

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET

Eugenija Basioli Kasap

ULOGA GLOBALNE DNA METILACIJE KAO EPIGENETSKOG  
MARKERA U KRONIČNOJ OPSTRUKTIVNOJ PLUĆNOJ BOLESTI

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Disertacija je rađena na Odjelu pulmologije Službe za interne bolesti Opće bolnice Zadar i u Zavodu za pulmologiju Klinike za unutrašnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Sanda Škrinjarić-Cincar, dr. med.

Komentor: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš Obrovac

Rad ima 103 lista

„Not all beautiful women are models, some are doctors“

Hvala svim divnim ženama koje su bile uz mene na svakom koraku izrade ove disertacije i mojoj obitelji na beskrajnoj ljubavi i razumijevanju.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Rizični čimbenici za razvoj KOPB-a .....	2
1.1.1. Okolišni čimbenici rizika u razvoju KOPB-a.....	2
1.1.2. Razvoj i starenja pluća u KOPB-a.....	4
1.1.3. Genetska osjetljivost u KOPB-u.....	5
1.1.4. Patogeneza KOPB-a .....	6
1.1.5. Tijek bolesti, simptomi, heterogenost i fenotipovi KOPB-a .....	8
1.1.6. Komorbiditeti u KOPB-u.....	11
1.2. Epigenetske promjene u KOPB-u .....	13
1.2.1. DNA metilacija.....	15
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>18</b>
<b>3. CILJEVI .....</b>	<b>19</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE.....</b>	<b>20</b>
4.1. Ustroj studije .....	20
4.2. Ispitanici .....	20
4.3. Metode.....	21
4.3.1. Anamneza i klinički pregled.....	21
4.3.2. Mjerenje plućne funkcije .....	23
4.3.3. Elektrokardiografija i ultrazvuk srca .....	24
4.3.4. Računalna tomografija (CT).....	25
4.3.5. Upitnici za procjenu kvalitete života .....	26
4.3.6. Laboratorijska dijagnostička obrada.....	27
4.3.7. Određivanje globalne DNA metilacije .....	28
4.4. Statistička obrada podataka .....	28
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>30</b>
5.1. Osnovna obilježja bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika.....	30
5.1.1. Izloženost okolišnim rizičnim čimbenicima.....	32
5.1.2. Klinička obilježja bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.....	35
5.1.3. Kvaliteta života bolesnika s KOPB-om.....	43
5.2. Globalna DNA metilacija.....	46
5.2.1. Razlike u vrijednostima globalne DNA metilacije između ispitivanih skupina.....	47

5.2.2. Klasteri bolesnika s niskometiliranom i visokometiliranom globalnom DNA metilacijom.....	55
5.2.3. Povezanost globalne DNA metilacije i obilježja bolesnika s KOPB-om .....	59
5.2.4. Uloga DNA metilacije u predviđanju obilježja ispitanika i obilježja bolesti (ROC analiza) .....	64
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>67</b>
6.1. Kliničke različitosti bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru .....	67
6.2. Globalna DNA metilacija u bolesnika s KOPB-om.....	72
6.3. Zaključci rasprave .....	76
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>77</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>79</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>81</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>83</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>99</b>
<b>12. PRILOZI .....</b>	<b>103</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

- 6 MWT - 6-minutni test hoda uz mjerenje saturacije krvi kisikom (*engl. 6-minute walk test*)
- ABS - analiza plinova u krvi
- AGER - specifični receptor za krajnji proizvod napredne glikozilacije (*engl. advanced glycosylation end-product specific receptor*)
- ATS - Američko torakalno društvo (*engl. American Thoracic Society*)
- AUC - površina ispod krivulje (*engl. area under the curve*)
- BP- tjelesni bolovi
- CAT - test za mjerenje utjecaja KOPB-a na život bolesnika te praćenje utjecaja bolesti tijekom vremena (*engl. COPD Assessment Test*)
- CHRNA3 - kolinergički receptor nikotinske alfa 3 podjedinice (*engl. cholinergic receptor nicotinic alpha 3 subunit*)
- CHRNA5 - kolinergički receptor nikotinske alfa 5 podjedinice (*engl. cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit*)
- CO - ugljični monoksid
- COPDGene - studija genetske epidemiologije KOPB-a (*engl. COPD Genetic Epidemiology study*)
- CpG - regije DNA gdje citozin slijedi gvanin
- CT- računalna tomografija (*engl. computed tomography*)
- DLCO - difuzijski kapacitet pluća za ugljični monoksid (*engl. diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide*)
- DMSs - različito metilirana mjesta (*engl. Differentially Methylated Sites*)
- DNA - deoksiribonukleinska kiselina (*engl. deoxyribonucleic acid*)
- DNMT - DNA metiltransferaza (*engl. DNA methyltransferase*)
- ECLIA - elektrokemiluminiscencija
- ECLIPSE - longitudinalna procjena KOPB-a u identifikaciji predviđenih zamjenskih krajnjih točaka (*engl. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints*)
- EGFR - receptor epidermalnog čimbenika rasta (*engl. Epidermal growth factor receptor*)
- EKG - elektrokardiografija
- ERS - Europsko Respiratorono društvo (*engl. European Respiratory Society*)
- FAM13A - obitelj sa sličnim nizom 13 članova A (*engl. family with sequence similarity 13 member A*)

FBLN5 - epidermalni faktor rasta arterija i neuralnog grebena (*engl. developmental arteries and neural crest epidermal growth factor*)

FeNO - frakcije izdahnutog dušikovog monoksida (*engl. fractional exhaled nitric oxide*)

FEV1- forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi (*engl. forced expiratory volumen in 1st second*)

FEV1/FVC- forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi / forsirani vitalni kapacitet (*engl. forced expiratory volumen in 1st second / forced vital capacity*)

FVC - forsirani vitalni kapacitet (*engl. forced vital capacity*)

gDNA metilacija - globalna DNA metilacija (*engl. global DNA metylation*)

GERB - gastroezofagealna refluksna bolest

GH - opće zdravlje

GOLD - globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (*engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*)

GWAS - cjelogenomske studije (*engl. Genome Wide Association Studies*)

HDAC - histon deacetilaze (*engl. histone deacetylases*)

HHIP - Hedgehog interakcijski protein (*engl. Hedgehog Interacting Protein*)

HU - Hounsfieldova jedinica (*engl. Hounsfield Units*)

ICGN - međunarodna mreža za genetiku KOPB-a (*engl. International COPD Genetics Network*)

ICS - inhalacijski kortikosteroidi (*engl. inhaled corticosteroids*)

IgE - imunoglobulin E

IL-8 - interleukin 8

IMM - indeks mišićne mase

IREB2 - protein koji veže elemente koji reagiraju na željezo 2 (*engl. Iron Responsive Element Binding Protein 2*)

ITM - indeks tjelesne mase

K2 EDTA – kalijetilendiamintetraoctena kiselina (*engl. dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid*)

KBC - Klinički bolnički centar

KOPB - kronična opstruktivna plućna bolest

KVB - kardiovaskularne bolesti;

LABA - dugodjelujući  $\beta_2$  agonist (*engl. long-acting  $\beta_2$  agonist*)

LAMA - dugodjelujući antagonist muskarinskih receptora (*engl. long-acting antimuscarinic antagonist*)

MDSS - upitnik za procjenu kvalitete prehrane (*engl. Mediterranean Diet Serving Score*)

MH - mentalno zdravlje

MMP1 - matrična metalopeptidaza 1 (*engl. Matrix Metalloproteinase 1*)

MMP12 - matrična metalopeptidaza 12 ili makrofagna metaloelastaza (*engl. Matrix Metalloproteinase 12*)

mMRC - modificirana ljestvica zaduhe britanskog Medicinskog istraživačkog vijeća (*engl. The modified Medical Research Council Dyspnea Scale*)

NH<sub>4</sub>(+) - amonijev ion

NO - dušični monoksid

NO<sub>3</sub>(-) – nitratni ion

NOS2A - sintetaza dušikovog oksida 2 (*engl. Nitric Oxide Synthase 2*)

OB - Opća bolnica

PF - fizičko funkcioniranje

PH - plućna hipertenzija

PM<sub>2.5</sub> - čestice poprečnog presjeka manjeg od 2,5 mikrometara (*engl. particulate matter*)

ppb - dijelova na milijardu (*engl. parts per billion*)

PY - kutija na godinu (*engl. pack /year*)

RE - ograničenje zbog psihičkih poteškoća

RNA - ribonukleinska kiselina (*engl. ribonucleic acid*)

ROC - (*engl. Receiver Operating Characteristic*)

RP - ograničenje zbog fizičkih poteškoća

SABA - kratkodjelujući β<sub>2</sub>-agonisti (*engl. short-acting β<sub>2</sub> agonist*)

SAMA - kratkodjelujući antagonist muskarinskih receptora (*engl. long-acting antimuscarinic antagonist*)

SERPINA 1 - gen na kromosomu 14q32.1 koji kodira inhibitor serin proteaze (serpin)

SF - socijalno funkcioniranje

SF-36 - upitnik zdravstvenog statusa (*Short Form -36*)

SFTPD - Surfactant Protein D

SGRQ-C - upitnik bolnice St George za bolesnike s KOPB-om (*engl. Saint George Respiratory Questionnaire for COPD patients*)

SRGQ - upitnik bolnice St George o problemima s disanjem (*engl. Saint George Respiratory Questionnaire*)

Sur. - suradnik



UK - Ujedinjeno Karľjevstvo (*eng. United Kingdom*)

