



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Jelena Knežević

**POTENCIJALNI MODULATORNI
ČIMBENICI NEDOSTATKA VITAMINA D
KOD PRETILOSTI I ASTME U
PEDIJATRIJSKOJ I ADOLESCENTNOJ
POPULACIJI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025. godina



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Jelena Knežević

**POTENTIAL MODULATORY EFFECTS
OF VITAMIN D DEFICIENCY IN OBESITY
AND ASTHMA IN PAEDIATRIC
POPULATION AND ADOLESCENTS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Dječjoj bolnici Srebrnjak, pod vodstvom prof.dr.sc. Mirjana Turkalj, dr.med., u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Informacije o mentoru

Prof.dr.sc. Mirjana Turkalj, dr. med, specijalist pedijatar je i subspecijalist alergologije i kliničke imunologije, pedijatrijske pulmologije te znanstveni savjetnik. Voditelj je Referentnog centra za kliničku alergologiju djece Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske. Profesor, predavač i voditelj je kolegija na dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi Medicinskog fakulteta i Studija sestrinstva Hrvatskog katoličkog sveučilišta, Medicinskog fakulteta i Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta u Osijeku, te nastavnik na dodiplomskoj nastavi Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Suraduje sa nekoliko sveučilišta i instituta u zemlji i inozemstvu (npr. UK, Njemačka, Austrija, Švicarska, Italija, Slovenija). Usavršavala se u Austriji, SAD-u i Danskoj. Članica je znanstvenog vijeća za antropologijska istraživanja HAZU-a, članica Hrvatskog klastera konkurentnosti za personaliziranu medicinu, voditeljica Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju u Dječjoj bolnici Srebrnjak, te Centra kompetencije u molekularnoj dijagnostici alergijskih i respiratornih bolesti djece. Također je članica međunarodnih i domaćih društava, kao što su EAACI, ERS, ISABS, HDAKI-a, HID-a, HDHG-a itd. Voditelj je na više međunarodnih znanstveno-istraživačkih projekata, kao što su FP6 I FP7 Europski projekti (EuroPreval, ATOPICA, iFAAM i GA2LEN), H2020 (IMPTOX, EDIAQI) te nacionalnih projekta (kao što su IRI projekti, CRIBS). Recezent je u nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih časopisa (PLOS, Children, Med Sci Mon, AJCR, CEJP, Global J All i dr.). Govori engleski i njemački te pasivno ruski jezik. Područje njenog interesa su: patomehanizmi astme i alergijskih bolesti, alergija na hranu, alergenska imunoterapija, imunodeficijencije. Napisala je preko 200 znanstvenih i stručnih radova, sa preko 1700 citata. Aktivno sudjeluje na domaćim i međunarodnim kongresima, na kojima je prezentirala više od 120 sažetaka.

Zahvale

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Doktorska disertacija

NEDOSTATAK VITAMINA D KOD PRETILOSTI I ASTME U PEDIJATRIJSKOJ I ADOLESCENTNOJ POPULACIJI - POTENCIJALNI MODULATORNI ČIMBENICI

JELENA KNEŽEVIĆ

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Sveučilište u Zagrebu

U svrhu boljeg razumijevanja mehanizama u pozadini pretilosti i astme, u ovom istraživanju analiziran je utjecaj nedostatka vitamina D na njihov tijek i težinu, s posebnim naglaskom na fenotip astme s pretilošću. Za određivanje vitamina D u plazmi korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, dok je lančana reakcija polimeraze korištena za utvrđivanje potencijalne povezanosti polimorfizama njegovog receptora s razvojem navedenih poremećaja. Rezultati istraživanja su pokazali kako je najveći postotak djece sa sniženim vitaminom D detektiran u skupini pretila djece, dok istodobno potvrđeni manjak vitamina D u kontrolnoj skupini ističe sve veći trend njegovih sniženih razina i među zdravom populacijom. Tijekom analize odabranih polimorfizama receptora vitamina D, zabilježena je veća frekvencija izmijenjenog alela FokI polimorfizma te dominantnog alela BsmI i TaqI polimorfizama kod pretilosti, dok je kod astmatičara najveći broj ispitanika identificiran kao heterozigot za sve ispitivane polimorfizme. Izdvojenom analizom rezultata djece sa sniženim vitaminom D, uočena je značajna razlika u distribuciji genotipova FokI polimorfizma, s većom učestalošću ff genotipa kod pretilosti te FF genotipa kod astme, ističući niske cirkulirajuće razine vitamina D te recesivni model FokI polimorfizma kao povećan rizik za razvoj pretilosti. Osim toga, enzimskim imunosorbentnim testom te mjerenjem dušikovog oksida u izdahu, dodatno su utvrđene značajno niže razine adiponektina te više razine dušikovog oksida, osobito u skupini pretilih astmatičara sa sniženim razinama vitamina D, ističući povezanost manjka vitamina D i disregulacije adiponektina te vezu između pretilosti i hiperreaktivnosti dišnih putova.

(125 stranica, 34 tablice, 17 slika, 252 literaturna izvora, 4 priloga, hrvatski jezik)

Ključne riječi: astma, pretilost, vitamin D, polimorfizmi receptora vitamina D, adiponektin, plućna funkcija

Mentor: prof.dr.sc. Mirjana Turkalj, dr.med.

Ocjenjivači:

1. prof.dr.sc. Domagoj Đikić

2. izv.prof. dr.sc. Ivana Šola

3. dr.sc. Olga Malev

Zamjena: prof. dr. sc. Donatella Verbanac

Rad prihvaćen:

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Doctoral Thesis

VITAMIN D DEFICIENCY IN OBESITY AND ASTHMA IN PEDIATRIC POPULATION AND ADOLESCENTS – POTENTIAL MODULATORY FACTORS

JELENA KNEŽEVIĆ

Faculty of Science, Department of Biology, University of Zagreb

To better understand the mechanisms underlying obesity and asthma, this study analysed the impact of vitamin D deficiency on their course and severity, with special emphasis on the obese asthmatic group. High-Performance Liquid Chromatography was used to determine vitamin D levels, while Polymerase Chain Reaction was used to determine the possible association of vitamin D receptor polymorphisms with development of these disorders. The results of the study show that the highest percentage of children with low vitamin D was detected in the obese group, while vitamin D insufficiency found in the control group highlights the increasing trend of its low levels even in the healthy population. A higher frequency of the altered allele of the FokI polymorphism and the dominant allele of the BsmI and TaqI polymorphisms was recorded in obesity, while the majority of asthma patients were identified as heterozygous. Separate analysis of the results for participants with low vitamin D revealed a significant difference in the distribution of the FokI polymorphism genotype, with a higher frequency of the ff genotype in obesity and FF genotype in asthma, highlighting low circulating vitamin D levels and the recessive model of the FokI polymorphism as an increased risk for development of obesity. In addition, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Exhaled Nitric Oxide testing, confirmed significantly higher levels of exhaled nitric oxide and lower levels of serum adiponectin in the obese asthmatic group, especially in children with low vitamin D. This highlights the association between vitamin D deficiency and adiponectin dysregulation and the association between obesity and airway hyperresponsiveness.

(125 pages, 34 tables, 17 images, 252 references, 4 annexes, Croatian)

Key words: asthma, obesity, vitamin D, receptor vitamin D polymorphisms, adiponectin, lung function

Supervisor: prof.dr.sc. Mirjana Turkalj, dr.med. – University of Osijek, Faculty of Science

Reviewers:

1. Professor Domagoj Đikić, PhD
2. Associate Professor Ivana Šola, PhD
3. Olga Malev, PhD

Replacement: Professor Donatella Verbanac, PhD

Thesis accepted:

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1.	Astma	3
2.1.1.	Patofiziologija astme	4
2.1.2.	Fenotipovi astme.....	6
2.1.3.	Epidemiologija astme	6
2.1.4.	Rizični čimbenici za razvoj i dijagnostiku astme	8
2.2.	Pretilost	11
2.2.1.	Uzroci i rizični faktori za razvoj pretilosti.....	12
2.2.2.	Interakcija pretilosti i astme.....	14
2.3.	Vitamin D.....	17
2.3.1.	Receptor vitamina D.....	20
2.3.2.	Polimorfizmi receptora vitamina D	22
2.3.2.1.	Povezanost vitamina D i astme	24
2.3.2.2.	Povezanost vitamina D i pretilosti.....	27
2.4.	Adiponektin.....	30
2.4.1.	Značaj adiponektina u astmi	32
3.	MATERIJALI I METODE.....	35
3.1.	Ispitanici.....	35
3.2.	Mjerenje plućne funkcije i određivanje indeksa tjelesne mase	36
3.3.	Određivanja vitamina D u uzorcima plazme.....	37
3.3.1.	Materijali uređaji	37
3.3.2.	Sakupljanje i pohrana uzoraka.....	37
3.3.3.	Priprema kalibratora i kontrolnih uzoraka iz kita	38
3.3.4.	Obrada uzoraka.....	38
3.3.5.	Kromatografski uvjeti.....	41
3.3.6.	Obrada podataka	42
3.4.	Određivanja adiponektina u uzorcima plazme.....	42
3.4.1.	Materijali i uređaji	42
3.4.2.	Sakupljanje i pohrana uzoraka.....	42
3.4.3.	Priprema reagensa dostupnih u kitu.....	42
3.4.4.	Priprema razrjeđenja standarda.....	43
3.4.5.	Priprema uzoraka	44
3.4.6.	Protokol testa	44

3.4.7.	Obrada podataka	45
3.5.	Izolacija DNA	45
3.5.1.	Materijali i uređaji	45
3.5.2.	Sakupljanje i pohrana uzoraka.....	46
3.5.3.	Priprema reagensa dostupnih u kitu.....	46
3.5.4.	Protokol testa	46
3.6.	Genotipizacija	47
3.6.1.	Materijali i uređaji	47
3.6.2.	Priprema reagensa.....	48
3.6.3.	Protokol testa	48
3.7.	Statistička obrada	50
4.	REZULTATI	51
4.1.	Demografske karakteristike i mjerenje indeksa tjelesne mase.....	51
4.2.	Razina vitamina D.....	51
4.3.	Povezanost polimorfizama receptora vitamina D s pretilošću i astmom	54
4.3.1.	FokI (rs2228570)	54
4.3.2.	TaqI (rs 731236).....	60
4.3.3.	BsmI	66
4.3.4.	ApaI	72
4.4.	Mjerenje plućne funkcije i FeNO.....	73
4.5.	Adiponektin.....	76
5.	RASPRAVA.....	79
6.	ZAKLJUČCI	87
7.	LITERATURA	90
8.	PRILOZI.....	105

1. UVOD

Astma i pretilost spadaju u najčešće kronične bolesti u pedijatrijskoj populaciji, a njihov komorbiditet predstavlja jedinstven klinički izazov. Brojne studije upućuju na njihov složen, dvosmjernan odnos, pri čemu pretilost može pridonijeti težoj kliničkoj slici astme, ali i obrnuto, kroz mehanizme koji još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni¹⁻³. Jedan od ključnih povezujućih čimbenika je masno tkivo, koje u pretilosti izlučuje izmijenjene razine adipokina i citokina, pridonoseći sustavnoj upali. U pretilih osoba često su povišene koncentracije proupalnih adipokina leptina i rezistina, dok su razine protuupalnog adiponektina značajno smanjene⁴⁻⁶. Pretpostavlja se da ova sustavna upala, posredovana citokinima i adipokinima, ima ključnu ulogu u etiologiji astme kod pretila djece, potencijalno dovodeći do pojačane upale dišnih putova i pogoršanja težine astme⁷⁻¹¹.

Dodatno, sve veći interes usmjeren je prema ulozi vitamina D kao potencijalnog modulatora povezanosti pretilosti i astme. Status vitamina D intenzivno je analiziran u različitim regijama i populacijama, uključujući različite etničke skupine, ali i dalje ne postoji konsenzus o njegovim optimalnim koncentracijama i referentnim vrijednostima, osobito u pedijatrijskoj dobi¹²⁻¹⁶. Naime, u većem broju različitih opservacijskih studija objavljeni su rezultati koji potvrđuju manjak vitamina D čak i kod zdrave djece, podižući svijest o potencijalno visokoj prevalenciji nedovoljnih razina vitamina D na globalnoj razini, na što ne utječu samo prehrambene navike ili izlaganje suncu, već i dob, spol ili ekonomski status.^{17,18,12,19-22,13,16}

Nedostatak vitamina D uočen kod pretilosti i bolesnika s astmom, čini djecu i adolescente s oba poremećaja još osjetljivijom skupinom, gdje njegova deficijencija može dovesti do težih, lošije kontroliranih oblika astme¹¹. Također, vitamin D bi mogao imati modulatoreni učinak na ekspresiju gena odgovornih za sintezu i izlučivanje adipokina, što su pokazale studije koje su izvijestile o značajno nižim razinama adiponektina kod pretila djece s nedostatkom vitamina D^{23,24}. Nadalje, neke su studije potvrdile obrnutu korelaciju između težine astme i razina vitamina D u serumu, pri čemu se suplementacija vitaminom D čini obećavajućim dodatkom terapiji, utječući na koncentracije adiponektina i kontrolu astme^{24,25}. Ipak, učinkovitost suplementacije vitamina D kao intervencije za poboljšanje ishoda astme kod pretila djece i dalje ostaje upitna, što naglašava potrebu za daljnjim istraživanjima.

Iako brojne studije pokušavaju uspostaviti jasnu vezu između astme i pretilosti kod djece, relativno je malo studija koje ciljano istražuju ulogu adiponektina, vitamina D i upalnih markera u ovom kontekstu, osobito u Hrvatskoj. Primjena različitih metoda omogućila bi identifikaciju potencijalno važnih bioloških čimbenika u razvoju oba poremećaja te definirala grupe djece s većim rizikom napredovanja navedenih poremećaja, osobito u slučaju potvrde njihove povezanosti s polimorfizmima receptora vitamina D. Analizirajući različite biomarkere, ovo istraživanje nastojalo je pojačati razumijevanje utjecaja pretilosti na egzacerbaciju astme te pridonijeti razvoju poboljšanih strategija liječenja ove ranjive pedijatrijske populacije.

Ciljevi istraživanja:

- Utvrditi postoje li razlike u razinama vitamina D kod djece s pretilošću i/ili astmom te zdrave djece;
- Utvrditi jesu li izabrani polimorfizmi receptora vitamina D povezani s razvojem pretilosti i astme;
- Utvrditi postoje li razlike u razinama adiponektina kod djece s pretilošću i/ili astmom te zdrave djece.

Hipoteze:

- Djeca s astmom i/ili pretilošću često uz osnovni poremećaj imaju nedostatak vitamina D, koji pridonosi napredovanju i težini njihove bolesti;
- Polimorfizmi receptora vitamina D povezani su s astmom i pretilošću te čine predispoziciju za njihov razvoj;
- Razine adiponektina snižene su kod osoba s pretilošću te se izostanak njegovih protuupalnih učinaka može povezati s većom prevalencijom astme.

Metode:

U svrhu izrade ovog doktorskog rada korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za određivanje razina vitamina D; metoda izolacije DNA i lančana reakcija polimeraze za utvrđivanje povezanosti polimorfizama receptora vitamina D s astmom i pretilošću te enzimski imunosorbentni test za određivanje razine adiponektina. Dodatno je kod svih ispitanika, tijekom kliničkog pregleda testirana plućna funkcija spirometrijom te je izmjerena frakcija izdahnutog dušikovog oksida.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Astma

Astma je opstruktivna upalna bolest donjih dišnih putova, koja se uvrštava u jednu od najčešćih kroničnih nezaraznih bolesti, s oko 300 milijuna oboljelih diljem svijeta. Na globalnoj razini smještena je među prvih 20 bolesti koje smanjuju kvalitetu života pacijenta, a procjenjuje se da bi do 2025. godine ovom bolesti moglo biti pogođeno dodatnih 100 milijuna ljudi ^{26,27}. Unatoč brojnim naporima kojima se pokušalo adresirati razvoj i progresija astme, Globalna inicijativa za astmu (engl. *Global Initiative for Asthma*, GINA) objavila je kako je teret koji astma predstavlja, zbog prerane smrti i smanjene kvalitete života te utjecaja na ekonomiju, i dalje značajan problem javnog zdravstva ^{27,28}. Unutar oboljele populacije, 14% pacijenata s dijagnosticiranom astmom spada u pedijatrijsku populaciju, što ju čini najčešćom kroničnom, respiratornom bolesti kod djece ²⁹, a loša kontrola bolesti povezuje se s brojnim negativnim posljedicama, uključujući izostanke iz škole, nesudjelovanje u fizičkim aktivnostima, bolovanja staratelja te strah od teških simptoma ²⁹⁻³¹.

Ovu kompleksnu, multifaktorijalnu bolest karakterizira nekoliko tipičnih simptoma, poput piskutavog disanja, kašlja, nedostatka daha, stezanja u prsima te različitih ekspiratornih smetnji disanja. Navedeni simptomi variraju tijekom vremena te se mogu razlikovati u intenzitetu, a često su aktivirani različitim okidačima poput alergena, fizičke aktivnosti, virusnih respiratornih infekcija i promjene vremena ²⁸. U pozadini astme mnogo je različitih procesa te se prema prepoznatljivim čimbenicima svrstava u nekoliko fenotipova i endotipova. Fenotip opisuje kliničke i morfološke karakteristike te individualne odgovore na terapiju, a klinički je relevantan za bolje shvaćanje okidača, prezentaciju bolesti i odgovor na danu terapiju, ali ne daje nužno uvid u patološke mehanizme u pozadini. S druge strane, endotipovi opisuju podtipove bolesti, koji se definiraju prema sličnim biološkim mehanizmima ^{28,32,33}.

Na temelju navedenih karakteristika, pacijenti se svrstavaju u određeni astmatski fenotip, a prema GINA-i ²⁸ neki od najčešćih su:

- Alergijska astma – najprepoznatljiviji tip astme koji se često pojavljuje već u djetinjstvu i povezan je s obiteljskom povijesti alergijskih bolesti poput alergijskog rinitisa, alergije na hranu te atopijskog dermatitisa. U sputumu bolesnika s alergijskom astmom često se identificira eozinofilna upala dišnih puteva, a pacijenti s ovim tipom astme često dobro odgovaraju na terapiju inhalacijskim kortikosteroidima (engl. *inhaled corticosteroids*, ICS).

- Nealergijska astma – astma koja nije povezana s alergijom. Stanični profil sputuma pacijenata može biti eozinofilni, neutrofilni ili sadržavati samo par upalnih stanica. Pacijenti s nealergijskom astmom često pokazuju nepotpuni ili kratkotrajniji odgovor na terapiju ICS-om.
- Astma u kasnijoj (odrasloj) dobi – neki pacijenti, osobito žene, razviju astmu tek u odrasloj dobi. Ovi pacijenti često nemaju alergije i često zahtijevaju veće doze ICS-a. Kod ove grupe pacijenata nužno je isključiti profesionalnu astmu (astma koja se javlja zbog izloženosti okidačima na poslu).
- Astma s perzistentno sniženom plućnom funkcijom – neki pacijenti razviju limitacije u protoku zraka, koje su stalne ili nepotpuno reverzibilne, a ovaj fenomen povezuje se s remodeliranjem stijenke dišnog puta.
- Astma s pretilošću – određeni dio pretilih pacijenata s astmom ima česta pogoršanja, lošiji odgovor na terapiju, te odsustvo eozinofilne upale dišnih puteva.

Ova izrazito heterogena bolest, kod pacijenata se može prezentirati različitim stupnjevima težine, od blage do teške astme ili od povremenih do trajnih opstrukcija dišnih putova ^{26,28,32}. Upravo zbog toga, uvrštavanje astme kod djece u određeni, jasno definirani fenotip može predstavljati veliki izazov za kliničare, osobito zbog nedostatka specifičnih i validiranih biomarkera.

2.1.1. Patofiziologija astme

Astmu karakteriziraju hiperreaktivnost te upala i obstrukcija dišnih putova, a sama pozadina bolesti je kompleksna i još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Simptomi astme i opstrukcija dišnih putova povezuju se s egzacerbacijom upale, a uključeni medijatori i stanice razlikuju se ovisno o stimulusu, pri čemu je krajnji rezultat kontrakcija glatkih mišića u stijenkama dišnih putova i upala koja se smiruje spontano ili s odgovarajućom terapijom ^{34,35}. Patogeneza astme uključuje različite stanice imunološkog sustava poput limfocita T, limfocita B, mastocita, makrofaga, neutrofila, eozinofila te dendritičnih stanica, a identifikacija i brojanje određenih populacija stanica u gornjim i donjim dišnim putovima ključno je u karakterizaciji vrsta upale, odnosno diferencijaciji endotipa. U patogenezi astme značajnu ulogu ima neravnoteža između Th1 i Th2 limfocita. Naime, podtip pomoćničkih limfocita T (CD4+ T-stanice), Th1 stanice, uključene su u proizvodnju citokina (npr. INF- γ) te suprimiraju aktivaciju Th2 stanica, što posljedično vodi do smanjivanje eozinofilne upale i poticanja neutrofilne upale. Koraci neutrofilne astme nisu do kraja razjašnjeni, ali čimbenici poput endotoksina i virusnih

infekcija uzrokuju ozljedu epitelnih stanica, što vodi do sekrecije IL-6 i IL-8 te privlačenja neutrofila, pomičući imunološki odgovor prema Th1 i Th17 odgovoru³⁶. Suprotno, mehanizam alergološke astme počinje susretom epitelnih stanica s alergenom i lučenjem citokina koji aktiviraju dendritične stanice te prezentiraju alergene naivnim limfocitima, promovirajući diferencijaciju Th2 stanica^{35,36}. Aktivirane Th2 stanice zatim potiču proizvodnju proupalnih citokina (IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13), pri čemu IL-4 i IL-13 potiču limfocite B na proizvodnju imunoglobulina E (IgE) te uzrokuju sekreciju mukusa i vode do preosjetljivosti dišnih putova^{37,34}.

Prema novijim saznanjima astma se prema tipu upale dijeli na astmu tipa 1 te astmu tipa 2, pri čemu je astma tipa 2 glavni endotip kod djece, a 80% djece s astmom može se svrstati u skupinu alergijske (ili atopijske) astme, kao podskupine astme tipa 2. Astmu tipa 2 karakteriziraju povišeni biomarkeri poput eozinofila u krvi ili sputumu, frakcija izdisaja dušikovog oksida te ukupni IgE³⁸. Alergeni, onečišćivači ili mikoorganizmi aktiviraju bronhijalni epitel te pokreću eozinofilnu upalu dišnih putova, koju stanice urođenog imunološkog sustava (prirodne stanice ubojice, progenitori eozinofila i bazofila, urođene limfoidne stanice tipa 2) te Th2 stanice održavaju lučenjem citokina poput IL4, IL-5 i IL-13³⁹.

Novija istraživanja sugeriraju kako bi disfunkcija makrofaga također mogla imati važnu ulogu u patogenezi astme, osobito kod alergijskog tipa astme, gdje aktivacija makrofaga može dovesti do lučenja citokina poput INF- γ , lipopolisaharida te faktora nekroze tumora-alfa (engl *Tumour Necrosis Factor alpha*, TFN- α) te posljedično aktivaciju neutrofila putem Th1 i Th17 stanica^{40,41}. Osim toga, novija istraživanja ističu važnu ulogu mastocita, osobito u teškom obliku astme, gdje je pronađena pozitivna korelacija submukozne upale mastocita sa stopom težih egzacerbacija⁴².

Klinički simptomi i patogeneze astme povezani su sa lučenjem citokina IL-4, IL-5 i IL-13, pri čemu IL-4 i IL-13 pridonose proizvodnji sluzi, hiperplaziji vrčastih stanica, fibrozi, izotipskom prekapčanju B-stanica, sintezi IgE-a, infiltracijom tkiva eozinofilima, proizvodnji dušikovog oksida i remodeliranju dišnih putova, dok IL-5 potiče sazrijevanje i aktivaciju eozinofila⁴³. Svi navedeni molekularni mehanizmi potiču upalne procese na razini tkiva i organa, koji rezultiraju važnim patofiziološkim i kliničkim posljedicama bolesti. Aktivacija upale tipa 2 uzrokuje trajnu hiperreaktivnost dišnih putova te disfunkciju epitelne barijere, a oštećena epitelna barijera kod astmatičara pokreće kontinuiranu aktivaciju upalnih signala tipa 2, rezultirajući začaranim krugom upalnih procesa⁴⁴.

2.1.2. Fenotipovi astme

Fenotipovi astme ovise o prirodi okidača (alergijska/nealergijska), dobi aktivacije u djece (dojenačka dob, predškolska i školska dob, adolescentna astma) te pozadini patofiziologije (povišeni/sniženi T2-posredovani stanični odgovor). Astma se na temelju brojanja stanica može podijeliti u četiri upalna fenotipa: eozinofilnu (povišeni eozinofili, uredni neutrofili), neutrofilnu (povišeni neutrofili, uredni eozinofili), miješanu granulocitnu (povišeni eozinofili, povišeni neutrofili) i paucigranulocitnu (uredni eozinofili, uredni neutrofili) astmu³⁴. Stanice imunološkog sustava u astmi su u međusobnoj kompleksnoj interakciji, što uzrokuje otpuštanje medijatora poput histamina i leukotriena te vodi do strukturalnih i fizioloških promjena^{45,46,37}. Fiziološka posljedica ove interakcije i procesa je hiperreaktivnost dišnih putova, što može voditi do daljnje obstrukcije i egzacerbacije astme, a do sada su predložena dva osnovna tipa koji djeluju kao okidači - okolišni i čimbenici domaćina. U čimbenike domaćina ubrajaju se genetika (roditelji astmatičari) i spol, pri čemu je prevelancija bolesti češće zabilježena kod dječaka. Okolišni čimbenici uključuju virusne infekcije, duhanski dim, alergene, fizičku aktivnost, stres i gastroezofagealni refluks, koji odvojeno ili zajednički mogu inicirati pogoršanje osnovne bolesti i napadaje astme. Osim toga, neke studije pokazale su kako čimbenici poput infekcija majke i pušenja tijekom trudnoće, imaju utjecaj već u prenatalnom razdoblju^{45,47,48,37}.

Poboljšanje u limitaciji dišnih putova često dolazi u kombinaciji s ublažavanjem i nestankom simptoma astme. Iako se ranije astmu smatralo reverzibilnim poremećajem, današnja istraživanja ukazuju na to da dolazi do trajnih strukturalnih promjena dišnih putova (remodeliranje dišnih puteva), koje pridonose patogenezi astme, progresiji i ozbiljnosti bolesti te nedostatku reverzibilnosti^{46,49,50,35}. Osim toga, sve je više dokaza da je astma dugoročno povezana s određenim smanjivanjem plućne funkcije, što je također indikacija strukturalnih i vjerojatno trajnih promjena dišnih putova kod pacijenata s perzistentnom astmom^{35,49,50}. Iako je sve više studija uključeno u bolje razumijevanje patogeneze astme i dalje postoji rastući trend u incidenciji i morbiditetu bolesti, osobito u zapadnjačkim zemljama te predstavlja značajan direktan medicinski i indirektni ekonomski teret.

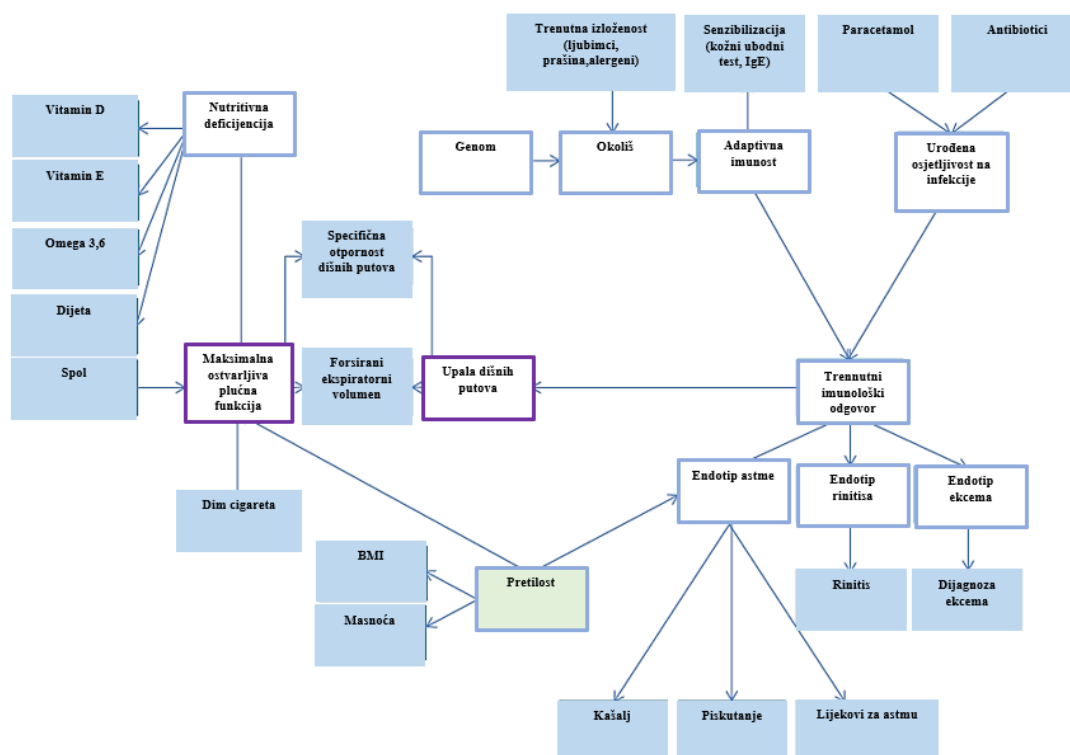
2.1.3. Epidemiologija astme

Definicija i klasifikacija astme kod djece je kompleksna zbog heterogene i multidimenzionalne prirode bolesti te varira između različitih istraživačkih grupa. Iako se

tijekom godina pokušalo doći do konsenzusa, gotovo 60 različitih definicija dječje astme korišteno je u preko 122 objavljene studije^{26,51,52}. Iako neke od definicija mogu djelovati gotovo identično, neke od njih su više osjetljive, dok su druge više specifične. Primjer toga opisali su Dharmage i sur., koji su na temelju literaturnih izvora prikazali kako postoji razlika između više osjetljivih definicija astme, gdje pojedinci sami procjenjuju pojavu piskutavog disanja u zadnjih 12 mjeseci bez prisutstva prehlade te više specifičnih definicija astme, dijagnosticiranih od strane liječnika. Naime, definicije postavljene na temelju upitnika efektivno procjenjuju veću prevalenciju, za razliku od kliničke definicije koja uz piskutavo disanje u određivanje dijagnoze često uključuje i objektivna mjerenja poput istodobnog prisutstva bronhijalne hiperreaktivnosti²⁶. Upravo zbog toga je česta pojava i previše i nedovoljno dijagnosticiranih slučajeva, gdje je osobito problematičan prevelik broj netočnih dijagnoza koji vodi do izlaganja djece nepotrebnim nuspojavama uzrokovanih lijekovima te trivijaliziranja bolesti.

Osim toga, dob pacijenta izuzetno je važan čimbenik, osobito kod mlađe djece, gdje je teško razlikovati prolazno piskutavo disanje uzrokovano virusnim infekcijama i početak prave astme, iako ponavljajuće epizode tijekom ranije dobi u mnogim slučajevima mogu predstavljati rane faze astme^{26,53}. Upravo zbog toga, simptomi poput piskutanja i kašlja te objektivne mjere poput plućne funkcije, biomarkera u krvi i sputuma i/ili urina, trebali bi se istodobno analizirati i promatrati kao čimbenici karakteristični za astmu. Ipak, postoji nekoliko ozbiljnih poremećaja koji se mogu povezati sa sličnim ili gotovo identičnim karakteristikama poput piskutanja, kroničnog kašlja i/ili nedostatka daha u djece i samim time djelovati kao astma^{26,29,54,55}.

Iako je u današnje vrijeme fenotipska heterogenost astme globalno prihvaćena, dodatan problem je ispravno identificiranje različitih endotipova astme i razumijevanje patofizioloških mehanizama u njihovoj podlozi, što je ključ za personaliziranu i preciznu medicinu. Bolje definirani endotipovi astme i alergijskih bolesti te konsenzus oko različitih fenotipova piskutavog disanja tijekom djetinjstva, na poslijetku vode k više ciljanim istraživanjima koja bi posljedično identificirala molekularne, genetičke, demografske i okolišne čimbenike te omogućila bolje predviđanje endotipova s većom preciznošću i sigurnošću. Upravo zbog varijabilnosti čimbenika koji mogu utjecati na razvoj bolesti i otežanog objektivnog mjerenja plućne funkcije u pedijatrijskoj populaciji, kliničari se u definiranju i dijagnosticiranju astme i alergijskih bolesti susreću s brojnim izazovima (Slika 1.)^{54,32}



Slika 1. Izazovi u razumijevanju i dijagnosticiranju astme (preuzeto i prilagođeno iz Belgrave i sur.; 2017.⁵⁴).

2.1.4. Rizični čimbenici za razvoj i dijagnostiku astme

Kada se postavi sumnja na astmu, dijagnoza bolesti u dječjoj populaciji zahtjeva precizno promatranje trenutnog stanja i povijesti bolesti, obiteljske povijesti bolesti te liječnički pregled. Ne postoji jedan test koji bi se smatrao zlatnim standardom u dijagnosticiranju astme, zbog čega se dijagnoza donosi na temelju više čimbenika poput ponavljajućih, karakterističnih simptoma, prisutnosti upale dišnih putova, odgovora na terapiju te mogućnosti postojanja drugih dijagnoza²⁹. Postavljanje dijagnoze temelji se na identifikaciji karakterističnih respiratornih simptoma poput piskutanja, kašlja i stezanja u prsima te dispneje sa sniženim ekspiratornim protocima, a dokaze je poželjno odmah dokumentirati, s obzirom na to da se simptomi s vremenom mogu poboljšati spontano ili zbog terapije. Primjerice, nakon uvođenja terapije ICS-om dijagnozu astme vrlo je teško potvrditi, zbog manje varijabilnosti simptoma i plućne funkcije²⁸.

Pri dijagnosticiranju astme kod djece iznad 5 godina starosti, kao jedna od provjerenih metoda često se izvodi spirometrija. Spirometrija je neinvazivni test kojim se mjeri volumen i

protok zraka tijekom udisaja i izdisaja, a najčešće mjereni parametri su forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi (engl. *Forced expiratory volume in 1 second*, FEV1) i forsirani vitalni kapacitet (engl. *Forced vital capacity*, FVC) te njihov omjer. FEV1 predstavlja forsirani volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi, dok je FVC ukupan volumen izdahnutog zraka u forsiranom udahu i izdahu ⁵⁶. Iako se sniženi FEV1 može povezati i s drugim plućnim bolestima, sniženi omjer FEV1/FVC (<80%) upućuje na snižen ekspiratorni volumen, tj. opstrukciju donjih dišnih putova te podržava dijagnozu astme, a testiranje je poželjno ponoviti ukoliko dođe do slabog ili nikakvog odgovora na terapiju ili dvojbenog postavljanja dijagnoze ^{28,56,29}. Također, kod astmatičara se često bilježi veći pad vrijednosti FEV1 i vrijednosti omjera FEV1/FVC tijekom vremena, ali kliničari zbog kompleksnosti bolesti i postojanja različitih fenotipova, u dijagnosticiranju koriste i dodatne markere ⁵⁷. Zbog toga se, kao jedan od pomoćnih testova, često koristi i test za mjerenje frakcije izdisaja dušikovog oksida (engl. *Fractional Exhaled Nitric Oxide*, FeNO). Naime, povišene razine FeNO-a detektirane su kod djece s astmom te reflektiraju eozinofilnu upalu dišnih putova, kao rezultat Th2 staničnog odgovora. Obzirom na postojanje dušikovog oksida u ljudskom dahu, mjerenje FeNO-a smatra se neinvazivnim, kvantitativnim pokazateljem upale dišnih putova, koji se pokazao korisnim markerom za donošenja odluke o izboru terapije kod djece s postavljenom dijagnozom (odgovor na kortikosteroide) ^{29,28,56}. Također, mjerenje FeNO-a je osobito praktičan test kod djece sa simptomima nekontrolirane astme, ali neočekivano normalnim rasponima parametara spirometrijskog testa ili u situaciji smanjene plućne funkcije kod bolesnika bez evidentiranih respiratornih simptoma ⁵⁸. Smjernice Američkog torakalnog društva i Europskog respiratornog društva predlažu mjerenje FeNO-a prije izvođenja spirometrije, zbog rezultata koji ukazuju na to kako spirometrija s ponavljajućim forsiranim udisajem i izdisajem može reducirati FeNO i do 25% kod pacijenata s i bez astme ^{59,60}. Također, Murray i suradnici u svojoj su studiji objavili kako bi FeNO mogao imati najbolju dijagnostičku točnost za trenutnu astmu te su razvili dijagnostički algoritam, koji potvrđuje logičnost mjerenja FeNO-a kao primarnog markera, osobito zbog potencijalnog utjecaja spirometrije na njegove vrijednosti ⁶¹.

Uz navedeno, jedno od testiranja koje se ne koristi rutinski u postavljanju dijagnoze, ali se preporuča prema brojnim smjernicama, je alergološko testiranje. Naime, alergološko testiranje je osobito korisno u identificiranju okidača astme, a obuhvaća kožni ubodni test i mjerenje specifičnog imunoglobulina E (sIgE) ^{29,62,63}. Nakon postavljene dijagnoze astme, alergološki testovi mogu biti vrlo korisni, osobito za uvrštavanje pacijenata u određeni astmatski fenotip te planiranje personaliziranih mjera liječenja i prevencije, što pridonosi uspješnom izbjegavanju okidača astmatskih napadaja ^{56,62}.

Također, u preciznoj dijagnostici astme od izuzetne je važnosti dobro poznavati potencijalne čimbenike koji mogu pridonijeti razvoju astme, a do danas je poznato nekoliko okidača koji mogu dovesti do napadaja karakterističnih za ovaj poremećaj (Tablica 1).

Tablica 1. Popis rizičnih faktora i najčešćih okidača astme (Preuzeto i prilagođeno iz Martin i sur.; 2022²⁹).

Česti okidači astme	Rizični faktori
▶ Virusne respiratorne infekcije ▶ Fizička aktivnost ▶ Ambijentalne promjene temperature i vlage ▶ Kućni zagađivači (npr. plijesan, grinje) ▶ Okolišni zagađivači ▶ Izloženost duhanskom dimu ▶ Kućni ljubimci ▶ Jaki mirisi ▶ Anksioznost i stres ▶ Lijekovi ▶ Gastroezofagealni refluks	▶ Osobna ili obiteljska atopijska povijest bolesti: ekcem, alergijski rinitis ▶ Obiteljska povijest astme ▶ Izloženost duhanskom dimu ▶ Prijevremeni porod ▶ Niska porođajna težina ▶ Pretilost ▶ Loša kvaliteta smještaja (plijesan i vlaga) ▶ Zagađenost zraka

U okidače astme spadaju alergijski i nealergijski čimbenici, pri čemu se u alergijske čimbenike ubrajaju alergeni iz zatvorenih prostora i vanjskog okoliša. U najčešće alergene zatvorenih prostora spadaju grinje, plijesan, dlaka mačke i psa, glodavci i žohari, dok u vanjske alergene spadaju pelud i okolišna plijesan. Jedan od glavnih nealergijskih okidača astme su virusne respiratorne infekcije, koje su uključene u većinu (>80%) egzacerbacija u djece, a u istu kategoriju spadaju i izloženost duhanskom dimu, zagađenje zraka, meterološke promjene, lijekovi te reakcije na hranu. Osim toga, u sve većem fokusu istraživanja uzročnika astme, osobito u pedijatrijskoj populaciji, su i prekomjerna težina te pretilost^{29,64}. Zbog svega navedenog, u dijagnosticiranju i liječenju astme sve je veći naglasak na važnosti analize svih potencijalnih čimbenika koji mogu pridonijeti razvoju i težini ove bolesti, pri čemu je kod simptomatskih pacijenata izuzetno važna osobna i obiteljska atopijska povijest bolesti (astma, alergijski rinitis, atopijski dermatitis), kao i edukacija o čimbenicima poput pretilosti, koja bi za bolje razumijevanje i individualno liječenje trebala postati dio rutine liječenja astmatskih pacijenata.

