti kojima se namjeravate redovito baviti za vrijeme cijelog istraživanja.

Molim Vas da se sjetite svih aktivnosti kojima ste se bavili u protekla 2 tjedna kod kojih Vas je astma ograničavala.

Ovo je popis aktivnosti kojima se neki ljudi zbog astme mogu ograničeno baviti. Nadamo se da će Vam to pomoći da navedete 5 aktivnosti koje su Vama najvažnije, u kojima Vas je astma ograničavala u protekla 2 tjedna.

1. VOŽNJA BICIKLOM	15. KUPOVANJE
2. ČIŠĆENJE SNIJEGA	16. PJEVANJE
3. PLESANJE	17. REDOVITE DRUŠTVENE AKTIVNOSTI
4. SITNI POPRAVCI PO KUĆI	18. SPOLNI ODNOSI
5. KUĆANSKI POSLOVI	19. SPAVANJE
6. RAD U VRTU	20. PRIČANJE
7. UŽURBAN HOD	21. TRČANJE UZ STEPENICE ILI UZBRDO
8. DŽOGIRANJE, VJEŽBANJE ILI TRČANJE	22. USISAVANJE PRAŠINE
9. SMIJANJE	23. POSJETE PRIJATELJIMA ILI RODBINI
10. PRANJE PODA	24. ŠETANJE
11. KOŠENJE TRAVE	25. HODANJE UZ STEPENICE ILI UZBRDO
12. IGRANJE S KUĆNIM LJUBIMCIMA	26. STOLARSKI ILI TESARSKI POSLOVI
13. IGRANJE S DJECOM ILI UNUCIMA	27. AKTIVNOSTI NA POSLU
14. BAVLJENJE SPORTOM	

Upišite svojih 5 aktivnosti na sljedećoj stranici.

UPITNIK O KVALITETI ŽIVOTA S ASTMOM
(CROATIAN VERSION)
UPITNIK ZA PACIJENTA

PACIJENT _____

DATUM _____

stranica 2 od 6

Molimo Vas da upišete 5 Vama najvažnijih aktivnosti na crte u donjoj tablici, a zatim odgovorite koliko Vas je **astma** ograničavala u obavljanju svake aktivnosti **u protekla 2 tjedna** tako da stavite znak **X** u kućicu kod odgovarajuće ocjene.

KOLIKO JAKO VAS JE ASTMA **OGRANIČAVALA** U OVIM AKTIVNOSTIMA U PROTEKLA 2 TJEDNA?

	potpuno me ograničavala	izrazito me ograničavala	jako me ograničavala	umjereno me ograničavala	malo me ograničavala	vrlo malo me ograničavala	nimalo me nije ograničavala	nisam to radio
	1	2	3	4	5	6	7	
1. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

KOLIKO STE **TJELESNIH ILI EMOCIONALNIH SMETNJI** IMALI U PROTEKLA 2 TJEDNA?

	izrazito velike smetnje	vrlo velike smetnje	dosta velike smetnje	umjerene smetnje	male smetnje	vrlo male smetnje	nikakve smetnje
	1	2	3	4	5	6	7
6. Koliko ste tjelesnih ili emocionalnih smetnji imali u protekla 2 tjedna zbog NAPETOSTI U PRSIMA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

OPĆENITO, **KOLIKO STE VREMENA** U PROTEKLA 2 TJEDNA:

	stalno	vrlo često	često	ponekad	rijetko	vrlo rijetko	nikada
	1	2	3	4	5	6	7
7. bili ZABRINUTI ZATO ŠTO IMATE ASTMU?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. OTEŽANO DISALI zbog astme?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. imali simptome astme ZBOG TOGA ŠTO STE BILI IZLOŽENI DIMU CIGARETA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. osjećali HRIPANJE u prsima ("škripalo" Vam je ili "sviralo" u plućima)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. morali IZBJEGAVATI SITUACIJE ILI PROSTORE ZBOG DIMA CIGARETA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