UZV - ultrazvuk

VT - osjećaj vitalnosti

Zaduha M - zaduha u mirovanju

Zaduha N - zaduha u naporu

## POPIS TABLICA

Tablica 5.1. Osnovna obilježja bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika .....	30
Tablica 5.2. Osnovna obilježja bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru .....	31
Tablica 5.3. Radni status i zanimanje bolesnika s KOPB-om .....	31
Tablica 5.4. Pušački status i pušačke godine (PY) u bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika .....	32
Tablica 5.5. Podaci vezani uz pušenje za bolesnike u Osijeku i Zadru .....	33
Tablica 5.6. Raspodjela bolesnika s KOPB-om obzirom na pušački status i indeks pušačkih godina .....	33
Tablica 5.7. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema profesionalnoj izloženosti i izloženosti biološkim gorivima.....	34
Tablica 5.8. Učestalost konzumiranja pojedinih namirnica od strane bolesnika s KOPB-om u Osijeku i u Zadru.....	35
Tablica 5.9. Simptomi bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.....	35
Tablica 5.10. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema stupnjevima mMRC skale.....	37
Tablica 5.11. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema broju egzacerbacija i prema posjetima hitnoj službi ili hospitalizaciji u posljednjih 12 mjeseci .....	38
Tablica 5.12. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema GOLD stupnjevima opstrukcije .....	38
Tablica 5.13. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema GOLD skupinama rizika.....	39
Tablica 5.14. Nalazi pokazatelja plućne funkcije u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru	40
Tablica 5.15. Nalazi ukupnog IgE i eozinofila u perifernoj krvi u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.....	40
Tablica 5.16. Zastupljenost pojedinih komorbiditeta u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i u Zadru .....	41
Tablica 5.17. Liječenje bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru .....	43
Tablica 5.18. Razlike u domenama i ukupnoj skali SGRQ između bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.....	43
Tablica 5.19. Razlike u domenama i ukupnoj skali kvalitete života SF-36 između bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.....	44

Tablica 5.20. Razlike u mMRC skali, CAT testu, SGRQ i SF-36 skali u odnosu na naviku pušenja.....	45
Tablica 5.21. Povezanost egzacerbacija s mMRC skalom i CAT testom, te SGRQ i SF-36 skalom .....	46
Tablica 5.22. Razlika u globalnoj DNA metilaciji između četiriju skupina u uzorku svih ispitanika (n =197) .....	47
Tablica 5.23. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena u uzorku svih ispitanika, u uzorku ispitanika u Osijeku i Zadru i obzirom na pušački status. ....	48
Tablica 5.24. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena u bolesnika s KOPB-om.....	48
Tablica 5.25. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena u kontrolnih ispitanika .....	49
Tablica 5.26. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača u uzorku svih ispitanika (n =197).....	50
Tablica 5.27. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača u skupini bolesnika s KOPB-om .....	50
Tablica 5.28. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača u skupini kontrolnih ispitanika .....	50
Tablica 5.29. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između ispitanika u Osijeku i Zadru u uzorku svih ispitanika .....	51
Tablica 5.30. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između ispitanika u Osijeku i Zadru u skupini bolesnika s KOPB-om .....	52
Tablica 5.31. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između ispitanika u Osijeku i Zadru u skupini kontrolnih ispitanika.....	52
Tablica 5.32. Razlike u g DNA metilaciji između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika u uzorku svih ispitanika.....	53
Tablica 5.33. Razlike u g DNA metilaciji između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika u skupini ispitanika u Osijeku .....	54
Tablica 5.34. Razlike u g DNA metilaciji između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika u skupini ispitanika u Zadru .....	54
Tablica 5.35. Povezanost DNA metilacije sa starosnom dobi bolesnika, dobi postavljanja dijagnoze, dobi početka pušenja, razdobljem od prestanka pušenja za bivše pušače, pušačkim godinama i indeksom tjelesne mase.....	60

Tablica 5.36. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na profesionalnu izloženost i izloženost biološkim gorivima .....	60
Tablica 5.37. Razlike u globalnoj DNA metilaciji obzirom na prisutnost simptoma KOPB-a .....	61
Tablica 5.38. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na opis nalaza CT-a toraksa .....	61
Tablica 5.39. Povezanost globalne DNA metilacije sa simptomima (mMRC skala, CAT upitnik) i brojem egzacerbacija .....	62
Tablica 5.40. Povezanost DNA metilacije s pokazateljima plućne funkcije .....	62
Tablica 5.41. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na GOLD klasifikaciju .....	63
Tablica 5.42. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na skupine rizika .....	63
Tablica 5.43. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na prisutnost komorbiditeta.....	64
Tablica 5.44. Vrijednosti ROC analize - kontrolni ispitanici vs bolesnici s KOPB .....	65
Tablica 5.45. Vrijednosti ROC analize - kašalj u bolesnika s KOPB-om .....	65
Tablica 5.46. Vrijednosti ROC analize - pušačke godine <i>PY</i> (< 20 <i>PY</i> vs. ≥ 20 <i>PY</i> ).....	66

## POPIS SLIKA

Slika 1.1. Epigenetske modifikacije u KOPB-u .....	14
Slika 1.2. Utjecaj međudjelovanja gena i okoliša na razvoj i heterogenost KOPB-a.....	17
Slika 5.1. Prikaz profesionalne izloženosti, izloženosti produktima sagorijevanja bioloških goriva ili kombinacija obaju rizičnih čimbenika u bolesnika u Osijeku i Zadru .....	34
Slika 5.2. Raspodjela simptoma i kombinacije simptoma u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.....	36
Slika 5.3. Raspodjela stupnjeva zaduhe prema mMRC u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru .....	37
Slika 5.4. Zastupljenost emfizema pluća i bronhiektazija u nalazima CT-a toraksa bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.....	39
Slika 5.5. Zastupljenost učestalijih pojedinačnih komorbiditete i njihovih kombinacija u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.....	42
Slika 5.6. Raspodjela vrijednosti globalne DNA metilacije u svih ispitanika (n =197).....	46
Slika 5.7. Raspodjela vrijednosti globalne DNA metilacije u bolesnika u Osijeku i Zadru.....	55
Slika 5.8. Raspodjela vrijednosti globalne DNA metilacije u dva klastera: klaster 1 (niskometilirana globalna DNA) i klaster 2 (visokometilirana globalna DNA) u cjelovitom uzorku ispitanika (n=197) .....	56
Slika 5.9. Udio niskometiliranih (klaster 1) i visokometiliranih (klaster 2) uzoraka globalne DNA metilacije u bolesnika u Osijeku i Zadru .....	56
Slika 5.10. Raspodjela klastera 1 i klastera 2 unutar ispitivanih podskupina bolesnika i kontrolnih ispitanika prema spolu.....	57
Slika 5.11. Raspodjela ispitanika s visokim vrijednostima globalne DNA metilacije (klaster 1) u ispitivanim podskupinama s obzirom na spol .....	58
Slika 5.12. Raspodjela ispitanika s visokometiliranim vrijednostima globalne DNA (klaster 2) prema ispitivanim skupinama s obzirom na pušački status.....	58
Slika 5.13. Zastupljenost klastera 2 u ispitivanim podskupinama obzirom na spol .....	59
Slika 5.14. Površina ispod krivulje (AUC) gDNA s obzirom na prisutan kašalj .....	65
Slika 5.15. Površina ispod krivulje (AUC) gDNA s obzirom na trajanje pušačkih godina.....	66

## 1. UVOD

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) treći je vodeći uzrok smrti u svijetu. Od KOPB-a u svijetu boluje 65 milijuna, a umire oko 3 milijuna ljudi godišnje, u Europi 200 000 do 300 000 bolesnika. Bolest je to starijih osoba koja se pokazuje obično nakon 40-godine života, a stopa prevalencije, incidencije i smrtnosti bitno je veća u starijoj populaciji. Međutim 90% mlađih od 70 godina umiru zbog KOPB-a u zemljama s niskim i srednjim nacionalnim dohotkom (1). Bolest pogađa oba spola, a noviji dokazi upućuju na spolnu razliku u osjetljivosti na štetne učinke pušenja cigareta na pluća, pa je ženski spol povezan s težim oštećenjem plućne funkcije i težom kliničkom slikom uz nižu izloženost pušenju (2).

Trenutno je shvaćanje patogeneze KOPB-a da su trajno oštećenje strukture pluća, kao i opstrukcija protoka zraka nastali kao posljedica abnormalnog upalnog odgovora na inhalirane štetne čestice i plinove (3). Bolest također obilježuju brojni sustavni upalni učinci i progredijentni tijek te brojne razlike u rizičnim čimbenicima, obrascima upale, patološkim promjenama i kliničkim pokazateljima koji ovu bolest čine iznimno složenom (4).

Za razvoj KOPB-a odavno se zna da su potrebni okolišni čimbenici i genetska sklonost, iako su tek relativno nedavna otkrića potvrdila da je kontrola nad izražavanjem genetskih osobina moguća (5, 6). Iako se smatra da brojni okolišni čimbenici, od najranije životne dobi kao i tijekom cijelog života, mogu utjecati na ekspresiju gena, još uvijek se malo zna o konkretnim epigenetskim modifikacijama u genima za koje je dokazano da su povezani s upalom i KOPB u plućima bolesnika kao i o načinu na koji utječu na pojavu, tijek i ishod te bolesti. Posljednjih desetljeća patogeneza KOPB-a intenzivno se istražuje pa iako su postignuti veliki napredci u shvaćanju složenih patogenetskih mehanizama, još uvijek nedostaju ključni dokazi koji bi ovu bolest učinili bolje liječivom i izmijenili njezin tijek (4, 5).