2.2. Pretilost

Uz astmu, kao jednu od najčešćih kroničnih bolesti kod djece, globalni rastući zdravstveni problem kod djece i adolescenta je pretilost, koja nastaje zbog prekomjernog nakupljanja tjelesne masti, kao posljedica neravnoteže između unosa i potrošnje energije ⁷. Pretilost u djetinjstvu povezuje se s povećanjem rizika za razvoj različitih poremećaja poput hipertenzije, dijabetesa, nealkoholne masne jetre, apneje u snu, policističnih jajnika i neredovitih menstruacija, mišićno-skeletnih i mentalnih bolesti te astme, za koju se pretilost u isto vrijeme smatra značajnim rizičnim faktorom, ali i modifikatorom bolesti ⁶⁵. Globalno se prevalencija pretilosti gotovo utrostručila od 1975. godine do 2016. godine. U zadnjih nekoliko godina je prekomjerna težina i pretilost zabilježena u preko 40 milijuna djece mlađe od 5 godina te oko 340 milijuna djece i adolescenata u dobi od 5 do 19 godina ^{66–68,65}, pri čemu se prevalencija za djevojčice povećala s 0.7% na 5.6%, a za dječake s 0.9% na 7.8% ⁶⁹. Unutar Europe, stopa pretilosti razlikuju se ovisno o geografskoj lokaciji, s najvišom zabilježenom prevalencijom u mediteranskim zemljama (24-37%) te značajno nižim stopama kod nacija atlantske i centralne Europe (14.21%) ⁷⁰.

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) objavila je 2022. godine rezultate petog kruga istraživanja Europske inicijative za praćenje debljine u djece – COSI (engl. *Childhood Obesity Surveillance Initiative*). Prikupljanje podataka provodilo se u razdoblju od 2018. do 2020. godine te su sudjelovale 33 zemlje Europske regije, a prema objavljenim rezultatima Hrvatska se nalazi na visokom petom mjestu s 35% djece u dobi od 8 do 8.9 godina s prekomjernom tjelesnom masom ⁷¹. Istraživanja provedena kod djece predškolske dobi također ukazuju na visoku stopu pretilosti, s 20.8% djece s prekomjernom težinom ili pretilošću, dok prevalencija pretilosti u srednjoškolskoj dobi do sada nije precizno dokumentirana ⁷⁰. Osim toga, Svjetski atlas debljine koji bilježi predviđanja stope rasta na globalnoj razini, objavio je predviđanja da će porast godišnje stope rasta debljine kod djece u razdoblju od 2020. do 2035. godine iznositi 4,8% (jako visoka stopa rasta), u usporedbi sa stopom kod odraslih koja će iznositi 2,0% (srednja stopa rasta) ⁷².

Pretilost se kod pacijenata najčešće definira pomoću vrijednosti indeksa tjelesne mase (ITM), matematičke formule, koja se zasniva na odnosu tjelesne težine i visine osobe (kg/m^2). ITM pokazuje visoku korelaciju s adipoznošću te viškom težine na razini populacije, ali ponekad može biti neprecizan, jer ne mjeri ukupnu tjelesnu adipoznost, ne razlikuje mast i mišiće te ne može predvidjeti distribuciju masti u tijelu ⁷³. Zbog navedenih razloga ITM može precijeniti adipoznost kod djece s povećanom mišićnom masom, što je vrlo čest slučaj kod

sportaša, a u isto vrijeme podcijeniti adipoznost kod djece s reduciranom mišićnom masom, uzrokovanom sjedilačkim načinom života. Kod adolescenata i djece se zbog toga za definiranje prekomjerne težine i pretilosti koriste percentilne krivulje. Djeca i adolescenti s ITM vrijednostima jednakim ili većim od 95-tog percentila, specifičnog za dob i spol, definiraju se kao pretila, dok se djeca i adolescenti s ITM vrijednostima jednakim ili većim od 85-tog percentila, ali manjim od 95-tog percentila definiraju kao ona s prekomjernom težinom te povećanim rizikom za razvoj pretilosti i povezane komorbiditete. Djeca s ITM vrijednostima iznad 99-tog percentila smatraju se ozbiljno pretilima ^{74,73,75}.

2.2.1. Uzroci i rizični faktori za razvoj pretilosti

Pretilost kod djece rezultat je kompleksne intrakcije između različitih nepromjenjivih (geni) i promjenjivih čimbenika (poput epigenetike, fizičke aktivnosti, prekomjernog unosa kalorija, intrauterinog okoliša, postnatalnog utjecaja, lijekova, socio-ekonomskog statusa te etničke pripadnosti). Genetika spada u rjeđe čimbenike koji uzrokuju pretilost, a s obzirom na genetsku predispoziciju definirana su tri tipa pretilosti: monogenetska, poligenetska te sindromska. Monogenetska pretilost rezultat je mutacije ili deficijencije jednog gena te se često povezuje s ranim razvojem pretilosti (u dobi od 3 do 5 godina), dok je poligenetska pretilost rezultat istodobne prisutnosti nekoliko varijanti gena, koji imaju akumulativni učinak. Sindromska pretilost povezuje se s drugim signalima razvojnog poremećaja, poput dismorfničkih značajki ili abnormalnosti organa ⁷⁶. Različita obiteljska istraživanja pokazala su da je jedan od važnijih prediktora pretilosti u djetinjstvu ITM roditelja, što bi potvrdilo važnost genske predispozicije, ali rijetki su poremećaji jednog gena koje se mogu povezati isključivo s pretilošću te su oni sami odgovorni za manje od 1% slučajeva ^{77,73}. Naime, objavljeni rezultati ističu kako će približno 80% djece s oba pretila roditelja također biti pretilo, dok ta vjerojatnost pada na 10% ukoliko se radi o jednom pretilom roditelju, ističući kako je pretilost kod ljudi većinom uvjetovana poligenetskim nasljeđivanjem ⁷⁸.

Uzimajući u obzir promjenjive faktore, definirano je nekoliko kritičnih faza razvoja, a vjeruje se kako je rana faza tijekom intrauterinog perioda kritično razdoblje za razvoj pretilosti u djetinjstvu ^{79,74}. Naime, čimbenici prisutni tijekom intrauterinog rasta mogu imati značajnu ulogu u razvoju prekomjerne težine, modificirajući neuroendokrine mehanizme kontrole apetita te funkcionalne sposobnosti gušterače, pri čemu prenatalna izloženost određenim čimbenicima poput dobivene prekomjerne težine u trudnoći, gestacijskog dijabetesa ili pušenja, može imati značajnu ulogu ^{79,74}. Reilly i sur. potvrdili su snažnu povezanost između porođajne težine i

dostignute ITM vrijednosti u kasnijem životu, a rezultati njihove longitudinalne studije pokazale su kako je povećana porođajna težina neovisno i linearno povezana s povećanjem prevalencije pretilosti u dječjoj dobi ⁸⁰. U skladu s time sve se više promovira zdravi životni stil tijekom trudnoće, prevenirajući prekomjernu težinu koja može dovesti do više porođajne težine i utjecati na razvoj prekomjerne težine i pretilosti kod djece.

Osim toga, veliku ulogu u porastu broja slučajeva pretilosti diljem svijeta imaju i individualni obrasci ponašanja te životni stil, a za bolje razumijevanje pretilosti u djetinjstvu potrebno je razmotriti i biološke i socijalne čimbenike na nekoliko razina, individualnoj, obiteljskoj te razini zajednice ⁸¹. Smanjena fizička aktivnost i kvaliteta sna, prekomjerna izloženost ekranima te prehrambene navike, samo su neki od čimbenika koji se povezuju s pretilošću i današnjim sjedilačkim načinom života. Istraživanje prehrambenih navika osoba s pretilošću pokazalo je kako je konzumacija brze hrane i zaslađenih pića direktno povezana s njenim razvojem u djetinjstvu, što je u skladu s podacima kako je takva prehrana povećana tri puta u zadnja dva desetljeća, kao i prevalencija pretilosti ⁷⁷. Individualni obrasci prehrane poput broja i trajanja obroka, također se povezuju s prekomjernom težinom i pretilošću, a Lee i sur. u svojem su istraživanju zabilježili kako je konzumacija hrane pri izostanku gladi značajno povezana s pretilošću. Naime, takav tip prehrambenih obrazaca kao odgovor na samu dostupnost hrane ili emotivno stanje pojedinca često dovodi do dobivanja na težini i prejedanja ⁷⁷.

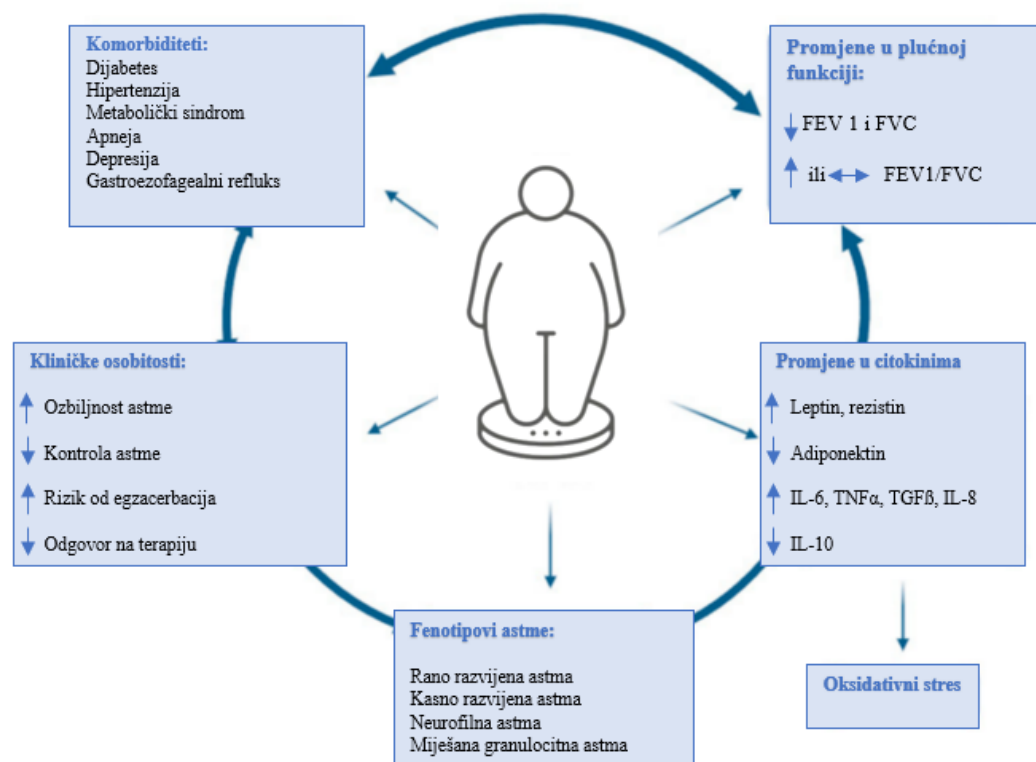
Osim navedenih, najčešćih čimbenika, prevalencija pretilosti povezuje se i sa izraženim socijalnim nejednakostima, a smatra se kako su niži socioekonomski status i suboptimalna kognitivna stimulacija direktno povezane s njenim razvojem. Naime, djeca i adolescenti nižeg socioekonomskog statusa često konzumiraju manje količine zdravijih namirnica poput voća i povrća te veće količine zasićenih masti. Također, zabilježene su jasne regionalne razlike, gdje u zemljama s nižim i srednjih dohotkom veći rizik od prekomjerne težine imaju djeca višeg socioekonomskog statusa, dok su u zemljama s visokim dohotkom u većem riziku djeca nižeg socioekonomskog statusa ⁶⁹.

Postojanje većeg broja čimbenika koji utječu na razvoj pretilosti te globalni porast broja djece s prekomjernom težinom, ističu kako se navedeni čimbenici ne mogu analizirati izolirano, nego kao dio njihove kompleksne interakcije. Okolišna, epidemiološka i nasljedna izloženost pojedinaca potencijalno ima jednaku važnost u razvoju pretilosti, a samo bolje razumijevanje svih prenatalnih i postanatalnih faktora, genetskih varijanti te stila života mogu pridonijeti prevenciji od najranije dobe.

2.2.2. Interakcija pretilosti i astme

Pretilost u pedijatrijskoj populaciji povezuje se s nekoliko različitih bolesti, a njena prisutnost u adolescentnoj i odrasloj dobi vodi k brojnim komplikacijama tijekom života. Astma i pretilost predstavljaju dvije od najčešćih kroničnih bolesti kod djece, a zbog istodobnog povećanja u prevalenciji oba poremećaja, sve je veći broj studija koji se bave njihovom uzročno-posljedičnom vezom i interakcijom^{82–85}. Nekoliko studija objavilo je kako je pretilost u djetinjstvu povezana s pojavom i težinom astme^{86–89}, ali je istodobno sve veći broj istraživanja koji podržavaju hipotezu kako astma u djetinjstvu može dovesti do ubrzanog dobivanja na težini te posljedičnog razvoja pretilosti^{90–92}. Naime, nekoliko rizičnih čimbenika koji pridonose razvoju pretilosti češći su kod astmatičara, uključujući smanjenu fizičku aktivnost te potencijalne nuspojave pojačanog apetita koje se javljaju tijekom uzimanja kortikosteroida, a s druge strane pretilost može uzrokovati upalne procese koji mogu utjecati na respiratorni sustav i razvoj astme^{91,90,93}.

Iako mehanizmi koji povezuju pretilost sa ekspresijom astme nisu do kraja objašnjeni, čini se kako adipozno tkivo ima značajnu ulogu kod astme povezane s pretilošću u djetinjstvu (Slika 2).



Slika 2. Utjecaj pretilosti na razvoj i težinu astme (preuzeto i prilagođeno iz Olejnik i Kuznarr-Kaminska⁹⁴).

Naime, adipozno tkivo predstavlja aktivan endokrini organ koji proizvodi citokine i hormone te regulira metabolizam i imunološki odgovor. Kod osoba s optimalnom tjelesnom težinom, adipozno tkivo izlučuje niže razine proupalnih citokina (poput TNF α i NF-kB) i adipokina leptina i rezistina te proizvodi veće količine protuupalnog adipokina adiponektina⁴⁻⁶. Suprotno, kod osoba s pretilošću, adipozno tkivo postaje infiltrirano s proupalnim makrofagima, koji zajedno s adipocitima proizvode veće količine proupalnih citokina i adipokina, a razine adiponektina su snižene, što je dovelo do pretpostavki da proupalni adipokini u pretilosti mogu povećati upalu u dišnim putevima⁸. Također, rezultati dosadašnjih studija su pokazale kako pretilost potencijalno može imati i učinak na plućnu fiziologiju i mehaniku disanja, uključujući restriktivne smetnje disanja zbog većeg adipoznog tkiva oko prsnog koša i povećanog abdomena što smanjuje kapacitet pluća^{25,3}. Istodobno, astma može pridonijeti pretilosti kod djece zbog nemogućnosti fizičke aktivnosti bez razvijanja kratkoće daha, čime je kod takvih pacijenata mogućnost trošenja kalorija te redukcija prekomjerne težine smanjena.

Dosadašnje studije predlažu postojanje bar dva fenotipa astme kod djece s pretilošću; prvi u kojem pretilost mijenja rani razvoj alergijske astme te drugi u kojem dolazi do razvoja fenotipa astme s kasnijim početkom^{95,96,2}. Rano razvijena alergijska astma karakterizirana je upalom vođenom Th2 limfocitima te povišenim citokinima (IL-4, IL-5), koji potiču eozinofiliju dišnih putova. Osim toga povišene su razine IL-13 koji vodi do mukuzne hiper-sekrecije, što zajedno s citokinima adipoznog tkiva (plazminogen aktivator inhibitor-1, IL-6, IL-8, monocitni kemotaktični faktor-1) te adipokinima štetno utječe na dišne putove. Točna uloga navedenih čimbenika u patogenezi alergijskih bolesti još uvijek nije do kraja razjašnjena, ali nekoliko je studija pokazalo potencijalnu značajnu ulogu adiponektina^{2,8,95}. Drugi fenotip povezuje pretilost s kasnijim razvojem astme. Ovaj neatopijski oblik astme je slabije definiran, ali čini se kako ga karakterizira niža razina eozinofne upale u dišnim putovima i Th2 upale te smanjene reaktivnosti dišnih putova, koja se poboljšava gubitkom tjelesne težine^{8,2,95}. Unatoč nastojanjima da se pretilost kombinirana s astmom uvrsti u jedan od ova dva izdvojena fenotipa, velik je broj ranije opisanih fenotipova astme u bolesnika s optimalnom tjelesnom masom, a koje pretilost također može značajno zakomplicirati.

Pretilost u pedijatrijskoj populaciji može imati značajne učinke na plućnu funkciju, ali istraživanja dosadašnjih studija pokazuju konfliktne rezultate. Naime, dio znanstvenika potvrdilo je povećan rizik za razvoj bronhijalne hiperreaktivnosti, dok ostali navode smanjen rizik te manje obstrukcije protoka zraka kod pretilih pojedinaca^{97,98}. Osim toga, objavljeni podaci o utjecaju povišenog ITM na plućnu funkciju često ukazuju na jasne razlike između

odraslih osoba i djece, pri čemu kod djece nema jasno izraženog pada u FEV1 i FVC. Naime, čini se kako su kod pretilih djece, unatoč postojanju pada u rezidualnom volumenu i funkcionalnom rezidualnom kapacitetu kao kod odraslih, najznačajnija karakteristika povišene i normalne vrijednosti FEV1 i FVC, kao i neproporcionalno povećanje FVC u odnosu na FEV1, zbog čega dolazi do smanjivanja omjera FEV1/FVC^{99,100,82,101,93}. Uzrok navedene razlike vrlo je vjerojatno takozvana disanapsa kod pretilih djece, gdje prekomjerna težina utječe na nejednak rast plućnog parenhima i kalibra dišnih putova, zbog čega FEV1/FVC omjer pada unatoč normalnim vrijednostima FEV1 i FVC-a^{93,67}.

Značajan učinak na međudjelovanje pretilosti i plućne funkcije pronađen je vezano za spol i dob. Naime, rezultati analiza utjecaja spola također su oprečni, prikazujući kako je povećan rizik od utjecaja prekomjerne težine na plućnu funkciju u nekim istraživanjima zabilježen češće kod dječaka, dok je u nekim istraživanjima utjecaj bio dominantniji kod djevojčica^{102,103,99}. Također, istraživanja dobi kao kritičnog čimbenika pokazuju kako se veća porođajna težina i dobivanje na težini u dojenačkoj dobi vežu uz viši izmjereni FEV1 i FVC te niži omjer FEV1/FVC u djece školske dobi¹⁰³, dok se pretilost razvijena kasnije povezuje sa značajnim sniženjem FEV1 i FEV1/FVC omjerom, bez značajnih povezanosti s FVC-om¹⁰⁴.

Uz navedene faktore, brojne studije o povezanosti koncentracija vitamina D te pretilosti i astme predložile su potencijalno postojanje direktne veze, što djecu koja pate od oba stanja čini posebno rizičnom skupinom za niske razine ovog vitamina^{25,105,106}. Ipak, objavljeni rezultati i dalje su konfliktni. Naime, dosadašnja istraživanja pokazala su kako bi vitamin D mogao imati protuupalno djelovanje i pozitivno utjecati na funkcioniranje imunološkog sustava, uz reduciranje otpornosti na steroide i remodeliranje dišnih putova u astmi^{107–109}, ali su istovremeno objavljene i brojne studije koje nisu pronašle značajne razlike u njegovoj razini kod pojedinaca s i bez astme^{110–112}. Slično, neka istraživanja povezala su niske razine vitamina D s višim ITM vrijednostima i razvojem pretilosti^{105,113,114,23}, dok druge studije nisu uspjele dokazati njegovu značajnu povezanost s prekomjernom težinom^{105,115}.

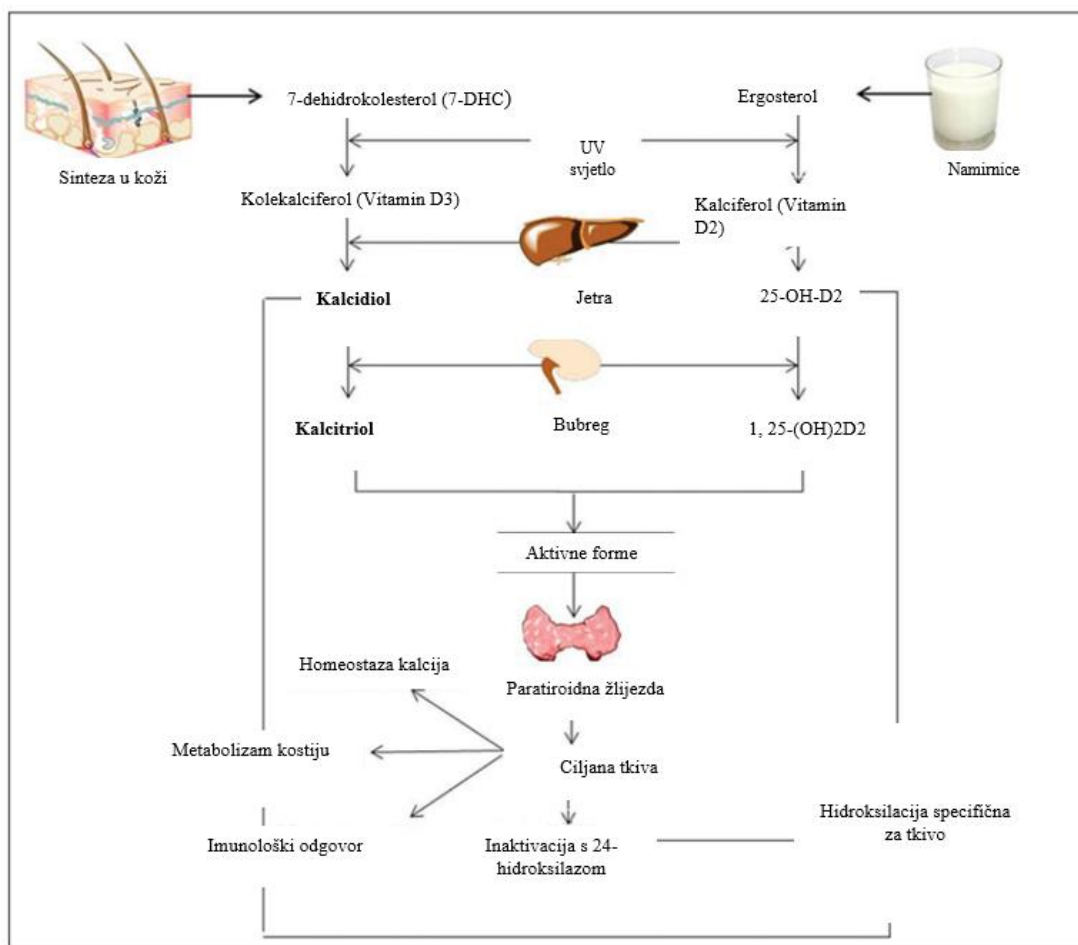
Unatoč nekonzistentnim rezultatima o benefitu suplementacije vitaminom D u različitim bolestima, brojni kliničari smatraju kako je potencijal dodatka ovog vitamina kao protuupalnog agensa izrazito velik, osobito u ranom djetinjstvu. Rezultati istraživanja, poput ovog, fokusiranih na djecu i adolescente s prekomjernom težinom i astmom bi time mogao imati veliki značaj za plan suplementacije vitaminom D kod različitih komorbiditeta povezanih s pretilošću.

2.3. Vitamin D

Vitamin D jedan je od vitamina topivih u mastima, a njegov utjecaj u tijelu sve je više u fokusu različitih istraživačkih i kliničkih skupina. Naime, spoznaja da se receptor vitamina D (engl. *Vitamin D Receptor*, VDR) nalazi i na stanicama izvan koštano-mišićnog sustava, dovela je do saznanja o tome kako vitamin D ne sudjeluje samo u regulaciji metabolizma kalcija i fosfata, nego utječe i na niz drugih procesa pa tako i na imunološki odgovor, zbog čega se njegova deficijencija kod odraslih i djece sve više povezuje s različitim bolestima poput reumatoidnog artritisa, dijabetesa, upalne bolesti crijeva i astme^{109,111}. Status vitamina D intenzivno je proučavan u različitim regijama i populacijama, uključujući različite etničke skupine, ali i dalje postoji mnogo različitih mišljenja o njegovim optimalnim koncentracijama i referentnim vrijednostima, osobito u pedijatrijskoj populaciji¹²⁻¹⁶.

Dva su glavna oblika vitamina D, ergokalciferol (vitamin D₂) te kolekalciferol (vitamin D₃). Vitamin D₃ sintetizira se u većoj mjeri tijekom izlaganja kože sunčevom zračenju, a manje količine vitamina D mogu se osigurati i hranom iz životinjskih (vitamin D₃) ili biljnih izvora (vitamin D₂). Obje forme vitamina D dalje se metaboliziraju pomoću istih enzima te formiraju slične metabolite^{116,117}. Pod utjecajem UV-B zraka iz 7-dehidrokolesterola nastaje previtamin D₃, koji pri uvjetima tjelesne temperature izomerizira u vitamin D₃. Nakon što vitamin D dođe u cirkulaciju, veže se na vitamin D vežući protein (engl. *Vitamin D Binding Protein*, VDBP) te se transportira do jetre, gdje započinje njegov metabolizam (Slika 3).

U jetri mitohondrijski enzim 25-hidoksilaza pokreće hidroksilaciju, pri čemu se formira 25-hidroksikolekalcitriol D (25(OH)D₃, kalcidiol), glavni cirkulirajući oblik vitamina D. Sintetizirani 25(OH)D₃ izlučuje se u krv te je potrebna hidroksilacija u bubrezima kako bi se, pod utjecajem enzima 1 α -hidroksilaze, formirao aktivan oblik 1,25-dihidroksivitamin D (1,25(OH)₂D₃, kalcitriol), koji se veže za nuklearni receptor vitamina D te je odgovoran za većinu bioloških učinaka vitamina D. Prosječni životni vijek kalcidiola (25(OH)D₃) je oko tri tjedna, zbog čega su njegove razine u serumu jasan pokazatelj statusa vitamina D u tijelu te se koriste tijekom definiranja deficijencije vitamina D^{118,119}.



Slika 3. Sinteza i metabolizam vitamina D (preuzeto i prilagođeno iz Sheetu i sur., 2018. ¹²⁰).

Kalcitriol pokreće vlastito uništavanje stimuliranjem 24-hidroksilaze, koja je također odgovorna i za degradaciju njegovog prekursora 25(OH)D3. Hidroksilacija je praćena s nekoliko reakcija oksidacije, uz koje ponekad dolazi i do konjugacije s glukuronskom kiselinom, pri čemu se formiraju brojni spojevi koji se izlučuju putem žuči. Izlučivanje preko bubrega je najčešće vrlo nisko (<5%), a kompleks VDBP-vitamin D može se filtrirati u glomerulu i specifično ponovno preuzeti u procesu posredovanim VDBP specifičnim receptorskim sustavom ¹¹⁹. Regulacija kalcitriola ovisi o ravnoteži između aktivnosti 1 α -hidroksilaze i 24-hidroksilaze, a oba enzima regulirana su serumskim kalcijem, kalcitriolom i razinama fosfata. Naime, u uvjetima kada su u serumu razine kalcija niske ili je niska razina vitamina D, paratiroidni hormon (engl. *Parathyroid Hormone*, PHT) izlučen od strane paratiroidne žlijezde stimulira sintezu 1 α -hidroksilaze, što rezultira povećanjem 1,25(OH)₂D aktivacije. Također, PHT može inducirati sintezu fibroblastnog faktora rasta 23 u osteocitima, koji utječe na homeostazu vitamina D suprimirajući bubrežnu ekspresiju 1 α -hidroksilaze te inducirajući 24-hidroksilazu, čime se posljedično reducira i razina kalcitriola u serumu ¹¹⁹.

U Hrvatskoj je većina dosadašnjih studija o nedostatku vitamina D obuhvaćala odraslu populaciju te su tako 2016. godine objavljene smjernice za detekciju, terapiju te prevenciju njegovog nedostatka kod odraslih ¹²¹, dok je za pedijatrijsku populaciju, a osobito zdravu djecu, jako malo dostupnih informacija i pravih smjernica. Naime, u većem broju studija diljem svijeta zabilježena je različita prevalencija manjka i nedostatka vitamina D upravo među zdravom djecom, što se povezuje s različitim etničkim populacijama, bojom kože, zagađenjem zraka, izloženosti suncu, prehrambenim navikama te suplementacijom vitaminom D, kao i metodama detekcije vitamina D ^{15,13,16–21}.

Podaci za Europsku uniju varijabilne su kvalitete, što dodatno otežava predviđanja prevalencije deficijencije vitamina D između različitih zemalja. Primjerice, Hilger i sur. u svom su radu objavili značajnu varijabilnost u srednjim vrijednostima koncentracije serumskog 25(OH)D među europskim zemljama, ali i unutar jedne zemlje, s razlikom od 10 do 300%, pri čemu se odabir analitičke metode smatra najvećim potencijalnim čimbenikom utjecaja na rezultate ¹²². Unatoč nedostatku globalnog konsenzusa o koncentraciji 25(OH)D koja definira deficijenciju, univerzalni dogovor je kako se koncentracija niža od otprilike 20 µg/L smatra manjkom. U skladu s time, program za standardizaciju vitamina D razvio je protokole za standardizaciju mjerenja 25(OH)D diljem svijeta ¹²³. Njihovo istraživanje ukazalo je na važnost odabira metoda detekcije, što su potvrdili usporedbom rezultata imunoesejskog određivanja vitamina D i kromatografije, pri čemu je rezultat od 6.5% godišnje prevalencije deficijencije vitamina D u odrasloj irskoj populaciji porastao na 11.2% zamjenom imunoesejske metode kromatografijom. U skladu s time, Cashman i sur. proveli su 2016. godine istraživanje procjene prevalencije deficijencije vitamina D bazirano na standardiziranim podacima serumskog 25(OH)D te su potvrdili raširenost deficijencije vitamina D diljem Europe, s prevalencijom koja zadovoljava kriterije pandemije ¹²⁴. Iako su unutar istraživanja postojale varijacije ovisno o dobi i etničkoj pripadnosti, oko 13% kombiniranih uzoraka različitih dobnih skupina (djeca, adolescenti, odrasli i stariji) diljem Europe imalo je deficijenciju u vrijeme uzorkovanja, što ako se prevede na 13 od 100 građana Europe, ističe sve veću potrebu za razvojem ciljanih strategija prevencije.

Zbog sve većeg broja djece s manjkom vitamina D čak i kod zdrave djece, velik broj internacionalnih smjernica preporučuje dodatak vitamina D tijekom prve godine djetetovog života, ali je nedostatak ujednačenosti među zemljama i dalje velik. Primjerice, dok Američka akademija za pedijatriju preporučuje dnevni unos vitamina za svu novorođenčad, djecu i adolescente, u Indiji i ostalim sjeveroistočnim azijskim zemljama nema jasno definiranih smjernica o rutinskoj primjeni vitamina D ^{125,17}. Važeće nacionalne smjernice u Hrvatskoj

vezane za unos vitamina D, objavljene na stranicama Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, preporučuju primjenu 400 IJ (10 µg) vitamina D dnevno za svu novorođenčad tijekom prve godine života, što je u skladu s američkim smjernicama ¹²⁶. Ipak, potreba za daljnjim studijama među djecom i adolescentima na području Hrvatske sve je izraženija, osobito u ranjivim skupinama djece poput pretilih astmatičara, gdje bi suplementacija vitaminom D potencijalno mogla imati veće blagotvorne učinke.

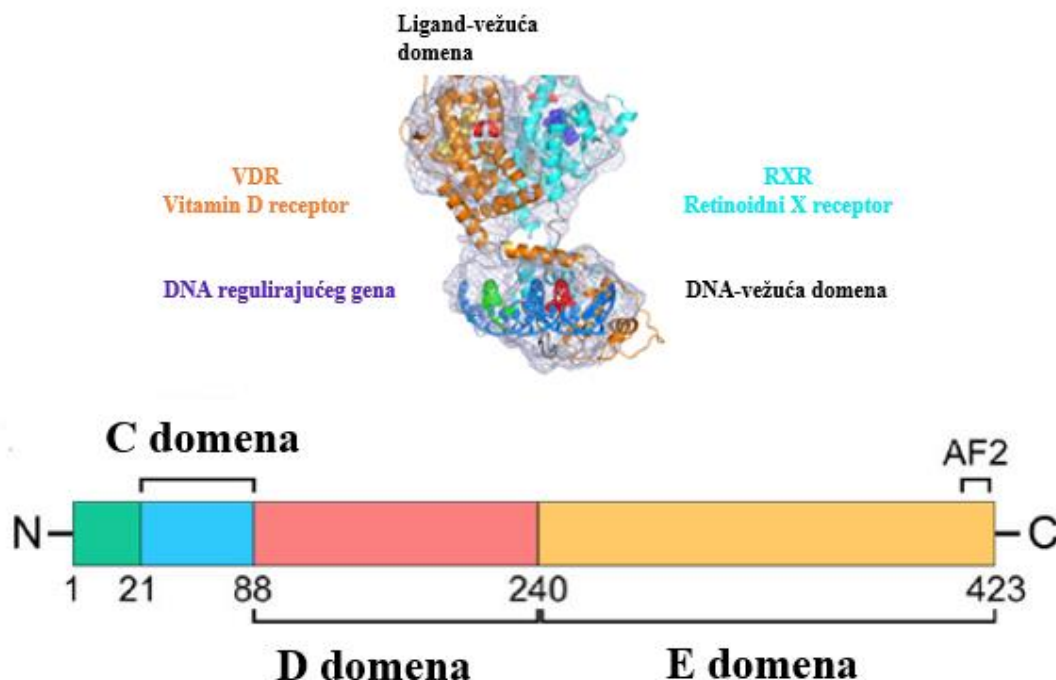
2.3.1. Receptor vitamina D

Biološka aktivnost 1,25(OH)₂D₃ (kalcitriola) inicirana je kroz precizne promjene u genskoj ekspresiji, koje su posredovane receptorom vitamina D. Ovaj receptor otkriven 1969. godine, pripada superporodici nuklearnih receptora te djeluje kao faktor transkripcije induciran ligandom. Navedenu superporodicu čini više od 60 nuklearnih receptora na koje se vežu lipofilni ligandi poput steroidnih/tiroidnih hormona, vitamin A i vitamin D ^{127–130}. Nuklearni receptori u većini slučajeva reguliraju transkripciju direktnim vezanjem na specifične elemente odgovora, monomere, homo- ili heterodimere, ali također mogu imati indirektni utjecaj na transkripciju putem drugih DNA-vežućih transkripcijskih faktora ¹³¹.

VDR je inicijalno otkriven u tkivima koja su uključena u regulaciju kalcija i homeostaze fosfata, primarno kostima, bubrezima, crijevima i paratiroidnoj žlijezdi, gdje je i najveća razina VDR ekspresije. Ipak, s godinama je postalo jasno kako je njegova ekspresija prisutna i u drugim tkivima te kako se njegova aktivnost ne veže samo uz regulaciju minerala. Danas je poznato kako je VDR eksprimiran i u stanicama koje nemaju ulogu u regulaciji kalcija, uključujući kožne fibroblaste i keratinocyte, imunološke stanice, kardiovaskularne stanice te stanične komponente mnogih drugih tkiva ^{128,132}. Aktivacija VDR-a potiče brzo vezanje ovog receptora na regulacijske regije ciljanih gena te djeluje na formiranje proteinskih kompleksa čije su aktivnosti ključne za transkripcijske promjene, što posljedično dovodi do ekspresije ciljanih gena i određenih bioloških odgovora specifičnih za tkivo ¹³³.

Strukturno VDR čine četiri glavne funkcionalne domene: visoko varijabilna A/B domena locirana na N-kraju, DNA-vežuća domena (C domena, engl. *DNA Binding Domain*, DBD), ligand-vežuća domena (domena E, engl. *Ligand Binding Domain*, LBD) te konekcijska domena (domena D) koja povezuje C i E domenu (Slika 4) ^{134,135}. Ligand vežuća domena aktivno prepoznaje ligand te ima važnu ulogu u vezanju liganda, dimerizaciji, nuklearnoj lokalizaciji te interakciji s koaktivatorskim i korepresorskim proteinima, a u slučaju VDR-a,

njena primarna funkcija je učinkovito prepoznavanje različitih liganda, kao što je kalcitriol i njegovi metaboliti ^{134,135}.



Slika 4. Struktura receptora vitamina D (preuzeto i prilagođeno s <https://phys.org/news/2012-01-3d-visualization-vitamin-d-receptor.html>).

Poznato je da VDR stvara homodimere i heterodimere s tirodinim recptorom i receptorom retinočne kiseline, ali najjaču vezu stvara s jednim od tri retinoidna X receptora (engl. *Retinoid X Receptor*, RXR), α , β i γ ¹³¹. Kompleks biološki aktivnog metabolita vitamina D i VDB proteina djeluje vezanjem na receptor vitamina D, koji stvara heterodimer s RXR alfa (engl. *Retinoid X Receptor Alpha*, RXR α). Naime, vezanje vitamina D na VDR aktivira navedeni heterodimerni kompleks, što posljedično dovodi do prepoznavanja elemenata odgovora vitamina D tj. DNA sekvence pronađene u promotorskoj regiji gena reguliranih vitaminom D. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR-RXR kompleks potom migrira u nukleus, što rezultira transkripcijom mnogih gena uključenih u učinke vitamina D, uključujući metabolizam fosfora i kalcija, proliferaciju stanica i kontrolu urođene i stečene imunosti ^{136,137}.

Selektivna okupiranost ligand-vežuće domene s $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (kalcitriolom) vodi do formiranja dvije neovisne površine interakcije proteina. Jedna koja olakšava interakciju s heterodimernim partnerom potrebnim za specifično vezanje DNA te jedna koja je bitna za regrutiranje velikih koregulatornih kompleksa potrebnih za modulaciju gena. Osim toga, dodatne studije pokazuju da VDR može biti post-translacijski modificiran kroz fosforilaciju, promjenom u proteinu koji je sposoban modulirati i fino podešavati njegovu transkripcijsku

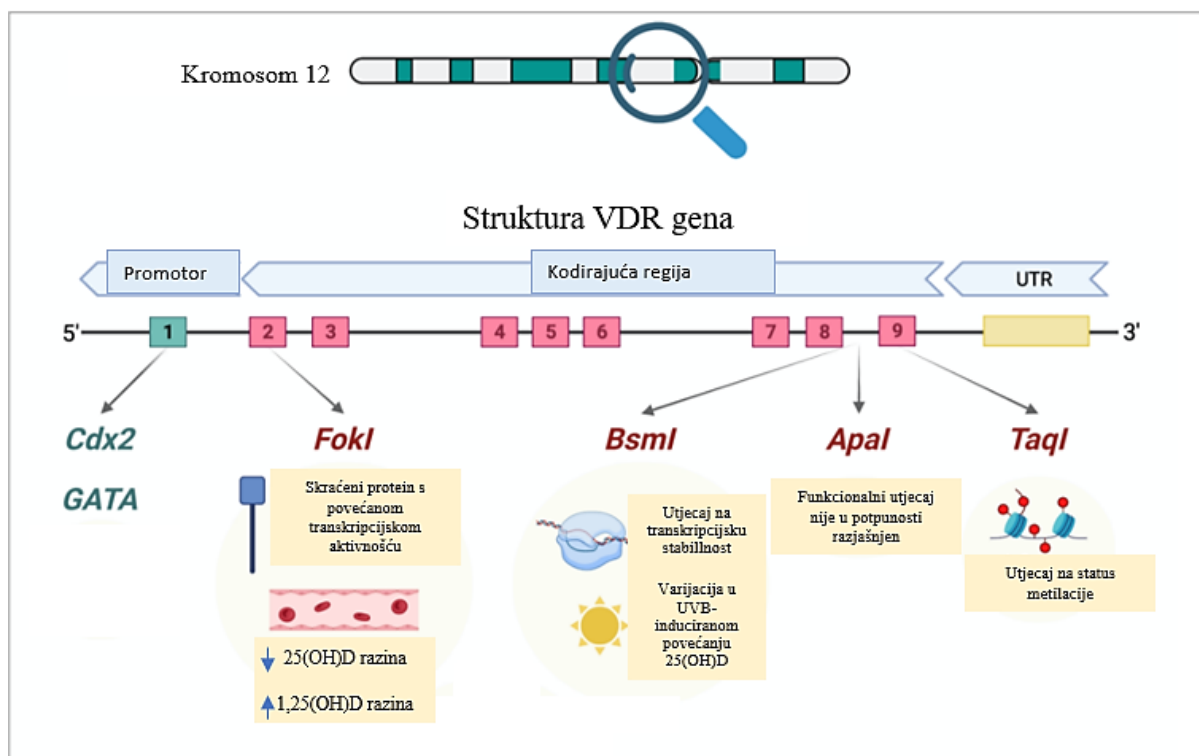
aktivnost. Konačno, domene unutar VDR-a stvaraju makromolekulu koja je receptivna za fiziološki relevantne razine cirkulirajućeg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ te je sposobna usmjeriti stanični regulatorni mehanizam k specifičnim podskupovima gena čiji su proteinski produkti ključni za odgovor $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^{133,128}.