KOLIKO STE TJELESNIH ILI EMOCIONALNIH SMETNJI IMALI U PROTEKLA 2 TJEDNA?

	izrazito velike smetnje	vrlo velike smetnje	dosta velike smetnje	umjerene smetnje	male smetnje	vrlo male smetnje	nikakve smetnje
	1	2	3	4	5	6	7
12. Koliko ste tjelesnih ili emocionalnih smetnji imali u protekla 2 tjedna zbog KAŠLJANJA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

OPĆENITO, KOLIKO STE VREMENA U PROTEKLA 2 TJEDNA:

	stalno	vrlo često	često	ponekad	rijetko	vrlo rijetko	nikada
	1	2	3	4	5	6	7
13. bili FRUSTRIRANI zbog astme?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. imali osjećaj TEŽINE U PRSIMA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. bili ZABRINUTI ZBOG POTREBE UZIMANJA LIJEKOVA za astmu?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16. imali potrebu PROČISTITI GRLO?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17. imali simptome astme zbog toga što ste BILI IZLOŽENI PRAŠINI?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18. imali POTEŠKOĆA S IZDISANJEM ILI UDISANJEM ZRAKA zbog astme?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19. morali IZBJEGAVATI SITUACIJE ILI PROSTORE ZBOG PRAŠINE?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20. BUDILI SE UJUTRO SA SIMPTOMIMA ASTME?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
21. UPLAŠILI SE DA NEMATE PRI RUCI LIJEKOVE ZA ASTMU?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22. NAPREZALI SE DA MOŽETE DISATI?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

OPĆENITO, KOLIKO STE VREMENA U PROTEKLA 2 TJEDNA:

	stalno	vrlo često	često	ponekad	rijetko	vrlo rijetko	nikada
	1	2	3	4	5	6	7
23. imali simptome astme ZBOG VREMENSKIH PRILIKA ILI ZAGAĐENOG ZRAKA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. BUDILI SE NOĆU zbog astme?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
25. IZBJEĞAVALI ILI OGRANIČAVALI SVOJE IZLASKE ZBOG VREMENSKIH PRILIKA ILI ZAGAĐENOG ZRAKA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
26. imali simptome astme ZBOG TOGA ŠTO STE BILI IZLOŽENI JAKIM MIRISIMA ILI PARFEMU?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
27. UPLAŠILI SE DA ĆETE OSTATI BEZ ZRAKA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
28. morali IZBJEĞAVATI SITUACIJE ILI PROSTORE ZBOG JAKIH MIRISA ILI PARFEMA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29. imali astmu koja Vas je OMETALA DA SE DOBRO NASPAVATE?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30. imali osjećaj da se BORITE DA DOĐETE DO ZRAKA?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

KOLIKO JAKO VAS JE ASTMA **OGRANIČAVALA** U PROTEKLA 2 TJEDNA?

	većinu nisam mogao obavljati		neke nisam mogao obavljati		samo nekoliko aktivnosti nisam mogao obavljati		uopće me nije ograničavala
	1	2	3	4	5	6	7
31. Pokušajte se sjetiti SVIH AKTIVNOSTI kojima ste se željeli baviti u protekla 2 tjedna. Koliko Vas je astma ograničavala u tim aktivnostima?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	potpuno me ograničavala	izrazilo me ograničavala	jako me ograničavala	umjereno me ograničavala	malo me ograničavala	vrlo malo me ograničavala	nimalo me nije ograničavala
	1	2	3	4	5	6	7
32. Od SVIH AKTIVNOSTI kojima ste se bavili u protekla 2 tjedna, koliko Vas je astma u tome ograničavala?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ŠIFRA DIMENZIJE:

Simptomi: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 29, 30

Aktivnost: 1, 2, 3, 4, 5, 11, 19, 25, 28, 31, 32

Emocije: 7, 13, 15, 21, 27

Vanjski podražaji: 9, 17, 23, 26