KOPB u mnogih bolesnika ima nepovoljan tijek i lošu prognozu (3). S obzirom na svoju heterogenost, suvremeno je shvaćanje KOPB-a da se pod zajedničkim „naslovom KOPB“ ustvari krije spektar različitih bolesti koje se preklapaju s mnogim sustavnim učincima i izvanplućnim pokazateljima, te da bi ih trebalo različito liječiti. S obzirom na nedostatno razjašnjenu ulogu različitih patogenetskih procesa, pristup dijagnosticiranju i liječenju te bolesti još uvijek je nezadovoljavajući (7). Mjere primarne i sekundarne prevencije te dijagnosticiranje bolesti u ranim stadijima često su neuspješne, a sadašnje mogućnosti farmakološkog i nefarmakološkog liječenja usmjerene na sprječavanje progresije bolesti, nisu

zadovoljavajuće upravo zbog toga jer ne uzimaju u obzir heterogenosti i specifične mehanizme bolesti.

S obzirom na činjenicu da su različiti čimbenici odgovorni za razvoj KOPB-a, obolijevanje od ove bolesti vjerojatno se može spriječiti ili smanjiti rizik od obolijevanja. Nove spoznaje o specifičnim patogenetskim mehanizmima i utjecaju epigenetike na tijek i razvoj KOPB-a, pored boljeg razumijevanja i prevencije ove bolesti, trebale bi također dati i novu perspektivu preciznog i personaliziranog liječenja u obliku bioloških lijekova, nanotehnologije, a možda i genetske terapije za specifične oblike bolesti (8).

### **1.1. Rizični čimbenici za razvoj KOPB-a**

Definicija KOPB-a povijesno je opširna i ističe važna obilježja bolesti uključujući čimbenike rizika odgovorne za njezin nastanak. Prema najnovijoj definiciji po GOLD-u: „Kronična opstruktivna plućna bolest vrlo je česta, a može se spriječiti i liječiti“. Obilježavaju je trajni respiratorni simptomi i ograničenje protoka zraka nastali zbog poremećaja na razini dišnih putova i alveola, a koje su obično uzrokovane izlaganjem toksičnim česticama i plinovima koje su potaknule abnormalan odgovor na njih uslijed osobina domaćina. U bolesnika su često prisutni komorbiditeti koji mogu utjecati na težinu i smrtnost (1).

Od KOPB-a ne obolijevaju sve osobe koje su izložene udahnutim štetnim česticama i plinovima, te se naglašava činjenica da se bolest razvija u osoba koje su sklone ili imaju uvjete za nastanak te bolesti. U nastanku KOPB-a veliku ulogu imaju genetski utjecaji na razvoj i starenje pluća. Bolest je proporcionalno zastupljenija u starijim dobnim skupinama, a starenje cijele populacije u velikoj mjeri doprinosi masovnoj pojavi ove bolesti (9). Pojednostavljeno rečeno, KOPB nastaje vrlo složenim suodnosom okolišnih i genetskih rizičnih čimbenika te starenja pluća, odnosno njihovog promijenjenog rasta i razvoja (1).

#### ***1.1.1. Okolišni čimbenici rizika u razvoju KOPB-a***

Pušenje cigareta najvažniji je i najčešći pojedinačni čimbenik rizika za razvoj KOPB-a u cijelom svijetu, a posebno u razvijenim zemljama svijeta, ali ne i jedini. S druge strane poznato je da manje od 20 % pušača razvije KOPB. U zemljama u razvoju glavni okolišni čimbenik za razvoj KOPB-a je kuhanje i grijanje na biološka goriva (10). Profesionalno izlaganje štetnim česticama i plinovima također predstavlja važan okolišni čimbenik rizika za razvoj KOPB-a. Smatra se da zagađenje atmosferskog zraka iz prometa i drugih izvora, kao i

pasivno pušenje, te prehrambeni čimbenici također bitno doprinose razvoju KOPB-a, ali dokazi nisu dostatno uvjerljivi da bi se zaključivalo o jasnoj uzročno-posljedičnoj vezi. Kronična astma i tuberkuloza bolesti su koje doprinose slabljenju plućne funkcije i kao takve mogu dovesti do nepovratne opstrukcije dišnih putova i doprinijeti KOPB-u (10).

Iako je pušenje uvjerljivo najvažniji okolišni čimbenik rizika za KOPB, čak 25 % do 33 % bolesnika čine nepušači (11). U ovih bolesnika nužno je potvrditi izloženost drugim čimbenicima rizika kao što je profesionalno izlaganje biološkim gorivima te drugim onečišćenjima zraka iz okoliša (12, 13). Izloženost manje čestim rizičnim čimbenicima je važno jer bitno pridonosi rastućem globalnom teretu KOPB-a u zemljama u razvoju. Međudjelovanje pušenja i izloženosti drugim rizičnim čimbenicima, posebice na radnom mjestu, može uvelike povećati rizik od nastanak KOPB-a (10).

Postoje četiri glavne vrste unutarnjeg onečišćenja, a to su produkti izgaranja, kemikalije, radon i biološke tvari. Najviše istraživanja bilo je usredotočeno na izgaranja bioloških goriva, prvenstveno u pećima za kuhanje i grijanje na kruta goriva. Takvim se pećima koristi u više od polovice kućanstava u svijetu i pokazalo se da na mnogim lokacijama proizvode visoke unutarnje koncentracije ugljičnog monoksida i drugih zagađivača povezanih s izgaranjem. Smanjena funkcija pluća uočena je u žena koje više vremena provode u blizini peći na ugljen u usporedbi s onima koje se koriste plinskim pećima. Uporaba bioloških goriva u kućanstvima povezuje se s respiratornim infekcijama u djece, utječe na razvoj pluća i preduvjet je za razvoj KOPB-a (14, 15).

Smatra se da je za blizu 20 % bolesnika s KOPB-om odgovorna profesionalna izloženost. Istraživanja su pokazala da je odgovor dišnih putova na udisanje organske prašine, npr. žitne prašine, može uzrokovati regrutiranje neutrofila u proksimalne i distalne dišne putove (12). Istraživanja rađena na populaciji rudara u rudnicima ugljena i zlata otkrila su bitnu povezanost između gubitka funkcije pluća i kumulativnog udisanja rudničke prašine (16).

Atmosferska onečišćenja poznata su kao važan rizični čimbenik za bolesti respiratornog sustava. U usporedbi s ranim studijama koje su bile usredotočene na teške epizode onečišćenja zraka, novije studije istražuju uobičajene razine onečišćenja u gradovima u razvijenom svijetu. Nedavne epidemiološke studije pokazale su da je onečišćenje zraka česticama koje se mogu udisati važan čimbenik u nastanku respiratornih simptoma, oštećenja funkcije pluća, povećanog broja hospitalizacija i drugih posjeta zdravstvenoj zaštiti zbog respiratornih i kardiovaskularnih bolesti, kao i povećanim izostankom s posla i škole ili drugim ograničenjima u aktivnostima, te povećane smrtnost. Kako su mnoga od tih stanja



važna u bolesnika s KOPB-om, atmosferska onečišćenja su zasigurno povezana na izravan i posredan način s nastankom i razvojem KOPB-a (17).

Više epidemioloških studija istaknulo je da prehrana može biti povezana s razvojem pluća te oštećenjem ili protektivnim učinkom na funkciju pluća. Istraživanja su pokazala da je visok unos ribe i omega-3 masnih kiselina povezan s boljom funkcijom pluća i nižim stupnjem KOPB-a. Međutim, istraživanja su bila usredotočena na pojedinačne hranjive tvari ili namirnice. Budući da se hrana konzumira zajedno, a hranjive tvari mogu međusobno reagirati, smatra se da treba procjenjivati ukupnu prehranu umjesto pojedinačnih sastavnica. U muškaraca prehrana bogata voćem, povrćem i ribom može smanjiti rizik od KOPB-a, dok prehrana bogata rafiniranim žitaricama, suhomesnatim i crvenim mesom, slatkišima i prženim krumpirom može povećati rizik od KOPB-a (18).

### ***1.1.2. Razvoj i starenja pluća u KOPB-a***

Osobni biološki čimbenici u velikoj mjeri utječu na razvoj i starenje pluća kao odgovor na utjecaj brojnih vanjskih čimbenika tijekom različitih vremenskih razdoblja. Pluća su osobito vulnerabilna ako se izloženost dogodila u ranom djetinjstvu ili intrauterino. Među važne čimbenika moguće izloženosti ubraja se prijevremeno rođenje, pothranjenost, prehrana siromašna povrćem i voćem, a važnu ulogu ima spol i autoimunost. Djeca rođena prijevremeno često ne dosežu puni razvoj pluća u odrasloj dobi i kasnije slijede krivulju loše plućne funkcije koja u odrasloj dobi potencijalno izgleda kao u KOPB-u (5, 6). Pluća tih osoba obilježavaju takozvane „disanapsa“. Pojam disanapsa je uveden 80-tih godina prošlog stoljeća a označava nerazmjer promjera bronhalnog stabla i veličine pluća (19). Osobe koje imaju potvrdu disanapsi na CT-u imaju mnogo veće ograničenje protoka zraka na CT-u. Studije su pokazale da je broj terminalnih bronhiola u odraslih osoba s KOPB-om bitno smanjen (20), no nije do kraja jasno je li taj nalaz posljedica pušenja ili disanapsi odnosno abnormalnog razvoja pluća u ranom životnom razdoblju ili ta dva mehanizma mogu postojati zajedno (6). Oštećenje plućne funkcije u odrasloj dobi često je povezano s abnormalnim razvojem pluća zbog različitih utjecaja u ranoj dobi, a kako se preživljenje prijevremene rođene djece unazad 30-tak godina izrazito povećalo, u bliskoj budućnosti očekuje se da će biti sve više onih s nedovoljno razvijenim plućima (21).