Neke od prethodnih genskih studija potvrdile su kako bi genske promjene u VDR genu mogle dovesti do značajnih poremećaja u aktivaciji gena te tako utjecati na procese poput stanične proliferacije, diferencijacije i funkcioniranja imunološkog sustava ¹³⁸. Također, sve je više sumnje kako postoji veza između varijacije VDR gena i nekih bolesti, uključujući i astmu i pretilost, ali specifični mehanizmi moduliranja uloge vitamina D u patogenezi astme i ostalih stanja povezanih s polimorfizmima VDR-a i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni.

2.3.2. Polimorfizmi receptora vitamina D

Brojne su studije do sada identificirale različite genske mutacije i polimorfizme koje imaju utjecaj na gene uključene u aktivaciju i proizvodnju vitamina D, transport proteina te promjene koje djeluju na proteine sekundarno uključene u regulaciju ekspresije vitamina D. VDR gen, sačinjen od 8 kodirajućih sekvenci (introna) te 9 nekodirajućih sekvenci (egzona), lociran je na 12q13.11 kromosomu. Polimorfizmi ovog gena suptilne su i česte varijacije u sekvenci te mijenjaju funkciju vitamina D u različitom opsegu. Na primjer, promjene u regiji introna mogu utjecati na ekspresiju gena, stabilnost mRNA te učinkovitost translacije proteina, dok promjene u dijelu egzona mogu uzrokovati promjene u sekvenci proteina ¹³⁸. Prema dostupnim podacima do sada je identificiran set od 15,174 polimorfizama jednog nukleotida (engl. *Single-Nucleotide Polymorphisms*, SNP) VDR gena, većinom za intronske regije gena (14,426 SNP-ova) ¹³⁹. U najbolje proučene i okarakterizirane polimorfizme VDR-a spadaju *ApaI* (rs7975232), *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236) i *FokI* (rs2228570), a ime su dobili po odgovarajućem restriksijskom enzimu koji se koristi u analizama duljine restriksijskih fragmenata polimorfizama ^{140,137,139}.

Tri od navedenih polimorfizma (*ApaI*, *TaqI* i *BsmI*) locirani su na 3'-kraju VDR gena te uzrokuju tihe mutacije koje povećavaju stabilnost VDR mRNA i mogu modificirati ekspresiju VDR gena bez uzrokovanja strukturnih promjena proteina. S druge strane polimorfizam *FokI*, lociran na egzonu 2 (u start kodonu), rezultira proizvodnjom proteina kraćeg za tri aminokiseline (424 aminokiseline, umjesto 427), s povećanom transkripcijskom aktivnošću ^{141,137,142} (Slika 5).



Slika 5. Struktura VDR gena i polimorfizmi receptora vitamina D (preuzeto i prilagođeno iz Orces, 2019.¹¹⁴).

ApaI polimorfizam, čiji funkcionalni utjecaj još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, lociran je na intronu 8 te je karakteriziran transverzijijskom zamjenom nukleotida. Na istom intronu gena lociran je i polimorfizam *BsmI*, kojeg karakterizira tranzicijska zamjena nukleotida, a poznato je da utječe na stabilnost transkripcije te na varijaciju u povećanju UVB-induciranih 25(OH)D razina.

TaqI i *FokI* polimorfizam također su definirani tranzicijskom zamjenom nukleotida, pri čemu je *TaqI* lociran na egzonu 9 VDR gena u CpG otoku te utječe na status metilacije, dok se *FokI* polimorfizam često povezuje s nižim razinama serumskog 25(OH)D (posebno referentni alel F)^{143,142,137,144}.

Osim navedenih posljedica uzrokovanih gore opisanim genetičkim varijantama VDR-a, isti se polimorfizmi povezuju s različitim odgovorom osoba na dodatke vitamina D, a primjer polimorfizama povezanih s odgovorom na suplementaciju vitaminom D su *TaqI*, *FokI* i *BsmI*. Naime, nekoliko je studija demonstriralo kako polimorfizmi VDR gena mogu modificirati aktivnost ovog receptora, što bi objasnilo različit odgovor na suplemente, ali rezultati ovakvih studija još uvijek su kontradiktorni i zahtjevaju daljnju potvrdu^{145,146}.

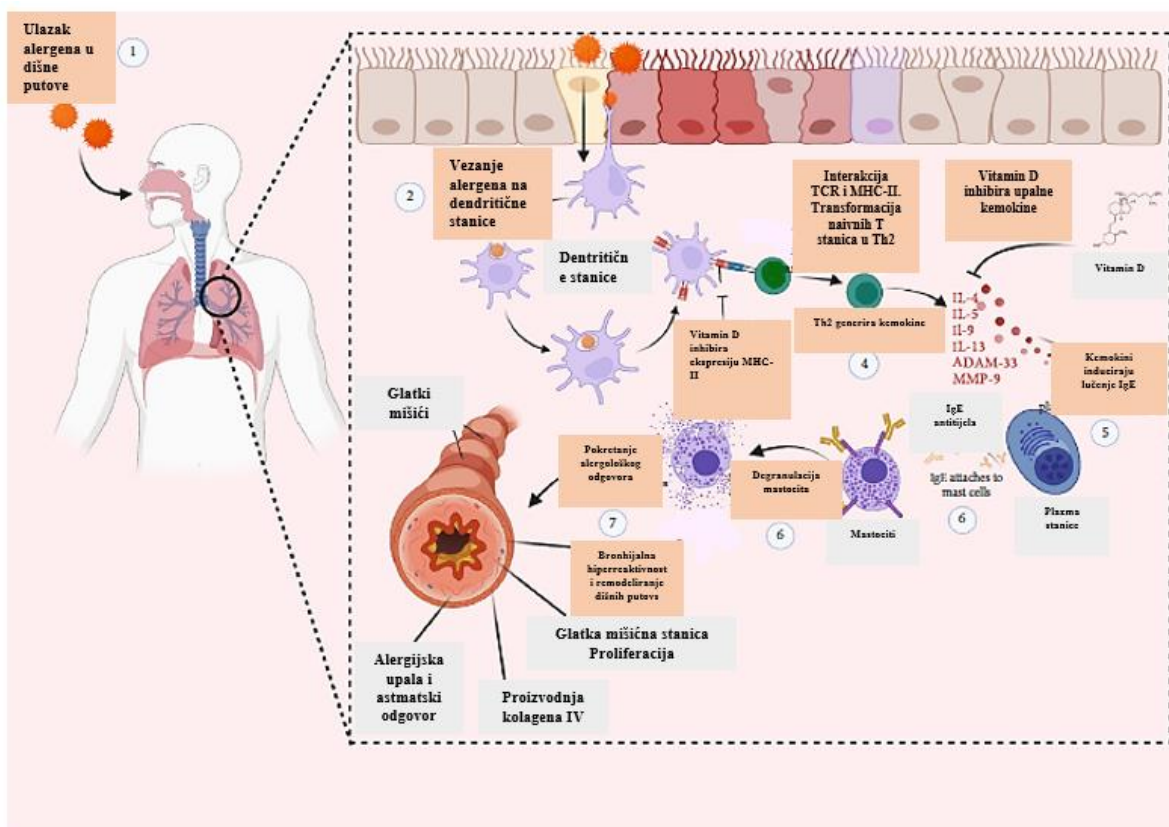
Regulacija VDR-a određena je okolišnim i genetičkim čimbenicima, a u glavne okolišne čimbenike spadaju prehrana, izloženost suncu, infekcije i onečišćivači. Smatra se kako bi navedeni okolišni čimbenici mogli modificirati razine vitamina D koje reguliraju receptor, a

ikao mehanizam nije poznati, pretpostavlja se kako bi se moglo raditi o epigenetskim mehanizmima. S druge strane, genetski faktori mogli bi modulirati utjecaj koji okolišni čimbenici imaju na VDR regulaciju, pri čemu bi polimorfizmi VDR gena potencijalno mogli modificirati njegovu aktivnost te mijenjati odgovor na suplementaciju vitaminom D na individualnoj razini ¹³⁷.

Također, jedan od glavnih razloga sve većeg interesa znanstvenika i liječnika za genetičke varijante VDR-a je i potencijalna predispozicija osoba s polimorfizmima VDR gena na različite kronične bolesti poput dijabetesa tipa 2, osteoporoze, karcinoma, reumatoidnog artritisa, autoimunih i kardiovaskularnih bolesti te astme ^{137,143,141}. Kontradiktorna opažanja zabilježena su i za suplementaciju vitaminom D te uzimanje vitamina D od strane trudnica, gdje još uvijek nema konzistentnih rezultata koji nedvojbeno potvrđuju značajan učinak na vrijeme razvoja ili morbiditet astme, kao ni na kontrolu astme, na upalu dišnih putova, simptome astme ili kvalitetu života bolesnika s astmom.

2.3.2.1. Povezanost vitamina D i astme

Brojne studije demonstrirale su učinak vitamina D na imunološki sustav i njegovu regulaciju, ali mehanizmi iza njegovog potencijalnog utjecaja na astmu te načini na koje nedostatak vitamina D može pridonijeti patogenezi ove bolesti još uvijek nisu potpuno jasni ^{147,148,140,139,149–152}. Tijekom prethodnih analiza bolesti posredovanih imunološkim sustavom, od posebne su se važnosti pokazali biološki učinci aktivne izoforme vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ^{136,140} (Slika 6). Naime, vezanje $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na VDR može potisnuti proliferaciju T stanica i utjecati na njihovo sazrijevanje, usmjeravajući T pomoćničke stanice iz Th1 u Th2 fenotip te povećati razinu T regulatornih stanica. Navedene promjene vode do povećane proizvodnje protuupalnih citokina (IL-4, IL-5, IL-10) te smanjenog izlučivanja upalnih citokina (IL-1, IL-12, IL-18, TNF- α i IFN- γ) ³⁷. Osim toga, vitamin D ima mogućnost smanjivanja ekspresije MHC klase II molekula i kostimulatornih molekula te inhibicije diferencijacije i sazrijevanja dendritičkih stanica, zadržavajući nezreli fenotip dendritičnih stanica, što uzrokuje toleranciju na antigen ¹⁵³.



Slika 6. Uloga vitamina D u imunološkim mehanizmima u pozadini astme (preuzeto iz Salmanopour i sur., 2022. ³⁷).

Upravo zbog navedenog pomaka ravnoteže prema Th2 staničnom odgovoru te ranije potvrđene povezanosti receptora vitamina D s bolestima posredovanim imunološkim sustavom (npr. dijabetes tipa 2, reumatoidni artritis, sindrom stečene imunodeficiencije, Chronova bolest), VDR je s vremenom postao jedan od glavnih fokusa istraživanja čimbenika regulacije atopije i astme. Također, sve je veći interes znanstvenika i kliničara za utjecaj polimorfizama VDR-a, umjesto razina cirkulirajućeg vitamina D, zbog čega se bilježi sve veći broj pokušaja utvrđivanja njihovog potencijala kao biomarkera za osjetljivost na razvoj astme ^{154,155}. Povezanost između genetičkih varijanti VDR-a i pedijatrijske astme proučavana je do sada u različitim etničkim skupinama, a rad Paramonove i sur. istaknuo je kako se zbog demografskih, evolucijskih i povijesnih faktora prevalencija specifičnih alela može znatno razlikovati, ističući važnost toga da bi se za bolje razumijevanje genetičke podloge astme, u budućim studijama trebala uzimati u obzir i različitost populacija ¹³⁹. Upravo zbog toga, postoji i velik broj objavljenih, kontradiktornih rezultata na različitim geografskim lokacijama, koji istovremeno potvrđuju, ali i demantiraju povezanost VDR receptora s razvojem i patogeneom astme, s posebnim fokusom na polimorfizme ApaI, FokI, BsmI i TaqI, a neki od njih prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Povezanost polimorfizama VDR gena s astmom u pedijatrijskoj populaciji.

VDR polimorfizam	Povezanost s astmom	Reference
<i>ApaI, TaqI, FokI</i>	Potvrđena povezanost polimorfizama TaqI i ApaI s osjetljivošću na astmu. Nema potvrđene povezanosti FokI polimorfizma i astme.	149
<i>ApaI, TaqI</i>	Potvrđena povezanost TaqI i ApaI polimorfizama s astmom.	154
<i>FokI, ApaI, BsmI, TaqI</i>	Polimorfizmi VDR gena usko su povezani s pojavom astme.	155
<i>ApaI</i>	ApaI polimorfizam VDR gena može pridonijeti osjetljivosti djece na astmu.	156
<i>FokI, ApaI, BsmI, TaqI</i>	Značajna povezanost ApaI polimorfizma i astme.	157
<i>FokI, ApaI, BsmI, TaqI</i>	Polimorfizam FokI štiti od astme, bez potvrđene povezanosti ostalih polimorfizama.	158
<i>FokI, BsmI</i>	FokI i BsmI polimorfizmi ne pridonose značajno razvoju astme.	159

Kontradiktorna opažanja zabilježena su i za suplementaciju vitaminom D te uzimanje vitamina D od strane trudnica, gdje još uvijek nema konzistentnih rezultata koji apsolutno potvrđuju značajan učinak na vrijeme razvoja ili morbiditet astme, kao ni na kontrolu astme, funkcioniranje i upalu dišnih putova, simptome ili kvalitetu života^{37,160–163}. Naime, poznato je da vitamin D ima pleiotropni učinak intrauterino, ali i postnatalno, osobito na razvoj pluća te imunološke funkcije povezane s astmom, što je utvrđeno u istraživanju Saadoon i sur. na mišjim modelima gdje je nedostatak vitamina D tijekom trudnoće doveo do poremećenog razvoja dišnih putova potomstva¹⁶⁴. U skladu s time, objavljena meta-analiza kojom se proučavalo prenatalno uzimanje vitamina potvrđuje značajno smanjivanje simptoma astme kod djece čije su majke uzimale vitamin D. Ipak, u istom radu se naglašava kako bi razina 25(OH)D u vrijeme regrutacije mogla biti važan modificirajući faktor¹⁶⁵. Kako bi istražili tu mogućnost, Wolsk i sur. proveli su kombiniranu analizu, uzimajući u obzir razine 25(OH)D majke u vrijeme ulaska u studiju. To je rezultiralo značajnim smanjivanjem rizika od astme te simptoma teškog disanja kod djece majki s 25(OH)D koncentracijom većom ili jednakom od 30 µg/L, ali istovremeno puno manji i neznatjan učinak među ženama s koncentracijom manjom od 30 µg/L¹⁶⁰, čime je opovrgnuta teza kako benefit od suplementacije vitaminom D imaju samo osobe s deficijencijom. Suprotno ovome, u istraživanju Litonjue i sur. suplementacija vitaminom D tijekom prenatalnog perioda nije spriječila razvoj astme ili simptome teškog disanja kod djece

kroz prvih 6 godina života¹⁶¹. Postojeći konfliktni rezultati različitih studija stoga upućuju na potrebu za dodatnim studijama, ne samo u pogledu povezanosti astme i nedostatka vitamina D, nego i potencijalnih pozitivnih učinaka njegove suplementacije u prenatalnom periodu kao vida prevencije.

2.3.2.2. Povezanost vitamina D i pretilosti

Patogeneza pretilosti kompleksna je i uključuje genetičke i okolišne faktore koji još uvijek nisu u potpunosti definirani. U tom se kontekstu vitamin D sve više spominje kao jedan od čimbenika sa značajnijom ulogom, što potvrđuju različiti epidemiološki, metabolički i genetički podaci¹⁶⁶. Pozadina povezanosti pretilosti i deficijencije vitamina D nije u potpunosti razjašnjena, ali pretpostavlja se kako postoji obostran utjecaj.

Vitamin D utječe na razvoj i funkcioniranje masnog tkiva, diferencijaciju te kataboličku i anaboličku aktivnost adipocita, upalu adipoznog tkiva i otpuštanje citokina, oksidativni stres te ekspresiju miRNA u adipoznom tkivu, dok njegova deficijencija pridonosi akumulaciji masti suprimiranjem određenih enzima u diferencijaciji adipoznog tkiva (lipoprotein lipaza, sintaza masnih kiselina)^{167,168}. Osim toga, vitamin D ima važnu ulogu u moduliranju imunološkog odgovora i upale u adipoznom tkivu, inhibirajući proupalne citokine (TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12) te regulacijom diferencijacije, infiltracije i transformacije makrofaga te inhibicijom proliferacije limfocita. Nadalje, modulatorni učinak vitamina D vidljiv je i kroz njegov utjecaj na gušteraču, djelujući na sintezu i izlučivanje inzulina te mijenjajući inzulinsku osjetljivost stimulacijom ekspresije gena zaduženih za osjetljivost na inzulin te povećanjem aktivnosti gena receptora inzulina te ukupnog broja inzulinskih receptora¹⁶⁸.

S druge strane, pretilost također utječe na vitamin D, uzrokujući njegovu deficijenciju kod pretilih osoba. Naime, sekvestracija vitamina D u masnom tkivu može dovesti do njegove smanjene bioraspoloživosti te onemogućenog oslobađanja u dovoljnoj količini, a ovu teoriju dodatno potvrđuje negativna korelacija između serumskog vitamina D i gubitka težine nakon operativnih zahvata kod pretilih pacijenata^{169,167,170}. U radu Lagunova i sur. pojašnjeno je i kako osobe s višim ITM vrijednostima često imaju visoku količinu tjelesne masti, koja djeluje kao rezeorvar za vitamin D, a istovremeno je njegovo otpuštanje značajno sporije. Svrha ovoga je zaštita tijela od toksičnih učinaka aktivnih formi vitamina D te zadržavanje optimalne koncentracije u krvi, ali višak masti uzrokuje izraženiju sekvestraciju i nisku dostupnost te niske razine serumskog 25(OH)D¹⁷⁰. Istovremeno, adipoznost (postotak tjelesne masti) je snažnije povezana s razinama serumskog 25(OH)D nego što su to ITM i tjelesna težina, što pojašnjava

činjenica da ITM i tjelesna težina ne reflektiraju nužno postotak tjelesne masti, zbog čega je u procjeni pretilih pacijenata uvijek potrebna detaljna, personalizirana obrada i precizna interpretacija ¹⁷⁰.

Vitamin D aktivan je u masnom tkivu te njegovo vezanje na VDR uzrokuje različite biološke funkcije s ključnom ulogom u regulaciji ekspresije gena, dok je njegova funkcija u metabolizmu adipocita i pretilosti i dalje nejasna ¹⁷¹. Ranije studije su pokazale kako je pretilost često kakarakterizirana istodobnom deficijencijom vitamina D i pojačanom ekspresijom VDR-a u subkutanom adipoznom tkivu, a polimorfizmi VDR-a mogu utjecati na izlučivanje inzulina, uzrokovati inzulinsku rezistenciju te pridonijeti pretjeranom taloženju masnog tkiva ^{172,173}. Osim toga, vitamin D putem svog receptora utječe na metabolizam jetrenih enzima, promiče apsorpciju kalcija u crijevima te može uzrokovati vezanje kalcija na masne kiseline i dovesti do formiranja netopivih kompleksa koji inhibiraju apsorpciju lipida ¹⁷⁴. Polimorfizmi VDR-a ranije su povezivani s mjerenjem adipoznosti i inzulinskom rezistencijom, ali i dalje je jako puno nesukladnosti u rezultatima o povezanosti između navedenih genetičkih varijanti i pretilosti te prekomjerne težine, osobito u pedijatrijskoj populaciji. Naime, dok su neke studije objavile kako postoji povezanost između ApaI, TaqI, BsmI i FokI polimorfizma s adipoznošću, druge istraživačke grupe nisu potvrdile vezu ovih genetičkih varijanti i prekomjerne težine ili pretilosti (Tablica 3). Potencijalni razlog iza ovih konfliktnih rezultata je što je većina studija određivala adipoznost baziranu samo na ITM vrijednostima te u mjerenja nije uključeno preciznije određivanje kompozicije tijela, poput mjerenja visceralne masti i ukupne težine tijela bez masti.

Tablica 3. Povezanost genetičkih varijanti VDR receptora s prekomjernom težinom i pretilošću u pedijatrijskoj populaciji.

VDR polimorfizam	Povezanost s pretilošću	Reference
<i>FokI</i>	Povezanost s povišenim cirkulirajućim masnim kiselinama i indeksom inzulinske rezistencije masnog tkiva.	175
<i>FokI, ApaI, BsmI, TaqI</i>	Nema povezanosti između pretilosti i srodnih patologija.	176
<i>FokI, ApaI, BsmI, TaqI</i>	Genetska varijabilnost VDR-a je potencijalno važan čimbenik, s utjecajem na antropometrijske karakteristike povezane s pretilošću.	177
<i>BsmI</i>	Značajan učinak na razvoj pretilosti i metaboličkog sindroma.	178
<i>FokI, TaqI</i>	Alel T za <i>TaqI</i> može imati zaštitni učinak. Alel F za <i>FokI</i> je potencijalni faktor rizika za razvoj pretilosti.	179
<i>TaqI, ApaI, BsmI</i>	Nema povezanosti za antropometrijske mjere. Potencijalna povezanost varijanti VDR-a sa serumskim adipokinima te s više metabolički aktivnim mastima.	180
<i>TaqI, BsmI</i>	Uloga u pretilosti povezana sa stupnjem upale, kao posljedica promjene propusnosti crijeva i mikrobne translokacije.	166
<i>BsmI</i>	Nema značajnih razlike među genotipovima za parametre pretilosti.	181
<i>BsmI</i>	Veća učestalost genotipa Bb kod pretilosti, bez statističke značajnosti.	182

Postoje različita mišljenja o suplementaciji vitaminom D te dozi koja bi bila učinkovita kod osoba s prekomjernom težinom. Primjerice Xenos i sur. objavili su, kako je dodatak vitamina D u spreju u trajanju od 3 mjeseca, zajedno s propisanom dijetom dovelo do povećanja razina 25(OH)D te pridonijelo većoj redukciji tjelesne težine, ITM-a i postotka masti te kako bi genetički polimorfizmi VDR-a mogli imati utjecaj na odgovor na suplementaciju vitamina D te markere pretilosti ¹⁸³. Ipak, doza i trajanje suplementacije i dalje nisu u potpunosti potvrđene. Naime, unatoč postojanju smjernica o primjeni 400 IJ vitamina D dnevno za svu

novorođenčad tijekom prve godine života, još uvijek nije jasno da li je ova ili veća doza potrebna kako bi se osigurao njegov ekstraskeletni blagotvorni učinak. Osim toga, nepoznata je i potrebna duljina trajanja suplementacije te način na koji se ona određuje kod starije djece, kod koje bi u obzir dodatno trebalo uzeti i prisutnost rizičnih faktora, ali i izloženost sunčevom zračenju ¹⁶⁹. Uzimajući u obzir sve navedeno, dodatna istraživanja su prije svega potrebna u svrhu definiranja koristi suplementacije vitamina D kod pretilih osoba te prevenciji razvoja drugih upalnih stanja, uzrokovanih viškom masnog tkiva.

2.4. Adiponektin

Kompleksnost pretilosti postala je sve izraženija kada je adipozno tkivo prepoznato kao endokrini organ koji sudjeluje u proizvodnji biološki aktivnih supstanci, adipokina. Adipokini su proteini s pleiotrofnim funkcijama koji sudjeluju u regulaciji metabolizma, inzulinskoj osjetljivosti, upali, aterosklerozi i proliferaciji, a među najistraživanije u pretilosti spadaju leptin, rezistin te adiponektin ¹⁸⁴. Ekspresija rezistina je inicijalno definirana u adipocitima, ali značajne razine kod ljudi detektirane su i u mononuklearnim leukocitima, makrofazima, slezeni te stanicama koštane srži, a smatra se kako ima značajnu ulogu i u inzulinskoj rezistenciji te dijabetesu ¹⁸⁵. Leptin, zajedno sa rezistinom, promovira upalu i oksidativni stres, a njegovi receptori smješteni u respiratornom epitelu, submukoznom području te aktiviranim limfocitima u plućima, uključeni su u regulaciju stečene i adaptivne imunosti. Receptori adiponektina, hormona osjetljivog na inzulin, također se mogu pronaći u respiratornom epitelu i glatkim mišićima dišnih putova, a predominantno ima protuupalni i antioksidativni učinak, čime između ostalog može prevenirati i bronhijalnu hiperreaktivnost te upalu dišnih putova, koji su karakteristični za astmu ¹⁸⁶.

Adiponektin je sačinjen od 244 aminokiseline te ga u najvećoj koncentraciji luči bijelo adipozno tkivo, a s vremenom je njegova ekspresija dokazana i u ostalim tkivima uključujući tkivo placente, epitelijalne stanice, osteoblaste, parenhimalne stanice jetre te miocite ^{187,4}.

Definirano je više njegovih oblika, a u krvotoku cirkulira kao trimerična, heksamerična ili viša multimerična forma s manjom, srednjom ili većom molekularnom težinom, koje se vežu za receptore AdipoR1 i AdipoR2. Navedene forme razlikuju se u distribuciji i koncentraciji u serumu, kao posljedica inhibicije oblika veće molekularne težine od strane cirkulirajućeg testosterona u pubertetu. Zbog toga je adiponektin veće težine karakterističan za ženski spol, dok oblici manje težine dominiraju u serumu muškaraca. S druge strane, forme srednje

molekularne težine većinom dominiraju u sputumu, nevezano uz razlike u koncentraciji ovisno o spolu ^{5,188,189}.

Za razliku od leptina i rezistina koji imaju proupalno djelovanje poput aktivacije nuklearnog faktora-kB (NF-kB), povećavanja razine TNF α te poticanja upale dišnih putova, adiponektin generalno djeluje protuupalno. Adiponektin inhibira učinke proupalnih citokina poput IL-6 i TNF α i smanjuje NF-kB aktivnost te istovremeno inducira ekspresiju protuupalnih citokina (IL-10 i antagonist receptora IL-1). Osim protuupalnog djelovanja adiponektin može pozitivno modulirati i endokrini sustav podižući inzulinsku osjetljivost kod osoba s pretilošću ⁴⁻⁶. Osim toga, ovaj hormon potiče katabolizam masnih kiselina, aktivno regulira šećer u krvi te stimulira oksidaciju masnih kiselina u mišićima koštanog sustava, što posljedično vodi do reduciranja akumuliranih triglicerida ⁶. Iako je njegov najveći izvor adipozno tkivo, većina dosadašnjih studija potvrdila je snižene razine adiponektina upravo kod osoba s pretilošću. Ova kontradiktornost povezuje se s viškom proupalnih citokina u pretilosti, zbog kojih dolazi do inhibicije mRNA ekspresije adiponektina u adipocitima te može pridonijeti njegovim sniženim razinama ⁵. Naime, kod smanjene tjelesne težine, adipozno tkivo obično izlučuje niže razine proupalnih citokina (npr. IL-6, IL-8, TNF α) i leptina te proizvodi veće razine adiponektina, dok kod pretilosti adipozno tkivo hipertrofira i postaje infiltrirano s proupalnim makrofazima. Aktivni makrofagi i hipertrofični adipociti potom pojačano izlučuju proupalne citokine i adipokine te smanjuju razine adiponektina ^{9,8}. Osim toga, njegova smanjena koncentracija kod pretilih osoba povezuje se i sa smanjenom fizičkom aktivnošću te sjedilačkim načinom života, što potvrđuju objavljeni rezultati koji su pokazali kako redovita fizička aktivnost može pridonijeti stimuliranju njegove proizvodnje u tijelu ¹⁸⁷.

Promjene u koncentraciji adiponektina u pretilosti pokrenule su među znanstvenicima hipotezu, koja pokušava objasniti mehanizme koji prekomjernu težinu povezuju s razvojem upalnih bolesti poput astme, a neka od dosadašnjih istraživanja pokazala su kako bi farmakološko podizanje upravo njegovih razina mogla biti jedna od obećavajućih strategija u prevenciji bolesti uzrokovanih pretilošću ^{190,191,187}. Učinak adiponektina u različitim tipovima plućnih stanica prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Funkcija adiponektina u plućnim stanicama.

Tip stanica	Funkcija adiponektina
Alveolarni makrofagi	APN suprimira povišene metaloproteinaze matriksa i TNF-a.
Plućni makrofagi	APN inhibira infekcijom izazvanu proizvodnju TNF-a, IL-6, CXCL1 i CXCL8.
Plućne regulatorne T stanice	Alergijska upala smanjuje ekspresiju AdipoR1.
Plućni embrionalni fibroblasti	APN inhibira proizvodnju TNF-a, IL-6, IL-1b i IL-18.
Plućni fibroblasti WI-38 (stanična linija embrionalnih plućnih fibroblasta)	APN povećava AdipoR1, ali ne i AdipoR2.
Epitelijalne stanice dišnih putova (stanična linija A549)	APN inducira oslobađanje IL-8 i IL-10.
	APN smanjuje apoptozu i inhibira TNF-a i IL-1b inhibicijom NF-kB aktivnosti, kroz djelovanje AdipoR1.
Endotelijalne stanice	Detektirana povećana proizvodnja IL-6 i E-selektina.

Kratice: APN - Adiponektin; AdipoR - adiponektin receptori. (Preuzeto i prilagođeno iz Lim i Templeton, 2023.¹⁸⁹).

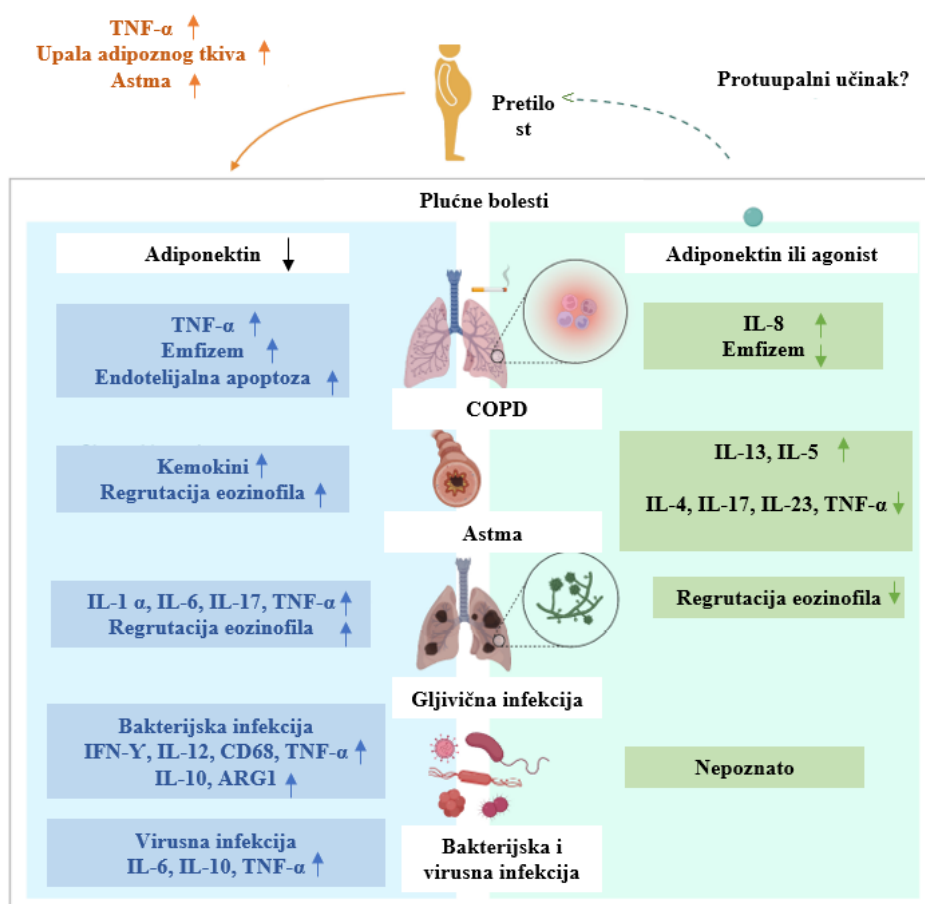
Osim toga, fokus brojnih studija tijekom godina sve više je postala potencijalna veza između niskih razina vitamina D i adiponektina koje se često mogu detektirati kod pretilih pojedinaca. U tom su smislu neke od studija objavile kako postoji pozitivna korelacija između adiponektina i nedostatka vitamina D kod djece s pretilošću te pozitivnog utjecaja na njegove razine u organizmu godinu dana nakon suplementacije vitaminom D, dok druge nisu pronašle značajnu vezu^{23–25,192,24}. Upravo zbog velikog broja kontradiktornih rezultata, potencijalna uloga adiponektina i vitamina D kao modificirajućih čimbenika u prevenciji i prognozi upalnih bolesti sve je češći cilj brojnih kliničkih ispitivanja.

2.4.1. Značaj adiponektina u astmi

Različite studije pokazale su kako veći rizik od razvoja astme postoji ne samo kod pretilosti već i kod osoba s prekomjernom težinom, iako mehanizmi koji pridonose njihovoj povezanosti još uvijek nisu u potpunosti jasni (Slika 7)¹⁹³. Razina adiponektina relativno je

visoka kod zdravih pojedinaca s optimalnom težinom, a njegove snižene razine sve se više povezuju s različitim poremećajima povezanim s pretilošću.

Jedan od najistraživanijih učinaka pretilosti svakako je utjecaj povećanog adipoznog tkiva na plućnu fiziologiju, uzrokujući povećani otpor, neučinkovitost respiratornih mišića te promjene u izmjeni plinova ¹⁹⁴. Za neke parametre plućne funkcije (FVC, FEV1) postoje kontradiktorni rezultati o povezanosti njihovih sniženih vrijednosti i prekomjerne težine ^{99,100,82,195}, dok se FeNO kao marker eozinofilne upale u dišnim putevima ističe kao potencijalno važan pokazatelj upale kod pretilosti. Naime, njegove povišene razine pronađene su i kod djece s pretilošću i kod pretilih astmatičara, a Azuma i sur. su u svom radu potvrdili kako se eozinofilna upala često veže uz smanjenu koncentraciju serumskog adiponektina ¹⁹⁶.



Slika 7. Utjecaj adiponektina na plućne bolesti (preuzeto iz Lim i sur., 2023. ¹⁸⁹).

Osim toga, stanje upale prisutne kod pretilosti može značajno mijenjati fenotip i prognozu astme, pri čemu adiponektin može utjecati na Th1/Th2 ravnotežu, razvoj pluća, glatke mišiće dišnih putova te odgovor dišnih putova koji su povezani s razvojem astme ⁷⁵. Većina epidemioloških studija dokazala je niske razine adiponektina u serumu astmatičara s pretilošću, iako su rezultati o njegovoj vezi s plućnom obstrukcijom i dalje nekonzistentni, prikazujući i

negativnu i pozitivnu korelaciju s razvojem i težinom astme, a smatra se kako su oprečni rezultati studija mogući iz više razloga, uključujući specifične podgrupe populacija i spol ispitanika^{36,75,197–199,194}. Ipak, velik broj grupa vezu između adiponektina i astme uspješno je dokazao i na mišjim modelima i kod ljudi, demonstrirajući značajno snižene koncentracije adiponektina kod pacijenata s težim oblikom astme ili tijekom egzacerbacije te osobito kod pretilih astmatičara u odnosu na astmatičare preporučene tjelesne mase^{200,198,201}.

Poznato je da pretilost pojačava kroničnu upalu dišnih putova kod astmatičara s prekomjernom težinom. Naime, jedno od istraživanja povezalo je pretilost s povećanim brojem makrofaga, neutrofila i eozinofila u bronhoalveolarnom ispirku miševa, pri čemu je i produkcija Th2 citokina (IL-13 i IL-5) bila povećana²⁰². Zbog navedenog utjecaja, adiponektin je došao u fokus i kao potencijalni terapeutik, gdje je primjena egzogenog adiponektina rezultirala smanjenjem upale kod pretilih miševa, dok je agonist receptora adiponektina uspješno smanjio razine IL-4, IL-17, IL-23 i TNF α . Tretiranje eksperimentalnih modela s adiponektinom smanjilo je patološke promjene na plućima smanjenjem eozinofila te ukupnih stanica u bronhoalveolarnom ispirku, što je dovelo do novih hipoteza o potencijalu adiponektina u regulaciji migracije stanica u dišne putove i uklanjanja plućne upale kod astme povezane s pretilošću^{202,189}.

Jedan od istaknutih čimbenika s utjecajem na razine adiponektina je i vitamin D, odnosno njegov nedostatak kod osoba s pretilošću, što posljedično može dovesti do razvoja astme. Naime, vitamin D ima modulatorni učinak na ekspresiju gena odgovornih za sintezu i izlučivanje adipokina, a snižene razine adiponektina zabilježene su osobito kod pretila djece s nedostatkom vitamina D^{23,24}. Različite studije s uključenom populacijom djece s pretilošću, s ili bez deficijencije vitamina D, opisale su potencijalni direktan učinak kalcitriola na više razine adiponektina te obrnuto proporcionalnu vezu između težine astme i razina serumskog vitamina D^{23,203}. Unatoč takvim saznanjima, učinak suplementacije vitaminom D na razine adiponektina te njegov značaj u kontroli astme kod odraslih i djece još uvijek nije potvrđen. O'Sullivan i sur. objavili su kako se ova nesigurnost može pripisati nedefiniranoj optimalnoj koncentraciji kalcitriola te u svom radu navode nekoliko studija koje predlažu razine kalcitriola koje bi trebalo ciljati kod djece i adolescenata kako bi se postigao željeni protuupalni učinak^{204–206}. Ipak, informacije o suplementaciji koja bi imala zadovoljavajući učinak kod pretila djece i dalje ostaje značajna nepoznanica u liječenju astme te ostalih upalnih stanja u kojima vitamin D ima potencijal kao dodatak konvencionalnoj terapiji, zbog čega je zajedno s adiponektinom i dalje u fokusu brojnih istraživanja, osobito u pedijatrijskoj populaciji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Devedeset bolesnika (u dobi od 6 do 18 godina), s pretilošću i/ili astmom, te 30 zdravih ispitanika uključeno je u opservacijsku kliničku studiju u Poliklinici Dječje bolnice Srebrnjak. Djeca i adolescenti u studiju su uključeni nakon potpisivanja informiranog pristanka od strane roditelja/zakonskih skrbnika, u skladu s lokalnim zakonodavstvom. Protokol studije odobrilo je Etičko povjerenstvo bolnice te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu, a kriterije za uključivanje i isključivanje procijenio je i definirao stručnjak alergolog s 15+ godina iskustva na tom području. Grupe, broj ispitanika te uključujući i isključujući kriteriji prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Kriteriji za uključivanje i isključivanje ispitanika u studiju.

Definirane skupine ispitanika/ Kriteriji za uključivanje i isključivanje u studiju	
Skupine ispitanika (broj ispitanika)	➤ Kontrolna skupina (30) ➤ Skupina djece s astmom (30) ➤ Skupina djece s pretilošću (30) ➤ Skupina djece s pretilošću i astmom (30)
Kriteriji za uključivanje sudionika s astmom	➤ Klinička dijagnoza astme (prema ERS/ATS smjernicama) najmanje godinu dana ➤ Primanje stabilne doze protuupalnog liječenja najmanje mjesec dana s djelomično kontroliranom ili nekontroliranom astmom prema GINA smjernicama
Kriteriji uključivanja za prekomjernu tjelesnu težinu i pretilost	➤ Vrijednosti BMI-a jednake ili veće od 85. percentila, ali manje od 95. percentila (prekomjerna tjelesna težina s povećanim rizikom za pretilost i povezane komorbiditete) ➤ vrijednosti BMI-a jednake ili veće od 95. percentila, specifične za dob i spol (pretilost)
Isključujući kriteriji za sve sudionike	Dijabetes tipa 1 ili 2, imunodeficijencija, maligne bolesti, teži hematološki poremećaji, autoimune bolesti, suplementacija vitaminom D u posljednja 3 mjeseca, akutna respiratorna ili druga infekcija posljednja 3 tjedna i istodobno postojanje drugih ozbiljnih kroničnih bolesti (teški metabolički poremećaji, nestabilna endokrina i kardiovaskularna stanja), korištenje sistemskih kortikosteroida, posjet hitnoj službi zbog pogoršanja astme u posljednja 3 tjedna, anafilaktička reakcija u proteklom mjesecu, poznata urođena ili perinatalna plućna bolest, plućna malformacija, mehanička ventilacija nakon rođenja, dijagnoza cistične fibroze, primarna cilijarna diskinezija, zatajenje srca, druge teške respiratorne bolesti (npr. intersticijska bolest pluća).