Fiziološko starenje pluća pogoduje nastanku KOPB-a. Pokazalo se da u KOPB-u dolazi do abnormalnog i za dob neprimjerenog procesa koji je vrlo sličan normalnom starenju plućnog tkiva. Molekularni mehanizmi u patogenezi KOPB-a u potpunosti su usporedivi s

procesima normalnog starenja pluća. Te poveznice dovele su do teorije da je KOPB bolest ubrzanog starenja pluća (22). Starenje pluća obilježava gubitak elastičnosti, upala i hiperinflacija. Jaka izloženost oksidansima utječe na stanice i može dovesti do njihovog oštećenja čak i u inače zdravih i mlađih osoba. U bolesnika s KOPB-om kao i u starih osoba oksidativni stres dovest će do oštećenja i zbog promijenjenog načina obnove stanica (23). Oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNA) osnova je genetske nestabilnosti, poremećaja staničnog ciklusa i smrti stanice. Mitohondrijska disfunkcija u pušača jedan je od glavnih uzroka povećane razine proizvodnje kisikovih slobodnih spojeva, što je izravno povezano sa starenjem. Visoka koncentracija slobodnih kisikovih spojeva dovodi do oštećenja DNA i skraćivanja telomera koje su pokazatelj senescencije stanica i procesa starenja (24). Jedno od glavnih obilježja KOPB-a upravo je povećana stanična senescencija te poremećaj regulacije ekstrastaničnog matriksa i iscrpljenje matičnih stanica. Sve to dovodi do zatvorenog procesa koji podržava upalu i daljnje oštećenje struktura pluća. Bolesnici s KOPB-om u odnosu na procijenjenu starost pluća mnogo su mlađe životne dobi. Te spoznaje mogu biti korisne za moguće buduće intervencije osobito u bolesnika s ranim početkom KOPB-a i ubrzanim propadanjem plućne funkcije, koji čine najranjiviju podskupinu, a za koje zasad ne postoji zadovoljavajuće liječenje (25).

Osobe starije životne dobi, osobito one s niskim socioekonomskim statusom, niskim obrazovnim stupnjem, koje u anamnezi imaju astmu ili su u djetinjstvu imali tešku respiratornu infekciju, imaju povećan rizik za nastanak KOPB-a (3). Pokazalo se također da su žene osjetljivije na učinke duhanskog dima. Učestalija pojava KOPB-a u žena koje su nepušači dovela je i do autoimune teorije kao mogućeg objašnjenja za prisutnost KOPB-a među ženama nepušačima (12). Dokazi iz brojnih istraživanja upućuju da je osjetljivost za nastanak KOPB-a kao i težina KOPB-a u žena drugačija. Razlike u biološkim pokretačima povezanim s KOPB-om između žena i muškaraca slabo su poznati, ali od budućih istraživanja očekuje se identificiranje spolno specifičnih genetskih asocijacija i molekularnih putova, koji će možda biti korisni za spolno specifične dijagnostičke i terapijske pristupe KOPB-u (26).

### ***1.1.3. Genetska osjetljivost u KOPB-u***

Za razliku od nekih nasljednih bolesti poput cistične fibroze, razumijevanje genetike složenih pulmoloških bolesti kao što je KOPB tek je na početku. Iako je učinjen veliki napredak ranim otkrivanjem inhibitora serpin peptidaze, na genu SERPINA1, koji je odgovoran za nedostatak alfa-1 antitripsina, novija istraživanja pokazala su da u podlozi

KOPB-a postoji složeniji genetski sustav (27, 28). Uočeno je da je KOPB multifaktorijalna bolest s uključenim različitim genima kod kojih mutacije ili poremećaji u ekspresiji mogu doprinosti patogenezi te bolesti. Genski izražaj je također važan u reakciji osobe na čimbenike okoliša (29). Istraživanja na blizancima pokazala su da 60 % individualne osjetljivosti za razvoj KOPB-a ovisi o genetskim čimbenicima (30).

Najveća saznanja o učincima promjena u genima, uočenih u KOPB-u dobivana su iz tzv. cjelogenomskih studija (GWAS – engl. Genome Wide Association Studies) (31). Takvim se istraživanjima služimo za identificiranje gena povezanih s određenom bolešću ili nekom osobinom bolesti, bez unaprijed postavljene hipoteze o povezanosti određenog gena i istraživanog svojstva. Cjelogenomske studije prepoznale su stotine genetskih varijanti koje utječu na rizik od KOPB-a, smanjenje plućne funkcije i drugih svojstava povezanih s KOPB-om (32). U obiteljskim i populacijskim studijama uočen je bitan udio rizika od KOPB-a povezan s genetskim varijacijama. Međunarodni konzorcij za genetiku KOPB-a i GWAS UK Biobank za KOPB otkrio je 82 bitne povezanosti s KOPB-om na razini čitavog genoma. Među genima koji su povezani s ovisnošću o nikotinu, nađeno je da su *CHRNA5* i *CHRNA3* također bitni i za razvoj KOPB-a (28, 29). Također je nađeno da su genetske varijante povezane s drugim plućnim i neplućnim osobinama, odgovorne za barem dio heterogenosti KOPB-a. One su imale značajan učinak na ukupni rizik od KOPB-a, implicirajući rizična događanja u ranoj životnoj dobi i često upućujući na gene za koje se nije mislilo da imaju ulogu u KOPB-u (32). Sadašnje cjelogenomske studije u KOPB-u bave se određivanjem gena za plućnu funkciju kao i različitih fenotipova povezanih s KOPB-om (33). Potvrđeno je da su neke genomske regije povezane s određenim fenotipovima KOPB-a. Otkriveno je osam zajedničkih gena unutar GWAS lokusa (*HHIP*, *FAM13A*, *IREB2*, *AGER*, *MMP1*, *MMP12*, *SFTPD* i *FBLN5*) koji određuju fenotip emfizema i u ljudi i u miševa (33).

Dosad objavljene najveće GWAS studije u KOPB-u su ECLIPSE, COPDGene i ICGN kohorte (5). Novootkriveni geni za KOPB-e studijama povezanosti pružili su nove uvide u patogenezu KOPB-a.

#### ***1.1.4. Patogeneza KOPB-a***

Tradicionalno je shvaćanje etiopatogeneze KOPB-a da je to bolest koja je izazvana pušenjem cigareta u genetski predisponiranih osoba u kojih upala, oksidativni stres i neravnoteža proteaza-antiproteaza čine patogenetski trijas (34).

Poznato je da se udisanjem toksičnih čestica i plinova aktiviraju receptori i stimulira urođeni imunološki odgovor koji regrutira neutrofile i makrofage u pluća te aktivira epitelne stanice dišnih putova. Aktivacija stanica pokreće oslobađanje upalnih citokina i procese koji održavaju kroničnu upalu koja traje i nakon prekida pušenja. Oksidativni stres uzrokovan reaktivnim kisikovim spojevima odgovoran je za destrukciju tkiva i oštećenje DNA. Upalne stanice, osobito neutrofili, izlučuju proteaze kao što je neutrofilna elastaza, proteinaza 3, mijeloperoksidaza i katepsin. Upala, oksidativni stres i neravnoteža proteaza-antiproteaza djeluju jedni na druge tako da se pojačavaju utječući na napredovanje bolesti. Bitnu ulogu ima i bakterijska kolonizacija koja osigurava antigene koji podržavaju upalu dišnih putova i aktiviraju epitelne stanice dišnih putova na otpuštanje IL-8 (35). Nova istraživanja su dokazala da je mitohondrijska disfunkcija u dišnim putovima i plućnom parenhimu pojedinaca ključna za patogenezu KOPB-a jer pojačava neravnotežu proteolize, indukciju apoptoze, oksidativni stres i kronični upalni odgovor (36).

KOPB obilježava kronična upala dišnih putova, parenhima i plućne vaskulature. S vremenom posljedična oštećenja nastala zbog opisanih procesa dovodi do vrlo raznolikih patoloških promjena karakterističnih za KOPB (3).

Klinički je to heterogena bolest koju treba promatrati kao sindrom obilježen prepoznatljivim obrascem kroničnih simptoma, te strukturnih i funkcionalnih oštećenja koji nastaju zbog interakcija gena i okoliša tijekom životnog vijeka, a koji utječu na razvoj i starenje pluća. Istraživanja su pokazala da su promjene mitohondrijske funkcije u KOPB-u ključne u patogenezi KOPB-a. Mitohondrijska funkcija u KOPB-u je izmijenjena pod utjecajem cigaretnog dima. Promjene su potaknute dimom cigareta i povezane s apoptozom, proliferacijom, depolarizacijom mitohondrija i povećanom upalom u epitelu dišnih putova (37). U posljednjem se desetljeću patogeneza KOPB-a intenzivno istražuje, a prikupljeni dokazi ukazuju da je bolest mnogo složenija nego što se tradicijski shvaćalo i da su uključeni brojni molekularni putevi. U kontekstu novog pristupa, KOPB se promatra kao klinički sindrom obilježen prepoznatljivim obrascem kroničnih simptoma i strukturnih ili funkcionalnih oštećenja zbog interakcija gena i okoline tijekom životnog vijeka, a koji utječu na normalan razvoj i starenje pluća. Nastanak i progresija mnogih složenih bolesti poput KOPB-a proizlaze iz međugre niza međusobno povezanih uzročnih gena tako da povećavaju učinke pojedinih utjecaja. Biološki odgovor i kliničke posljedice mogu varirati ovisno o dobi pojedinaca u kojoj se javlja određeno međudjelovanje gena i okoliša kao i nakupljanju brojnih međudjelovanja gena i okoline koja su se događala tijekom života (38).

Sve bolje razumijevanje učinaka dinamičkih međudjelovanja između gena i okoliša, danas se dobiva integracijom informacija u širokom rasponu istraživačkih polja genomike, epigenomike, transkriptomike, proteomike, metabolomike koje se provode u sklopu cjelogenomskih studija (6). Koristeći nove tehnologije u studijama cijelog genoma služe za otkrivanje čitavih mreža bioloških putova koje su u podlozi različitih oblika bolesti. Ta će istraživanja pružiti detaljniji uvid u patogenezu KOPB-a, a time omogućiti ranije prepoznavanje, te rano i precizno liječenje bolesnika s KOPB-om na temelju specifičnih patogenetskih mehanizama za bolest (5, 6).

#### ***1.1.5. Tijek bolesti, simptomi, heterogenost i fenotipovi KOPB-a***

Do unazad 20-tak godina mišljenje o liječenju bolesti bilo je prilično nihilističko (39). I danas u mnogih bolesnika spori tijek razvoja simptoma i mišljenje koje imaju o tegobama i pušenju onemogućuju sprječavanje bolesti i ranu dijagnozu. Bolesnici prilagođavaju način života tegobama koje ne pripisuju bolesti već smatraju „normalnim“ s obzirom na pušenje i dob. Tjelesna neaktivnost uz nastavak pušenja i neliječenje put je k progresiji bolesti za koju u razvijenom stupnju bolesti postoje skromne mogućnosti liječenja (40).

Dijagnoza KOPB-a razmatra se u bolesnika sa simptomima kašlja, iskašljavanja, zaduhe i netolerancije tjelesnog napora, koji su dugotrajno bili izloženi poznatim okolišnim rizičnim čimbenicima. Dijagnoza se postavlja na temelju spirometrijskog nalaza i pokazatelja trajne opstrukcije dišnih putova nakon primjene bronhodilatatora,  $FEV_1/FVC \leq 0,7$  (forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi / forsirani vitalni kapacitet). Stupanj opstrukcije prema globalnoj inicijativi za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) određuje se prema vrijednosti FEV<sub>1</sub> (forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi). Simptomi bolesnika s KOPB-om procjenjuju se pomoću standardiziranih upitnika, CAT (COPD Assessment Test) i mMRC (modified Medical Reserach Concil) skali. U procjeni bolesti služimo se mjerama uhranjenosti, indeksa tjelesne mase (ITM) i/ili indeks mišićne mase (IMM) te kapacitetom vježbanja procijenjenim šestominutnim testom hoda (6MWT) (41). Prema nalazu opstrukcije dišnih putova, te osobito simptomima i riziku od egzacerbacija, smjernice GOLD-a preporučuju shematizirani pristup liječenju bolesnika s KOPB-om (3).

Iako se u kliničkoj praksi najveća važnost pridaje intenzitetu simptoma i stupnju opstrukcije dišnog putova kao i riziku od loših ishoda bolesti zbog učestalih egzacerbacija, bolesnici se s KOPB-om međusobno razlikuju prema brojnim drugim karakteristikama

bolesti. KOPB je vrlo heterogena bolest koja tijekom vremena napreduje i pogoršava se i pri tom nisu svi bolesnici jednako ugroženi. Precizni patološki biološki mehanizmi koji pridonose heterogenosti i napretku KOPB-a definiraju tzv. endotipove bolesnika i rijetko su poznati u KOPB-u. Jedan od rijetkih primjera endotipa KOPB-a je genetski nedostatak alfa-1-antitripsina. Odgovoran je za bolest u samo malog broja bolesnika s KOPB-om, ali važno ga je prepoznati jer omogućuje precizno liječenje nadomjeskom alfa-1-antitripsina. Dok ne budu poznati drugi endotipovi bolesnika s KOPB-om, utjecaj na tijek bolesti pokušava se procijeniti na temelju brojnih vanjskih obilježja bolesti tzv. fenotipova (4). Za mnoge fenotipove dokazano je pušenje kao zajednički čimbenik rizika, dok je utjecaj drugih rizičnih čimbenika u određivanju fenotipova manje istražen i dalje slabo shvaćen. Najvažniji je doprinos određivanja fenotipova KOPB-a je njihova povezanost s kliničkim ishodima (42).

Još sredinom prošlog stoljeća opisano je da postoje tipovi bolesnika koje obilježavaju vanjske karakteristike kroničnog bronhitisa i emfizema pluća tzv. *Pink puffer* i *Blue bloater* koji su i danas prepoznati kao fenotip bolesnika s dominantnim emfizemom i fenotip bolesnika s kroničnim bronhitisom (43). Uz navedene poznat je čitav niz drugih fenotipova bolesnika s KOPB-om koji se mogu razvrstati prema kliničkim, radiološkim i fiziološkim kriterijima (4, 8). Najpoznatiji fenotipovi KOPB-a prema kliničkim obilježjima su fenotip čestog egzacerbatora, fenotip bolesnika s niskim ITM i plućnom kaheksijom, fenotip bolesnika s jako izraženom zaduhom, fenotip bolesnika s depresijom i anksioznošću. Prema radiološkim kriterijima izdvaja se fenotip bolesnika s dominantnim emfizemom i fenotip bolesnika s dominantom bolešću dišnih putova odnosno bronhiektazijama, a prema fiziološkim odnosno patofiziološkim kriterijima poznat je fenotip bolesnika s brzim padom FEV1 (tzv. *fast decliner*), fenotip bolesnika s hiperreaktivnošću dišnih putova, fenotip bolesnika s hiperinflacijom, fenotip bolesnika s hiperkapnijom, fenotip bolesnika sa sniženim difuzijskim kapacitetom, fenotip bolesnika s plućnom hipertenzijom i fenotip bolesnika sa smanjenom tolerancijom napora (4).

Pogoršavanje plućne funkcije i pad FEV1 ne odvija se jednakom brzinom u svih bolesnika, a bolesnici u kojih se to događa brzo, prepoznati su kao jedna od posebno rizičnih skupina bolesnika u kojih se progresija KOPB-a odvija brzo (44). Druga posebno rizična skupina bolesnika s KOPB-om su oni s učestalim akutnim egzacerbacijama. Egzacerbacije dovode do ubrzanog pogoršanja bolesti i plućne funkcije, a povezane su sa smanjenjem tjelesne aktivnosti, povećanjem simptoma depresije i anksioznosti, pogoršanjem kvalitete života i lošom prognozom kao i rizikom smrti zbog KOPB-a (45, 46). GOLD definira egzacerbacije KOPB-a kao akutna pogoršanja respiratornih simptoma koji nadilaze normalne

dnevne varijacije i iziskuju promjenu liječenja. U preporukama GOLD-a posebno su dorađene preporuke za liječenje bolesnika s fenotipom čestih egzacerbacija (3). U praksi je osobito važno pravilno liječiti bolesnika koji imaju dvije ili više egzacerbacija, znati prepoznati čimbenike koji predviđaju buduće egzacerbacije te ih spriječiti (47).

U oko 25 % bolesnika s KOPB-om i oko 20 % bolesnika s astmom, bolesnici imaju „preklapajuće karakteristike” tih dviju bolesti. Uočeno je da ti bolesnici imaju težu kliničku sliku, teža i češća pogoršanja, te da se više koriste zdravstvenim uslugama nego bolesnici koji imaju jasnu dijagnozu astme ili KOPB-a (48). Od 2007. godine pokušava se definirati fenotip preklapanja astme i KOPB tzv. ACO (Asthma COPD Overlap) kako bi se objedinili bolesnici koji imaju klinički prepoznatljiva obilježja obje bolesti. Međutim, pokazalo se da su i ti bolesnici vrlo heterogena skupina s neravnomjernim udjelom karakteristika i astme i KOPB-a unutar koje postoji više različitih pod-fenotipova. Unatoč, i dalje, velikom zanimanju za bolesnike s obilježjima astme i KOPB-a, postoje bitne kontroverze u pogledu njezine definicije i njezinog položaja unutar kliničkih smjernica za bolesnike s opstruktivnim bolestima pluća. Suvremeno je mišljenje da liječenje bolesnika s KOPB-om i s astmom zbog njihove heterogenosti treba biti personalizirano, a ako su obje bolesti istovremeno prisutne u određenog bolesnika, obje trebaju biti odgovarajuće liječene te se termin „preklapanje“ više ne preporučuje (3, 49).