3.2. Mjerenje plućne funkcije i određivanje indeksa tjelesne mase

Za sve sudionike provedena su mjerenja plućne funkcije i FeNO-a, kao markera eozinofilne upale u donjim dišnim putovima. Spirometrija je provedena korištenjem kompjuteriziranog pneumotaha (Ganzhorn, Njemačka) prema ATS smjernicama ^{207,208}. Forsirani ekspiracijski volumen u jednoj sekundi (FEV1) i forsirani vitalni kapacitet (FVC) zabilježeni su i izraženi kao postotak (%) predviđenih vrijednosti, dok je omjer FEV1 i FVC (FEV1/FVC) zabilježen kao apsolutna vrijednost ²⁰⁹. Vrijednosti FVC (> 80% od predviđenog ili iznad donje granice normale), FEV1 (> 80% od predviđenog ili iznad donje granice normale) i omjer FEV1/FVC (> 0,90) tumačene su kao normalne. Opstruktivni obrazac definiran je sniženim FEV1 i FVC (< 80% od predviđenog ili ispod donje granice normale) i sniženim FEV1/FVC. Postotak FEV1 korišten je za predviđanje težine opstrukcije dišnih putova u djece: FEV1 > 80% kao pokazatelj blage opstrukcije; FEV1 60 – 80% kao pokazatelj umjerene opstrukcije; FEV1 < 60% kao pokazatelj teške opstrukcije ^{209–211,28}. Razine FENO mjerene su metodom jednog izdisaja pri 50 mL/s tijekom 10 sekundi pomoću NiOX analizatora (Aerocrine) u skladu s preporukama ERS/ATS ^{59,60}.

Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je kao omjer tjelesne mase u kilogramima i kvadrata tjelesne visine u metrima, a dobivene vrijednosti za svakog ispitanika uspoređivane su s percentilnim krivuljama rasta specifičnim za spol i dob djeteta ^{212,213}. U tablici 6 je prikazan stupanj uhranjenosti djeteta, prema kojem je definirana prisutnost prekomjerne težine i pretilosti.

Tablica 6. Odnos percentila i stupnja uhranjenosti.

Percentil	Stupanj uhranjenosti
<5.	Pothranjenost
5. do 85.	Normalna tjelesna masa
85. do 95.	Prekomjerna tjelesna masa
≥ 95.	Pretilost

3.3. Određivanja vitamina D u uzorcima plazme

Razina vitamina D određena je metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*), pomoću in vitro, komercijalno dostupnog kita, certificiranog za primjenu u kliničkoj dijagnostici.

3.3.1. Materijali uređaji

- HPLC kit za određivanje vitamina 25-OH D3/D2 u plazmi (25-OH-Vitamin D3 and D2 in plasma by UV – FAST, Kat. br. Z19110, Eureka Lab Division)
- Kalibrator za određivanje vitamina 25-OH D3/D2 u plazmi (Kat. br. Z19116, Eureka Lab Division)
- Kontrolni uzorci za niži (br.1) i viši koncentracijski raspon (br. 2.) vitamina 25-OH D3/D2 (Kat. br. Z19119, Eureka Lab Division)
- C18 ili Genesis C18 HPLC analitička kolona Poroshell 120, 4.6x50mm, 2.7µm (Kat. br. Z699975902 ili ZFM15960E, Agilent)
- Prefilteri za HPLC analitičku kolonu (Kat. br. S90199511, Javelin)
- Staklene pyrex tube 10 mL sa SVL čepovima (Kat. br. 212-7549, SciLabware)
- Stakleni HPLC viali volumena od 1.5 mL do 15 µL te njihovi pripadajući čepovi (Kat. br. 5182-0733, Agilent)
- Vakuum uređaj za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Vac Elut 12 and 20 Position, Agilent)
- Ultračista voda
- Acetonitril (Kat.br. 34851, Sigma-Aldrich)
- HPLC uređaj (Infinity 1260 Bioinert, Agilent Technologies)
- Softver za analizu podataka Chemstation online no FRC (Agilent Technologies)

3.3.2. Sakupljanje i pohrana uzoraka

Za analizu je korištena EDTA-plazma (uzorkovano minimalno 5 mL krvi za analizu). Uzorkovana puna krv se centrifugirala 10 minuta na 3500 rpm u hladenoj centrifugi (16 °C). Uzorci plazme alikvotirali su se te skladištili u prikladnim krio-vialama. Za pohranu u trajanju do najduže 3 mjeseca dobiveni uzorci plazme spremljeni su na -20 °C do provedbe daljnjih analiza.

3.3.3. Priprema kalibratora i kontrolnih uzoraka iz kita

- Neotopljeni liofilizirani Eureka kalibrator čuvao se pohranjen na temperaturi od -20 °C. U bočicu liofilizata dodano je 5.0 mL ultračiste vode (ili volumen naveden prema certifikatu koji je priložen kalibratoru). Po potrebi je korištena ultrazvučna kupelj u trajanju od 15 sekundi (15 s x 2). Otopina se nakon toga ostavila da stoji na sobnoj temperaturi 15 min uz povremeno blago okretanje (korišten roler za blago miješanje uzorka). Kalibrator se nakon pripreme alikvotirao i pohranio na -20 °C. Pripremljeni kalibrator se dalje obrađivao i analizirao na potpuno isti način kao uzorci ispitanika.
- Neotopljeni liofilizirani Eureka kontrolni uzorci pohranjeni su se na temperaturi od -20 °C. U bočicu liofilizata dodano je 5.0 mL ultračiste vode (ili volumen naveden prema certifikatu koji je priložen kontrolnim uzorcima). Po potrebi je korištena ultrazvučnu kupelj u trajanju od 15 sekundi (15 s x 2). Otopina se nakon toga ostavila da stoji na sobnoj temperaturi 15 min uz povremeno blago okretanje (korišten roler za blago miješanje uzorka). Kontrolni uzorci su se nakon pripreme alikvotirali te pohranili na -20 °C. Pripremljeni kontrolni uzorci su se dalje obrađivali i analizirali na potpuno isti način kao uzorci ispitanika.

3.3.4. Obrada uzoraka

Zamrznuti alikvoti kalibratora, kontrolnih uzoraka i uzoraka plazme su se prije analize otopili na sobnoj temperaturi, minimalno 30 min prije analize (uz blago okretanje na roleru). Iz otopljenih uzoraka plazme odrađena je precipitacija proteina i ekstrakcija na čvrstoj fazi prema sljedećim koracima:

I. Precipitacija proteina - priprema kalibratora/kontrola/uzoraka

1. U zasebne staklene pyrex tube se u uzorke kalibratora, kontrolnih uzoraka i uzoraka plazme dodao precipitacijski reagens A dostupan u Eureka kitu, prema shemi u tablici 7.

Tablica 7. Precipitacija proteina provedena na uzorcima kalibratora/kontrola/uzoraka

	Kalibrator	Kontrolni uzorak 1	Kontrolni uzorak 2	Uzorak (plazma)
Kalibrator	0.50 mL			
Kontrolni uzorak 1		0.50 mL		
Kontrolni uzorak 2			0.50 mL	
Uzorak - plazma				0.50 mL
Reagens A precipitacijski reagens sa internim standardom (IS)	0.75 mL	0.75 mL	0.75 mL	0.75 mL

- Precipitacija proteina izvršena je direktno na vorteks mješalici, u trajanju od 30 sekundi.
- Uzorak je pohranjen 5 minuta na 2-8 °C, a za to vrijeme je ohlađena centrifuga na odgovarajuću temperaturu.
- Uzorci su centrifugirani 15 minuta na 4000 rpm, pri 16°C, nakon čega je supernatant odvojen od proteinskog precipitata.
- 1.0 ml supernatanta dodan je u u čistu staklenu vialu, na što je dodano 250 µL ultračiste vode i miješano na vorteks mješalici 10 sekundi. Uzorci su nakon centrifugiranja pohranjeni na 2-8°C do ekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. *Solid phase extraction*; SPE)

II. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi proveden je postupkom centrifugiranja ili pomoću vakuum kade za ekstrakciju uz pomoć SPE kolona dostupnih u kitu za određivanje vitamina D. Kolona za ekstrakciju se aktivirala i kondicionirala prema postupku opisanom u nastavku, pazeći pritom da ne dođe do potpunog sušenja kolone prije nanošenja uzorka. Uzorak je zatim centrifugiranjem ili pod niskim tlakom (5 mm Hg) lagano propušten kroz kolonu, prema pojedinačno opisanim fazama u nastavku.

A. Kondicioniranje kolone

- U zasebne kolone (svaka za pojedini uzorak/kontrolu/kalibrator) dodano je 1.0 mL reagensa B iz Eureka kita (otopina za kondicioniranje 1).

2. Perkolacija tekućine provela se procesom centrifugiranja (1000 rpm; 2 minute)
3. Nakon centrifuge, u SPE kolone dodano je 1.0 mL reagensa C iz Eureka kita (otopina za kondicioniranje 2).
4. Perkolacija tekućine provela se procesom centrifugiranja (1000 rpm; 2 minute).
5. Zaostala tekućina je u potpunosti propuštena kroz punilo kolone, nakon čega je punilo osušeno pod niskim tlakom (5 mm Hg)

B. Nanošenje uzorka

1. Prethodno pripremljena gornja faza supernatanta (kalibrator, kontrole, uzorci) odpipetirala se u pojedinačne SPE kolone (ukupno ~1.25 mL mješavine supernatant/ultračista voda).
2. Perkolacija tekućine provela se procesom centrifugiranja (1000 rpm; 3 minute).
3. Punilo ostaje lagano vlažno

C. Ispiranje SPE kolone

1. U zasebne SPE kolone odpipetirano je 0.5 mL reagensa D iz Eureka kita (otopina za ispiranje).
2. Perkolacija je izvršena procesom centrifugiranja (4000 rpm; 1 minutu).
3. Ukoliko je bilo potrebno, nakon centrifuge punilo kolone je dodatno osušeno pod niskim tlakom (5 mm Hg)

D. Eluacija produkta (analita)

1. U zasebne SPE kolone odpipetirano je 0.2 mL Reagensa E (otopina za eluaciju).
2. Dobiveni eluat prikupljen je u staklenu HPLC vialu. Završna perkolacija tekućine kroz SPE kolonu izvršena je pod niskim tlakom (5 mm Hg) uz nizak protok.
3. U dobiveni eluat dodano je 25 µL ultračiste HPLC vode te je miješano 10 sekundi na vorteks mješalici.

E. Priprema i injektiranje testne otopine

1. U staklenu HPLC vialu za pripremu uzorka otpipetirano je 400 µL mobilne faze (Reagens M) i 100 µL reagensa F (Test otopina) te je miješano 10 sekundi na vorteks mješalici.
2. Volumen injektiranja u kromatografski sustav bio je 50 µL.

3. Injektiranjem testne otopine provjerena je prikladnost sustava; retencijsko vrijeme (RT) vrška 25-OH D3 između 4.0 i 6.0 min. Ukoliko je RT vrijednost potvrđena kao prikladna nastavilo se s postupkom analize uzoraka.

3.3.5. Kromatografski uvjeti

Analiza se provela prema kromatografskim uvjetima opisanim u tablici 8.

Tablica 8. Kromatografski uvjeti pri određivanju vitamina D u uzorcima plazme.

Analitička kolona	C18 ili Genesis C18 HPLC analitička kolona Poroshell 120, 4.6x50mm, 2.7µm
Otopina za čišćenje/ ispiranje	Otopina vode i acetonitrila (Voda : Acetonitril; 20 : 80; v/v)
Otopina za kondicioniranje kolone	Mobilna faza dostupna u kitu za određivanje vitamina D
Otopina za čišćenje igle injektora	Otopina ultračiste vode i acetonitrile (Voda : Acetonitril; 80 : 20; v/v)
Volumen injektiranja	50 µL
Protok	0.8 mL/min
Temperatura kolone	20 °C
Detekcija (UV/VIS)	265 nm

Napomena: Tijekom svake analize korišten je Javelin pred-filter, za dodatnu zaštitu analitičke kolone. Pred-filter je zamijenjen svakih 70-100 injektiranja ili ranije ukoliko je bilo potrebno. Nakon podešavanja kromatografskih uvjeta, snimljen je sljedeći analitički slijed u programu Chemstation pri valnoj duljini od 265 nm:

- a) Negativna kontrola (čista mobilna faza); b) Testna otopina; c) Kalibrator (2x); d) Kontrolni uzorak br. 1; e) Kontrolni uzorak br. 2; f) Uzorak pacijenta; g) Kalibrator (provjera stabilnosti analitičkih uvjeta tijekom cijele analize); h) Negativna kontrola (čista mobilna faza)

3.3.6. Obrada podataka

1. Nakon završetka sekvence vizualno je provjerena kvaliteta dobivenih kromatograma. Pregled kromatograma se izvršio u Chemstation programu. Ukoliko pojedini kromatografski vršak nije dobro imenovan prozor oko odgovarajućeg retencijskog vremena se prilagodio, kao i integracijski uvjeti u slučaju nezadovoljavajuće integracije pojedinog kromatograma.
2. Analizom je dobiven izračun koncentracije analita u uzorcima (u ng/mL). Koncentracije 25-OH D3 i 25-OH D2 u izlaznom izvještaju su izražene u µg/L.

3.4. Određivanja adiponektina u uzorcima plazme

Razina adiponektina određena je metodom ELISA (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) - Enzimski imunosorbentni test, pomoću komercijalno dostupnog kita.

3.4.1. Materijali i uređaji

- ELISA kit (Human Adiponectin kit, BMS2032-2, Invitrogen, ThermoFisher Scientific)
- Deionizirana voda
- Spektrofotometar za očitavanje apsorbancije (450nm) (Agilent BioTek Epoch 2 Microplate Spectrophotometer)

3.4.2. Sakupljanje i pohrana uzoraka

Za analizu adiponektina je korišten serum. Uzorkovana puna krv centrifugirala se 10 minuta na 3000g, na sobnoj temperaturi. Uzorci seruma skladištili su se u prikladnim krio-vialama na -80 °C do analize.

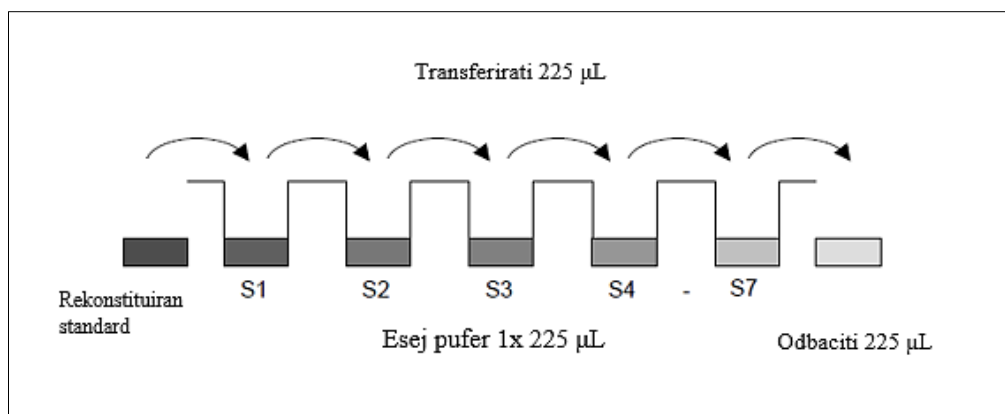
3.4.3. Priprema reagensa dostupnih u kitu

1. Pufer za ispiranje (engl. *Wash buffer*) 1x - u menzuru od 1000mL dodano je 50mL koncentrata pufera za ispiranje (20x), nakon čega je dodana deionizirana voda do konačnog volumena od 1L. Pripremljeni pufer (1x) transferiran je u bocu te pohranjen na sobnu temperaturu.

2. Esej pufer (engl. *Assay buffer*) 1x - u menzuru od 100 mL dodano je 5mL koncentrata pufera (20x), nakon čega je dodana deionizirana voda do konačnog volumena od 100ml. Pripremljeni pufer (1x) transferiran je u bocu te pohranjen u hladnjak.
3. Biotin-konjugat – pripremljen netom prije korištenja (potrebno upotrijebiti do 30 minuta nakon razrjeđivanja). Pripremljeno je 1:100 razrjeđenje koncentrirane otopine biotin konjugata (20x) u eseju puferu (1x).
4. Streptavidin-HRP – pripremljen netom prije korištenja (potrebno upotrijebiti do 30 minuta nakon razrjeđivanja). Pripremljeno je 1:400 razrjeđenje koncentrirane otopine biotin konjugata (20x) u eseju puferu (1x).
5. Standard adiponektin – standard je rekonstituiran s destiliranom vodom, volumenom označenim na bočici standarda. Pripremljeni standard je blago promiješan kako bi se osigurala homogenost te potpuno otapanje (koncentracija rekonstituiranog standarda = 30 ng/mL). Rekonstituirani standard ostavljen je 10-30 minuta na sobnoj temperaturi te blago promiješan prije pripreme razrjeđenja. Standard se iskoristio odmah nakon rekonstitucije.
6. TMB supstrat (engl. 3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine*) – spreman za korištenje.
7. Stop otopina – spremna za korištenje.

3.4.4. Priprema razrjeđenja standarda

1. Pripremljena su 1:2 serijska razrjeđenja za standardnu krivulju:
 - a) Odpipetirano je 225 μ L eseja pufera (1x) u svaku od 7 označenih tubica.
 - b) Odpipetirano je 225 μ L rekonstituiranog standarda (koncentracija=30ng/mL) u prvu tubicu označenu s S1 (koncentracija standarda 1 =15 ng/mL).
 - c) Odpipetirano je 225 μ L pripremljene otopine S1 u sljedeću tubicu označenu sa S2 (koncentracija standarda 2 =7.5 ng/mL).
 - d) Na isti način ponovljeni su transferi do tubice označene sa S7 prema shemi (Slika 8.)



Slika 8. Priprema razrjeđenja standarda adiponektina.

3.4.5. Priprema uzoraka

Uzorci plazme razrijeđeni su 1:2500 u esej puferu (1x) prema proceduri:

- a) Razrjeđenje 1 – 10 µL uzorka + 490 µL esej pufera (1x)
- b) Razrjeđenje 2 – 10 µL razrjeđenja 1 + 490 µL esej pufera (1x)

3.4.6. Protokol testa

1. Uzorci seruma prethodno pohranjeni na -80 °C, izvađeni su na sobnu temperaturu.
2. 96-jažična ploča isprana je s 350 µL pufera za ispiranje (1x), sa aspiracijom između ispiranja. Prije aspiracije pufer za ispiranje je ostavljen 10-15 sekundi u jažicama. Nakon zadnjeg ispiranja, jažica je preokrenuta na čisti ubrus i tapkanjem se uklonila sva tekućina iz jažica.
3. Odpipetirano je 100 µL razrjeđenja standarda (S1-S7) u duplikatu u jažice A1-G7.
4. U jažice H1 i H2 odpipetirano je 100 µL esej pufera (negativna kontrola za mjerenje optičke gustoće pozadine).
5. U jažice A3-H12 dodano je 50 µL esej pufera, nakon čega je u iste jažice dodano 50 µL razrijeđenog uzorka u duplikatu.
6. Pripremljen je biotin-konjugat te je dodano 50 µL u sve jažice.
7. 96-jažična ploča je nakon ispiranja prekrivene zaštitnom folijom te je stavljena na inkubaciju 2 sata na mješalici za mikrotitarske pločice, pri sobnoj temperaturi.
8. Nakon inkubacije, pripremljen je streptavidin-HRP, jažice su ispražnjene preokretanjem 96-jažične ploče, a potom je ploča isprana 6 puta na jednak način kao u koraku 1. Nakon ispiranja, u svaku jažicu je dodano 100 µL streptavidin-HRP te je ploča

prekrivena zaštitnom folijom i stavljena na inkubaciju 2 sata na mješalici za mikrotitarske pločice, pri sobnoj temperaturi.

9. Nakon inkubacije jažice su ispražnjene preokretanjem 96-jažične ploče, a potom je ploča isprana 6 puta na jednak način kao u koraku 1. Nakon ispiranja, u svaku jažicu je dodano 100 μ L TMB supstrata, koji u reakciji s vezanim konjugatom rezultira plavim obojenjem. Intenzitet obojenja mjerio se pri zadanoj valnoj duljini te je proporcionalan količini proteina adiponektina uzorku. Ploča stavljena na inkubaciju 30 minuta na sobnu temperaturu, u mraku.
10. Nakon 30 minuta u svaku je jažicu dodano 100 μ L stop otopine koja zaustavlja reakciju, pri čemu plavo obojenje u jažicama prelazi u žuto.
11. Nakon dodavanja stop otopine 96-jažična ploča se očitala unutar 30 minuta na spektrofotometru pri valnoj duljini od 450nm.

3.4.7. Obrada podataka

Izračunate su prosječne vrijednosti apsorbancije za svaki skup duplikata (standardi i uzorci). Izrađena je standardna krivulja unutar softvera Gen5 Secure, na temelju dobivenih srednjih vrijednosti svake koncentracije standarda. Na temelju dobivene standardne krivulje, određena je koncentracija cirkulirajućeg adiponektina za svaki uzorak, pri čemu je u obzir uzet faktor razrjeđenja od 5000. Koncentracija adiponektina izražena je u ng/mL.

3.5. Izolacija DNA

Ekstrakcija DNA iz uzoraka krvi provedena je pomoću komercijalno dostupnog kita (GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit, ThermoFisher Scientific).

3.5.1. Materijali i uređaji

- Kit za izolaciju DNA (Kat. br. K0781, GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit, ThermoFisher Scientific).
- Etanol 96-100% (Kat. br. PI47303, GramMol)
- Spektrofotometar NanoPhotometer P300 (Implen®).

3.5.2. Sakupljanje i pohrana uzoraka

Ispitanicima je izvađena venska krv te prikupljena u sterilne epruvete s EDTA antikoagulansom, koje su pohranjene na -80 °C do PCR analize.

3.5.3. Priprema reagensa dostupnih u kitu

1. Reagensi dostupni u kitu spremni za upotrebu:

- a) Otopina proteinaze K
- b) Otopina za lizu
- c) Elucijski pufer (10mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)
- d) Kolone za purifikaciju genomske DNA u kombinaciji s kolekcijskim tubama
- e) Kolekcijske tube (2ml)

2. Priprema pufera za ispiranje:

- a) Pufer za ispiranje I - u bočicu pufera dodano je 30ml etanola (96-100%), prema uputi proizvođača
- b) Pufer za ispiranje II - u bočicu pufera dodano je 30ml etanola (96-100%), prema uputi proizvođača

3.5.4. Protokol testa

- 1. U 200µl pune krvi dodano je 20 µL otopine proteinaze K te odmah promiješano pomoću vorteks mješalice.
- 2. U uzorak krvi s proteinazom K dodano je 400 µL otopine za lizu te odmah promiješano pomoću vorteks mješalice.
- 3. Nakon dodavanja otopine za lizu, uzorci su stavljeni na inkubaciju na 56 °C, na 10 minuta, tijekom čega su povremeno promiješani pomoću vorteks mješalice.
- 4. Nakon inkubacije u uzorke je dodano 200 µL etanola (96-100%) te odmah promiješano pipetom.
- 5. Uzorak pripremljen u koracima 1-4, transferiran je na spin kolonu unutar kolekcijske tube te centrifugiran 6,000 x g, 1 minutu. Nakon centrifuge kolekcijska tuba je bačena, a kolona je postavljena u novu kolekcijsku tubu.

6. Na kolonu je dodano 500 μ L pufera za ispiranje te centrifugirano na 8,000 x *g*, 1 minutu. Nakon centrifuge dio koji je prošao u kolekcijsku tubu je bačen, nakon čega je kolona vraćena u istu, praznu kolekcijsku tubu.
7. Na kolonu je dodano 500 μ L pufera za ispiranje II te centrifugirano na 20,000 x *g*, 3 minute. Nakon centrifuge dio koji je prošao u kolekcijsku tubu je bačen, nakon čega je kolona vraćena u istu, praznu kolekcijsku tubu i centrifugirano je na dodatnih 20,000 x *g*, 1 minutu. Nakon centrifuge kolekcijska tuba je bačena, a kolona je premještena u sterilnu tubu od 1,5 mL.
8. Na kolonu je pažljivo dodano 200 μ l pufera za eluciju, na centralni dio membrane kolone, kako bi se eluirala genomska DNA te se sve inkubiralo 2 minute na sobnoj temperaturi, a potom centrifugiralo na 8,000 x *g*, 1 minutu.
9. Koncentracija izolirane DNA izmjerena je spektrofotometrom NanoPhotometer P300 (Implen®).

3.6. Genotipizacija

Genotipizacija za 4 različita polimorfizma VDR gena (TaqI, FokI, ApaI i BsmI) provedena je pomoću komercijalno dostupnog kita s TaqMan probama, dizajniranim i kalibriranim za korištenje uz TaqMan Master Mix reagense, pod univerzalnim termalnim postavkama ciklusa.

3.6.1. Materijali i uređaji

- Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix with High ROX (Kat. br. 600888, Agilent Technologies)
- TaqMan Predesigned SNP Genotyping Assays (Kat. br. 4351379, Applied Biosystems) ¹⁴⁴:
 - C_2404008_10 rs731236, PN4351379 (TaqI)
 - C_12060045_20 rs2228570, PN4351379 (FokI)
 - C_28977635_10 rs7975232, PN4351379 (ApaI)
 - C__8716062_20 rs1544410, (BsmI)
- TE pufer (Kat. Br. AM9849, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)
- Ultračista voda (Water Molecular Biology Grade, Nuclease Free, Kat. br. 7732-18-5, VWR)
- 96-jažična ploča (Kat. br. 732-1463, PCR plates for Roche® LightCycler® 480 VWR)

- PCR uređaj (LightCycler® 480 Instrument II, Roche Diagnostics)

3.6.2. Priprema reagensa

1. Svaki SNP (TaqI/FokI/ApaI/BsmI) razrijeđen je 20x s TE puferom (10-mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, in DNase-free, sterile-filtered water) prema preporuci proizvođača 20x, nakon čega je kratko centrifugiran te alikvotiran. Alikvoti su pohranjeni na -20 °C do analize.
2. Master Mix je spreman za korištenje (pohrana na -20 °C do analize).

3.6.3. Protokol testa

Analiza je provedena pomoću komercijalno dostupnog TaqMan esej za genotipizaciju te TaqMan Master Mix reagensa. TaqMan esej sadrži uzvodne (*engl. forward*) i nizvodne (*engl. reverse*) početnice specifične za sekvencu (amplifikacija sekvence od interesa) te probe jedinstvene za određeni ciljani polimorfizam. Svaka proba ima reporter boju na 5' kraju - HEX boja (533-580nm) se nalazi na 5' kraju probe za detekciju sekvence alela 1, a FAM boja (465-510nm) se nalazi na 5' kraju probe za detekciju sekvence alela 2 (Tablica 9). Na 3' kraju probe se nalazi nefluorescentni kvenčer. Detekcija povećanog signala u fluorescenciji HEX-boje indicirala je homozigote za alel 1, VIC-boje homozigote za alel 2, a signal u obje je indicirao heterozigote.

Tablica 9. Opis TaqMan predizajniranih proba.

VDR POLIMORFIZAM	GENETSKA SUPSTITUCIJA	SEKVENCA	ALEL 1 (HEX)	ALEL 2 (FAM)
TAQI (RS731236)	A>G	TGGACAGGCGGTCTGGATGGCCTC[A/G]]ATCAGCGCGGCGTCTGCACCCAG	A(T)	G(t)
FOKI (RS2228570)	A>G	GGAAGTGCTGGCCGCCATTGCCTCC[A/G] TCCCTGTAAGAACAGCAAGCAGGCC	A(F)	G(f)
APAI (RS7975232)	C>A	AAGGCACAGGAGCTCTCAGCTGGGC[A/C]]CCTCACTGCTCAATCCCACCACCC	A(a)	C(A)
BSMI (RS1544410)	C>T	GAGCAGAGCCTGAGTATTGGGAATG[T/C]]GCAGGCCTGTCTGTGGCCCCAGGAA	T(b)	C(B)

1. Nakon otapanja uzoraka izolirane DNA, koji su prethodno bili pohranjeni na -20 °C, pripremila se reakcijska smjesa prema shemi opisanoj u tablici 10:

Tablica 10. Pripremanje reakcijske smjese za RT-PCR.

Reakcijska smjesa	
Master Mix	12,5 µL
20X Assay Working Stock (SNP)	1,25 µL
Ultračista voda	6,25 µL
DNA uzorak	
Uzorak	5 µL
Ukupni volumen po jažici	25 µL

2. U pojedinu jažicu 96-jažične ploče dodano je 20 µL reakcijske smjese.
3. Nakon dodavanja reakcijske smjese, u jažice je dodano 5 µL uzorka izolirane DNA ili negativne kontrole (ultračista voda).
4. Pripremljena 96-jažična ploča prekrivena je adhezivnom pokrovnicom, nakon čega je ploča stavljena kratko u centrifugu kako bi se dodana reakcijska smjesa i uzorci spustili do dna jažice te izbjeglo potencijalne mjehuriće.
5. RT-PCR reakcija je provedena je na Roche LC 480 II PCR uređaju pri uvjetima opisanim u tablici 11:

Tablica 11. Postavljeni uvjeti za RT-PCR.

Korak	Temperatura	Duljina trajanja	Broj ciklusa
Aktivacija polimeraze	95°C	10 minuta	40
Denaturacija	95°C	15 sekundi	
Vezanje početnica / Sinteza komplementarnih lanaca	60°C	1 minuta	
Hlađenje	40°C	30 sekundi	

6. Nakon završene PCR reakcije rezultati su analizirani unutar softvera LC 480 II PCR te su rezultati za svaki uzorak izraženi kao "homozigot za alel 1", "homozigot za alel 2" ili "heterozigot".

3.7. Statistička obrada

Sve kontinuirane varijable prikazane su kao srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije ($\pm$ SD), dok su kategorički podaci izraženi u brojevima (N) i postocima (%). Dobivene vrijednosti ITM-a uspoređivane su s percentilnim krivuljama rasta specifičnim za spol i dob. Za analizu distribucije podataka proveden je Kolmogorov-Smirnov test. Usporedbe između grupa napravljene su korištenjem ANOVA-e (ordinary one way ANOVA) za varijable s normalnom distribucijom te Mann-Whitney test za podatke koji nisu imali normalnu distribuciju. Učestalost alela i genotipova izračunata je direktnim brojanjem, a Hi-test (χ^2 -test) te Fisher-exact test (pri očekivanoj vrijednosti manjoj od 5) korišteni su za usporedbu rezultata između grupa. Također, učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizama procijenjene su za Hardy-Weinbergovu ravnotežu pomoću Hi-kvadrat testa (χ^2 -testa). Podaci su analizirani pomoću GraphPada 8.0. P vrijednost od $p < 0.05$ smatrana je statistički značajnom za sve provedene testove.

4. REZULTATI

4.1. Demografske karakteristike i mjerenje indeksa tjelesne mase

U istraživanju su definirane četiri različite skupine (30 ispitanika u svakoj skupini): kontrolna skupina (zdrava djeca), djeca s pretilošću, djeca s astmom te djeca s pretilošću i astmom. Prosječna dob te omjer muškog i ženskog spola bili su usporedivi između grupa (Tablica 12.).

Vrijednosti ITM-a, izračunate i prilagođene prema percentilima za dob i spol, prikazane su u tablici 12. Očekivano, rezultati ITM-a pokazali su značajno više izmjerene vrijednosti u skupini djece s pretilošću ($28 \pm 4,5$) te grupi pretilih astmatičara ($27,1 \pm 3$), u usporedbi s kontrolnom skupinom ($17,9 \pm 3$) i astmatičarima s optimalnom tjelesnom težinom ($17,8 \pm 2,5$) ($P < 0,01$).

Tablica 12. Demografske karakteristike i indeks tjelesne mase među grupama ispitanika.

Parametar	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma + pretilost
Dob (SV $\pm$ SD)	9.97 $\pm$ 3.8	11.03 $\pm$ 3.4	11.13 $\pm$ 3.4	12 $\pm$ 2.8
Ženski spol (N)	15	17	16	17
Muški spol (N)	15	13	14	13
ITM (kg/m ²), SV $\pm$ SD	17.9 $\pm$ 3.0	28.0 $\pm$ 4.5	17.8 $\pm$ 2.5	27.1 $\pm$ 3.0

Kratice: SV- srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; N – broj; ITM – indeks tjelesne mase

4.2. Razina vitamina D

Prema rezultatima analize 25-OH vitamina D3 u plazmi (u daljnjem tekstu vitamin D), ispitanici su smješteni u kategorije ovisno o razinama vitamina D: optimalne vrijednosti vitamina D (20-70 $\mu\text{g/L}$); manjak vitamina D (10–19,99 $\mu\text{g/L}$); nedostatak vitamina D (<10 $\mu\text{g/L}$) ili ozbiljni nedostatak vitamina D (<5 $\mu\text{g/L}$)²¹⁴⁻²¹⁷. U 120 analiziranih uzoraka, ukupno je detektirano 40 ispitanika s manjkom te 13 ispitanika s nedostatkom vitamina D, odnosno definirano je ukupno 53 ispitanika sa niskim razinama vitamina D (manjak + nedostatak). Izmjerene vrijednosti vitamina D prikazane su u Prilogu 2.

Analizom rezultata nisu primijećene statistički značajne razlike u razinama vitamina D između skupina. Ipak, **manjak vitamina D je u najvećem postotku zabilježen u grupi astmatičara (37%),** dok je u **grupi pretile djece detektiran najveći broj ispitanika s nedostatkom vitamina D (23%).** Razina vitamina D ispod 10 ug/L u ostalim je grupama izmjerena kod samo 7% ispitanika (Tablica 13).

Kombinirajući manjak i nedostatak vitamina D u skupinu označenu kao "nizak vitamin D" nije uočena značajna razlika između skupina, ali je najveći broj djece s njegovim sniženim razinama detektiran u grupi pretile djece (53%). U kontrolnoj skupini te skupini djece s pretilošću i astmom, niske razine vitamina D zabilježene su u 40% ispitanika, dok je kod astmatičara zabilježena u 43% ispitanika (Tablica 13).

Tablica 13. Zastupljenost manjka i nedostatka vitamina D u analiziranim grupama ispitanika.

Status vitamina D	Kontrolna skupina N (%)	Pretilost N (%)	Astma N (%)	Astma + pretilost N (%)
Manjak/nedostatak vitamina D				
Manjak (10-19.99 ug/L), N=40	10 (33)	9 (30)	11 (37)	10 (33)
Nedostatak (<10 ug/L), N=13	2 (7)	7 (23)	2 (7)	2 (7)
Ozbiljni nedostatak (<5 ug/L)	0	0	0	0
Optimalne razine (≥ 20 ug/L), N=67	18 (60)	14 (47)	17 (57)	18 (60)
Niske razine vitamina D				
Nizak vitamin D (manjak + deficijencija), N=53	12 (40)	16 (53)	13 (43)	12 (40)
Optimalne razine (≥ 20 ug/L), N=67	18 (60)	14 (47)	17 (57)	18 (60)

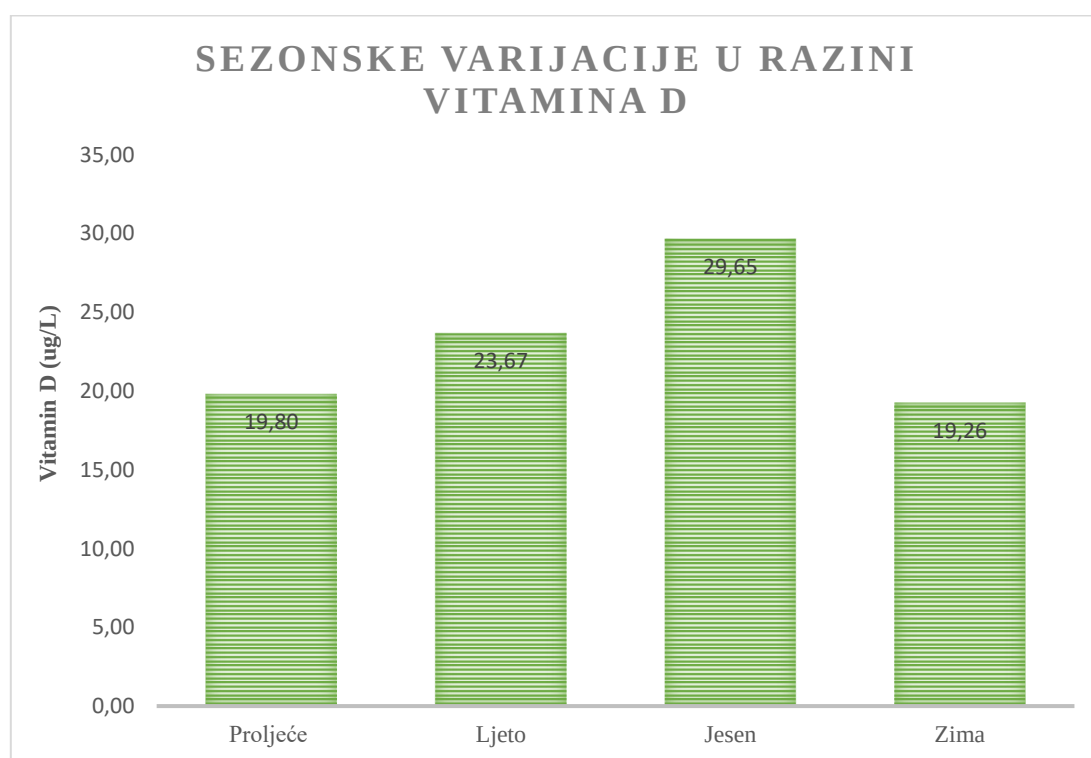
Kratice: N – broj

Dodatnom analizom dobivenih podataka primijećene su sezonske varijacije u rezultatima, s višim srednjim razinama vitamina D u uzorcima prikupljenim u ljetnim (23.6 µg/L) i jesenskim mjesecima (29.7 µg/L) u usporedbi s uzorcima prikupljenim u proljetnim (19.8 µg/L) i zimskim (19.3 µg/L) mjesecima (Tablica 14). Naime, najveća srednja vrijednost izmjerenog vitamina D detektirana je u jesenskim mjesecima, nakon ljeta i veće izloženosti suncu (Slika 9). Također, najveći broj uzoraka plazme prikupljen je tijekom jeseni i zime.

Tablica 14. Razlike u broju prikupljenih uzoraka te razini vitamina D kroz godišnja doba.

Godišnje doba	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Broj sudionika
Proljeće (ožujak – svibanj)	19.80 $\pm$ 10.8	19
Ljeto (lipanj – kolovoz)	23.67 $\pm$ 8.6	15
Jesen (rujan - studeni)	29.65 $\pm$ 15.3	44
Zima (prosinac – veljača)	19.26 $\pm$ 7.5	42

Kratice: SD – standardna devijacija



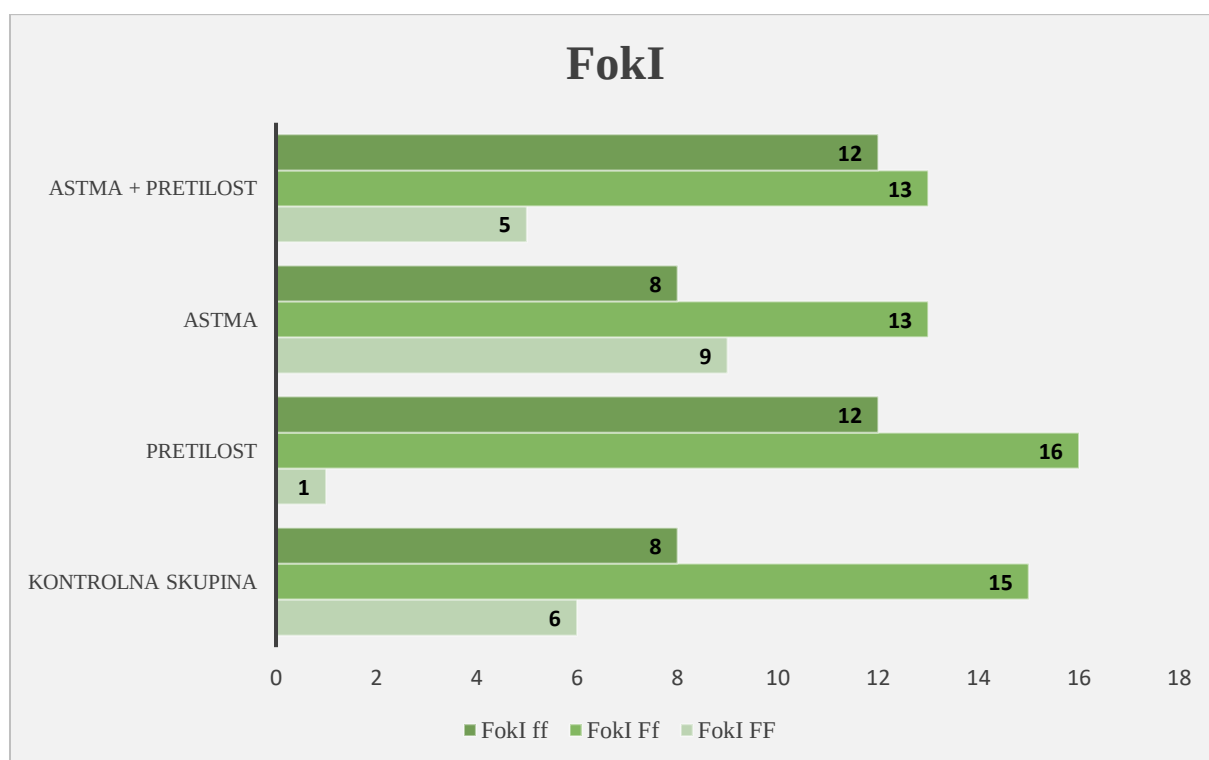
Slika 9. Usporedba razina vitamina D u uzorcima plazme prikupljenim kroz različita godišnja doba.