Kao što je već ranije navedeno, fenotip bolesnika s emfizemom i fenotip bolesnika s kroničnim bronhitisom prvi su prepoznati fenotipovi KOPB-a (43, 45). Emfizem se anatomski jasno definira kao trajno destruktivno proširenje zračnih prostora distalno od terminalnih bronhiola s popratnim gubitkom alveolarnih septi (50). Fenotip bolesnika s emfizemom određuje se na temelju smanjene gustoće plućnog parenhima računalnom tomografijom (CT) toraksa (51). Mnogi bolesnici s emfizemom imaju i brojna vanjska obilježja kao i sniženi difuzijski kapacitet (DLCO). Drugi davno prepoznati fenotip je fenotip bolesnika s kroničnim bronhitisom koji karakterizira bronhalna hipersekrecija koja za posljedicu ima iskašljavanje sekreta većinu dana tijekom najmanje 3 mjeseca godišnje tijekom najmanje dviju uzastopnih godina (52).

KOPB je povezan s visokim razinama psihološkog stresa. Među bolesnicima s KOPB-om izdvajaju se bolesnici u kojih je osobito jako izražena tjeskoba, depresija i strah od nedostatka zraka, dugih i čestih boravaka u bolnici. Taj je fenotip nazvan fenotipom emocionalne slabosti (53, 54). Ti bolesnici izloženi su visokom riziku od nepovoljnih zdravstvenih ishoda i potrebno im je omogućiti psihosocijalnu potporu, odnosno uključiti u sveobuhvatne plućne rehabilitacijske programe (55).

U studiji Pinto i suradnika, klaster analizama identificirana je skupina bolesnika sa „sistemskim KOPB-om“ koju je karakterizirao visok indeks tjelesne mase, visoka stopa dijabetesa, te kongestivnog zatajenja srca i ishemijske bolesti srca. Ti bolesnici imali su jače izraženu zaduhu, lošiju kvalitetu života, povećanu zdravstvenu skrb i povećani rizik smrtnosti u usporedbi s bolesnicima sličnog oštećenja plućne funkcije, ali bez opterećenja navedenim komorbiditetima. U istoj studiji izdvojena je skupina relativno mlađih bolesnika s KOPB-om bez važnijih kardiovaskularnih oboljenja kojima brže propadaju plućne funkcije, imaju nizak indeks tjelesne mase i sveukupno lošije zdravstveno stanje te visoku smrtnost (56).

Varijabilne vanjske manifestacije KOPB-a povezane su s jedinstvenim prognostičkim, kliničkim i fiziološkim osobinama i predstavljaju različite fenotipove unutar KOPB-a. Uvidjelo se da gotovo svaki pojedinac s KOPB-om koji puši ima različita fenotipska obilježja, dok je utjecaj drugih čimbenika na ekspresiju fenotipa manje istražen, ali se danas zna da imaju važan utjecaj (4).

Najveći nedostatak današnjeg liječenja KOPB-a farmakološka je intervencija „jedna veličina za sve“. Današnje mogućnosti liječenja ublažavaju tegobe bolesnika i pomažu usporiti napredovanje bolesti, ali ni jedan oblik liječenja ne poboljšava funkciju pluća i ne utječe na smrtnost. Bolje od shematiziranog pristupa liječenju koje ne uzima u obzir individualne osobitosti bolesti je personalizirano liječenje odnosno liječenje prema fenotipskim karakteristikama bolesti. Međutim, ono čemu težimo precizno je liječenje specifičnih patogenetskih mehanizama (endotipova). Dok ne budu poznati patogenetski mehanizmi zadovoljavamo se personaliziranim liječenjem pojedinih fenotipova KOPB-a (57).

#### ***1.1.6. Komorbiditeti u KOPB-u***

Važna su karakteristika KOPB-a i brojni sistemski upalni učinci, koji u velikoj mjeri doprinose učestalosti pridruženih stanja i bolesti, tzv. komorbiditeta. U bolesnika s KOPB-om, komorbiditeti su bitno učestaliji nego u osoba iste životne dobi koje nemaju KOPB (58, 59). Iako nedostaju snažne prospektivne studije, smatra se da komorbiditeti pridonose simptomima koji su nerazmjerni stupnju oštećenja plućne funkcije (60). Prisutnost komorbiditeta u KOPB-u povezana je s lošijom kvalitetom života, povećanim rizikom od egzacerbacija te povećanom smrtnošću. Stoga im treba posvetiti potrebnu pozornost i odgovarajuće ih zbrinjavati (61, 62).

Glavnim razlogom za nastanak pridruženih bolesti u bolesnika s KOPB-om smatra se sustavna upala nastala kao posljedica prelijevanja upalnih medijatora iz pluća (63).



Najučestaliji su komorbiditeti u bolesnika s KOPB-om: hiperlipoproteinemija, hipertenzija, anksioznost, koronarna bolest, sarkopenija i pretilost (64). Više od 90 % bolesnika s KOPB-om ima barem jednu pridruženu bolest, a čak polovica dvije ili više njih.

Bolesnici s KOPB-om, osobito oni koji nemaju teške oblike KOPB-a umiru od pridruženih bolesti, najčešće infarkta miokarda, popuštanja srca i aritmija tijekom akutnih egzacerbacija. Mortalitet hospitaliziranih bolesnika s teškim KOPB-om i aritmijom neusporedivo je veći nego u bolesnika bez aritmija (65). Pogoršanje sistemske upale uslijed infekcije i egzacerbacije KOPB-u utječe na destabilizaciju aterosklerotskog plaka izazivajući kardiovaskularne i cerebrovaskularne incidente (66). Rizik od infarkta miokarda povećan je prvih 5 dana, a od moždanog udara prvih 10 dana od početka egzacerbacije (67).

Rizik kardiovaskularnih bolesti u bolesnika s KOPB-om je dva do tri puta veći nego u osoba koje nemaju KOPB. To su ujedno i najčešći komorbiditeti u bolesnika s KOPB-om. Upala i oksidativni stres potiču endotelnu vaskularnu disfunkciju i nastanak ateroskleroze. Bolesnici s KOPB-om najčešće boluju od hipertenzije, ishemične bolesti srca, plućne hipertenzije i popuštanja srca (68). Čak i u bolesnika s blagim oštećenjem plućne funkcije nađena je disfunkcija i popuštanje srca (69).

Među metaboličkim bolestima i poremećajima u bolesnika s KOPB-om najčešće su bolesti osteoporoza, dijabetes, sarkopenija i pretilost. Rizični čimbenik za osteoporozu tjelesna je masa (ITM < 18,5 kg/m<sup>2</sup>) odnosno smanjena mišićna masa, koja je često prisutna u bolesnika s KOPB-om. Osteoporozom uzrokovane frakture pogoršavaju tjelesnu aktivnost i kvalitetu života bolesnika s KOPB-om, a utječu i na samu plućnu funkciju (70). Tijekom egzacerbacija KOPB-a remeti se regulacija glikemije čak i kod bolesnika s dobro reguliranim dijabetesom (71). U bolesnika s KOPB-om i pothranjenost i pretilost loš su rizični čimbenik. Pothranjeno je oko 20 % bolesnika s KOPB-om i pothranjenost se povezuje s povećanim rizikom od egzacerbacija i smrtnosti (72). Pretili bolesnici s KOPB-om također mogu imati smanjenu mišićnu masu i njihovu snagu, te sve rizike povezane s tim. U pretilih bolesnika s KOPB-om upala u masnom tkivu povezuje se s hipoksijom i doprinosi sistemske upale u KOPB-u (73).

Prevalencija karcinoma pluća 3-4 puta veća je u bolesnika s KOPB-om nego u prosječnoj populaciji i čest je uzrok smrti u tih bolesnika. U velikom prospektivnom istraživanju, na otprilike pola milijuna nepušača, nađeno je da je rak pluća također bio češći i u bolesnika s KOPB-om koji nikada nisu pušili. Upala i povećani oksidativni stres, kao i povećana ekspresija receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR), u KOPB-u mogu ubrzati i nastanak i metastaziranje raka pluća (74). Anksioznost i depresija česte su pridružene

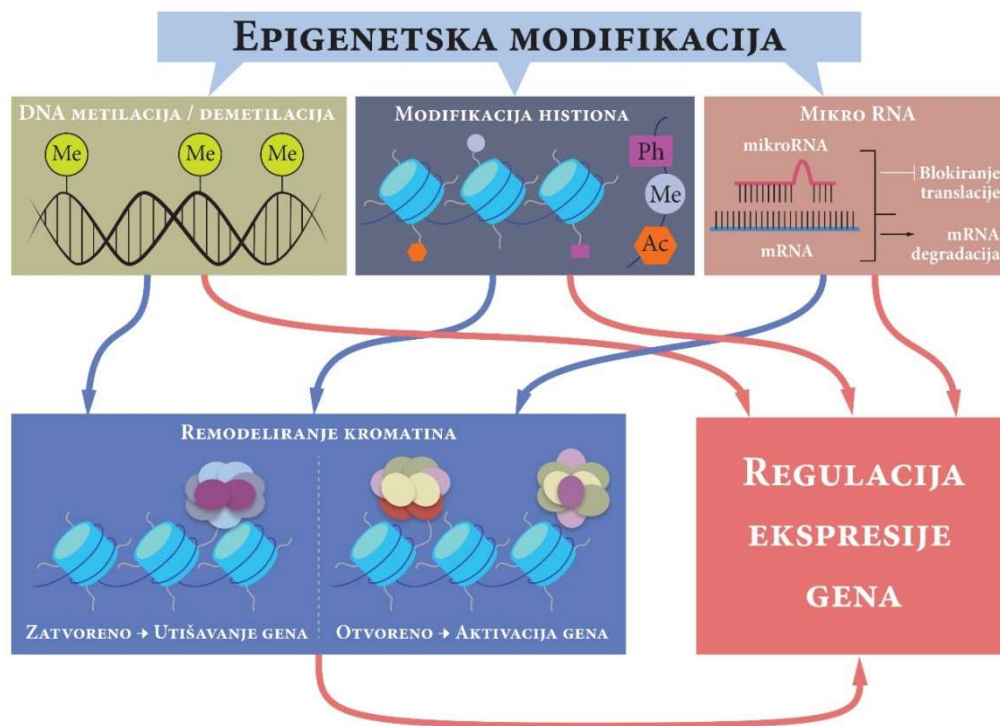
bolesti bolesnika s KOPB-om. U njihovu nastanku bitnu ulogu imaju zaduha, pothranjenost, tjelesna neaktivnost i pušenje. Simptomi anksioznosti i depresije često su neprepoznati i neliječeni u ovih bolesnika, a utječu na progresiju bolesti i liječenje, te izrazito pogoršavaju simptome, kvalitetu života i loše ishode KOPB-a (75). Samo jedna trećina bolesnika s KOPB-om i depresijom ili simptomima anksioznosti kao komorbiditetom dobiva odgovarajuće liječenje.

Prevalencija gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB) u studijama varira od 17 % do 78 %. Veliki broj bolesnika s KOPB-om i GERB-om nema simptome GERB-a. GERB povećava rizik od akutnih egzacerbacija KOPB-a i može utjecati na napredovanje bolesti. Razvoju GERB-a u KOPB-u mogu doprinijeti lijekovi koji utječu na slabljenje tonusa sfinktera jednjaka, kao i promijenjena respiratorna mehanika, koja ugrožava antirefluksnu barijeru (76). Gastroezofagealni refluks povezan je s lošim ishodima KOPB-a, kao i kognitivno oštećenje, anksioznost i depresija (77). Plućna hipertenzija će se razviti u bitnog udjela bolesnika s KOPB-om tijekom njihove bolesti i time povećati morbiditet i mortalitet. Strukturne i funkcionalne promjene u plućnim arterijama primijećene su već u bolesnika s blagim do umjerenim KOPB-om (78).

Istraživanja su također pokazala da u različitim fenotipovima KOPB-a prevladavaju specifični komorbiditeti. Potvrđena je povezanost bolesti dišnih putova s kardiovaskularnim i metaboličkim komorbiditetima, te emfizema sa sarkopenijom i osteoporozom (79).

## **1.2. Epigenetske promjene u KOPB-u**

Prema definiciji epigenetika (od grčkog *epi* – preko, iznad, izvan) je znanstvena grana koja proučava sve potencijalno stabilne nasljedne promjene u ekspresiji gena ili staničnom fenotipu, koje se događaju bez promjena u rasporedu baza DNA, tako da se danas pod pojmom epigenetika misli na naslijeđenu informaciju koja ne ovisi o sekvenci DNA. Epigenetski mehanizmi pokreću se kao odgovor na čimbenik ili signal iz okoline, a stabilni su čak i u odsutnosti početnog signala (80). Mehanizmi su epigenetskih promjena: 1. DNA metilacija koja se događa dodavanjem ili oduzimanjem metilne skupine na DNA na CpG pozicijama, 2. modifikacija histona koja se događa omatanjem DNA oko proteina histona i 3. modificiranje ne-kodirajuća RNA kojima se koristi DNA kao uputom za pravljenje kodirajuće i ne-kodirajuće RNA (Slika 1.1) (81, 82).



Slika 1.1. Epigenetske modifikacije u KOPB-u

Epigenetski procesi povezuju okolišne čimbenike s genetskim kodom te omogućavaju vanjskim utjecajima ostaviti biokemijski trag na genomu. Promjene koje se nakupljaju tijekom života nose informaciju o međudjelovanju organizma s okolišem, a epigenetski kod se pod utjecajem kroničnog, ali i prolaznog utjecaja iz okoliša može trajno promijeniti. Ključni događaji epigenetskog reprogramiranja obično se događaju tijekom razvoja zametnih stanica i rane embriogeneze, ali mogu se događati tijekom cijelog života. Takve promjene mogu biti od velike važnosti za potomke, jer mogu omogućiti određene prednosti u prilagodbi, ali također mogu povećati rizik od nastanka bolesti (83).

Razvoj epigenetike zajedno s drugim srodnim molekularnim disciplinama omogućio je bolje razumijevanje patogeneze KOPB-a koje u konačnici ima za cilj unaprjeđenja prevencije i ciljanog liječenja usmjerenog na određene patogenetske mehanizme. Poznati genetski lokusi za individualne genetske varijacije objašnjavaju samo mali dio osjetljivosti za nastanak KOPB-a. Činjenica da od KOPB-a obolijeva samo dio pušača ukazuje da u podlozi patogeneze KOPB-a ključnu ulogu ima interakcija genetike i epigenetike (6).

Smatra se da se u KOPB-u glavni epigenetski mehanizmi, prvenstveno metilaciju DNA i razne post-translacijske modifikacije histona aktiviraju pušenjem (84, 85). Studije na cijelom

genomu pokazale su da je DNA metilacija određenih lokusa u plućnom tkivu bolesnika s KOPB-om povezana s plućnom funkcijom, astmom, ovisnošću o nikotinu, razvojem T stanica i nekim drugim čimbenicima. Te promjene povezane su s izloženošću cigaretnom dimu i ne prestaju nakon prekida njegovom izlaganju. Aktivnost histon deacetilaze (HDAC), u plućima bolesnika s KOPB-om smanjena je proporcionalno smanjenju protoka zraka kroz dišne putova i doprinosi pojačanom upalnom odgovoru u KOPB-u (39).

Postoje brojni dokazi o abnormalnim epigenetskim obilježjima u KOPB-u koji se događaju od ranih faza fetalnog života i tijekom cijelog života što u konačnici utječe na osjetljivost pojedinca na KOPB i potencijalno sudjeluju u patogenezi bolesti. Neka istraživanja su pokazala da bi epigenetske promjene mogle biti važne za određivanje fenotipskih obilježja i objasniti povezanosti genotipa s fenotipom bolesti (86, 87). Epigenetski mehanizmi u KOPB-u mogući su molekularni putevi koji bi mogli premostiti neusklađenost genetske pozadine i okolišnih čimbenika rizika koji pridonose patogenezi plućnih bolesti. Smatra se da bi postnatalna reverzibilnost ovih događaja metilacije ili acetilacije mogla biti točka za terapijske intervencije (5, 6).

Na mogući zaštitni učinak mediteranske prehrane kao epigenetskog regulatora plućne funkcije u aktivnih pušača ukazala je španjolska studija u kojoj je učinak voća, povrća i maslinovog ulja bogatog vitaminom E i polifenolima u prehrani imalo negativnu povezanost s jačinom oksidativnog stresa (88). Prehrana siromašna voćem i povrćem u pušača mogla bi imati povećani rizik od razvoja KOPB-a u usporedbi s pušačima koji jedu mnogo voća i povrća (89).

Zahvaljujući modernim tehnologijama u otkrivanju proteina i tumačenju epigenetskih oznaka tijekom posljednjih dvaju desetljeća postignut je veliki napredak u razumijevanju KOPB-a kao i mnogih drugih bolesti (83). Štoviše, očekuje se da bi se kombiniranje molekularnih testova s mrežnom analizom epigenomskih podataka pomoglo u razjašnjavanju prijelaza iz stanja "predbolesti" u stanje "bolesti", s ciljem poboljšanja primarne prevencije (90).

### ***1.2.1. DNA metilacija***

DNA metilacija najvažniji je i najbolje istražen epigenetski mehanizam u KOPB-u. Riječ je o procesu koji se odvija na citozinskim ostacima koji prethode gvaninima u tzv. CpG dinukleotidima ili otocima u polinukleotidnom lancu. Proces je kataliziran DNA metiltransferazama (DNMT). Aktivna metilacija i demetilacija odgovorni su za stvaranje i

održavanje metilacije CpG otoka duž genoma. Epigenetske promjene mogu utjecati na ekspresiju mnogih gena u plućima bolesnika s KOPB-om. Mjesta metilacije DNA mogu se naslijediti replikacijom DNA. Hipermetilacija CpG otoka u promotorima gena obično smanjuje ekspresije gena, dok hipometilacija povećava regulacije gena (91).

Istraživanja su pokazala da se u bolesnika s KOPB-om mogu naći brojni znaci abnormalne DNA ekspresije epigenetskih oznaka u krvi, sputumu i plućnom tkivu, te da bi bolje shvaćanje utjecaja okolišnih čimbenika na razvoj KOPB-a metilacijom određenih gena mogalo imati ključnu ulogu u prevenciji, a također utjecati i na prognozu KOPB-a (92). Poznato je da metilacija DNA igra važnu ulogu tijekom ranih razdoblja fetalnog razvoja, te da može biti pod utjecajem izloženosti okoliša tijekom cijelog života što u konačnici utječe na osjetljivost pojedinca na KOPB i neke druge plućne bolesti poslije u životu (93).