4.3. Povezanost polimorfizama receptora vitamina D s pretilošću i astmom

Detektirane frekvencije alela prikazane su u tablici u Prilogu 3. Analizom je potvrđeno kako su svi ispitani polimorfizmi VDR receptora (TaqI, FokI, Apai i BsmI) u Hardy-Weinberg ravnoteži.

4.3.1. FokI (rs2228570)

Referentni alel za FokI polimorfizam je u grafičkim prikazima i rezultatima označen kao F, pri čemu su homozigoti označeni kao FF. Ukoliko je došlo do tranzicijske supstitucije (A>G), izmijenjeni alel je u grafičkim prikazima označen kao f (homozigoti označeni kao ff). Heterozigoti su u grafičkim prikazima označeni su kao Ff. Distribucija genotipova FokI VDR polimorfizma između ispitivanih grupa prikazana je na slici 10.



Slika 10. Učestalost genotipova za FokI VDR polimorfizam između grupa ispitanika. Referentni alel za FokI je označen kao F (homozigoti – FF). Izmijenjeni alel je označen kao f (homozigoti – ff). Heterozigoti su označeni su kao Ff.

Usporedba grupe zdrave djece i djece s pretilošću i/ili astmom

Rezultati provedene analize pokazuju kako nema statistički značajne razlike između zdrave djece i djece s pretilošću i/ili astmom ni u genotipu ni u učestalosti alela F ili f za FoqI polimorfizam. Također, grupe se međusobno nisu značajno razlikovale u recesivnom ili dominantnom genskom modelu (Tablica 15).

Distribucija genotipova FoqI VDR polimorfizma prikazana na slici 10, prikazuje **veću učestalost ff (41%) i Ff genotipa (55%)** u odnosu na FF genotip (3%) **kod djece s pretilošću**. Također, **kod astmatičara je detektirana veća učestalost, Ff (43%) genotipa**, u odnosu na FF (30%) i ff (27%) genotip, dok je **kod pretilih astmatičara potvrđena veća učestalost Ff (43%) i ff (40%) genotipa**, u odnosu na FF (17%) genotip. U **kontrolnoj skupini najzastupljeniji je bio Ff genotip (52%)**.

Dodatno su se usporedile grupa ispitanika s pretilošću i grupa astmatičara te obje te grupe sa skupinom pretilih astmatičara. **Analiza rezultata je pokazala statistički značajnu razliku u genotipu ($p=0.024$), frekvenciji alela ($p=0.037$) te dominantnom genskom modelu ($p=0.012$) između skupine djece s pretilošću i skupine djece s astmom**, dok za recesivni model nije uočena značajna razlika (Tablica 16). Između djece s kombiniranom pretilošću i astmom te ostalim grupama nije detektirana statistički značajna razlika ni u genotipu ni u frekvenciji alela F ili f za FoqI polimorfizam, kao ni za recesivni ili dominantni genski model (Tablica 16).

Tablica 15. Usporedba frekvencije genotipova i alela za FokI VDR polimorfizam između kontrolne skupine i ispitanika s pretilošću i/ili astmom

FokI (RS2228570) A/G	Kontrola N (%)	Pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Kontrola N (%)	Astma N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Kontrola N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)
Genotip												
FF	6 (20.7)	1 (3.4)	FE0.116	N/P	6 (20.7)	9 (30.0)	0.696		6 (20.7)	5 (16.7)	0.601	
Ff	15 (51.7)	16 (55.2)			15 (51.7)	13 (43.3)			15 (51.7)	13 (43.3)		
ff	8 (27.6)	12 (41.4)			8 (27.6)	8 (26.7)			8 (27.6)	12 (40.0)		
Recesivni model (ff vs. FF+Ff)												
ff	8 (27.6)	12 (41.4)	0.269	0.407	8 (27.6)	8 (26.7)	0.937	0.831	8 (27.6)	12 (40.0)	0.314	0.464
FF+Ff	21 (72.4)	17 (58.6)			21 (72.4)	22 (73.3)			21 (72.4)	18 (60.0)		
Dominantni model (FF vs. Ff+ff)												
FF	6 (20.7)	1 (3.4)	FE 0.102	N/P	6 (20.7)	9 (30.0)	0.412	0.602	6 (20.7)	5 (16.7)	0.692	0.950
Ff+ff	23 (79.3)	28 (96.6)			23 (79.3)	21 (70.0)			23 (79.3)	25 (83.3)		
Alel												
F	27 (46.6)	18 (31.0)	0.086	0.127	27 (46.6)	31 (51.6)	0.578	0.710	27 (46.6)	23 (38.3)	0.366	0.473
f	31 (53.4)	40 (69.0)			31 (53.4)	29 (48.3)			31 (53.4)	37 (61.7)		

Kratice: N-broj; N/P – nije primjenjivo ; * χ^2 test/ Fisher's exact test (^{FE}P). Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

Tablica 16. Usporedba frekvencije genotipova i alela za FoqI VDR polimorfizam između skupine ispitanika s pretilošću i/ili astmom

FokI (RS2228570) A/G	Pretilost N (%)	Astma N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Astma N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Pretilost N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)
Genotip												
FF	1 (3.4)	9 (30.0)	FE0.024*	N/P	9 (30.0)	5 (16.7)	0.379		1 (3.4)	5 (16.7)	FE0.289	N/P
Ff	16 (55.2)	13 (43.3)			13 (43.3)	13 (43.3)			16 (55.2)	13 (43.3)		
ff	12 (41.4)	8 (26.7)			8 (26.7)	12 (40.0)			12 (41.4)	12 (40.0)		
Recesivni model (ff vs. FF+Ff)												
ff	12 (41.4)	8(26.7)	0.233	0.358	8(26.7)	12 (40.0)	0.273	0.412	12 (41.4)	12 (40.0)	0.914	0.875
FF+Ff	17 (58.6)	22 (73.3)			22 (73.3)	18 (60.0)			17 (58.6)	18 (60.0)		
Dominantni model (FF vs. Ff+ff)												
FF	1 (3.4)	9 (30.0)	FE 0.012*	N/P	9 (30.0)	5 (16.7)	0.222	0.360	1 (3.4)	5 (16.7)	FE 0.195	N/P
Ff+ff	28 (96.6)	21 (70.0)			21 (70.0)	25 (83.3)			28 (96.6)	25 (83.3)		
Alel												
F	18 (31.0)	31 (51.6)	0.023	0.037*	31 (51.6)	23 (38.3)	0.142	0.120	18 (31.0)	23 (38.3)	0.405	0.523
f	40 (69.0)	29 (48.3)			29 (48.3)	37 (61.7)			40 (69.0)	37 (61.7)		

Kratice: N-broj; N/P – nije primjenjivo; * χ^2 test/ Fisher's exact test (^{FE}P). Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

Distribucija genotipova FokI polimorfizma u odnosu na razine vitamina D

Rezultati potencijalne veze između razina vitamina D i genotipa FF, Ff ili ff FokI polimorfizma, kod pretilosti i astme, prikazani su u tablici 17 te na slici 11. Analizom nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između skupine djece s optimalnim razinama te skupine djece sa sniženim vrijednostima vitamina D, ni u jednoj od ispitivanih grupa pacijenata. **Veći postotak djece sa sniženim razinama vitamina D kod djece s pretilošću uočen je podjednako za Ff (50%) i ff genotip (50%), kod astmatičara za Ff (39%) i FF (39%) genotip, u odnosu na ff genotip (23%) te kod pretilih astmatičara za ff genotip (50%), u odnosu na Ff (42%) i FF genotip (8%).**

Tablica 17. Distribucija genotipova FokI polimorfizma u grupama pacijenata sa sniženim i optimalnim razinama vitamina D.

Genotip	Optimalne razine vitamina D N(%)	Snižene razine vitamina D (manjak + deficijencija) N(%)	P vrijednost*
Pretilost			
FF	1 (7.7)	0 (0)	0.451
Ff	8 (61.5)	8 (50.0)	
ff	4 (30.8)	8 (50.0)	
Astma			
FF	4 (23.5)	5 (38.5)	0.720
Ff	8 (47.0)	5 (38.5)	
ff	5 (29.4)	3 (23.1)	
Astma + Pretilost			
FF	4 (22.2)	1 (8.3)	0.555
Ff	8 (44.4)	5 (41.7)	
ff	6 (33.3)	6 (50.0)	

Kratice: N-broj; *Fisher's exact test. Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

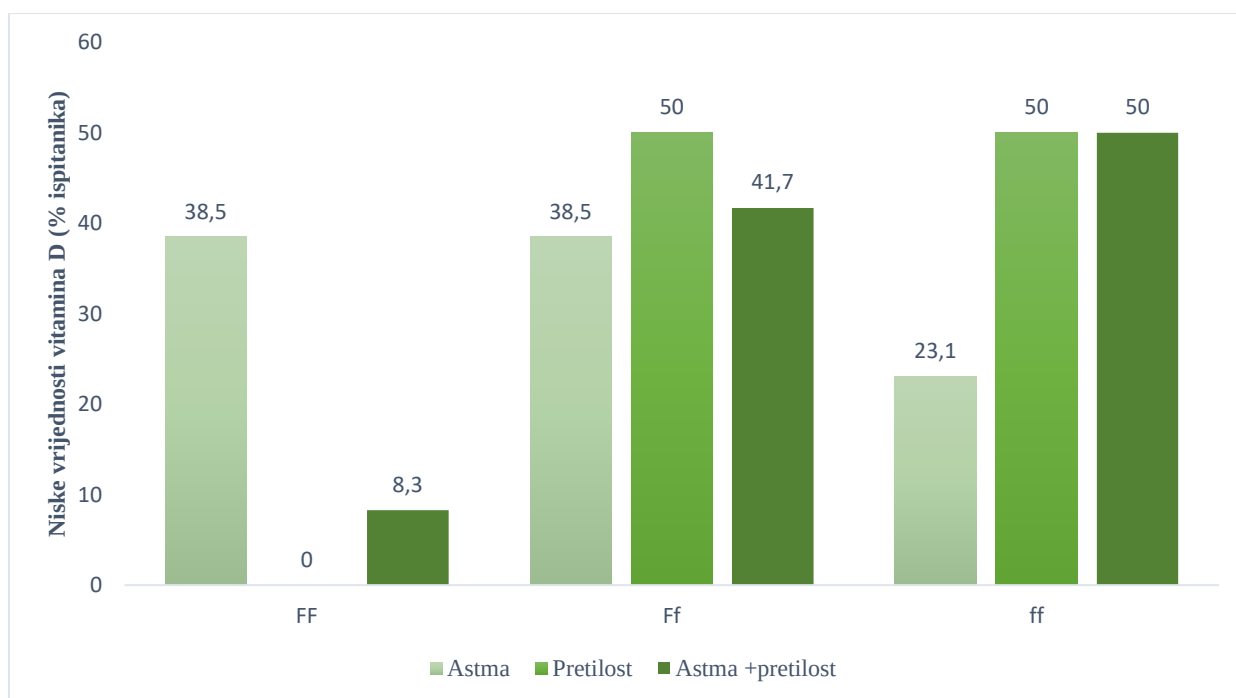
Uzimajući u obzir samo pacijente sa sniženim vitaminom D, **ustanovljena je značajna razlika u distribuciji genotipova između pretilih djece te djece s astmom (p=0.022).** Naime, **veći postotak djece sa sniženim razinama vitamina D kod djece s pretilošću uočen je za ff (50%) i Ff genotip (50%), dok je kod astmatičara veći postotak zabilježen za FF (39%) i Ff (39%) genotip.** Kod **pretilih astmatičara najveći je postotak djece sa sniženim razinama vitamina D uočen za ff genotip (50%),** a uspoređujući tu grupu s ostale dvije skupine nisu uočene značajne razlike (Tablica 18). Između kontrolne skupine i djece s pretilošću i/ili astmom također nisu detektirane značajne razlike.

Tablica 18. Usporedba distribucije genotipova FokI polimorfizma kod djece s pretilošću i/ili astmom te sniženim razinama vitamina D.

Genotip	Broj pacijenata sa sniženim razinama vitamina D								
	Pretilost N (%)	Astma N (%)	*P	Astma N (%)	Astma i pretilost N (%)	*P	Pretilost N (%)	Astma i pretilost N (%)	*P
FF	0 (0)	5 (38.5)	0.022*	5 (38.5)	1 (8.3)	0.210	0 (0)	1 (8.3)	0.685
Ff	8 (50.0)	5 (38.5)		5 (38.5)	5 (41.7)		8 (50.0)	5 (41.7)	
ff	8 (50.0)	3 (23.1)		3 (23.1)	6 (50.0)		8 (50.0)	6 (50.0)	

Kratice: N-broj; N/P – nije primjenjivo

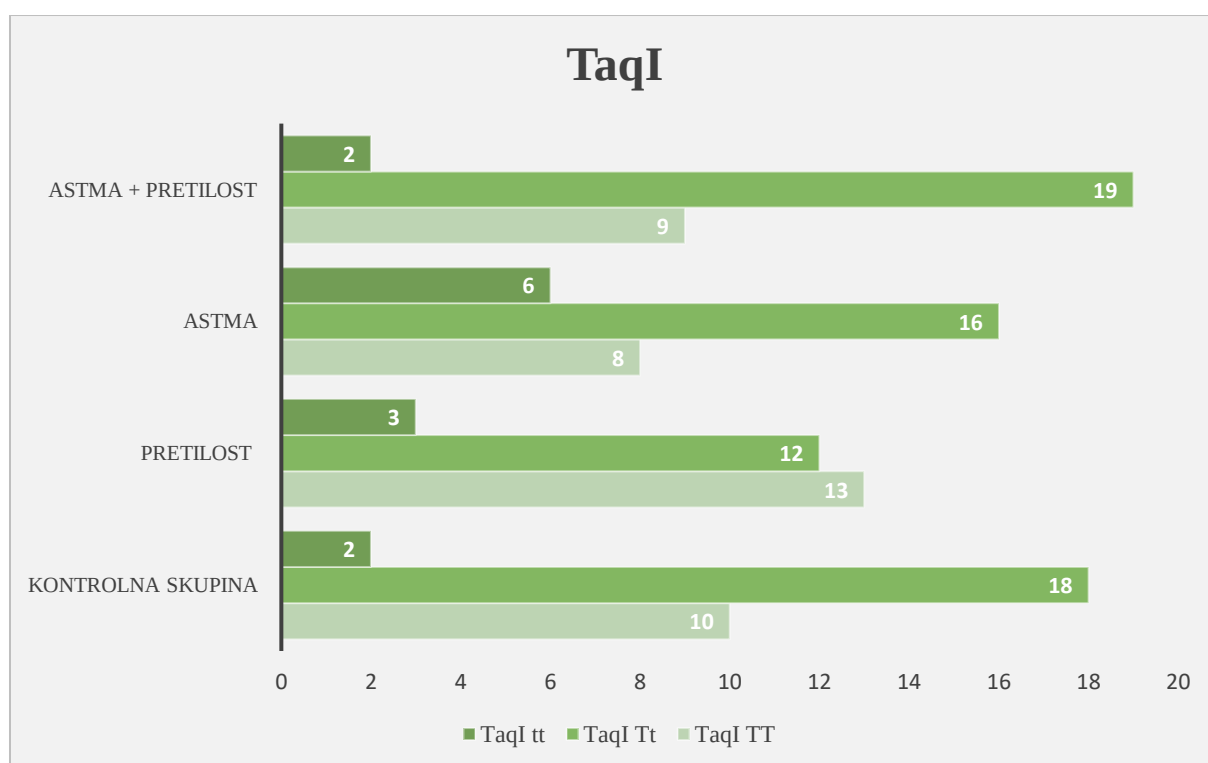
* Fisher's exact test. Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01



Slika 11. Distribucija genotipova FokI polimorfizma kod djece s pretilošću i/ili astmom te sniženim razinama vitamina D.

4.3.2. *TaqI* (rs 731236)

Referentni alel za *TaqI* polimorfizam u grafičkim je prikazima označen kao T, pri čemu su homozigoti označeni kao TT. Ukoliko je došlo do tranzicijske supstitucije (A>G), izmijenjeni alel u grafičkim je prikazima označen kao t, pri čemu su homozigoti označeni kao tt. Heterozigoti su u grafičkim prikazima označeni su kao Tt. Distribucija genotipova *TaqI* VDR polimorfizma između ispitivanih grupa prikazana je na slici 12.



Slika 12. Učestalost genotipova za *TaqI* VDR polimorfizam između grupa ispitanika. Referentni alel za *TaqI* polimorfizam je označen kao T (homozigoti – TT). Izmijenjeni alel je označen kao t (homozigoti – tt). Heterozigoti su označeni kao Tt.

Usporedba grupe zdrave djece i djece s pretilošću i/ili astmom

Usporedbom grupa djece s pretilošću i/ili astmom nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela T ili t za *TaqI* polimorfizam, kao ni u recesivnom ili dominantnom genskom modelu (Tablica 19). Ipak, distribucija genotipova *TaqI* VDR polimorfizma prikazana na slici 12, prikazuje kako je **kod djece s pretilošću detektirana veća učestalost TT (46%) i Tt genotipa (43%),** u odnosu na tt genotip (11%), dok je **kod astmatičara bio zabilježen veći broj heterozigota (53%),** u odnosu na TT(27%) i tt (20%) genotip. **Kod pretilih astmatičara najveća zastupljenost uočena je također za heterozigote**

(63%), u usporedbi s TT(30%) i tt (7%) genotipom, što je istovjetno **kontrolnoj skupini** gdje je također bio **najzastupljeniji Tt genotip (60%)**.

Dodatnom usporedbom grupa ispitanika s pretilošću i grupa astmatičara te obje te grupe sa skupinom pretilih astmatičara nisu primjećene statistički značajne razlike između navedenih grupa ispitanika, ni u genotipu ni u frekvenciji alela T ili t za TaqI polimorfizam. Također, grupe se međusobno nisu značajno razlikovale u recesivnom ili dominantnom genskom modelu (Tablica 20).

Tablica 19. Usporedba frekvencije genotipova i alela za TaqI VDR polimorfizam između kontrolne skupine i ispitanika s pretilošću i/ili astmom.

Taqi (RS731236) A/G	Kontrola N (%)	Pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Kontrola N (%)	Astma N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Kontrola N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)
Genotip												
TT	10 (33.3)	13 (46.4)	^{FE} 0.494	N/P	10 (33.3)	8 (26.7)			10 (33.3)	9 (30)		
Tt	18(60)	12 (42.9)			18(60)	16 (53.3)			18(60)	19 (63.3)		
tt	2 (6.7)	3 (10.7)			2 (6.7)	6 (20)			2 (6.7)	2 (6.7)		
Recesivni model (tt vs. TT+Tt)												
tt	2 (6.7)	3 (10.7)	^{FE} 0.665	N/P	2 (6.7)	6 (20)	^{FE} 0.254	N/P	2 (6.7)	2 (7)	^{FE} 1	N/P
TT+Tt	28 (93.3)	25 (89.3)			28 (93.3)	24 (80)			28 (93.3)	28 (93)		
Dominantni model (TT vs. TT+tt)												
TT	10 (33.3)	13 (46.4)	0.308	0.453	10 (33.3)	8 (26.7)	0.573	0.778	10 (33.3)	9 (30)	0.781	1
Tt+tt	20 (66.7)	15 (53.6)			20 (66.7)	22 (73.3)			20 (66.7)	21 (70)		
Alel												
T	38 (63.3)	38 (67.9)	0.608	0.751	38 (63.3)	32 (53.3)	0.267	0.355	38 (63.3)	37 (62)	0.850	1
t	22 (36.7)	18 (32.1)			22 (36.7)	28 (46.7)			22 (36.7)	23 (38)		

Kratice: N-broj; N/P – nije primjenjivo; * χ^2 test/ Fisher's exact test (^{FE}P). Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

Tablica 20. Usporedba frekvencije genotipova i alela za TaqI VDR polimorfizam između skupine ispitanika s pretilošću i/ili astmom.

Taqi (RS731236) A/G	Pretilost N (%)	Astma N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Astma N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Pretilost N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)
Genotip												
TT	13 (46.4)	8 (26.7)	^{FE} 0.289	N/P	8 (26.7)	9 (30)	^{FE} 0.316	N/P	13 (46.4)	9 (30)	^{FE} 0.283	N/P
Tt	12 (42.9)	16 (53.3)			16 (53.3)	19 (63.3)			12 (42.9)	19 (63)		
tt	3 (10.7)	6 (20)			6 (20)	2 (6.7)			3 (10.7)	2 (7)		
Recesivni model (tt vs. TT+Tt)												
tt	3 (10.7)	6 (20)	^{FE} 0.473	N/P	6 (20)	2 (6.7)	^{FE} 0.254	N/P	3 (10.7)	2 (7)	^{FE} 0.665	N/P
TT+Tt	25 (89.3)	24 (80)			24 (80)	28 (93.3)			25 (89.3)	28 (93)		
Dominantni model (TT vs. TT+tt)												
TT	13 (46.4)	8 (26.7)	0.118	0.197	8 (26.7)	9 (30)	0.774	1	13 (46.4)	9 (30)	0.198	0.309
Tt+tt	15 (53.6)	22 (73.3)			22 (73.3)	21 (70)			15 (53.6)	21 (70)		
Alel												
T	38 (67.9)	32 (53.3)	0.110	0.159	32 (53.3)	37 (61.7)	0.356	0.460	38 (67.9)	37 (62)	0.486	0.615
t	18 (32.1)	28 (46.7)			28 (46.7)	23 (38.3)			18 (32.1)	23 (38)		

Kratice: N-broj; N/P – nije primjenjivo; * χ^2 test/ Fisher's exact test (^{FE}P). Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

Distribucija genotipova TaqI polimorfizma u odnosu na razine vitamina D

Rezultati potencijalne veze između razina vitamina D i genotipa TT, Tt ili tt za različite grupe pacijenata prikazani su u tablici 21 te na slici 13. Analizom nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između skupine djece s optimalnim razinama te skupine djece sa sniženim vrijednostima vitamina D, ni u jednoj od ispitivanih grupa pacijenata. **Veći postotak djece sa sniženim razinama vitamina D kod djece s pretilošću uočen je za TT (40%) i Tt genotip (47%), u odnosu na tt genotip (13%), kod astmatičara za Tt genotip (64%), u odnosu na TT (18%) i tt genotip (18%) te kod pretilih astmatičara za Tt genotip (77%), u odnosu na TT (23%) i tt genotip (0%) (Tablica 21).**

Tablica 21. Distribucija genotipova TaqI polimorfizma u grupama ispitanika sa sniženim i optimalnim razinama vitamina D

Genotip	Optimalne razine vitamina D N(%)	Snižene razine vitamina D (manjak+ deficijencija) N(%)	P vrijednost*
<i>Pretilost</i>			
TT	7 (53.8)	6 (40)	0.873
Tt	5 (38.5)	7 (46.7)	
tt	1 (7.7)	2 (13.3)	
<i>Astma</i>			
TT	6 (31.6)	2 (18.2)	0.787
Tt	9 (47.4)	7 (63.6)	
tt	4 (21.1)	2 (18.2)	
<i>Astma + Pretilost</i>			
TT	6 (35.3)	3 (23.1)	0.200
Tt	9 (52.9)	10 (76.9)	
tt	2 (11.8)	0 (0)	

Kratice: N-broj

*Fisher's exact test. Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

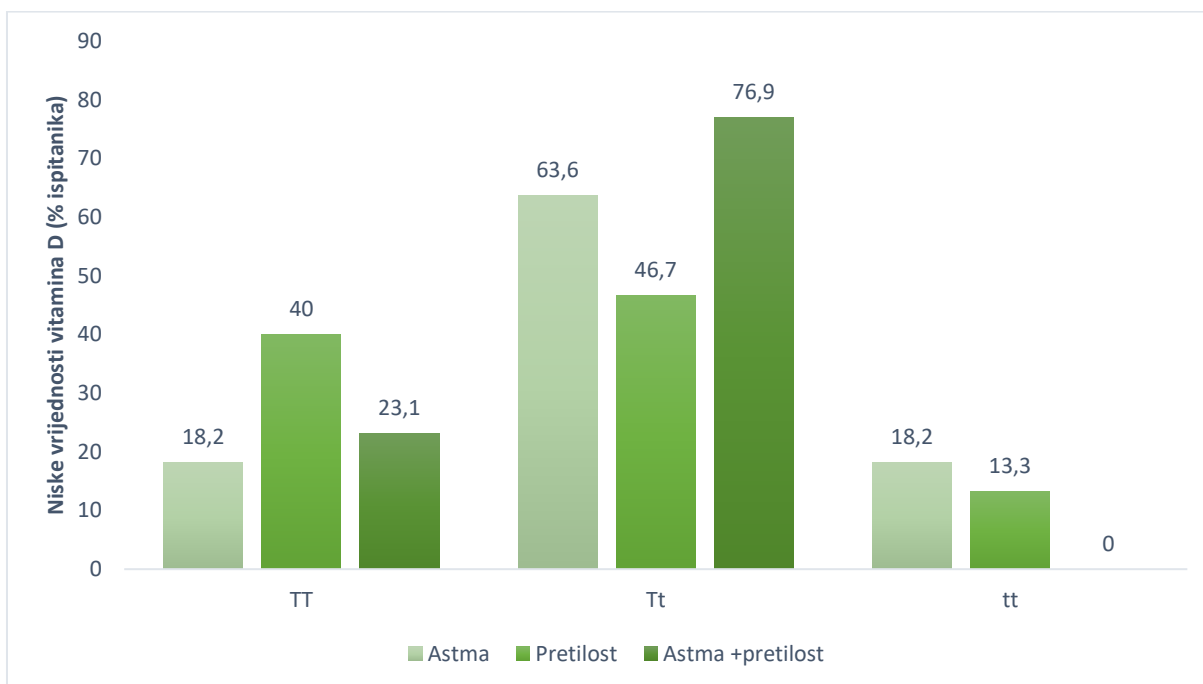
Analizirajući samo rezultate sniženog vitamina D, nisu utvrđene statistički značajne razlike između djece s pretilošću i/ili astmom. (Tablica 22). Između kontrolne skupine i djece s pretilošću i/ili astmom također nisu detektirane značajne razlike.

Tablica 22. Usporedba grupa pacijenata sa sniženim razinama vitamina D u distribuciji genotipova TaqI polimorfizma kod pretilosti i/ili astme

TaqI (RS7312 36) A/G	Pretilost N (%)	Astma N (%)	*P	Astma N (%)	Astma i pretilost N (%)	*P	Pretilost N (%)	Astma i pretilost N (%)	*P
Genotip									
TT	6 (40)	2 (18.2)	0.552	2 (18.2)	3 (23.1)	0.357	6 (40)	3 (23.1)	0.257
Tt	7 (46.7)	7 (63.6)		7 (63.6)	10 (76.9)		7 (46.7)	10 (76.9)	
tt	2 (13.3)	2 (18.2)		2 (18.2)	0 (0)		2 (13.3)	0 (0)	

Kratice: N-broj; N/P – nije primjenjivo

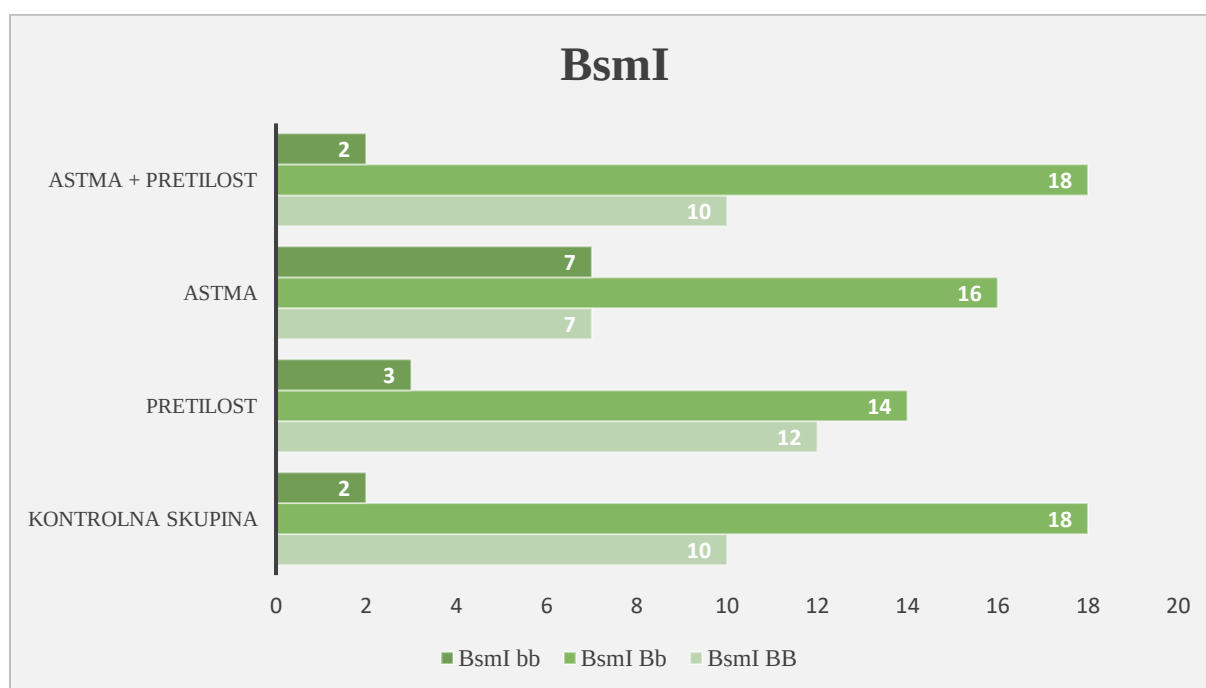
* Fisher's exact test. Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01



Slika 13. Distribucija genotipova TaqI polimorfizma kod djece s pretilošću i/ili astmom te sniženim razinama vitamina D.

4.3.3. BsmI

Referentni alel za BsmI polimorfizam u grafičkim je prikazima označen kao B, pri čemu su homozigoti označeni kao BB. Ukoliko je došlo do tranzicijske supstitucije (C>T), izmijenjeni alel u grafičkim je prikazima označen kao b, pri čemu su homozigoti označeni kao bb. Heterozigoti su u grafičkim prikazima označeni su kao Bb. Distribucija genotipova BsmI VDR polimorfizma između ispitivanih grupa prikazana je na slici 14.



Slika 14. Učestalost genotipova za BsmI VDR polimorfizam između grupa ispitanika. Referentni alel za BsmI polimorfizam označen je kao B (homozigoti – BB). Izmijenjeni alel je označen kao b (homozigoti – bb). Heterozigoti su označeni kao Bb.

Usporedba grupe zdrave djece i djece s pretilošću i /ili astmom

Dobivenim rezultatima nije utvrđena statistički značajna razlika između zdrave djece i djece s pretilošću i/ili astmom ni u genotipu ni u učestalosti alela B ili b za BsmI polimorfizam, kao ni za recesivni i dominantni genski model (Tablica 23). Ipak, **kod djece s pretilošću je detektirana veća učestalost BB (41%) i Bb genotipa (48%) u odnosu na bb genotip (10%)**, dok je kod **astmatičara najveća zastupljenost bila za Bb genotip (53%)**, u usporedbi s BB (23%) te bb (23%) genotipom. **Kod pretilih astmatičara je također najveća bila učestalost Bb genotipa (60%)**, u usporedbi s BB (33%) te bb (7%) genotipom, kao i u **kontrolnoj**

skupini gdje su u najvećem broju detektirani heterozigoti s Bb genotipom (60%) (Slika 14).

Dodatno su se usporedile grupe ispitanika s pretilošću i/ili astmom, a analizom rezultata nisu primjećene statistički značajne razlike, ni u genotipu ni u frekvenciji alela B ili b. Također, grupe se međusobno nisu značajno razlikovale u recesivnom ili dominantnom genskom modelu. Ipak **p vrijednost dobivena usporedbom grupe ispitanika s pretilošću i grupe astmatičara ($P=0.129$) te grupe astmatičara i djece s kombinacijom astme i pretilosti ($p=0.108$) ukazuje na potencijalni trend, s većom učestalošću referentnog alela B kod ipitanika s pretilošću i pretilih astmatičara (Tablica 24).**

Tablica 23. Usporedba frekvencije genotipova i alela za BsmI VDR polimorfizam između kontrolne skupine i ispitanika s pretilošću i/ili astmom.

BsmI (RS1544410) T/C	Kontrola N (%)	Pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Kontrola N (%)	Astma N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Kontrola N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)
Genotip												
BB	10 (33.3)	12 (41.4)	FE0.671	N/P	10 (33.3)	7 (23.3)	FE 0.202	N/P	10 (33.3)	10 (33)	FE1	N/P
Bb	18(60)	14 (48.3)			18(60)	16 (53.3)			18(60)	18(60)		
bb	2 (6.7)	3 (10.3)			2 (6.7)	7 (23.3)			2 (6.7)	2 (7)		
Recesivni model (bb vs. BB+Bb)												
bb	2 (6.7)	3 (10.3)	FE 0.671	N/P	2 (6.7)	7 (23.3)	FE 0.146	N/P	2 (6.7)	2 (7)	FE1	N/P
BB+Bb	28 (93.3)	26 (89.7)			28 (93.3)	23 (76.7)			28 (93.3)	28 (93)		
Dominantni model (BB vs. Bb+bb)												
BB	10 (33.3)	12 (41.4)	0.523	0.712	10 (33.3)	7 (23.3)	0.390	0.567	10 (33.3)	10 (33)	1	0.784
Bb+bb	20 (66.7)	17 (58.6)			20 (66.7)	23 (76.7)			20 (66.7)	20 (67)		
Alel												
B	38 (63.3)	38 (65.5)	0.804	0.956	38 (63.3)	30 (50.0)	0.141	0.197	38 (63.3)	38 (63)	1	0.850
b	22 (36.7)	20 (34.5)			22 (36.7)	30 (50.0)			22 (36.7)	22 (37)		

Kratice: N-broj; N/P – nije primjenjivo; * χ^2 test; Fisher's exact test (^{FE}P). Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

Tablica 24. Usporedba frekvencije genotipova i alela za BsmI VDR polimorfizam između skupine ispitanika s pretilošću i/ili astmom.

BsmI (RS1544410) T/C	Pretilost N (%)	Astma N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Astma N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)	Pretilost N (%)	Astma i pretilost N (%)	P vrijednost*	P vrijednost (Yates correction)
Genotip												
BB	12 (41.4)	7 (23.3)	FE0.217	N/A	7 (23.3)	10 (33.3)	FE 0.202	N/A	12 (41.4)	10 (33)	FE0.671	N/A
Bb	14 (48.3)	16 (53.3)			16 (53.3)	18(60)			14 (48.3)	18(60)		
bb	3 (10.3)	7 (23.3)			7 (23.3)	2 (6.7)			3 (10.3)	2 (7)		
Recesivni model (bb vs. BB+Bb)												
bb	3 (10.3)	7 (23.3)	FE 0.299	N/A	7 (23.3)	2 (6.7)	FE 0.146	N/A	3 (10.3)	2 (7)	FE 0.671	N/A
BB+Bb	26 (89.7)	23 (76.7)			23 (76.7)	28 (93.3)			26 (89.7)	28 (93)		
Dominantni model (BB vs. Bb+bb)												
BB	12 (41.4)	7 (23.3)	0.138	0.229	7 (23.3)	10 (33.3)	0.391	0.567	12 (41.4)	10 (33)	0.523	0.712
Bb+bb	17 (58.6)	23 (76.7)			23 (76.7)	20 (66.7)			17 (58.6)	20 (67)		
Alel												
B	38 (65.5)	30 (50.0)	0.088	0.129	30 (50.0)	38 (63.3)	0.141	0.108	38 (65.5)	38 (63)	0.804	0.956
b	20 (34.5)	30 (50.0)			30 (50.0)	22 (36.7)			20 (34.5)	22 (37)		

Kratice: N-broj; N/P – nije primjenjivo; * χ^2 test/ Fisher's exact test (^{FE}P). Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

Distribucija genotipova BsmI polimorfizma u odnosu na razine vitamina D

Rezultati potencijalne veze između razina vitamina D i genotipa BB, Bb ili bb BsmI polimorfizma za djecu s pretilošću i ili astmom prikazani su u tablici 25 te na slici 15. Analizom nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između skupine djece s optimalnim razinama te skupine djece sa sniženim vrijednostima vitamina D, ni u jednoj od ispitivanih grupa pacijenata. **Veći postotak djece sa sniženim razinama vitamina D kod djece s pretilošću uočen je za BB (44%) i Bb (44%), u odnosu na bb (13%) genotip, kod astmatičara za Bb (62%), u odnosu na BB (16%) i bb (23%) genotip te kod pretilih astmatičara za Bb genotip (75%), u odnosu na BB (25%) i bb genotip (0%) (Tablica 25).**

Tablica 25. Distribucija genotipova BsmI polimorfizma u grupama pacijenata sa sniženim i optimalnim razinama vitamina D.

Genotip	Optimalne razine vitamina D N(%)	Snižene razine vitamina D (manjak + deficijencija) N(%)	P vrijednost*
Pretilost			
BB	5 (38.5)	7 (43.8)	0.877
Bb	7 (53.8)	7 (43.8)	
bb	1 (7.7)	2 (12.5)	
Astma			
BB	5 (29.4)	2 (15.4)	0.719
Bb	8 (47.1)	8 (61.5)	
bb	4 (23.5)	3 (23.1)	
Astma + Pretilost			
BB	7 (38.9)	3 (25.0)	0.417
Bb	9 (50.0)	9 (75.0)	
bb	2 (11.1)	0 (0)	

Kratice: N-broj; *Fisher's exact test. Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01

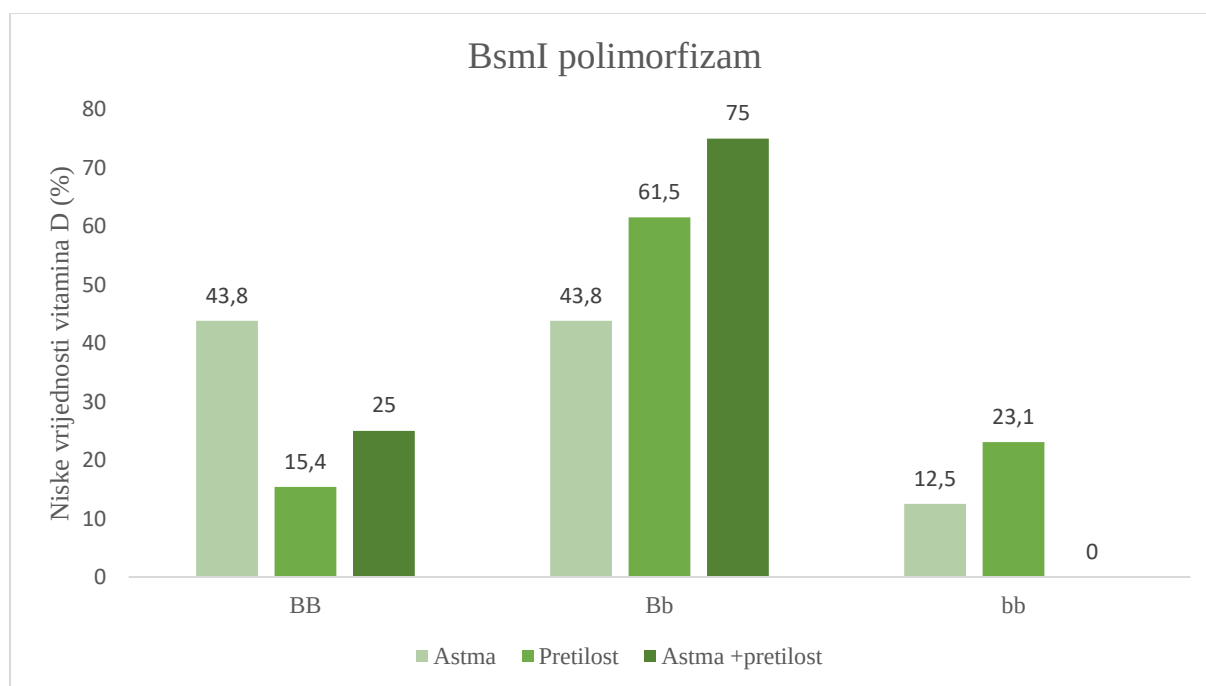
Usporedbom distribucije genotipova između grupe astmatičara, pretilih ispitanika te pretilih astmatičara sa sniženim razinama vitamina D, nisu uočene značajne razlike između skupina. (Tablica 26). Između kontrolne skupine i djece s pretilošću i/ili astmom također nisu detektirane značajne razlike.

Tablica 26. Usporedba grupa pacijenata sa sniženim razinama vitamina D u distribuciji genotipova BsmI polimorfizma kod djece s pretilošću i/ili astmom.

BsmI (RS15444 10) T/C	Pretilost N (%)	Astma N (%)	*P	Astma N (%)	Astma i pretilost N (%)	*P	Pretilost N (%)	Astma i pretilost N (%)	*P
Genotip									
BB	7 (43.8)	2 (15.4)	0.323	2 (15.4)	3 (25.0)	0.285	7 (43.8)	3 (25.0)	0.253
Bb	7 (43.8)	8 (61.5)		8 (61.5)	9 (75.0)		7 (43.8)	9 (75.0)	
bb	2 (12.5)	3 (23.1)		3 (23.1)	0 (0)		2 (12.5)	0 (0)	

Kratice: N-broj

* Fisher's exact test. Statistički značajno: *p < 0.05; ** p < 0.01



Slika 15. Učestalost genotipova BsmI polimorfizma kod djece s pretilošću i/ili astmom uz snižene razine vitamina D.

4.3.4. *ApaI*

Referentni alel za *ApaI* polimorfizam u grafičkim je prikazima označen kao A, pri čemu su homozigoti označeni kao AA. Ukoliko je došlo do tranzicijske supstitucije (C>A), izmijenjeni alel u grafičkim je prikazima označen kao a, pri čemu su homozigoti označeni kao aa. Heterozigoti su u grafičkim prikazima označeni su kao Aa. Distribucija genotipova *ApaI* VDR polimorfizma između ispitivanih grupa prikazana je u tablici 22.

Tablica 27. Distribucija genotipova i alela za *ApaI* VDR polimorfizam između ispitivanih skupina ispitanika

<i>ApaI</i> (RS7975232) A/C	Kontrolna skupina N (%)	Pretilost N (%)	Astma N (%)	Astma + Pretilost N (%)
Genotip				
AA	N/A	N/A	N/A	N/A
Aa	N/A	N/A	N/A	N/A
aa	5 (16.7)	8 (26.7)	3 (10)	4 (13.3)

Kratice: N-broj; N/A-not available

U svim grupama je za gotovo sve uzorke dobiven negativan rezultat, koji je ponavljanjem analize potvrđen s istim očitavanjem za sve uzorke. **Analizom je u svim ispitivanim grupama potvrđena samo prisutnost aa genotipa, s najvećim postotkom (27%) kod pretile djece, u odnosu na 10% kod astmatičara, 13% kod pretilih astmatičara te 17% u kontrolnoj skupini.**

4.4. Mjerenje plućne funkcije i FeNO

Rezultati provedene spirometrije prikazani su u tablici 28, a izmjerene vrijednosti izražene su kao postotak predviđene vrijednosti prilagođene za dob, spol, težinu i visinu. Između definiranih grupa nije bilo statički značajnih razlika za izmjerene parametre plućne funkcije. Srednje vrijednosti postotaka FEV1, FVC te FEV1/FVC omjera bile su unutar optimalnih raspona u svim grupama, bez naznaka teške astme u vrijeme mjerenja. Međutim, **srednje razine dušikovog oksida u izdahu (FeNO), koje ukazuju na eozinofilnu upalu dišnih putova, bile su značajno povišene u skupini astmatičara (23.63 ppb) i pretilih astmatičara (22.77 ppb) u odnosu na djecu s pretilošću (14.10 ppb) (P=0.038; p=0.021, tim redom) te kod pretilih astmatičara (22.77ppb) u odnosu na kontrolnu skupinu (12.38 ppb) (P =0.040)** (Slika 16, tablica 29). Izmjerene vrijednosti plućne funkcije i FeNO prikazane su u Prilogu 1.

Tablica 28. Rezultati spirometrije.

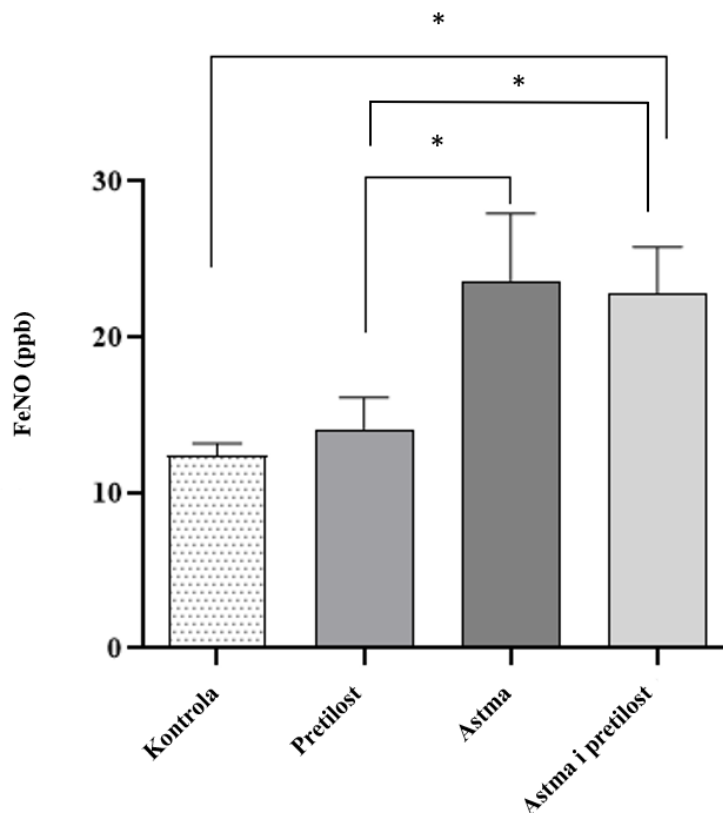
Parametar	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma + pretilost
FEV1 (%) predicted, SV ± SD	97.54 ± 13.84	103.86 ± 12.83	100.21 ± 15.65	100.38 ± 12.17
FVC (%) predicted, SV ± SD	87.23 ± 10.73	95.11 ± 12.91	94.71 ± 13.43	95.89 ± 12.80
FEV1/FVC predicted, SV ± SD	111.86 ± 8.4	109.63 ± 7.7	105.96 ± 10.93	105 ± 6.44

Kratice: SV- srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; FEV1 - Forced expiratory volume in 1 second, FVC- Forced vital capacity

Tablica 29. Usporedba izmjerenih FeNO vrijednosti između grupa ispitanika.

	Kontrola	Pretilost	Kontrola	Astma	Kontrola	Pretilost +Astma
FeNO (ppb); SV± SD	12.38 ± 3.98	14.10 ± 10.85	12.38 ± 3.98	23.63 ± 23.53	12.38 ± 3.98	22.77 ± 16.60
P vrijednost*	0.702		0.152		0.040*	
	Pretilost	Astma	Pretilost	Pretilost +Astma	Astma	Pretilost +Astma
FeNO (ppb); SV± SD	14.10 ± 10.85	23.63 ± 23.53	14.10 ± 10.85	22.77 ± 16.60	23.63 ± 23.53	22.77 ± 16.60
P vrijednost*	0.038*		0.021*		0.783	

Kratice: SV- srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; ppb – parts per billion, FeNO - Fractional Exhaled Nitric Oxide (Frakcijski izdahnuti dušikov oksid); *Mann Whitney test (*p < 0.05, ** p < 0.01)



Slika 16. Usporedba izmjerenih vrijednosti FeNO između testiranih grupa ispitanika. Usporedbe su napravljene pomoću Mann Whitney testa.

Analiza potencijalne razlike između izmjerenih FeNO vrijednosti između ispitanika s optimalnim i niskim razinama vitamina D nije pokazala značajnu razliku ni u jednoj od pojedinačno testiranih grupa, unatoč nešto višim FeNO vrijednostima kod ispitanika sa niskim vitaminom D kod pretilo djece, djece s astmom i pretilošću te kontrolnoj skupini (tablica 30).

Tablica 30. Usporedba izmjerenih vrijednosti FeNO između ispitanika s optimalnim i sniženim razinama vitamina D unutar pojedinačnih skupina.

	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma + Pretilost
FeNO (ppb), SV ± SD				
Optimalan vitamin D (> 20 ug/L)	12 ± 4.7	13.2 ± 12.09	24.06 ± 20.84	20.84 ± 16.8
Nizak vitamin D (< 20 ug/L)	14.1 ± 3.8	15.07 ± 9.7	16.4 ± 10.1	26.09 ± 16.6
P vrijednost*	0.172	0.332	0.523	0.333

Kratice: SV- srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; ppb – parts per billion; FeNO - Fractional Exhaled Nitric Oxide (Frakcijski izdahnuti dušikov oksid); * Mann Whitney test (*p < 0.05; ** p < 0.01).

Usporedbom rezultata izmjerenih samo kod djece sa sniženim razinama vitamina D, nisu detektirane značajne razlike u izmjerenim FeNO vrijednostima između grupa, iako **p vrijednost dobivena usporedbom pretilih astmatičara s kontrolnom grupom (p=0.069), djecom s pretilošću (p=0.077) te astmatičarima (p=0.115) sugerira potencijalni trend, ističući veće izmjerene FeNO vrijednosti kod pretilih astmatičara sa sniženim vitaminom D.** (Tablica 31).

Tablica 31. Usporedba izmjerenih vrijednosti FeNO između grupa ispitanika sa sniženim razinama vitamina D.

Nizak vitamin D (< 20 ug/L)	Kontrola	Pretilost	Kontrola	Astma	Kontrola	Pretilost +Astma
FeNO (ppb), SV ± SD	14.1 ± 3.8	15.07 ± 9.7	14.1 ± 3.8	16.4 ± 10.1	14.1 ± 3.8	26.09 ± 16.6
P vrijednost*	0.806		0.725		0.069	
Nizak vitamin D (< 20 ug/L)	Pretilost	Astma	Pretilost	Pretilost +Astma	Astma	Pretilost +Astma
FeNO (ppb), SV ± SD	15.07 ± 9.7	16.4 ± 10.1	15.07 ± 9.7	26.09 ± 16.6	16.4 ± 10.1	26.09 ± 16.6
P vrijednost*	0.557		0.077		0.115	

Kratice: SV- srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; ppb – parts per billion; FeNO - Fractional Exhaled Nitric Oxide (Frakcijski izdahnuti dušikov oksid); * Mann Whitney test, *p < 0.05; ** p < 0.01

4.5. Adiponektin

Analizom serumskog adiponektina detektirana je njegova niža koncentracija u grupi djece s pretilošću te grupi pretilih astmatičara, u odnosu na kontrolnu skupinu te astmatičare s regularnom tjelesnom težinom (Tablica 32).

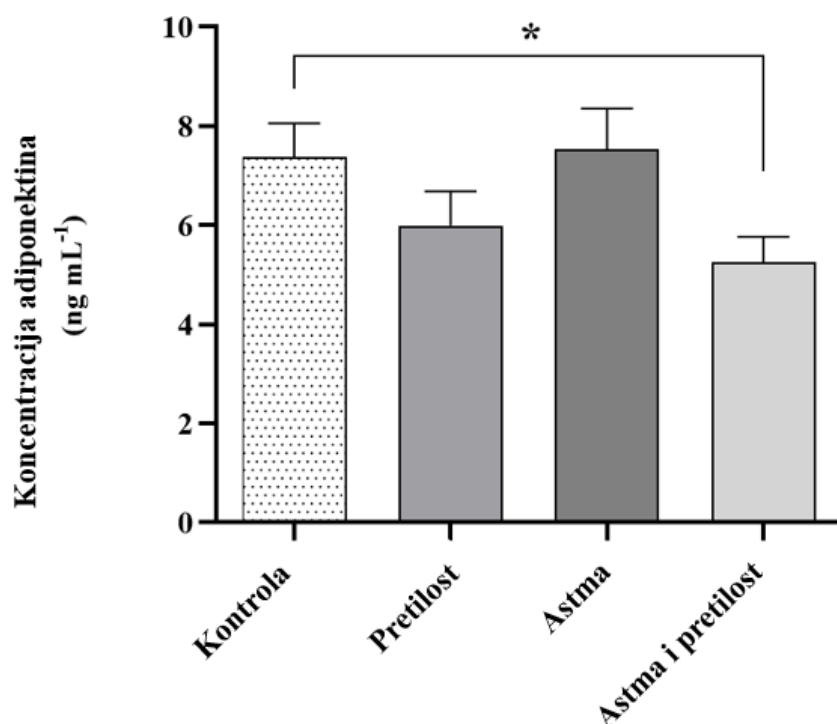
Statističkom obradom uočena je značajna razlika između pretilih astmatičara (5,3 ng/mL) i kontrolne skupine (7,1 ng/mL) ($p=0.024$) (Slika 17). Osim toga, razlika u razini adiponektina između zdrave i pretila djece ($p=0.100$) te astmatičara i pretilih astmatičara ($p=0.065$) sugerira potencijalni trend. Nisu uočene statistički značajne razlike u razinama adiponektina između kontrolne skupine ispitanika i astmatičara. Rezultati izmjerenih vrijednosti adiponektina nalaze se u Prilogu 4.

Tablica 32. Usporedba izmjerenih koncentracija adiponektina između ispitivanih skupina.

	Kontrola	Pretilost	Kontrola	Astma	Kontrola	Pretilost +Astma
Adiponektin (ng/ml), SV $\pm$ SD	7.1 $\pm$ 3.8	6.0 $\pm$ 3.8	7.1 $\pm$ 3.8	7.5 $\pm$ 4.5	7.1 $\pm$ 3.8	5.3 $\pm$ 2.8
P vrijednost*	0.100		0.792		0.024*	
	Pretilost	Astma	Pretilost	Pretilost +Astma	Astma	Pretilost +Astma
Adiponektin (ng/ml), SV $\pm$ SD	6.0 $\pm$ 3.8	7.5 $\pm$ 4.5	6.0 $\pm$ 3.8	5.3 $\pm$ 2.8	7.5 $\pm$ 4.5	5.3 $\pm$ 2.8
P vrijednost*	0.188		0.662		0.065	

Kratice: SV – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija

* Mann Whitney test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$



Slika 17. Usporedba koncentracije serumskog adiponektina između ispitivanih skupina djece. Usporedbe su napravljene pomoću Mann Whitney testa.

Rezultati potencijalne veze između razina vitamina D i nižih razina adiponektina prikazani su u tablici 33. Unatoč nedostatku statistički značajne razlike u koncentraciji adiponektina između djece s otpimalnim i niskim vitaminom D, **u grupi pretilih astmatičara vidljiva je najizraženija razlika.**

Tablica 33. Razlike u razini adiponektina između djece s optimalnim i sniženim razinama vitamina D

	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma + Pretilost
Adiponektin (ng/ml), SV ± SD				
Optimalan vitamin D (> 20 ug/L)	7.65 ± 3.9	5.75 ± 3.3	7.45 ± 4.2	5.85 ± 2.9
Nizak vitamin D (< 20 ug/L)	6.98 ± 3.3	6.20 ± 4.3	7.63 ± 4.9	4.38 ± 2.5
P vrijednost*	0.871	0.917	0.884	0.117

Kratice: SV – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija

*Mann Whitney test, *p < 0.05; ** p < 0.01

Usporedbom grupa djece sa sniženim razinama vitamina D, detektirane su značajne razlike u koncentraciji adiponektina između kontrolne skupine (6.98 ng/ml) i grupe pretilih astmatičara (4.38 (p=0.014), dok je između astmatičara te astmatičara s pretilošću vidljiv potencijalni trend (p=0.066) (Tablica 34)

Tablica 34. Usporedba koncentracija serumskog adiponektina između grupa ispitanika sa sniženim razinama vitamina D.

Nizak vitamin D (< 20 ug/L)	Kontrola	Pretilost	Kontrola	Astma	Kontrola	Pretilost +Astma
Adiponektin (ng/ml), SV ± SD	6.98 ± 3.3	6.20 ± 4.3	6.98 ± 3.3	7.63 ± 4.9	6.98 ± 3.3	4.38 ± 2.5
P vrijednost*	0.302		0.650		0.014**	
Nizak vitamin D (< 20 ug/L)	Pretilost	Astma	Pretilost	Pretilost +Astma	Astma	Pretilost +Astma
Adiponektin (ng/ml), SV ± SD	6.20 ± 4.3	7.63 ± 4.9	6.20 ± 4.3	4.38 ± 2.5	7.63 ± 4.9	4.38 ± 2.5
P vrijednost*	0.503		0.443		0.066	

Kratice: SV – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija

* Mann Whitney test, *p < 0.05; ** p < 0.01

5. RASPRAVA

Rastuća prevalencija pretilosti i astme u pedijatrijskoj populaciji predstavlja značajan javnozdravstveni problem, a rezultati dosadašnjih istraživanja uglavnom obuhvaćaju odraslu populaciju. Ovim se istraživanjem pokušala dodatno objasniti uzročno-posljedična veza između pretilosti i astme kod djece i adolescenata te bolje razumjeti mehanizme u njihovoj pozadini.

Nedostatak vitamina D i polimorfizmi gena VDR-a

Iako postoje brojne studije koje su potvrdile korelaciju između nedostatka vitamina D i pretilosti i astme ^{218–220,113,221,222,148,223,109}, njihov broj je i dalje značajno veći u odrasloj populaciji, a zbog kontradiktornih rezultata sve se više ističe potreba za daljnjim analizama na globalnoj razini. Naime, neke od objavljenih studija u svom radu nisu pronašale značajne razlike u nedostatku vitamina D između skupina djece s astmom i/ili pretilošću i kontrolne skupine, istovremeno ukazujući na rastući trend sniženih razina vitamina D i kod zdrave djece ^{224,225,105,168,226}. U skladu s time, nedostatak značajnih razlika između zdrave djece te djece s pretilošću i/ili astmom unutar ovog istraživanja te rezultat od oko 30% djece s njegovim manjkom u svim grupama, ističe sve veću potrebu za individualnim pristupom u preporukama za suplementaciju vitaminom D. U tom su smislu Alonso i sur. u svom radu istaknuli kako se kod usporedbe objavljenih rezultata treba uzeti u obzir i odabrana metodologija. Naime, različiti eseji pokazuju drugačiji afinitet za vitamin D₂ i D₃, što može uzrokovati niže izmjerene razine ovih oblika u regionalnim područjima gdje se u suplementaciji češće koristi D₂, zbog čega je standardizacija metoda i uključivanje referentnih laboratorija ključno za osiguravanje točnosti i pouzdano uspoređivanje rezultata ¹⁴. Također, zadnjih se nekoliko godina sve više istražuju i drugi potencijalni markeri statusa vitamina D, uključujući bioraspoložive oblike 25OHD te metabolički omjer 25OHD i 24,25(OH)₂D, ali još uvijek nema dovoljno provedenih studija i dokaza za njihovo uvođenje u dijagnostiku i kliničku praksu.

U ovoj studiji pravi nedostatak vitamina D (<10 µg/L) detektiran je kod 23% ispitanika, od kojih je većina bila pretila, a kod iste skupine je zabilježen i najveći postotak djece s generalno niskim vitaminom D (nedostatak + manjak) (53%), što upućuje na njihovu međusobnu povezanost. Ipak, upravo zbog osjetljive pedijatrijske populacije ispitivane u radu te posljedično manjeg broja uzoraka, rezultati koji ne ukazuju na značajnu razliku između kontrolne skupine i pacijenata, moraju se pažljivo analizirati. Erkocoglu i sur. u tom su smislu istaknuli važnost opreza u intepretaciji rezultata, osobito u sličnim slučajevima gdje detektirane niske razine vitamina D i kod zdrave djece ne znače nužno i nepovezanost manjka

ovog vitamina s razvojem, a osobito težinom astme i pretilosti ¹⁰⁵. Osim toga, potreban je veći broj studija i analiza kojima bi se definirale skupine pacijenata koje bi imale najveći benefit od suplementacije vitaminom D te utvrdilo njegovo pozitivno djelovanje kod prevencije i tretmana specifičnih bolesti. Na tu temu su Castro i sur. ispitali učinak suplementacije vitamina D kod odraslih astmatičara, koji su uz srednje vrijednosti ITM-a preko 30 imali i snižene razine vitamina D. Njihovi rezultati su pokazali kako nakon 28 tjedana nije bilo značajnog terapijskog učinka suplementacije vitaminom D na aktivaciju i stopu egzacerbacije astme, kao ni funkciju pluća. Ipak, unutar iste studije uočeno je kako su za održavanje kontrole astme kod ispitanika sa srednjom razinom vitamina D višom od 40 µg/ml potrebne niže doze ICS-a ²²⁷. Osim toga, 2023. godine pokrenuta je meta-analiza, sa svrhom utvrđivanja potencijalne uloge vitamina D u smanjenju rizika od pogoršanja te poboljšanja kontrole astme. Dobiveni rezultati studije ne podupiru značajnu ulogu suplementacije vitaminom D u astmi, ali ističu istodobnu slabu zastupljenost sudionika s teškom astmom i niskom razinom vitamina D, što opravdava daljnja istraživanja²²⁸. Upravo zbog toga su i u Hrvatskoj potrebne dodatne studije s većim brojem ispitanika, kojima bi se uspješno detektirale izraženije razlike među osjetljivim skupinama, poput djece s prekomjernom težinom i astmom, a koje bi imale najveći potencijalni benefit od suplementacije vitaminom D.

Dodatno, poznato je kako razine vitamina D mogu značajno varirati u ovisnosti o izloženosti ultraljubičastom zračenju i više ili manje aktivnom životu tijekom različitih godišnjih doba te samoj geografskoj lokaciji. Navedeno potvrđuje i naša studija, sa znatno nižim razinama vitamina D detektiranim u prvom dijelu godine do svibnja te višim razinama pri većoj izloženosti suncu od lipnja do studenog. U skladu s tim, daljnje studije s kontinuiranim i jednako zastupljenim brojem uzorkovanja tijekom cijele sezone svakako bi pridonijele boljem razumijevanju ovisnosti izmjerenog statusa vitamina D o različitim čimbenicima i stilu života.

Osim proučavanja ovisnosti razvoja različitih poremećaja o razinama vitamina D, u fokusu istraživanja je i njegova biološka aktivnost koja uključuje regulaciju ekspresije gena na transkripcijskoj razini te vezanje aktivne forme vitamina D na VDR receptor. S obzirom na to da je VDR rasprostranjen u različitim tkivima u tijelu, funkcionalne promjene mogu uzrokovati značajne posljedice, a genetičke varijante u VDR genu mogu utjecati na samu strukturu receptora, kapacitet za interakciju s vitaminom D, signaliziranje i funkciju te osjetljivost na bolesti ²²⁹. Unatoč brojnim studijama koje potvrđuju korelaciju između polimorfizama gena VDR-a te pretilosti i astme ^{155,159,158,166,140,182,138,152,149}, postoje i brojni kontradiktorni rezultati ^{159,158,181,174,140,182,152}, a većina je provedenih istraživanja rađena na odrasloj populaciji. U Hrvatskoj je provedeno nekoliko studija ovog tipa, ali tijekom literaturnog pregleda nisu

pronađeni rezultati s fokusom na pedijatrijsku populaciju, kao ni proučavanje potencijalne veze između odabranih polimorfizama s pretilošću i astmom. Klinički značaj ispitivanih polimorfizama u ovoj studiji također ostaje nejasan, što se može pripisati i ograničenju veličine uzorka, a potencijalno i specifičnosti populacije, zbog čega su potrebna buduća istraživanja za bolje razumijevanje njihovog utjecaja na većoj i raznolikijoj populaciji.

Na temelju uspoređenih rezultata učestalosti određenih genotipova između kontrolne skupine i djece s pretilošću i/ili astmom dobivenih u ovoj studiji, može se zaključiti kako TaqI, BsmI, ApaI i FokI polimorfizam nisu povezani s povećanim rizikom od razvoja astme i/ili pretilosti, što je u skladu s prethodno navedenim literaturnim izvorima. Ipak i ovim rezultatima treba pristupiti s oprezom. Naime, iako za FokI polimorfizam nisu utvrđene značajne razlike između zdrave djece te astmatičara i pretile djece, kada je skupina djece s astmom uspoređene s grupom pretile djece, uočena je statistički značajna razlika u genotipu, frekvenciji alela te dominantnom modelu nasljeđivanja. Pritom je detektirana frekvencija alela F bila 30% te 3%, dok je frekvencija alela f bila 27% te 41% u skupini astmatičara i pretile djece, tim redoslijedom ($p=0.024$). Dodatno, iako u skupini astmatičara nije vidljiva izražena razlika u distribuciji FF (30%), Ff (43%) i ff (27%) genotipova, rezultati kod djece s pretilošću daju naslutiti kako bi genotip ff (41%) potencijalno mogao biti rizičan faktor za razvoj pretilosti, dok genotip FF (3%) djeluje kao protektivni faktor. Slično tome, kod pretilih astmatičara najmanja detektirana frekvencija bila je za FF genotip (17%), u sporedbi s ff (40%) genotipom.

Za polimorfizme TaqI i BsmI nisu uočene značajne razlike tijekom usporedbe kontrolne skupine i djece s pretilošću i/ili astmom, kao ni u slučaju usporedbe grupe astmatičara i pretile djece. Ipak, i ovdje treba naglasiti, kako je unatoč tome što nije bilo statistički značajnih razlika, u skupini djece s pretilošću detektirana veća frekvencija genotipa TT (46%) u odnosu na tt (11%) genotip, što je u skladu s rezultatima za pretile astmatičare gdje je frekvencija genotipa TT bila 30%, u usporedbi sa 7% za tt genotip. U slučaju BsmI polimorfizma situacija je vrlo slična kao za TaqI polimorfizam, gdje je u skupini djece s pretilošću detektirana veća frekvencija genotipa BB (41%) u odnosu na bb (10%) genotip, kao i kod pretilih astmatičara gdje je frekvencija genotipa BB bila 33%, u usporedbi sa 7% za bb genotip. Za razliku od FokI polimorfizma, u slučaju BsmI i TaqI bi se dakle moglo naslutiti kako bi genotip BB odnosno TT, mogao biti rizičan faktor za razvoj pretilosti, dok bi genotipovi bb i tt mogli djelovati protektivno.

Osim toga, najveći broj djece u svim ispitivanim skupinama identificiran je kao heterozigot (Ff/Bb/Tt). Najizraženije razlike u postotku detektirane su za TaqI (60%) i BsmI (60%) u grupi zdrave djece, slično kao i u grupi pretilih astmatičara gdje je identificirano 63%

heterozigota za TaqI te 60% heterozigota za BsmI polimorfizam. Iako bi heterozigotni genotip mogao biti smatran potencijalnom prednošću u smislu uravnotežene ekspresije gena, manje uzrokovanih promjena u funkciji receptora te veće fleksibilnosti u odgovoru na promjenjive razine vitamina D u populaciji s većim postotkom deficijencije vitamina D, određeni VDR polimorfizmi mogu pojedince činiti osjetljivijima na bolesti povezane sa nedostatkom vitamina, bez obzira na to da li su homozigoti ili heterozigoti. Također, nekoliko je mogućnosti za vidljive razlike između rezultata objavljenih studija, a u do sada najistaknutije spadaju različite etničke skupine, geografska lokacija, izloženost različitim ekološkim čimbenicima, nejednakosti u mjerenju masnog tkiva i dijagnosticiranju astme, a ponajviše u varijabilnoj veličini uzorka i nedovoljnoj statičkoj snazi ²³⁰.

U sklopu ove studije dodatno su se analizirali i rezultati potencijalne veze između sniženih razina vitamina D i različitih genotipova FokI, BsmI i TaqI polimorfizma, pri čemu nije utvrđena značajna razlika u distribuciji genotipova između skupine djece s optimalnim razinama te skupine djece sa sniženim vrijednostima vitamina D, ni u jednoj od individualno ispitivanih grupa pacijenata. Ipak, kada su se skupine pacijenata s astmom i/ili pretilošću međusobno usporedile, detektirana je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između pretilih djece te djece s astmom ($p=0.022$) za FokI polimorfizam. Pritom je veći postotak djece sa sniženim razinama vitamina D kod djece s pretilošću uočen za ff (50%) i Ff (50%) genotip, dok je kod astmatičara veći postotak zabilježen za FF (39%) i Ff (39%) genotip. Na osnovu tih, i rezultata općenite distribucije genotipova za FokI polimorfizam, može se zaključiti kako bi ff genotip zajedno s niskim cirkulirajućim razinama vitamina D mogao povećati rizik za razvoj pretilosti, dok bi FF genotip uz snižen vitamin D mogao predstavljati rizičan faktor za razvoj astme. Nekoliko studija potvrdilo je povezanost između FokI polimorfizma i sniženog vitamina D te povećanog rizika od razvoja određenih bolesti ^{231–233}, no za astmu i pretilost objavljeni rezultati većinom se vežu uz ostale polimorfizme. Prethodno objavljeni rezultati za povezanost BsmI i TaqI polimorfizama s deficijencijom vitamina D razlikuju se među istraživačkim skupinama ^{181,182,232,234,235}, a u ovom istraživanju nisu uočene značajne razlike između tri skupine pacijenata, dok je najveći postotak djece sa sniženim razinama vitamina D detektiran među heterozigotima za oba polimorfizma.

Za ApaI polimorfizam je u svim ispitivanim grupama potvrđena samo prisutnost aa recesivnog genotipa, s najvećim postotkom kod pretilih djece (28%), u odnosu na 10% kod astmatičara, 13% kod pretilih astmatičara te 17% kod zdrave djece. Negativan rezultat za AA i Ag genotip ukazuje na odsutnost ili vrlo nisku frekvenciju alela u ispitivanoj populaciji, a s obzirom na to da ponavljanjem testa nisu utvrđeni tehnički razlozi za to, potrebno je napraviti

studiju na većoj kohorti kako bi se utvrdilo da li rezultat ponecijalno ovisi o veličini uzorka ili genetičkoj pozadini populacije.

Plućna funkcija

Dosadašnje studije čiji je fokus primarno bila povezanost pretilosti i astme, rezultirale su brojnim proturječnim rezultatima o utjecaju pretilosti na funkciju pluća i upalu dišnih putova^{97,98,100,236,102}. U sklopu ovog istraživanja nisu pronađene značajne razlike u parametrima plućne funkcije (FEV₁, FVC, FEV₁/FVC omjer) između ispitivanih grupa, što je u skladu s već objavljenim rezultatima poput onog Erkocoglu i sur. čiji rezultati nisu potvrdili korelaciju između razina vitamina D i astme i pretilosti, kao ni izmijenjene vrijednosti FEV₁ u grupi pretilih astmatičara¹⁰⁵. Unatoč tome, unutar ove studije detektirane su značajno više razine FeNO-a u grupi astmatičara i pretilih astmatičara, s izmjerenim srednjim vrijednostima iznad 20 ppb, koje prema smjernicama Američkog Torakalnog društva ukazuju na veću mogućnost eozinofilne upale kod djece⁵⁹. Ovaj rezultat sugerira slabiju kontrolu astme te potencijalnu vezu između pretilosti i hiperreaktivnosti dišnih putova, a također je u skladu s objavljenim istraživanjima koja sugeriraju da ITM može utjecati na upalu dišnih putova^{237–240}. Ipak, ovaj odnos i dalje nije u potpunosti razjašnjen, primarno zbog variranja odabranih markera adipoznosti u različitim studijama.

Osim toga, u prijašnjim studijama koje su proučavale povezanost između FeNO i parametara izmjerenih spirometrijom te kontrole astme, objavljeni rezultati također su demonstrirali povišene razine FeNO kod pacijenata s normalnim vrijednostima FEV₁ i FVC, sugerirajući da uredna respiratorna funkcija ne mora nužno značiti i odsutnost upale dišnih putova te adekvatnu kontrolu astme^{241–243}. Da Silva Salviano i sur. dodatno su potvrdili ovu hipotezu, ističući kako bi mjerenje FeNO-a mogla biti neinvazivna metoda ranog otkrivanja upale, vidljive i prije simptoma ili promjene na razini spirometrije²⁴³. U skladu s time, značajno povišene FeNO vrijednosti u grupi pretilih astmatičara u ovom istraživanju, sugeriraju na kompleksniji upalni odgovor ovog specifičnog fenotipa, ali ostaje upitno da li je ova upala vođena primarno pretilošću, astmom ili oboje. Naime, povišene FeNO vrijednosti pronađene istodobno i u skupini astmatičara s optimalnom tjelesnom težinom, sugeriraju sličan upalni obrazac, ali nedostatak značajne razlike između ove dvije skupine otežava donošenje zaključaka o utjecaju pretilosti na razvoj i pogoršanje astme.

Usporedbom FeNO vrijednosti unutar svake grupe, nisu uočene značajne razlike između ispitanika sa sniženim i optimalnim razinama vitamina D, što je u skladu s prethodno objavljenim studijama koje nisu potvrdile korelaciju između deficijencije vitamina D i

izmijenjenih vrijednosti FeNO-a ^{244–246}. Također, ispitivanjem potencijalne razlike između svake skupine međusobno, nije detektirana njegova značajna razlika ni kod djece s optimalnim, ni kod djece sa sniženim razinama vitamina D. Ipak i ovim rezultatima treba oprezno pristupiti. Naime, unatoč izostanku statističke značajnosti, u gotovo svim skupinama je kod djece s niskim vitaminom D vidljiv i nešto viši FeNO, što se posebno ističe kod pretilih astmatičara. Uzimajući u obzir manji uzorak djece testiran u ovoj studiji te prisutnost manjka vitamina D i unutar kontrolne skupine, ističe se potreba za većom studijom koja bi preciznije analizirala potencijalnu korelaciju između razina vitamina D i FeNO-a te utjecaj koji bi njegova deficijencija mogla imati na pokretanje eozinofilne upale, osobito kod djece s pretilošću i/ili astmom.

Adiponektin

Uslijed proučavanja potencijalne uloge adipoznog tkiva u razvoju upalnih stanja poput astme, protuupalni adipokin adiponektin u sve je većem fokusu istraživanja ^{186,184,196}. Naime, hipertrofija adipoznog tkiva te snižene razine adiponektina potencijalno su jedan od glavnih uzročnika upalnih stanja u pretilosti, a ovim istraživanjem pokušala se objasniti njihova povezanost s hiper-reaktivnošću dišnih putova te dodatno odrediti postoji li veza između sniženih razina adiponektina te deficijencije vitamina D.

Iako su dokazi o povišenoj preosjetljivosti i upali dišnih putova te nižoj razina adiponektina još uvijek u većem broju demonstrirani na mišjim modelima, Azuma i sur. sugerirali su kako bi eozinofilna upala detektirana kod ljudi također mogla biti povezana sa sniženim razinama adiponektina ^{247,196}. U skladu s time u ovoj su studiji u skupini pretilih astmatičara istodobno detektirane više FeNO vrijednosti te značajno niže razine adiponektina u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0.024$), što je istovjetno ranije objavljenim studijama ^{8,187,9,5,196}. Također, unatoč nedostatku statistički značajne razlike, uočen je trend nižih razina adiponektina pretilih astmatičara u odnosu na astmatičare optimalne tjelesne težine, ($p=0.06$), ističući dodatno specifičnost ovog fenotipa. Prema našim saznanjima ovo je prva studija u Hrvatskoj koja je proučavala i na poslijetku demonstrirala obrasce sniženog adiponektina u uzorcima seruma pretilih astmatičara, a prisutnost povišenih vrijednosti FeNO unutar iste skupine potvrđuje posebnost ovog osjetljivog fenotipa te potrebu za daljnjim istraživanjem njegovih osobitosti.

Osim toga, Holguin i sur. u svom su radu objavili kako su kod pretilih miševa snižene razine adiponektina detektirane i u uzorcima bronhioalveolarne lavaže (BAL). Ipak, nepoznato je da li su promjene u njegovoj koncentraciji u BAL-u povezane s upalnim promjenama i/ili

oksidativnim stresom te još uvijek nije razjašnjeno da li postoji veza između njegovih razina u plazmi/serumu i dišnim putovima, što bi moglo biti važno s obzirom na to da se brojni zaključci o patogenezi pretilosti i astme, poput ove studije, vežu uz razine adiponektina u plazmi/serumu, što ne mora nužno reflektirati i njihovu koncentraciju u dišnim putovima¹⁸⁶. Iako se radi o više invazivnoj metodi, dodatno uzorkovanje BAL-a, zajedno s mjerenjem distribucije masnoće u tijelu uz izmjerenu tjelesnu težinu i ITM, dalo bi dodatna saznanja o utjecaju prekomjerne težine na razvoj i kontrolu astme.

Analizom povezanosti razina adiponektina i nedostatka vitamina D u grupi pretilih astmatičara sa sniženim vitaminom D, dodatno su detektirane niže vrijednosti adiponektina u odnosu na ispitanike s optimalnim vrijednostima. Također, usporedbom rezultata djece sa niskim vitaminom D između različitih grupa, potvrđene su njegove značajno niže razine kod pretilih astmatičara u odnosu na zdravu djecu. Ovi rezultati u skladu su s ranijim studijama koje su potvrdile utjecaj deficijencije vitamina D na endokrinološku funkciju adipoznog tkiva, rezultirajući sniženim razinama adiponektina^{10,248,249}. Slično tome su u studiji Rashidmayvan i sur., osim potvrde pozitivne korelacije između statusa vitamina D i adiponektina, objavljeni i rezultati koji naglašavaju pozitivan učinak suplementacije vitamina D na razine adiponektina te samim time njegovo protuupalno djelovanje kod ispitanika²⁵⁰. Rezultati takvih studija dodatno ističu potrebu za daljnjim istraživanjem koristi koje bi suplementacija vitamina D potencijalno mogla imati, osobito u Hrvatskoj gdje nedostaje ciljanih ispitivanja na većoj kohorti pedijatrijske populacije, a gdje se svake godine bilježi porast pretilosti i/ili astme u svim dobnim skupinama.

Na poslijetku, iako ova studija ne razjašnjava u potpunosti uzročno-posljedičnu vezu između pretilosti i astme, ona naglašava složene upalne interakcije koje su potencijalna posljedica njihovog komorbiditeta, uz isticanje literaturnih izvora koji opisuju dodatne komplikacije ovog odnosa u djetinjstvu te različite modificirajuće parametre poput spola, dobi ili drugih bolesti. Uz nedovoljno jasne rezultate o utjecaju pretilosti na razvoj i kontrolu astme, još uvijek nema dovoljno studija o potencijalnom razvoju pretilosti kao posljedice astme, a zbog sve većeg broja pretilih astmatičara diljem svijeta i proturječnih rezultata o njihovoj povezanosti, sve je jasnije koliko je važno više se usredotočiti na individualne i personalizirane mehanizme prevencije. Ranije je potvrđeno kako promjene u načinu života, uključujući gubitak tjelesne težine i više aktivnosti na otvorenom, imaju pozitivan učinak na zdravlje astmatičara^{251,252}, ali postoji jasna potreba za dodatnim israživanjima koja bi analizirale može li smanjenje tjelesne mase utjecati na kontrolu i težinu astme u djece. Razlikovanje specifičnih fenotipova astme i veća populacijska istraživanja o učinku čimbenika poput adiponektina i vitamina D u

ranjivim skupinama, poput pretilih astmatičara, potencijalno bi rezultiralo bolje definiranim skupinama pacijenata koji pate od oba poremećaja. Osim toga, takva saznanja bi dovela do poboljšanih personaliziranih strategija usmjerenih na upravljanje prekomjerne tjelesne težine i pretilosti kako bi se ublažili simptomi astme te poboljšala kvaliteta života pedijatrijskih pacijenata, a ovakva vrsta multidisciplinarnog pristupa omogućila bi ranije intervencije te bolju kontrolu bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja uzročno-posljedične veze i međusobne interakcije između astme i pretilosti te njihove potencijalne povezanosti s nedostatkom vitamina D, u pedijatrijskoj populaciji donešeni su sljedeći zaključci:

Vitamin D i polimorfizmi VDR-a

1. Nisu utvrđene značajne razlike u razinama vitamina D između ispitivanih skupina (astmatičari, pretila djeca, pretili astmatičari, zdrava djeca). Detektirani manjak vitamina D u kontrolnoj skupini potvrđuje visoku prevalenciju njegovog nedostatka i u zdravoj populaciji, što upućuje na potrebu za daljnjim studijama, osobito kako bi se što točnije procijenila povezanost njegove deficijencije s astmom i/ili pretilošću;
2. Najveći udio djece s niskim razinama vitamina D, kao i oblikom pravog nedostatka vitamina D ($< 10 \mu\text{g/L}$), zabilježen je u skupini djece s pretilošću, što upućuje na moguće metaboličke i hormonske čimbenike koji utječu na njegovu dostupnost kod prekomjerne težine;
3. Rezultati analize vitamina D potencijalno su uvjetovani nejednakim brojem uzorkovanja tijekom cijele godine te sezonskim varijacijama veće ili manje izloženosti UV zračenju. Buduće studije s kontinuiranim praćenjem razina vitamina D potrebne su kako bi se smanjio utjecaj sezonalnosti, te jasnije postigla potencijalna razlika između različitih upalnih stanja;
4. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti određenih genotipova između kontrolne skupine i djece s pretilošću i/ili astmom polimorfizama TaqI, BsmI, ApaI i FokI;
5. Detektirana je značajna razlika u genotipu, frekvenciji alela te dominantnom modelu nasljeđivanja za FokI polimorfizam između grupa astmatičara i pretile djece;
6. Genotip ff polimorfizma FokI identificiran je kao potencijalno rizičan faktor, dok je FF genotip identificiran kao potencijalno protektivan faktor za razvoj pretilosti. Isti rezultat potvrđen je u skupini pretilih astmatičara;
7. Genotip BB BsmI polimorfizma mogao bi biti rizičan faktor, a genotip bb protektivan faktor za razvoj pretilosti. Isti rezultat potvrđen je u skupini pretilih astmatičara;
8. Genotip TT TaqI polimorfizma mogao bi biti rizičan faktor, a genotip tt protektivan faktor za razvoj pretilosti, što je potvrđeno i u skupini pretilih astmatičara;

9. U grupi astmatičara nije uočena dominacija izmijenjenog ili referentnog alela, ni za jedan od ispitivanih polimorfizama receptora vitamina D;
10. Najveći postotak djece u svim grupama identificiran je kao heterozigot (Ff/Bb/Tt), s najizraženijim razlikama za TaqI i BsmI u grupi zdrave djece te u grupi pretilih astmatičara;
11. Nije utvrđena značajna razlika u distribuciji genotipova između skupine djece s optimalnim razinama te skupine djece sa sniženim vrijednostima vitamina D, ni u jednoj od individualno ispitivanih grupa pacijenata;
12. Uočena je značajna razlika u distribuciji genotipova FokI polimorfizma između djece s astmom i pretilošću sa sniženim razinama vitamina D. Pritom su genotip ff i Ff bili češći kod pretilih, dok su FF i Ff dominirali među astmatičarima. Ovi rezultati sugeriraju da bi recesivni model FokI polimorfizma u kombinaciji s niskim vitaminom D mogao predstavljati povećan rizik za pretilosti, dok bi dominantni model mogao biti povezan s astmom;
13. Za ApaI polimorfizam potvrđena je samo prisutnost aa recesivnog genotipa u svim ispitivanim grupama, s najvećim postotkom kod pretile djece (28%), u odnosu na 10% kod astmatičara, 13% kod pretilih astmatičara te 17% kod zdrave djece;

Plućna funkcija

14. Nisu utvrđene značajne razlike u parametrima plućne funkcije (FEV1, FVC, FEV1/FVC omjer) između ispitivanih grupa;
15. Značajno više razine FeNO-a detektirane su u skupini astmatičara i pretilih astmatičara, ukazujući na potencijalnu vezu između pretilosti i hiperreaktivnosti dišnih putova;
16. Nisu uočene značajne razlike u FeNO vrijednostima između ispitanika sa sniženim i optimalnim razinama vitamina D, ali su u grupi pretile djece, djece s astmom i pretilošću te kontrolnoj skupini detektirane više FeNO vrijednosti kod ispitanika koji su istodobno imali snižen vitamin D;
17. Usporedbom rezultata za ispitanike sa sniženim vitaminom D, uočen je trend koji sugerira veće izmjerene FeNO vrijednosti kod pretilih astmatičara u odnosu na astmatičare, pretilu djecu te kontrolnu skupinu;

Adiponektin

18. U skupini pretilih astmatičara utvrđene su značajno niže razine adiponektina, u odnosu na kontrolnu skupinu, a istovremeno je uočen trend nižih razina adiponektina iste skupine u odnosu na astmatičare optimalne tjelesne težine. Unatoč nedostatku jasno definiranih uzročnih mehanizama, ovi rezultati podupiru hipotezu da su disregulacija adiponektina i povišene FeNO vrijednosti karakteristični za fenotip astme s pretilošću;
19. U grupi pretilih astmatičara uočen je trend nižih razina adiponektina kod djece koja su istodobno imala i snižene razine vitamina D. U grupi astmatičara, djece s pretilošću te kontrolnoj skupini nisu detektirane značajne razlike u razinama adiponektina između djece sa sniženim i optimalnim razinama vitamina D;
20. Međusobnom usporedbom svih grupa, detektirane su značajne razlike u koncentraciji adiponektina između kontrolne skupine i grupe pretilih astmatičara kod djece sa sniženim razinama vitamina D.

7. LITERATURA

- 1 Ali Z, Ulrik CS. Obesity and asthma: a coincidence or a causal relationship? A systematic review. *Respir Med* 2013;**107**(9):1287–300.
- 2 Mohanan S, Tapp H, McWilliams A, Dulin M. Obesity and asthma: pathophysiology and implications for diagnosis and management in primary care. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014;**239**(11):1531–40.
- 3 Baffi CW, Winnica DE, Holguin F. Asthma and obesity: mechanisms and clinical implications. *Asthma Res Pract* 2015;**1**:1.
- 4 Wood LG, Gibson PG. Adiponectin: the link between obesity and asthma in women? *Am J Respir Crit Care Med* 2012;**186**(1):1–2.
- 5 Sood A, Shore SA. Adiponectin, Leptin, and Resistin in Asthma: Basic Mechanisms through Population Studies. *J Allergy (Cairo)* 2013;**2013**:785835.
- 6 Khoramipour K, Chamari K, Hekmatikar AA *et al.* Adiponectin: Structure, Physiological Functions, Role in Diseases, and Effects of Nutrition. *Nutrients* 2021;**13**(4).
- 7 Bantulà M, Roca-Ferrer J, Arismendi E, Picado C. Asthma and Obesity: Two Diseases on the Rise and Bridged by Inflammation. *J Clin Med* 2021;**10**(2).
- 8 Sideleva O, Suratt BT, Black KE *et al.* Obesity and asthma: an inflammatory disease of adipose tissue not the airway. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;**186**(7):598–605.
- 9 Salah A, Ragab M, Mansour W, Taher M. Leptin and adiponectin are valuable serum markers explaining obesity/bronchial asthma interrelationship. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis* 2015;**64**(3):529–33.
- 10 Bidulescu A, Morris AA, Stoyanova N *et al.* Association between Vitamin D and Adiponectin and Its Relationship with Body Mass Index: The META-Health Study. *Front Public Health* 2014;**2**.
- 11 Fainardi V, Passadore L, Labate M, Pisi G, Esposito S. An Overview of the Obese-Asthma Phenotype in Children. *IJERPH* 2022;**19**(2):636.
- 12 Chlebna-Sokół D, Konstantynowicz J, Abramowicz P *et al.* Evidence of a significant vitamin D deficiency among 9–13-year-old Polish children: results of a multicentre study. *Eur J Nutr* 2019;**58**(5):2029–36.
- 13 Shaka MF, kabthymmer RH, Meshesha MD, Borde MT. Vitamin D deficiency among apparently healthy children and children with common medical illnesses in Sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine & Surgery* 2022;**75**.
- 14 Alonso MA, Mantecón L, Santos F. Vitamin D deficiency in children: a challenging diagnosis! *Pediatr Res* 2019;**85**(5):596–601.
- 15 Corsello A, Spolidoro GCI, Milani GP, Agostoni C. Vitamin D in pediatric age: Current evidence, recommendations, and misunderstandings. *Front Med* 2023;**10**.
- 16 van de Walle L, Vandenplas Y, Toelen J, Raaijmakers A. Vitamin D Status in Belgian Children: A Regional Study. *Nutrients* 2024;**16**(5):657.
- 17 Angurana SK, Mahajan V. Vitamin D deficiency among healthy children in developing countries: an epidemic being recognized. *Public Health Nutr* 2016;**19**(8):1526–7.

- 18 Avagyan D, Neupane SP, Gundersen TE, Madar AA. Vitamin D status in pre-school children in rural Nepal. *Public Health Nutr* 2016;**19**(3):470–6.
- 19 Cristina A Stoian Martha Lyon, Robin G Cox David K Stephure Jean K Mah. Vitamin D concentrations among healthy children in Calgary, Alberta. *Paediatr Child Health* 2011;**16**(2):82–6.
- 20 Isa H, Almaliki M, Alsabea A, Mohamed A. Vitamin D deficiency in healthy children in Bahrain: do gender and age matter? *East Mediterr Health J* 2020;**26**(3):260–7.
- 21 Li H-A, Zou S-Q, Li B-T *et al.* Serum vitamin D status among healthy children in Hainan, South China: a multi-center analysis of 10,262 children. *Transl Pediatr* 2022;**11**(6):1010–7.
- 22 Oktaria V, Putri DAD, Ihyauddin Z *et al.* Vitamin D deficiency in South-East Asian children: a systematic review. *Arch Dis Child* 2022;**107**(11):980–7.
- 23 Zakharova I, Klimov L, Kuryaninova V *et al.* Vitamin D Insufficiency in Overweight and Obese Children and Adolescents. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;**10**:103.
- 24 Szymczak-Pajor I, Miazek K, Selmi A, Balcerczyk A, Śliwińska A. The Action of Vitamin D in Adipose Tissue: Is There the Link between Vitamin D Deficiency and Adipose Tissue-Related Metabolic Disorders? *Int J Mol Sci* 2022;**23**(2).
- 25 O'Sullivan BP, James L, Majure JM *et al.* Obesity-related asthma in children: A role for vitamin D. *Pediatr Pulmonol* 2021;**56**(2):354–61.
- 26 Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Front Pediatr* 2019;**7**:246.
- 27 Wang Z, Li Y, Gao Y *et al.* Global, regional, and national burden of asthma and its attributable risk factors from 1990 to 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Respir Res* 2023;**24**(1):169.
- 28 Global Initiative for Asthma. GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2023.
- 29 Martin J, Townshend J, Brodlie M. Diagnosis and management of asthma in children. *BMJ Paediatr Open* 2022;**6**(1).
- 30 Nichols M, Miller S, Treiber F, Ruggiero K, Dawley E, Teufel Ii R. Patient and Parent Perspectives on Improving Pediatric Asthma Self-Management Through a Mobile Health Intervention: Pilot Study. *JMIR Form Res* 2020;**4**(7):e15295.
- 31 FitzGerald JM, Barnes PJ, Chipps BE *et al.* The burden of exacerbations in mild asthma: a systematic review. *ERJ Open Res* 2020;**6**(3).
- 32 Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy* 2012;**67**(7):835–46.
- 33 Ray A, Das J, Wenzel SE. Determining asthma endotypes and outcomes: Complementing existing clinical practice with modern machine learning. *Cell Rep Med* 2022;**3**(12):100857.
- 34 Shinde V, Wankhede P, Vyawahare N. Asthma: Cells involved in the pathophysiology of asthma. *J Assoc Chest Physicians* 2023;**11**(1):10.
- 35 Nizar N. Jarjour, Elizabeth A.B. Kelly. Pathogenesis of asthma 2002;**86**:925–36.
- 36 Otelea MR, Arghir OC, Zugravu C, Rascu A. Adiponectin and Asthma: Knowns, Unknowns and Controversies. *Int J Mol Sci* 2021;**22**(16).

- 37 Salmanpour F, Kian N, Samieefar N, Khazeei Tabari MA, Rezaei N. Asthma and Vitamin D Deficiency: Occurrence, Immune Mechanisms, and New Perspectives. *J Immunol Res* 2022;**2022**:6735900.
- 38 Licari A, Castagnoli R, Brambilla I *et al.* Asthma Endotyping and Biomarkers in Childhood Asthma. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 2018;**31**(2):44–55.
- 39 Maspero J, Adir Y, Al-Ahmad M *et al.* Type 2 inflammation in asthma and other airway diseases. *ERJ Open Res* 2022;**8**(3):576–2021.
- 40 Foppiano F, Schaub B. Childhood asthma phenotypes and endotypes: a glance into the mosaic. *Mol Cell Pediatr* 2023;**10**(1).
- 41 Zhu X, Cui J, La Yi *et al.* The Role of T Cells and Macrophages in Asthma Pathogenesis: A New Perspective on Mutual Crosstalk. *Mediators of Inflammation* 2020;**2020**:1–14.
- 42 Kuruvilla ME, Lee FE-H, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2019;**56**(2):219–33.
- 43 Ghezzi M, Pozzi E, Abbattista L, Lonoce L, Zuccotti GV, D’Auria E. Barrier Impairment and Type 2 Inflammation in Allergic Diseases: The Pediatric Perspective. *Children* 2021;**8**(12):1165.
- 44 Busse WW, Kraft M, Rabe KF *et al.* Understanding the key issues in the treatment of uncontrolled persistent asthma with type 2 inflammation. *Eur Respir J* 2021;**58**(2):2003393.
- 45 Øymar K, Halvorsen T. Emergency presentation and management of acute severe asthma in children. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2009;**17**:40.
- 46 Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;**38**(6):872–97.
- 47 Sears MR. Epidemiology of asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**(4):662–8.
- 48 Sykes A, Johnston SL. Etiology of asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**(4):685–8.
- 49 Peter J Brown, Hugh W Greville, Kevin E Finucane. Asthma and irreversible airflow obstruction 1984;**39**:131–6.
- 50 Busse William, Elias Jack, Sheppard Dean, and Banks-Schlegel Susan. Airway Remodeling and Repair 1999;**160**:1035–42.
- 51 Van Wonderen KE, van der Mark LB, Mohrs J, Bindels PJE, van Aalderen WMC, Riet G ter. Different definitions in childhood asthma: how dependable is the dependent variable? *Eur Respir J* 2010;**36**(1):48–56.
- 52 Haldar P, Pavord ID, Shaw DE *et al.* Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**178**(3):218–24.
- 53 Lødrup Carlsen KC, Pijnenburg M. Identification of asthma phenotypes in children. *BRE* 2011:38–44.
- 54 Belgrave D, Henderson J, Simpson A, Buchan I, Bishop C, Custovic A. Disaggregating asthma: Big investigation versus big data. *J Allergy Clin Immunol* 2017;**139**(2):400–7.
- 55 Custovic A, Ainsworth J, Arshad H *et al.* The Study Team for Early Life Asthma Research (STELAR) consortium 'Asthma e-lab': team science bringing data, methods and investigators together. *Thorax* 2015;**70**(8):799–801.
- 56 Gaillard EA, Kuehni CE, Turner S *et al.* European Respiratory Society clinical practice guidelines for the diagnosis of asthma in children aged 5-16 years. *Eur Respir J* 2021;**58**(5).

- 57 Rathod MB, Budensab A, Bhalla S, Mahesh NK, Alex E, Jesudas M. Spirometric Assessment of Pulmonary Function Tests in Asthma Patients. *Cureus* 2024;**16**(2):e54979.
- 58 Rao DR, Phipatanakul W. An Overview of Fractional Exhaled Nitric Oxide and Children with Asthma. *Expert Rev Clin Immunol* 2016;**12**(5):521–30.
- 59 ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**171**(8):912–30.
- 60 Raed A. Dweik, Peter B. Boggs, Serpil C. Erzurum, Charles G. Irvin, Margaret W. Leigh, Jon O. Lundberg. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**184**:602–15.
- 61 Murray C, Foden P, Lowe L, Durrington H, Custovic A, Simpson A. Diagnosis of asthma in symptomatic children based on measures of lung function: an analysis of data from a population-based birth cohort study. *Lancet Child Adolesc Health* 2017;**1**(2):114–23.
- 62 Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen K-H *et al.* International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy* 2012;**67**(8):976–97.
- 63 Alobid I, Colás C, Castillo JA *et al.* Spanish Consensus on the Management of Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps (POLiPosis NASal/POLINA 2.0). *J Investig Allergol Clin Immunol* 2023;**33**(5):317–31.
- 64 Gautier C, Charpin D. Environmental triggers and avoidance in the management of asthma. *J Asthma Allergy* 2017;**10**:47–56.
- 65 Mohd Saat NZ, Abd Talib R, Alarsan SF, Saadeh N, Shahrour G. Risk Factors of Overweight and Obesity Among School Children Aged 6 to 18 Years: A Scoping Review. *NDS* 2023;**Volume 15**:63–76.
- 66 WHO obesity and overweight (2024). [Online] Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> [Accessed 3 June 2024].
- 67 Di Cesare M, Sorić M, Bovet P *et al.* The epidemiological burden of obesity in childhood: a worldwide epidemic requiring urgent action. *BMC Med* 2019;**17**(1):212.
- 68 Shaban Mohamed MA, AbouKhatwa MM, Saifullah AA *et al.* Risk Factors, Clinical Consequences, Prevention, and Treatment of Childhood Obesity. *Children (Basel)* 2022;**9**(12).
- 69 Jebeile H, Kelly AS, O'Malley G, Baur LA. Obesity in children and adolescents: epidemiology, causes, assessment, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2022;**10**(5):351–65.
- 70 Matana A, Krajinović H. Prevalence of Overweight and Obesity and Association with Risk Factors in Secondary School Children in Croatia. *Children (Basel)* 2024;**11**(12).
- 71 HZJZ (2022.). [Online] Available at <https://www.hzjz.hr/sluzba-promicanje-zdravlja/objavljeni-rezultati-petog-kruga-europske-inicijative-za-pracenje-debljine-u-djece-2018-2022/> [Accessed 11 November 2023.].
- 72 HZJZ (2023). [Online] Available at <https://www.hzjz.hr/sluzba-promicanje-zdravlja/ekonomske-posljedice-prekomjerne-tjelesne-mase-i-debljine-u-hrvatskoj-ce-2035-godine-premasiti-3-milijarde-dolara/> [Accessed 11 December 2023.].
- 73 Güngör NK. Overweight and obesity in children and adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2014;**6**(3):129–43.
- 74 Manu Raj, R. Krishna Kumar. Obesity in children & adolescents 2010:598–607.

- 75 Osman AME, Motawie AAM, Abd Al-Aziz AM, Mostafa NAA, Hasan NS, El-Baz MS. Role of adiponectin, resistin and monocyte chemo-attractant protein-1 in overweight/obese asthma phenotype in children. *BMC Pediatr* 2023;**23**(1):226.
- 76 Beenish Masood MM. Causes of obesity: a review. *Clinical Medicine*; **23**(4):284–91.
- 77 Lee EY, Yoon K-H. Epidemic obesity in children and adolescents: risk factors and prevention. *Front Med* 2018;**12**(6):658–66.
- 78 Karam JG, McFarlane SI. Secondary causes of obesity. *Therapy* 2007;**4**(5):641–50.
- 79 Lister NB, Baur LA, Felix JF *et al.* Child and adolescent obesity. *Nat Rev Dis Primers* 2023;**9**(1):24.
- 80 Reilly JJ, Armstrong J, Dorosty AR *et al.* Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. *BMJ* 2005;**330**(7504):1357.
- 81 Albuquerque D, Nóbrega C, Manco L, Padez C. The contribution of genetics and environment to obesity. *Br Med Bull* 2017;**123**(1):159–73.
- 82 Alolayan A.M.H., Alabeesy M.S.Y., Alqabbani A.A.A.. Interrelationship between body mass index and asthma in children suffering from asthma-analytical cross-sectional study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2021;**25**:5208–14.
- 83 Zhang Y, Chen Z, Berhane K *et al.* The Dynamic Relationship Between Asthma and Obesity in Schoolchildren. *Am J Epidemiol* 2020;**189**(6):583–91.
- 84 Shan L-S, Zhou Q-L, Shang Y-X. Bidirectional Association Between Asthma and Obesity During Childhood and Adolescence: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pediatr* 2020;**8**:576858.
- 85 Ahmadizar F, Vijverberg SJH, Arets HGM *et al.* Childhood obesity in relation to poor asthma control and exacerbation: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2016;**48**(4):1063–73.
- 86 Gilliland FD, Berhane K, Islam T *et al.* Obesity and the risk of newly diagnosed asthma in school-age children. *Am J Epidemiol* 2003;**158**(5):406–15.
- 87 Hancox RJ, Milne BJ, Poulton R *et al.* Sex differences in the relation between body mass index and asthma and atopy in a birth cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**171**(5):440–5.
- 88 Rzehak P, Wijga AH, Keil T *et al.* Body mass index trajectory classes and incident asthma in childhood: results from 8 European Birth Cohorts--a Global Allergy and Asthma European Network initiative. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**(6):1528–36.
- 89 Zhang Z, Lai HJ, Roberg KA *et al.* Early childhood weight status in relation to asthma development in high-risk children. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**126**(6):1157–62.
- 90 Hossain MJ, Xie L, Lang JE, Wysocki TT, Shaffer TH, Bunnell HT. Piecewise Mixed Effects Model to Compare the Weight-gain Patterns Before and After Diagnosis of Asthma in Children Younger than 5 Years. *J Biom Biostat* 2015;**6**(4):248.
- 91 Chen Z, Salam MT, Alderete TL *et al.* Effects of Childhood Asthma on the Development of Obesity among School-aged Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;**195**(9):1181–8.
- 92 Green TL. Examining the temporal relationships between childhood obesity and asthma. *Econ Hum Biol* 2014;**14**:92–102.
- 93 Manuel S-S, Luis G-M. Nutrition, Obesity and Asthma Inception in Children. The Role of Lung Function. *Nutrients* 2021;**13**(11).
- 94 Olejnik AE, Kuźnar-Kamińska B. Association of Obesity and Severe Asthma in Adults. *J Clin Med* 2024;**13**(12).

- 95 Dixon AE, Poynter ME. Mechanisms of Asthma in Obesity. Pleiotropic Aspects of Obesity Produce Distinct Asthma Phenotypes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2016;**54**(5):601–8.
- 96 Martinez FD, Guerra S. Early Origins of Asthma. Role of Microbial Dysbiosis and Metabolic Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;**197**(5):573–9.
- 97 Chinn S, Jarvis D, Burney P, on behalf of the European Community Respiratory Health. Relation of bronchial responsiveness to body mass index. *Thorax* 2002;**57**:1028–33.
- 98 Schachter L M, Salome C M, Peat J K, Woolcock A J. Obesity is a risk for asthma and wheeze but not airway obstruction. *Thorax* 2001;**56**:4–8.
- 99 Peters U, Dixon AE, Forno E. Obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2018;**141**(4):1169–79.
- 100 Forno E, Han Y-Y, Mullen J, Celedón JC. Overweight, Obesity, and Lung Function in Children and Adults-A Meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018;**6**(2):570-581.e10.
- 101 Köchli S, Endes K, Bartenstein T *et al.* Lung function, obesity and physical fitness in young children: The EXAMIN YOUTH study. *Respir Med* 2019;**159**:105813.
- 102 Tantisira K G, Litonjua A A, Weiss S T, Fuhlbrigge A L, for the Childhood Asthma Management. Association of body mass with pulmonary function. *Thorax* 2003;**58**:1036–41.
- 103 Dekker HT den, Sonnenschein-van der Voort AMM, Jongste JC de *et al.* Early growth characteristics and the risk of reduced lung function and asthma: A meta-analysis of 25,000 children. *J Allergy Clin Immunol* 2016;**137**(4):1026–35.
- 104 Strunk RC, Colvin R, Bacharier LB *et al.* Airway Obstruction Worsens in Young Adults with Asthma Who Become Obese. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;**3**(5):765-71.e2.
- 105 Erkoçoğlu M, Çapanoğlu M, Civelek E *et al.* Vitamin D Levels of Asthmatic Children with and Without Obesity. *Asthma Allergy Immunol* 2016;**14**(1):24–9.
- 106 Lang JE, Ramirez RG, Balevic S *et al.* Pharmacokinetics of Oral Vitamin D in Children with Obesity and Asthma. *Clin Pharmacokinet* 2023;**62**(11):1567–79.
- 107 Sutherland ER, Goleva E, Jackson LP, Stevens AD, Leung DYM. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;**181**(7):699–704.
- 108 Clifford RL, Knox AJ. Vitamin D - a new treatment for airway remodelling in asthma? *Br J Pharmacol* 2009;**158**(6):1426–8.
- 109 Zhu Y, Jing D, Liang H *et al.* Vitamin D status and asthma, lung function, and hospitalization among British adults. *Front Nutr* 2022;**9**:954768.
- 110 Gergen PJ, Teach SJ, Mitchell HE *et al.* Lack of a relation between serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and asthma in adolescents. *Am J Clin Nutr* 2013;**97**(6):1228–34.
- 111 Sobczak M, Pawliczak R. Relationship between vitamin D and asthma from gestational to adulthood period: a meta-analysis of randomized clinical trials. *BMC Pulm Med* 2023;**23**(1):212.
- 112 Chinellato I, Piazza M, Sandri M *et al.* Serum vitamin D levels and exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma. *Eur Respir J* 2011;**37**(6):1366–70.
- 113 Fiamenghi VI, Mello ED de. Vitamin D deficiency in children and adolescents with obesity: a meta-analysis. *J Pediatr (Rio J)* 2021;**97**(3):273–9.
- 114 Orces C. The Association between Body Mass Index and Vitamin D Supplement Use among Adults in the United States. *Cureus* 2019;**11**(9):e5721.

- 115 Spyksma EE, Alexandridou A, Mai K, Volmer DA, Stokes CS. An Overview of Different Vitamin D Compounds in the Setting of Adiposity. *Nutrients* 2024;**16**(2).
- 116 Herrmann M. Assessing vitamin D metabolism - four decades of experience. *Clin Chem Lab Med* 2023;**61**(5):880–94.
- 117 Morris A. Howard. Vitamin D metabolism and molecular modes of action 2014;**2**(1):1–5.
- 118 Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 2014;**21**(3):319–29.
- 119 Gil Á, Plaza-Diaz J, Mesa MD. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab* 2018;**72**(2):87–95.
- 120 Sheetu Wadhwa, Deep Shikha Sharma, Meenu Mehta, Divya Thakur, Sanchit Mahajan, Sachin Kumar Singh, Saurabh Satija. Vitamin D deficiency, skin, and sunshine: A review. *International Journal of Green Pharmacy* 2018;**12**(2):345–53.
- 121 Vranešić Bender D, Giljević Z, Kušec V, Laktašić Žerjavić N. Guidelines for prevention, detection and therapy of vitamin D deficiency in adults. *Liječnički vjesnik*; **138**:121–32.
- 122 Hilger J, Friedel A, Herr R *et al.* A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* 2014;**111**(1):23–45.
- 123 Binkley N, Sempos CT. Standardizing vitamin D assays: the way forward. *J Bone Miner Res* 2014;**29**(8):1709–14.
- 124 Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z *et al.* Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr* 2016;**103**(4):1033–44.
- 125 Wagner CL, Greer FR. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics* 2008;**122**(5):1142–52.
- 126 Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2020.) Vitamin D i preporuke za nadomjesnu primjenu vitamina D od jeseni. [Online] Available at <https://www.hzjz.hr/sluzba-zdravstvena-ekologija/vitamin-d-i-preporuke-za-nadomjesnu-primjenu-vitamina-d-od-jesen/> [Accessed 2 May 2025].
- 127 Zenata Ondrej and Vrzal Radim. Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by posttranscriptional and post-translational modifications. *Oncotarget* 2017;**8**(21):35390–402.
- 128 Pike JW, Meyer MB, Lee S-M, Onal M, Benkusky NA. The vitamin D receptor: contemporary genomic approaches reveal new basic and translational insights. *J Clin Invest* 2017;**127**(4):1146–54.
- 129 Shigeaki Kato. The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *J. Biochem.* 2000;**127**(5):717–22.
- 130 Rochel N. Vitamin D and Its Receptor from a Structural Perspective. *Nutrients* 2022;**14**(14).
- 131 Carlberg Carsten and Seuter Sabine. A Genomic Perspective on Vitamin D Signaling. *Anticancer Research* 2009;**(29)**:3485–94.
- 132 Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006;**147**(12):5542–8.
- 133 Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;**39**(2):255-69, table of contents.
- 134 Molnár F. Structural considerations of vitamin D signaling. *Front Physiol* 2014;**5**:191.

- 135 Wan L-Y, Zhang Y-Q, Chen M-D, Du Y-Q, Liu C-B, Wu J-F. Relationship between Structure and Conformational Change of the Vitamin D Receptor Ligand Binding Domain in 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 Signaling. *Molecules* 2015;**20**(11):20473–86.
- 136 Bastyte D, Tamasauskienė L, Golubickaitė I, Ugenskienė R, Sitkauskienė B. Vitamin D receptor and vitamin D binding protein gene polymorphisms in patients with asthma: a pilot study. *BMC Pulm Med* 2023;**23**(1):245.
- 137 Usategui-Martín R, Luis-Román D-A de, Fernández-Gómez JM, Ruiz-Mambrilla M, Pérez-Castrillón J-L. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms Modify the Response to Vitamin D Supplementation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2022;**14**(2).
- 138 Akter R, Afrose A, Sharmin S, Rezwana R, Rahman MR, Neelotpol S. A comprehensive look into the association of vitamin D levels and vitamin D receptor gene polymorphism with obesity in children. *Biomed Pharmacother* 2022;**153**:113285.
- 139 Paramonova N, Trapina I, Gradauskienė Sitkauskienė B *et al.* Genetic Diversity in Bronchial Asthma Susceptibility: Exploring the Role of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Varied Geographic Contexts. *Int J Mol Sci* 2024;**25**(3).
- 140 Rojo-Tolosa S, Pineda-Lancheros LE, Gálvez-Navas JM *et al.* Association between Single Nucleotide Polymorphisms Related to Vitamin D Metabolism and the Risk of Developing Asthma. *Nutrients* 2023;**15**(4).
- 141 Zhai N, Bidares R, Makoui MH *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of the type 1 diabetes: a meta-regression and updated meta-analysis. *BMC Endocr Disord* 2020;**20**(1):121.
- 142 Voltan G, Cannito M, Ferrarese M, Ceccato F, Camozzi V. Vitamin D: An Overview of Gene Regulation, Ranging from Metabolism to Genomic Effects. *Genes (Basel)* 2023;**14**(9).
- 143 Kosik K, Szpecht D, Al-Saad SR *et al.* Single nucleotide vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI, ApaI, and TaqI) in the pathogenesis of prematurity complications. *Sci Rep* 2020;**10**(1):21098.
- 144 National Library of Medicine (2022) Reference SNP (rs) Report. [Online] Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7975232> [Accessed 6 December 2024].
- 145 Elnenaie MO, Chandra R, Mangion T, Moniz C. Genomic and metabolomic patterns segregate with responses to calcium and vitamin D supplementation. *Br J Nutr* 2011;**105**(1):71–9.
- 146 Serrano JCE, Lorenzo D de, Cassanye A *et al.* Vitamin D receptor BsmI polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes Nutr* 2013;**8**(6):561–9.
- 147 Hollams EM, Hart PH, Holt BJ *et al.* Vitamin D and atopy and asthma phenotypes in children: a longitudinal cohort study. *Eur Respir J* 2011;**38**(6):1320–7.
- 148 Bener A, Ehlayel MS, Tulic MK, Hamid Q. Vitamin D deficiency as a strong predictor of asthma in children. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;**157**(2):168–75.
- 149 Kilic M, Ecin S, Taskin E, Sen A, Kara M. The Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Asthmatic Children: A Case-Control Study. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 2019;**32**(2):63–9.
- 150 Yao T-C, Tu Y-L, Chang S-W *et al.* Suboptimal vitamin D status in a population-based study of Asian children: prevalence and relation to allergic diseases and atopy. *PLoS One* 2014;**9**(6):e99105.

- 151 Sezim Şafak A, Bulut F. Comparison of Vitamin D Levels in Allergic Patients with and Without Asthma. *BMB* 2019;**4(4)**:93–8.
- 152 Zhou Y, Li S. Meta-Analysis of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Childhood Asthma. *Front Pediatr* 2022;**10**:843691.
- 153 Aranow Cynthia. Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med*. 2011;**59(6)**:881–6.
- 154 Hutchinson K, Kerley CP, Faul J, Grealley P, Coghlan D, Louw M, Elnazir B, Rochev Y. Grealley, David Coghlan, Basil Elnazir, Michael Louw, and Yury Rochev. Vitamin D Receptor Variants and Uncontrolled Asthma. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* 2017;**46**:764–1489.
- 155 He L, Zhou X, Mo H, Li X, Guo S. The association between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Palliat Med* 2022;**11(2)**:574–87.
- 156 Nidhi Awasthi, Shally Awasthi, Shivani Pandey, Sarika Gupta. Association of vitamin D receptor in North India. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2021;**12(2)**:24–34.
- 157 Saadi A, Gao G, Li H, Wei C, Gong Y, Liu Q. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study. *BMC Med Genet* 2009;**10**:71.
- 158 Rajaram M, Selvarajan S, Neelamegan R *et al*. Effects of genetic polymorphisms in Vitamin D metabolic pathway on Vitamin D level and asthma control in South Indian patients with bronchial asthma. *Lung India* 2019;**36(6)**:483–91.
- 159 Wen-Liang Fang, Lin-Bo Gao, Wei-Bo Liang, Hui Xue, Peng Bai, Mei-Li Lv, Yan-Yun Wang, Bin Zhou, Lin Zhang. Association Analysis of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Chinese Population with Asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2009;**8**:141–7.
- 160 Wolsk HM, Chawes BL, Litonjua AA *et al*. Prenatal vitamin D supplementation reduces risk of asthma/recurrent wheeze in early childhood: A combined analysis of two randomized controlled trials. *PLoS One* 2017;**12(10)**:e0186657.
- 161 Litonjua AA, Carey VJ, Laranjo N *et al*. Six-Year Follow-up of a Trial of Antenatal Vitamin D for Asthma Reduction. *The New England Journal of Medicine* 2020;**382(6)**:525–33.
- 162 Litonjua AA, Carey VJ, Laranjo N *et al*. Effect of Prenatal Supplementation With Vitamin D on Asthma or Recurrent Wheezing in Offspring by Age 3 Years: The VDAART Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;**315(4)**:362–70.
- 163 Gold DR, Litonjua AA, Carey VJ *et al*. Lung VITAL: Rationale, design, and baseline characteristics of an ancillary study evaluating the effects of vitamin D and/or marine omega-3 fatty acid supplements on acute exacerbations of chronic respiratory disease, asthma control, pneumonia and lung function in adults. *Contemp Clin Trials* 2016;**47**:185–95.
- 164 Saadoon A, Ambalavanan N, Zinn K *et al*. Effect of Prenatal versus Postnatal Vitamin D Deficiency on Pulmonary Structure and Function in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2017;**56(3)**:383–92.
- 165 Vahdaninia Mariam, Mackenzie Heather Helps Suzannah, Dean Taraneh. Prenatal Intake of Vitamins and Allergic Outcomes in the Offspring: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2017;**5(3)**:771–8.
- 166 Al-Daghri NM, Guerini FR, Al-Attas OS *et al*. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity and inflammasome activity. *PLoS One* 2014;**9(7)**:e102141.

- 167 Kim SY. The pleiomorphic actions of vitamin D and its importance for children. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2013;**18**(2):45–54.
- 168 Zhao Y, Qin R, Hong H *et al.* Is vitamin D deficiency influenced by obesity during the first 5 years of life? A cross-sectional multicenter study. *Food Sci Nutr* 2023;**11**(2):1084–95.
- 169 Antonucci R, Locci C, Clemente MG, Chicconi E, Antonucci L. Vitamin D deficiency in childhood: old lessons and current challenges. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2018;**31**(3):247–60.
- 170 Zoya Lagunova Alina Carmen Porojnicu, Fedon Lindberg, Sofie Hexeberg, Johan Moan. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *ANTICANCER RESEARCH* 2009;**29**:3713–20.
- 171 Shen F, Wang Y, Sun H *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with triceps skin fold thickness and body fat percentage but not with body mass index or waist circumference in Han Chinese. *Lipids Health Dis* 2019;**18**(1):97.
- 172 Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**(7):1911–30.
- 173 Jonas MI, Kuryłowicz A, Bartoszewicz Z *et al.* Vitamin D Receptor Gene Expression in Adipose Tissue of Obese Individuals is Regulated by miRNA and Correlates with the Pro-Inflammatory Cytokine Level. *Int J Mol Sci* 2019;**20**(21).
- 174 Beata Kaleta, Magdalena Walicka, Ada Sawicka, Małgorzata Wrzosek, Agata Bogołowska-Stieblich, Grażyna Nowicka, Andrzej Górski, Jacek Łukaszewicz, Ewa Marcinowska-Suchowierska. Vitamin D receptor gene polymorphism in Polish patients with morbid obesity. *Progress in Medicine* 2014:65–9.
- 175 Pramono A, Jocken JWE, Adriaens ME *et al.* The association between vitamin D receptor polymorphisms and tissue-specific insulin resistance in human obesity. *Int J Obes (Lond)* 2021;**45**(4):818–27.
- 176 Gariballa S, Al-Bluwí GSM, Yasin J. Frequency of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in a Population with a very High Prevalence of Vitamin D Deficiency, Obesity, Diabetes and Hypertension. *Biomedicines* 2023;**11**(4).
- 177 Bienertová-Vašků J, Zlámál F, Pohořalá A *et al.* Allelic variants in vitamin D receptor gene are associated with adiposity measures in the central-European population. *BMC Med Genet* 2017;**18**(1):90.
- 178 Özhan B, Bilgihan E, Çetin O, Ağladioğlu K. The relations of vitamin D receptor gene polymorphisms with risk of obesity, metabolic syndrome, hepatostetosis in Turkish children. *Pam Tıp Derg* 2023:14.
- 179 Yuliawati TH, Ratna Sari D, Kencono Wungu CD *et al.* Vitamin D Receptor Polymorphisms Associated The role of vitamin d receptor gene polymorphisms in obesity: a systematic review and meta-analysis. *Salud, Ciencia y Tecnología* 2025;**5**:1072.
- 180 Khan RJ, Riestra P, Gebreab SY *et al.* Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Abdominal Visceral Adipose Tissue Volume and Serum Adipokine Concentrations but Not with Body Mass Index or Waist Circumference in African Americans: The Jackson Heart Study. *J Nutr* 2016;**146**(8):1476–82.
- 181 Rahmadhani R, Zaharan NL, Mohamed Z, Moy FM, Jalaludin MY. The associations between VDR BsmI polymorphisms and risk of vitamin D deficiency, obesity and insulin resistance in adolescents residing in a tropical country. *PLoS One* 2017;**12**(6):e0178695.

- 182 Khattab Y, Reda R, El-Gaafary M, Zeitoun Y, Abo-Shady R, Abdelhady W. BsmI gene polymorphism of vitamin D receptor in obese Egyptian male medical students and its relationship with vitamin D deficiency. *Egypt J Med Hum Genet* 2022;**23**(1).
- 183 Xenos K, Papasavva M, Raptis A, Katsarou M-S, Drakoulis N. Vitamin D Supplementation and Genetic Polymorphisms Impact on Weight Loss Diet Outcomes in Caucasians: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Study. *Front Med (Lausanne)* 2022;**9**:811326.
- 184 Nigro E, Scudiero O, Monaco ML *et al.* New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *Biomed Res Int* 2014;**2014**:658913.
- 185 Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 2012;**165**(3):622–32.
- 186 Holguin F, Rojas M, Brown LA, Fitzpatrick AM. Airway and plasma leptin and adiponectin in lean and obese asthmatics and controls. *J Asthma* 2011;**48**(3):217–23.
- 187 Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2017;**18**(6).
- 188 Holguin F. Obesity as a risk factor for increased asthma severity and allergic inflammation; cause or effect? *Clin Exp Allergy* 2012;**42**(5):612–3.
- 189 Lim J-Y, Templeton SP. Regulation of lung inflammation by adiponectin. *Front Immunol* 2023;**14**:1244586.
- 190 T. Yamauchi, J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M.L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel & T. Kadowak. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine* 2001;**7**:941–6.
- 191 Terry P. Combs, John A. Wagner, Joel Berger, Tom Doebber, Wen-Jun Wang, Bei B. Zhang, Michael Tanen, Anders H Berg, Stephen O’Rahilly, David B. Savage, Krishna Chatterjee, Stuart Weiss, Patrick J. Larson, Keith M. Gottesdiener, Barry J. Gertz, Maureen J. Charron, Philipp E. Scherer, David E. Moller. Induction of Adipocyte Complement-Related Protein of 30 Kilodaltons by PPAR γ Agonists: A Potential Mechanism of Insulin Sensitization. *Endocrinology* 2002;**143**:998–1007.
- 192 Walker GE, Ricotti R, Roccio M *et al.* Pediatric obesity and vitamin D deficiency: a proteomic approach identifies multimeric adiponectin as a key link between these conditions. *PLoS One* 2014;**9**(1):e83685.
- 193 Loureiro Carlos, Mota Pinto Anabela, Muc Magdalena, Vale Pereira Sofia, Angelo Filipa, Todo -Bom Ana. Resistin, adiponectin and leptin levels in overweight patients with asthma 2012;**20**(2):121–8.
- 194 Russjan E. The Role of Peptides in Asthma–Obesity Phenotype. *IJMS* 2024;**25**(6):3213.
- 195 Sutherland ER, Lehman EB, Teodorescu M, Wechsler ME. Body mass index and phenotype in subjects with mild-to-moderate persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**123**(6):1328–34.e1.
- 196 Norihiko Azuma, Tomoko Otani, Midori Kotani, Yuki Yasuda. Impact of Serum Adiponectin, Plasminogen Activator Inhibitor-1, and Oxidative Stress Levels on Eosinophilic Inflammation of the Airway and the Whole Body in Children with Obesity. *Tokyo Women's Medical University Journal* 2020;**4**:33–43.

- 197 Nasiri Kalmarzi R, Ataee P, Mansori M *et al.* Serum levels of adiponectin and leptin in asthmatic patients and its relation with asthma severity, lung function and BMI. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2017;**45**(3):258–64.
- 198 Atqah AbdulWahab, Muna M. Maarafiya, Ashraf Soliman. Serum Leptin and Adiponectin Levels in Obese and Nonobese Asthmatic School Children in relation to Asthma Control. *J Allergy (Cairo)* 2013:1–6.
- 199 Nagel G, Koenig W, Rapp K, Wabitsch M, Zoellner I, Weiland SK. Associations of adipokines with asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in German schoolchildren. *Pediatric Allergy Immunology* 2009;**20**(1):81–8.
- 200 Coffey MJ, Torretti B, Mancuso P. Adipokines and Cysteinyl Leukotrienes in the Pathogenesis of Asthma. *J Allergy (Cairo)* 2015;**2015**:157919.
- 201 Yuksel H, Sogut A, Yilmaz O, Onur E, Dinc G. Role of adipokines and hormones of obesity in childhood asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012;**4**(2):98–103.
- 202 Shore SA, Terry RD, Flynt L, Xu A, Hug C. Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**(2):389–95.
- 203 O'Sullivan B, Ounpraseuth S, James L *et al.* Vitamin D Oral Replacement in Children With Obesity Related Asthma: VDORA1 Randomized Clinical Trial. *Clin Pharmacol Ther* 2024;**115**(2):231–8.
- 204 Scott T. Weiss, Augusto A. Litonjua. Vitamin D in Host Defense: Implications for Future Research. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2017;**56**(6):692–3.
- 205 Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AL *et al.* Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**126**(1):52-8.e5.
- 206 Sabetta JR, DePetrillo P, Cipriani RJ, Smardin J, Burns LA, Landry ML. Serum 25-hydroxyvitamin d and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults. *PLoS One* 2010;**5**(6):e11088.
- 207 Miller MR, Hankinson J, Brusasco V *et al.* Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;**26**(2):319–38.
- 208 Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR *et al.* Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;**200**(8):e70-e88.
- 209 Quanjer Ph.H, Tammeling G.J., Cotes J.E., Pedersen O.F., Peslin R., Yernault J-C.. Lung Volumes And Forced Ventilatory Flows. *European Respiratory Journal* 1993;**6**(16):5–40.
- 210 Jat KR. Spirometry in children. *Prim Care Respir J* 2013;**22**(2):221–9.
- 211 National Heart, Lung and Blood Institute. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma 2007.
- 212 Kako određujemo imamo li prekomjernu tjelesnu masu. [Online] Available at <https://petica.hr/cesta-pitanja/kako-odredujemo-imamo-li-prekomjernu-tjelesnu-masu/> [Accessed 17 December 2024]
- 213 Age-based Pediatric Growth Reference Charts. [Online] Available at <https://www.bcm.edu/bodycomplab/BMIapp/BMI-calculator-kids.html> [Accessed 17 December 2024]

- 214 South East London clinical guidance for the management of vitamin D deficiency and insufficiency in infants, children and young people up to the age of 18 years (refer to the SEL Paediatric Formulary for dose guidance in neonates) This document is for guidance only and not intended to replace the health professionals' clinical judgement:1–11.
- 215 Test Definition: 25HDN 25-Hydroxyvitamin D2 and D3, Serum. [Online] Available at <https://www.mayocliniclabs.com/api/sitecore/TestCatalog/DownloadTestCatalog?testId=83670> [Accessed 19 September 2024]
- 216 Vitamin D Deficiency and Nutritional Rickets: Supplementation and Treatment in Infants and Children. [Online] Available at <https://www.alderhey.nhs.uk/wp-content/uploads/2023/09/Vitamin-D-Treatment-Guidelines.pdf> [Accessed 13 February 2024]
- 217 Rêgo C, Cordeiro-Ferreira G, Lages-Fonseca MJ, Moura-Relvas M, Ferreira R, Pinto-da Costa S. A reviewed approach to vitamin D supplementation in pediatric age in Portugal. *PJP* 2024;**55**(1).
- 218 Plesner JL, Dahl M, Fonvig CE *et al.* Obesity is associated with vitamin D deficiency in Danish children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2018;**31**(1):53–61.
- 219 Pérez-Bravo F, Duarte L, Arredondo-Olguín M, Iñiguez G, Castillo-Valenzuela O. Vitamin D status and obesity in children from Chile. *Eur J Clin Nutr* 2022;**76**(6):899–901.
- 220 Adikaram SGS, Samaranayake DBDL, Atapattu N, Kendaragama KMDLD, Senevirathne JTN, Wickramasinghe VP. Prevalence of vitamin D deficiency and its association with metabolic derangements among children with obesity. *BMC Pediatr* 2019;**19**(1):186.
- 221 Tabassum N, Anwar KS, Sarkar PK *et al.* Vitamin D Serum 25(OH) cholecalciferol Insufficiency is Associated With Childhood Asthma: Recent Case-Control Findings From Bangladesh. *Glob Pediatr Health* 2024;**11**:2333794X241240574.
- 222 Jat KR, Khairwa A. Vitamin D and asthma in children: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Lung India* 2017;**34**(4):355–63.
- 223 Al-Zayadneh E, Alnawaiseh NA, Ajarmeh S *et al.* Vitamin D deficiency in children with bronchial asthma in southern Jordan: a cross-sectional study. *J Int Med Res* 2020;**48**(12):300060520974242.
- 224 Carlos A. Camargo, JR, Tristram Ingham, Kristin Wickens *et al.* Cord-Blood 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Respiratory Infection, Wheezing, and Asthma. *Pediatrics* 2011;**127**:180–7.
- 225 Gergen Peter J, Teach Stephen J, Mitchell Herman E, Freishtat Robert F, Calatroni Agustin, Matsui Elizabeth, Kattan Meyer, Bloomberg Gordon R, Liu Andrew H, Kerckmar Carolyn, O'Connor George, Pongracic Jacqueline, Rivera-Sanchez Yadira, Morgan Wayne J, Sorkness Christine A, Binkley Neil, Busse William. Lack of a relation between serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and asthma in adolescents. *Am J Clin Nutr* 2013:1228–34.
- 226 Mohammed Khalid Mansoor K, Iqbal S, Nowshad N, Abdelmannan D. Interplay between Vitamin D, Obesity, and Other Metabolic Factors in a Multiethnic Adult Cohort. *Dubai Diabetes Endocrinol J* 2020;**26**(4):152–7.
- 227 Castro M, King TS, Kunselman SJ *et al.* Effect of vitamin D3 on asthma treatment failures in adults with symptomatic asthma and lower vitamin D levels: the VIDA randomized clinical trial. *JAMA* 2014;**311**(20):2083–91.
- 228 Williamson A, Martineau AR, Sheikh A, Jolliffe D, Griffiths CJ. Vitamin D for the management of asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2023;**2**(2):CD011511.
- 229 Ferrer-Suay S, Alonso-Iglesias E, Tortajada-Girbés M, Carrasco-Luna J, Codoñer-Franch P. Vitamin D receptor gene ApaI and FokI polymorphisms and its association with inflammation

- and oxidative stress in vitamin D sufficient Caucasian Spanish children. *Transl Pediatr* 2021;**10(1)**:103–11.
- 230 Papadopoulou A, Kouis P, Middleton N *et al*. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D levels with asthma and atopy in Cypriot adolescents: a case-control study. *Multidiscip Respir Med* 2015;**10(1)**:26.
 - 231 Raflis R, Yuwono HS, Yanwirasti Y, Decroli E. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism FokI and 25-Hydroxy Vitamin D Levels among Indonesian Diabetic Foot Patients. *Open Access Maced J Med Sci* 2020;**8(A)**:846–51.
 - 232 Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Płaksej J *et al*. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male* 2008;**11(3)**:134–9.
 - 233 Moura SS de, Menezes-Júnior LAA de, Rocha AMS *et al*. Vitamin D deficiency and VDR gene polymorphism FokI (rs2228570) are associated with diabetes mellitus in adults: COVID-inconfidentes study. *Diabetol Metab Syndr* 2024;**16(1)**:118.
 - 234 Souza Freitas R de, Fratelli CF, Souza Silva CM de *et al*. Association of Vitamin D with the TaqI Polymorphism of the VDR Gene in Older Women Attending the Basic Health Unit of the Federal District, DF (Brazil). *J Aging Res* 2020;**2020**:7145193.
 - 235 Elneam AIA, Al-Dhubaibi MS, Bahaj Ss, Mohammed GF. TaqI polymorphism T/t genotypes at the vitamin D receptor gene (VDR) are associated with increased serum vitamin D levels in mild and moderate psoriasis vulgaris: A pilot study 2022.
 - 236 Forno E, Weiner DJ, Mullen J *et al*. Obesity and Airway Dysanapsis in Children with and without Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;**195(3)**:314–23.
 - 237 Ekström S, Hallberg J, Kull I *et al*. Body mass index status and peripheral airway obstruction in school-age children: a population-based cohort study. *Thorax* 2018;**73(6)**:538–45.
 - 238 Komakula S, Khatri S, Mermis J *et al*. Body mass index is associated with reduced exhaled nitric oxide and higher exhaled 8-isoprostanes in asthmatics. *Respir Res* 2007;**8(1)**:32.
 - 239 Barański K, Kocot K. The Effect of Obesity on Fractional Exhaled Nitric Oxide in School-Aged Children. *Children (Basel)* 2022;**9(9)**.
 - 240 Straumann A, Simon H-U. Eosinophilic esophagitis: escalating epidemiology? *J Allergy Clin Immunol* 2005;**115(2)**:418–9.
 - 241 Nulma S Jentzsch Muriel le Bourgeois, Jacques de Blic, Pierre Scheinmann, Serge Waernessyckle, Paulo A M Camargos. Nitric oxide in children with persistent asthma. *J Pediatr (Rio J)* 2006;**82**:193–6.
 - 242 Kovesi Tom DR. Exhaled nitric oxide and respiratory symptoms in a community sample of school aged children. *Pediatr Pulmonol* 2008;**43(12)**:1198–205.
 - 243 Da Salviano LDS, Taglia-Ferre KD, Lisboa S, Da Costa ACC, Da Campos HS, March MdFP. Associação Entre A Fração Exalada De Óxido Nítrico E Dados Da Espirometria E O Controle Clínico Da Aasma Em Crianças E Adolescentes. *Rev paul pediatr* 2018;**36(1)**:17–24.
 - 244 Bar Yoseph R, Livnat G, Schnapp Z, Hakim F, Dabbah H, Goldbart A, Bentur L. The effect of vitamin D on airway reactivity and inflammation in asthmatic children: A double-blind placebo-controlled trial. *Pediatr Pulmonol* 2015;**50(8)**:747–53.
 - 245 Meo S. association-of-serum-25hydroxyvitamin-d-with-lung-function-and-fractional-exhaled-nitric-oxide. *Biomedical Research* 2016;**27(4)**:1140–4.

- 246 Tsung-Chieh Yao MD, Yu-Ling Tu, Su-Wei Chang, Hui-Ju Tsai, Po-Wen Gu, Hsian-Chen Ning Man-Chin Hua Sui-Ling Liao Ming-Han Tsai, Chih-Yung Chiu, Shen-Hao Lai Kuo-Wei Yeh, Jing-Long Huang. Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels in Relation to Lung Function and Exhaled Nitric Oxide in Children 2014;**165(6)**:1098–103.
- 247 Norihiko Azuma, Tomoko Otani, Midori Kotani, Yuki Yasuda. Impact of Serum Adiponectin, Plasminogen Activator Inhibitor-1, and Oxidative Stress Levels on Eosinophilic Inflammation of the Airway and the Whole Body in Children with Obesity. *Tokyo Women's Medical University Journal* 2020;**4**:33–43.
- 248 Hofman-Hutna J, Hutny M, Matusik E, Olszanecka-Glinianowicz M, Matusik P. Vitamin D Deficiency in Obese Children Is Associated with Some Metabolic Syndrome Components, but Not with Metabolic Syndrome Itself. *Metabolites* 2023;**13(8)**.
- 249 Murugiah V, Pal P, Sahoo J, Nanda N, Shamanna SB. Association of Low Vitamin D Status With Adiponectin and Fibroblast Growth Factor-21 in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Cureus* 2024;**16(10)**:e71448.
- 250 Rashidmayvan M, Sahebi R, Avan A *et al*. Double blind control trial of vitamin D fortified milk on the expression of lncRNAs and adiponectin for patients with metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr* 2023;**15(1)**:9.
- 251 Juel CT-B, Ali Z, Nilas L, Ulrik CS. Asthma and obesity: does weight loss improve asthma control? a systematic review. *J Asthma Allergy* 2012;**5**:21–6.
- 252 Brita Stenius-Aarniala, Tuija Poussa, Johanna Kvarnström, Eeva-Liisa Grönlund, Mikko Ylikahri. Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study. *British Medical Journal* 2000;**320**:827–32.

8. PRILOZI

Prilog 1. Izmjerene vrijednosti FEV 1, FVC i FeNO u testiranim grupama ispitanika

ID	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma+Pretilost	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma+Pretilost	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma+Pretilost
	FEV 1				FVC				FeNO			
1	118	89	115	127	106	83	103	127	14	10	10	35
2	107	144	122	113	93	130	106	94	14	5	10	11
3	111	108	91	94	93	102	105	95	13	20	14	8
4	90	108	87	87	76	87	79	87	17	5	12	31
5	NA	100	113	106	NA	88	108	104	NA	14	11	12
6	133	114	47	107	115	94	58	110	15	11	13	10
7	91	100	91	109	94	83	87	104	17	5	16	32
8	101	111	104	89	87	92	84	80	10	14	5	14
9	86	98	98	116	71	95	101	110	5	21	14	43
10	92	104	86	92	76	93	89	76	13	8	11	19
11	88	123	95	110	92	115	97	116	18	6	23	67
12	67	81	97	103	75	69	78	93	12	5	7	37
13	82	103	89	111	82	97	92	108	7	8	17	29
14	97	102	116	NA	83	93	115	NA	18	9	34	9
15	97	92	121	117	86	96	115	112	12	16	58	22
16	91	78	117	101	77	77	96	94	9	21	NA	5
17	99	109	100	88	90	99	81	80	15	37	6	33
18	99	106	95	87	84	105	98	91	18	30	22	20
19	94	104	101	79	84	107	102	76	11	21	9	25
20	112	97	95	93	99	84	80	89	8	8	65	8
21	91	NA	110	83	82	NA	108	83	9	5	13	15
22	84	101	95	102	73	98	87	104	12	5	8	7
23	NA	100	90	104	NA	93	79	98	12	5	12	47
24	106	NA	98	79	89	NA	92	77	23	NA	23	5
25	NA	96	125	98	NA	91	113	91	NA	17	23	17
26	92	120	NA	107	83	114	NA	96	5	9	34	10
27	94	98	NA	96	82	82	NA	94	12	8	41	7
28	91	116	90	113	90	109	93	108	8	52	66	12
29	123	108	115	108	106	105	104	95	18	18	10	64
30	NA	98	103	92	NA	82	102	89	NA	16	11	29

Kratice: NA-not available

Prilog 2. Izmjerene razine vitamina D metodom tekućinske kromatografije

ID	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma+Pretilost
VITAMIN D (ug/L)				
1	24,06	45,89	25,2	17,78
2	17,85	23,09	17,4	34,52
3	17,44	56,49	18,5	29,44
4	22,57	20,56	27,4	32,04
5	34	26,24	14,7	20,36
6	18,52	10,4	9,8	28,22
7	18,65	17,52	16	11,32
8	34,11	20,1	37,07	11,83
9	28,43	19,95	25,91	24,65
10	23,74	26,01	15,7	25,84
11	16,31	9,24	65,4	28,74
12	24,94	19,11	33,7	17,64
13	34,1	13,76	20	19,3
14	14	11,4	34,7	22,17
15	22,41	9	26,4	9
16	11,34	7,74	33,7	44,78
17	24,08	15,44	20	20,9
18	25,63	7,83	19	25,39
19	15,38	7,78	29,3	18,96
20	8,28	18,88	21,91	30,56
21	19,59	20,04	27,08	28,4
22	29,67	86,85	15,9	19,86
23	34,08	33,99	17,5	31,09
24	30,09	10,22	21,34	17,49
25	47,47	22,11	22,4	9,7
26	35,56	40,63	10,82	28,24
27	52,1	43,17	9,82	15,23
28	38,02	25,59	20,4	43,32
29	9,06	8,75	12,96	18,4
30	15,69	9	18,7	24,65

Prilog 3. Rezultati frekvencije alela za izabrane polimorfizme receptora vitamina D

ID	TaqI			FokI			ApaI			BsmI		
	465-510	533-580	Call	465-510	533-580	Call	465-510	533-580	Call	465-510	533-580	Call
Astma 1	4.970	5.405	Both Alleles	17.046	24.579	Both Alleles	0.300	0.996	Negative	15.995	21.999	Both Alleles
Astma 2	4.382	4.519	Both Alleles	1.633	30.499	Allele Y	0.391	1.171	Negative	14.349	18.473	Both Alleles
Astma 3	4.625	4.574	Both Alleles	15.382	20.228	Both Alleles	0.306	1.136	Negative	16.030	20.422	Both Alleles
Astma 4	1.886	7.623	Allele Y	1.688	28.990	Allele Y	0.450	0.538	Negative	24.717	2.303	Allele X
Astma 5	4.411	3.910	Both Alleles	15.302	19.119	Both Alleles	0.334	0.782	Negative	14.937	18.230	Both Alleles
Astma 6	7.291	1.874	Allele X	1.594	28.521	Allele Y	0.287	0.678	Negative	2.264	30.527	Allele Y
Astma 7	7.436	1.973	Allele X	25.496	3.336	Allele X	0.272	1.552	Negative	2.824	35.088	Allele Y
Astma 8	4.675	4.553	Both Alleles	1.896	27.919	Allele Y	0.566	1.872	Negative	17.210	21.402	Both Alleles
Astma 9	1.715	7.118	Allele Y	14.728	18.998	Both Alleles	0.667	1.748	Negative	16.103	19.950	Both Alleles
Astma 10	4.573	4.906	Both Alleles	13.588	18.111	Both Alleles	0.484	1.457	Negative	15.485	19.870	Both Alleles
Astma 11	8.348	1.986	Allele X	17.926	25.047	Both Alleles	0.386	2.177	Negative	2.666	35.881	Allele Y
Astma 12	5.644	6.113	Both Alleles	1.915	34.943	Allele Y	0.347	1.418	Negative	16.881	22.681	Both Alleles
Astma 13	1.988	8.507	Allele Y	14.979	20.674	Both Alleles	0.373	0.450	Negative	23.261	2.036	Allele X
Astma 14	5.148	5.305	Both Alleles	22.806	2.427	Allele X	0.228	0.655	Negative	15.494	19.765	Both Alleles
Astma 15	5.752	5.904	Both Alleles	15.704	20.533	Both Alleles	0.684	0.935	Negative	17.379	21.750	Both Alleles
Astma 16	9.405	2.112	Allele X	23.018	2.419	Allele X	0.576	3.500	Unknown	2.346	30.375	Allele Y
Astma 17	4.790	5.062	Both Alleles	22.944	2.566	Allele X	0.415	1.178	Negative	15.356	18.449	Both Alleles
Astma 18	2.264	8.851	Allele Y	25.102	2.653	Allele X	0.755	14.977	Allele Y	24.982	2.347	Allele X
Astma 19	2.036	7.961	Allele Y	24.320	2.938	Allele X	0.404	0.627	Negative	27.402	2.709	Allele X

Astma 20	1.946	7.648	Allele Y	23.259	2.631	Allele X	0.308	8.140	Allele Y	24.704	2.468	Allele X
Astma 21	8.491	1.817	Allele X	15.606	20.767	Both Alleles	0.341	1.453	Negative	2.572	33.699	Allele Y
Astma 22	5.885	6.110	Both Alleles	1.892	32.440	Allele Y	0.431	1.184	Negative	18.122	23.175	Both Alleles
Astma 23	7.550	8.078	Both Alleles	23.580	2.257	Allele X	0.550	10.277	Allele Y	18.004	22.723	Both Alleles
Astma 24	8.529	1.615	Allele X	1.585	33.896	Allele Y	0.168	0.900	Negative	2.259	34.555	Allele Y
Astma 25	1.824	7.772	Allele Y	14.144	19.309	Both Alleles	0.421	1.222	Negative	22.778	2.362	Allele X
Astma 26	6.613	6.652	Both Alleles	1.673	30.541	Allele Y	0.674	2.439	Negative	18.188	23.863	Both Alleles
Astma 27	5.823	5.726	Both Alleles	1.848	30.982	Allele Y	0.557	1.911	Negative	18.523	23.606	Both Alleles
Astma 28	6.105	5.910	Both Alleles	16.681	21.017	Both Alleles	0.512	1.540	Negative	16.861	20.891	Both Alleles
Astma 29	2.095	7.628	Allele Y	14.805	17.896	Both Alleles	0.555	1.494	Negative	22.659	2.503	Allele X
Astma 30	6.287	6.180	Both Alleles	15.253	19.545	Both Alleles	0.472	3.613	Unknown	2.960	34.822	Allele Y
Pretilost 1	1.935	7.551	Allele Y	23.716	2.649	Allele X	0.411	9.472	Allele Y	27.943	2.625	Allele X
Pretilost 2	2.215	8.859	Allele Y	24.253	2.709	Allele X	0.439	0.780	Negative	25.747	1.955	Allele X
Pretilost 3	2.174	8.654	Allele Y	24.005	3.512	Allele X	0.726	3.115	Unknown	18.366	22.695	Both Alleles
Pretilost 4	10.234	4.844	Allele X	16.755	23.048	Both Alleles	0.503	2.904	Unknown	2.590	31.622	Allele Y
Pretilost 5	0.313	0.279	Negative	16.350	21.776	Both Alleles	0.705	15.926	Allele Y	18.525	23.899	Both Alleles
Pretilost 6	8.535	1.912	Allele X	16.560	23.307	Both Alleles	0.317	2.887	Unknown	2.784	36.180	Allele Y
Pretilost 7	5.188	5.431	Both Alleles	21.942	2.512	Allele X	0.396	3.899	Unknown	16.879	22.370	Both Alleles
Pretilost 9	2.075	8.330	Allele Y	24.264	3.120	Allele X	0.444	0.732	Negative	25.739	2.899	Allele X
Pretilost 10	2.104	8.271	Allele Y	1.787	29.247	Allele Y	0.592	1.761	Negative	26.656	2.530	Allele X
Pretilost 11	2.485	9.914	Allele Y	18.295	23.435	Both Alleles	0.927	21.038	Allele Y	26.654	3.046	Allele X

Pretilost 12	2.413	9.519	Allele Y	26.278	3.757	Allele X	0.940	17.881	Allele Y	25.937	2.467	Allele X
Pretilost 13	4.520	4.559	Both Alleles	22.061	2.629	Allele X	0.529	1.597	Negative	17.998	21.848	Both Alleles
Pretilost 14	2.400	9.423	Allele Y	26.708	3.519	Allele X	0.582	1.415	Negative	29.744	2.664	Allele X
Pretilost 15	2.236	9.174	Allele Y	24.742	2.948	Allele X	0.449	12.065	Allele Y	27.283	2.636	Allele X
Pretilost 16	5.650	5.680	Both Alleles	22.676	2.754	Allele X	0.400	1.647	Negative	15.916	19.841	Both Alleles
Pretilost 17	4.863	5.088	Both Alleles	21.229	2.696	Allele X	0.619	12.551	Allele Y	17.272	21.984	Both Alleles
Pretilost 18	2.342	9.516	Allele Y	15.421	21.810	Both Alleles	1.033	1.076	Negative	26.740	2.955	Allele X
Pretilost 19	5.449	5.811	Both Alleles	14.391	19.278	Both Alleles	0.425	1.176	Negative	15.547	20.132	Both Alleles
Pretilost 20	9.624	2.100	Allele X	15.783	21.087	Both Alleles	0.290	2.421	Negative	2.285	31.272	Allele Y
Pretilost 21	1.930	8.372	Allele Y	16.388	21.364	Both Alleles	0.327	0.530	Negative	25.270	2.765	Allele X
Pretilost 22	5.583	5.694	Both Alleles	24.517	2.813	Allele X	0.533	2.004	Negative	17.799	22.887	Both Alleles
Pretilost 23	2.364	9.674	Allele Y	18.262	23.432	Both Alleles	0.599	1.187	Negative	26.053	3.015	Allele X
Pretilost 24	6.555	6.040	Both Alleles	17.134	21.351	Both Alleles	0.707	16.119	Allele Y	17.800	21.963	Both Alleles
Pretilost 25	5.840	5.114	Both Alleles	16.329	19.762	Both Alleles	0.397	0.520	Negative	16.578	20.156	Both Alleles
Pretilost 26	5.612	5.386	Both Alleles	16.690	20.069	Both Alleles	0.461	1.275	Negative	18.584	23.274	Both Alleles
Pretilost 27	5.957	5.858	Both Alleles	16.579	21.062	Both Alleles	0.588	1.840	Negative	17.807	21.983	Both Alleles
Pretilost 28	6.090	6.184	Both Alleles	16.234	20.791	Both Alleles	0.573	1.916	Negative	16.598	20.627	Both Alleles
Pretilost 29	5.750	5.934	Both Alleles	15.487	20.401	Both Alleles	0.625	13.411	Allele Y	18.832	23.965	Both Alleles
Pretilost 30	2.202	9.636	Allele Y	15.949	21.964	Both Alleles	0.515	1.235	Negative	27.180	3.046	Allele X

Astma+ Pretiost 1	5.383	5.532	Both Alleles	15.509	20.878	Both Alleles	0.485	1.365	Negative	16.375	21.787	Both Alleles
Astma+ Pretiost 2	8.339	2.084	Allele X	24.772	3.114	Allele X	0.284	1.416	Negative	2.430	33.117	Allele Y
Astma+ Pretiost 3	5.377	5.540	Both Alleles	15.629	20.491	Both Alleles	0.350	0.975	Negative	15.305	19.549	Both Alleles
Astma+ Pretiost 4	5.725	5.986	Both Alleles	25.396	3.023	Allele X	0.485	1.410	Negative	17.165	21.961	Both Alleles
Astma+ Pretiost 5	2.253	9.036	Allele Y	16.074	20.595	Both Alleles	0.675	17.091	Allele Y	23.315	2.165	Allele X
Astma+ Pretiost 6	2.106	8.349	Allele Y	15.889	21.011	Both Alleles	0.835	14.843	Allele Y	25.642	2.590	Allele X
Astma+ Pretiost 7	4.654	4.588	Both Alleles	21.545	2.797	Allele X	0.664	1.693	Negative	18.062	22.486	Both Alleles
Astma+ Pretiost 8	6.095	6.077	Both Alleles	22.851	3.026	Allele X	0.481	1.413	Negative	16.401	19.498	Both Alleles
Astma+ Pretiost 9	4.927	5.319	Both Alleles	13.716	18.738	Both Alleles	0.621	2.384	Negative	16.639	21.289	Both Alleles
Astma+ Pretiost 10	6.038	6.005	Both Alleles	16.531	21.458	Both Alleles	0.400	0.820	Negative	24.989	2.707	Allele X
Astma+ Pretiost 11	6.278	6.418	Both Alleles	17.468	22.343	Both Alleles	0.653	2.252	Negative	18.315	23.476	Both Alleles
Astma+ Pretiost 12	2.296	9.854	Allele Y	17.031	23.790	Both Alleles	0.573	14.859	Allele Y	25.421	2.684	Allele X
Astma+ Pretiost 13	1.938	8.037	Allele Y	23.124	2.833	Allele X	0.421	0.544	Negative	22.659	1.908	Allele X
Astma+ Pretiost 14	4.825	4.830	Both Alleles	14.802	20.096	Both Alleles	0.405	1.339	Negative	16.604	22.230	Both Alleles
Astma+ Pretiost 15	5.110	5.143	Both Alleles	15.924	21.458	Both Alleles	0.422	1.437	Negative	15.676	20.119	Both Alleles

Astma+ Pretilost 16	1.579	6.965	Allele Y	1.640	29.653	Allele Y	0.508	0.777	Negative	24.009	1.952	Allele X
Astma+ Pretilost 17	5.080	5.140	Both Alleles	23.032	2.281	Allele X	0.288	0.863	Negative	15.840	19.503	Both Alleles
Astma+ Pretilost 18	4.509	4.642	Both Alleles	22.160	2.829	Allele X	0.515	14.341	Allele Y	19.080	23.244	Both Alleles
Astma+ Pretilost 19	4.347	4.272	Both Alleles	1.598	25.603	Allele Y	0.453	1.335	Negative	17.139	21.130	Both Alleles
Astma+ Pretilost 20	1.876	7.556	Allele Y	23.213	2.552	Allele X	0.675	1.410	Negative	24.571	2.254	Allele X
Astma+ Pretilost 21	7.024	1.487	Allele X	13.094	16.798	Both Alleles	0.556	3.510	Unknown	2.529	31.775	Allele Y
Astma+ Pretilost 22	5.951	5.845	Both Alleles	24.164	2.589	Allele X	0.491	1.297	Negative	17.447	21.809	Both Alleles
Astma+ Pretilost 23	5.632	5.840	Both Alleles	1.935	30.580	Allele Y	0.243	0.796	Negative	18.077	23.033	Both Alleles
Astma+ Pretilost 24	5.402	5.753	Both Alleles	14.333	19.377	Both Alleles	0.361	0.715	Negative	14.669	19.112	Both Alleles
Astma+ Pretilost 25	1.781	7.527	Allele Y	13.443	18.133	Both Alleles	0.375	0.860	Negative	20.562	1.556	Allele X
Astma+ Pretilost 26	1.732	7.867	Allele Y	22.574	2.430	Allele X	0.177		Negative	22.778	1.797	Allele X
Astma+ Pretilost 27	5.196	5.359	Both Alleles	23.007	3.390	Allele X	0.440	1.633	Negative	16.790	22.007	Both Alleles

Astma+ Pretilost 28	4.981	5.074	Both Alleles	1.196	27.925	Allele Y	0.462	1.485	Negative	15.849	20.425	Both Alleles
Astma+ Pretilost 29	4.566	4.623	Both Alleles	22.245	2.668	Allele X	0.465	1.730	Negative	17.068	21.755	Both Alleles
Astma+ Pretilost 30	1.716	7.056	Allele Y	1.819	29.100	Allele Y	0.540	0.845	Negative	26.097	2.369	Allele X
Kontrola 1	4.879	5.083	Both Alleles	17.250	23.869	Both Alleles	0.342	1.061	Negative	27.159	2.865	Allele X
Kontrola 2	5.232	5.037	Both Alleles	17.783	24.238	Both Alleles	0.431	1.564	Negative	20.538	27.169	Both Alleles
Kontrola 3	1.650	6.427	Allele Y	15.379	19.748	Both Alleles	0.193		Negative	26.538	2.616	Allele X
Kontrola 4	4.953	4.838	Both Alleles	24.582	2.243	Allele X	0.418	1.334	Negative	19.347	24.399	Both Alleles
Kontrola 5	4.776	4.642	Both Alleles	16.631	20.791	Both Alleles	0.283	0.647	Negative	18.828	23.234	Both Alleles
Kontrola 6	1.992	7.694	Allele Y	27.059	3.058	Allele X	0.537	0.383	Negative	29.785	2.706	Allele X
Kontrola 7	4.571	4.409	Both Alleles	25.246	2.817	Allele X	0.391	0.823	Negative	19.976	24.431	Both Alleles
Kontrola 8	4.927	5.227	Both Alleles	16.137	20.667	Both Alleles	0.276	0.821	Negative	19.334	24.080	Both Alleles
Kontrola 9	1.813	7.507	Allele Y	25.712	3.006	Allele X	0.384	0.174	Negative	30.089	3.346	Allele X
Kontrola 10	5.238	5.498	Both Alleles	1.855	32.475	Allele Y	0.345	0.941	Negative	20.001	26.392	Both Alleles
Kontrola 11	4.794	5.104	Both Alleles	1.913	35.117	Allele Y	0.317	0.874	Negative	19.964	26.778	Both Alleles
Kontrola 12	2.118	8.563	Allele Y	2.046	37.115	Allele Y	0.421	15.030	Allele Y	29.788	2.986	Allele X
Kontrola 13	2.119	8.109	Allele Y	17.602	24.296	Both Alleles	0.390	15.318	Allele Y	27.614	3.035	Allele X
Kontrola 14	5.222	5.329	Both Alleles	16.802	22.368	Both Alleles	0.312	0.877	Negative	17.797	22.534	Both Alleles

Kontrola 15	1.859	6.644	Allele Y	1.744	30.254	Allele Y	0.361	0.084	Negative	27.269	2.493	Allele X
Kontrola 16	5.085	5.025	Both Alleles	26.330	3.305	Allele X	0.217	0.387	Negative	18.593	23.027	Both Alleles
Kontrola 17	8.423	2.068	Allele X	2.330	31.140	Allele Y	0.265	1.341	Negative	3.087	36.609	Allele Y
Kontrola 18	2.156	8.115	Allele Y	17.956	22.053	Both Alleles	0.527	0.700	Negative	27.759	2.430	Allele X
Kontrola 19	1.968	7.401	Allele Y	18.319	22.983	Both Alleles	0.539	12.374	Allele Y	30.064	3.158	Allele X
Kontrola 20	4.886	4.677	Both Alleles	16.868	20.834	Both Alleles	0.248	0.504	Negative	19.458	23.679	Both Alleles
Kontrola 21	7.579	1.699	Allele X	17.478	23.079	Both Alleles	0.287	1.414	Unknown	2.931	36.549	Allele Y
Kontrola 22	5.611	5.811	Both Alleles	17.466	22.495	Both Alleles	0.303	0.731	Negative	18.909	23.398	Both Alleles
Kontrola 23	4.719	4.972	Both Alleles	16.958	22.696	Both Alleles	0.371	1.039	Negative	19.467	24.498	Both Alleles
Kontrola 24	3.629	3.946	Both Alleles	1.270	30.306	Allele Y	0.282	3.751	Allele Y	15.276	19.048	Both Alleles
Kontrola 25	5.435	5.081	Both Alleles	24.966	2.385	Allele X	0.484	13.092	Allele Y	17.037	21.519	Both Alleles
Kontrola 26	5.692	5.785	Both Alleles	17.294	22.128	Both Alleles	0.222	0.337	Negative	18.864	23.930	Both Alleles
Kontrola 27	5.340	5.044	Both Alleles	27.830	2.982	Allele X	0.357	0.950	Negative	20.515	25.376	Both Alleles
Kontrola 28	4.480	4.397	Both Alleles	17.962	22.117	Both Alleles	0.333	0.751	Negative	18.544	22.275	Both Alleles
Kontrola 29	2.315	8.656	Allele Y	27.263	2.996	Allele X	0.426	0.626	Negative	28.148	2.589	Allele X
Kontrola 30	2.221	8.288	Allele Y	NA	NA	NA	0.440	1.192	Negative	20.619	24.983	Both Alleles

NA – not available;

Prilog 4. Izmjerene vrijednosti adiponektina u uzorcima seruma ispitanika

ID	Kontrolna skupina	Pretilost	Astma	Astma+Pretilost
Adiponektin (ng/ml)				
1	2,442	5,225	7,838	3,895
2	4,230	7,482	16,175	7,056
3	7,320	7,361	13,150	4,359
4	6,261	11,552	5,975	1,890
5	11,220	7,239	6,613	6,040
6	4,149	7,773	6,625	1,680
7	3,785	14,238	5,738	5,357
8	7,782	3,631	9,975	3,335
9	8,494	7,757	1,650	7,415
10	3,000	12,191	1,825	6,268
11	8,744	3,513	4,613	2,660
12	6,528	9,875	13,688	3,335
13	9,950	7,875	7,963	4,403
14	5,896	15,875	3,213	10,217
15	5,508	1,775	15,375	1,478
16	7,150	2,888	7,300	4,455
17	-0,123	2,863	6,375	7,905
18	11,439	3,488	1,413	8,720
19	7,854	2,475	2,675	3,019
20	3,558	8,188	6,050	4,359
21	8,129	3,800	13,370	4,499
22	12,401	5,850	12,949	6,881
23	7,053	1,425	6,995	11,916
24	3,922	5,025	12,835	2,257
25	14,052	4,575	3,746	10,760
26	13,154	2,863	5,769	8,352
27	5,905	1,413	3,510	4,377
28	1,002	5,950	4,053	4,919
29	15,775	2,188	3,702	3,413
30	7,215	3,400	14,788	2,581

Životopis autora



+385 91 789 7604
zjelena86@gmail.com
10 000 Zagreb, Croatia
01.07.1986.
License B category

Social skills and competencies

Quick adaptation to new working environment, teamwork, good presentation skills, dependable, motivated, ambitious, determined, communicative, reliable, creative, proactive

Languages

English (C2)
German (A1)

Jelena Knežević

Work history

- Scientist Vaccines** May 2022
Genera d.d., Kalinovica, Croatia Current
Research and development of veterinary vaccines, development and validation of laboratory methods, planning of safety and efficacy studies, preparation of standard operating procedures. Support in project management- organization of departmental meetings, presentations and reports, project updates.
- Researcher** January 2013
Srebrnjak Children's Hospital, Zagreb, Croatia May 2022
Associate at Department for translational medicine. Experience in various laboratory techniques, with main focus on application of Flow Cytometry, High Performance Liquid Chromatography, RT-qPCR and ELISA in biomedicine-field of immunology. Participation in several national and EU research projects -preparation of administrative forms and reports, data collection, laboratory analysis.

- Volunteer research work** January 2012
Clinical Hospital Center Dubrava, Zagreb, Croatia May 2012
Collection and organisation of clinical data for ongoing research projects.

Education

- PhD** 2016
Faculty of Science, Zagreb, Croatia September 2025
PhD student at Department of Biology.
- Master of Science in Experimental Biology** 2008
Faculty of Science, Zagreb, Croatia 2011
- Bachelor of Science in Biology** 2005
Faculty of Science, Zagreb, Croatia 2008
- High school graduate** 2001
IV Gymnasium, UNESCO ASP – associated school, Zagreb, Croatia 2005

Technical skills

Laboratory and organisational skills

- Work with cell cultures and laboratory animals
- Flow Cytometry, High-Performance Liquid Chromatography, RT-PCR, ELISA, Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), Peptide Electrophoresis in Tris- tricin gel, Western-blot, Toxicity test (MTT test), Immunoprecipitation, bb FISH (Beacon Based Fluorescence In Situ Hybridization), virus titration, lyophilization, ultrafiltration
- Development, optimization and validation of biological assays
- Organization and conducting of meetings, presentations and reports
- Supporting manager in study planning and project updates

Professional training

Completed courses

- Design, production, purification and characterization of recombinant proteins
- Understanding bioassays: Supporting the development of biologics
- Upstream bioprocessing
- Intellectual property
- HPLC&UPLC: Solving problems
- Training in chromatography
- Flow Cytometry training programme

Publications

Scientific papers and congress reports

- Co-author and author of 8 published scientific papers
- Co-author and author of more than 20 abstracts presented as posters and oral abstracts at international and regional congresses

Interests

Acting classes, reading books, writing, drawing.