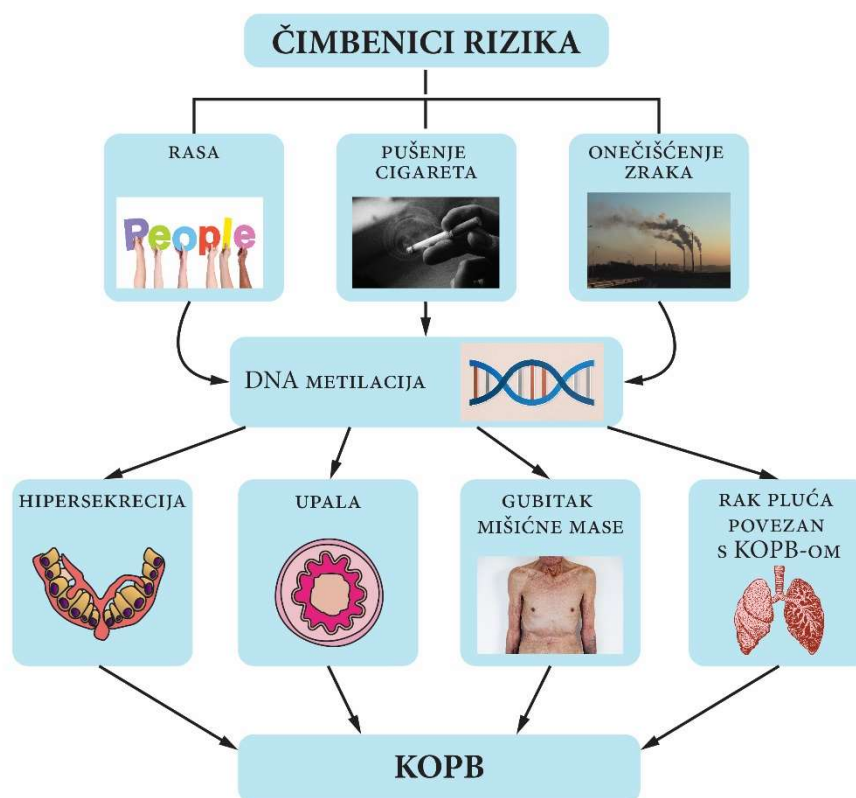
Prijašnja istraživanja, koja su se bavila povezanošću između metilacije DNA i KOPB-a ukazala su da bi metilacija DNA mogla imati bitnu ulogu u etiopatogenezi KOPB-a (Slika 1.2) (94). Epigenetske modifikacije u KOPB-u najčešće se aktiviraju pušenjem, infekcijama i starenjem (95).

Rezultati sve većeg broja studija sugeriraju da je oštećena respiratorna funkcija u KOPB-u povezana s čimbenicima rizika koji nisu pušenje, primjerice, kao onečišćenjima atmosferskog zraka i izloženost izgaranju bioloških goriva u zatvorenim prostorima, a koji također mogu doprinijeti patogenezi KOPB-a aberantnom DNA metilacijom. Chen i suradnici pronašli su da je DNA hipometilirana na NOS 2A u uzorcima bukalne sluznice u bolesnika s KOPB-om kao i u nepušača koji su bili izloženi atmosferskom zagađenju zraka PM2.5. Rezultati ukazuju da bi organski ugljik, elementarni ugljik, NO<sub>3</sub>(-) i NH<sub>4</sub>(+) mogli biti odgovorni za učinke PM2.5 na smanjenu metilaciju NOS2A DNA i povišen FeNO u pacijenata s KOPB-om (96).

Studije koje analiziraju cijeli genom pokazale su da markeri metilacije DNA variraju ovisno o dobi, te da bi te varijacije mogle biti biomarkeri za KOPB u perifernoj krvi za KOPB. Međutim, specifična DNA metilacija gena povezanih sa starenjem u perifernoj krvi pacijenata s KOPB-om ostaje uglavnom nepoznata. Istražuju se metilacije novih CpG otoka povezanih s težinom KOPB-a koje bi mogle dati nove uvide u potvrdu i predviđanje KOPB-a (97).

Prva istraživanja globalne DNA metilacije u KOPB-u učinjena su uzimajući u obzir hipotezu da postoji metabolička veza između promjena u metilaciji DNA i oksidativnog stresa s obzirom na to da KOPB karakterizira stanje povećanog lokalnog i sustavnog oksidativnog stresa (98, 99). Brojna istraživanja u različitim bolestima kao i prethodna u KOPB-u,

pokazala su da je ta metoda široko primjenjiva u kliničkim istraživanjima s obzirom na to da je jednostavna, pouzdana, ponovljiva i relativno jeftina. Krvni biomarkeri u usporedbi s uzimanjem uzoraka plućnog tkiva, manje su rizični za uzorkovanje što može biti korisno za dugotrajno praćenje progresije bolesti. U usporedbi s manje invazivnim ili neinvazivnim biološkim uzorcima, kao što su urin, iskašljaj ili kondenzat izdahnutog zraka, uzorci krvi imaju širi raspon primjene i veću ponovljivost što ih čini praktičnijim od tih uzoraka (100).



Slika 1.2. Utjecaj međudjelovanja gena i okoliša na razvoj i heterogenost KOPB-a

## 2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog doktorskog rada temelji se na postavci da epigenetske promjene doprinose patogenezi KOPB-a, kliničkoj raznovrsnosti i napredovanju, odnosno, težini bolesti. Podneblje i način života mogli bi imati drukčiji utjecaj na bolesnike s KOPB-om koji žive u Osijeku i okolini i liječe se u Osijeku, od onih koji žive u Zadru i okolini i liječe se u Zadru te različito utjecati na kliničke osobitosti, težinu, tijek bolesti i kvalitetu života. Na temelju navedenog, očekuje se da bi se kliničke i fenotipske osobitosti KOPB-a, kao i DNA metilacije mogli razlikovati između skupine bolesnika koji se liječe u Osijeku i skupine bolesnika koji se liječe u Zadru, te da bi se globalna DNA metilacija mogla razlikovati u odnosu na pojedina obilježja KOPB-a.

### 3. CILJEVI

Ciljevi su istraživanja:

1. Ispitati postoje li razlike u kliničkim osobitostima i kvaliteti života bolesnika s KOPB-om u dvama hrvatskim zemljopisnim područjima, a koji se liječe u dvama središtima, Osijeku i Zadru.
2. Ispitati razinu globalne DNA metilacije u bolesnika s KOPB-om koji žive u kontinentalnoj i primorskoj Hrvatskoj i liječe se u Osijeku i Zadru, te ispitati postoji li razlika u globalnoj DNA metilaciji između bolesnika i kontrolnih ispitanika, kao i između bolesnika s KOPB-om koji pripadaju zadarskoj i osječkoj skupini.
3. Ispitati povezanost razine globalne DNA metilacije s rizičnim čimbenicima i načinom života, te kliničkim i fenotipskim osobitostima KOPB-a, kao i pridruženim bolestima.



## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

U ovom doktorskom radu napravljeno je presječno istraživanje (eng. cross sectional study) na bolesnicima s KOPB-om koji su liječeni u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Osijek i Općoj bolnici (OB) Zadar, a u vrijeme istraživanja živjeli su u Osijeku ili Zadru ili okolici ova dva grada. Istraživanje je učinjeno prema pravilima dobre kliničke prakse. Za izvođenje ovog istraživanja dobiveno je Odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Osijek i OB Zadar te Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. U istraživanje su uključeni bolesnici s dijagnozom KOPB-a stariji od 40 godina. Dijagnozu KOPB-a postavio je prije istraživanja nadležni pulmolog zdravstvene ustanove u kojoj su liječeni, a prilikom uključivanja u studiju učinjena je standardna dijagnostika u cilju potvrde dijagnoze i reevaluacije nalaza predviđena protokolom istraživanja. Svi bolesnici s KOPB-om imali su zadovoljen spirometrijski kriterij FEV1/FVC manji od 0,7 koji se nije bitno mijenjao tijekom vremena od najmanje šest mjeseci. Prema izračunanoj procjeni za uočavanje srednjeg učinka u razlici numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina, planirano je uključiti 128 ispitanika s KOPB-om, 64 ispitanika u svakom centru. Završni broj bio je 69 (66) bolesnika u KBC Osijek i 67 bolesnika u OB Zadar. Kontrolnu skupinu činila su 64 ispitanika, po 32 iz svakog centra.

### 4.2. Ispitanici

Ispitanici su žene i muškarci stariji od 40 godina s ranije postavljenom dijagnozom KOPB koji su se liječili u KBC Osijek i OB Zadar kao i kontrolni ispitanici koji nisu imali dijagnozu KOPB-a. Nakon usmenog i pismenog objašnjenja svaki ispitanik potpisao je informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. U svih ispitanika uzeti su detaljni anamnestički podaci o pušenju. U bolesnika s KOPB-om uzeti su podaci o drugim rizičnim čimbenicima za KOPB, trajanju bolesti, simptomima, te svim pridruženim bolestima kao što su kardiovaskularne bolesti, depresija, dijabetes, gastritis, astma, preboljela tbc, karcinomi i drugo. U pogledu rizičnih čimbenika, težine bolesti kao i pridruženih bolesti nije bilo posebnih uključnih i isključnih kriterija. U trenutku uključivanja u istraživanje, bolesnici s KOPB-om morali su imati stabilnu bolest, a jedino je egzacerbacija KOPB-a ili pogoršanje neke od pridruženih bolesti bio isključni kriterij. U sklopu istraživanja svim bolesnicima s KOPB-om učinjeni su testovi plućne funkcije, spirometrija s bronhodilatacijskim testom i

plućna difuzija te test frakcije izdahnutog dušikovog oksida (FeNO) za procjenu aktivnosti upale u dišnim putovima. Također je svim bolesnicima učinjena punkcije arterije radialis za dobivanje uzorka arterijske krvi za analizu respiracijskih plinova i acidobaznog statusa.

Ispitanici su samostalno ispunili validirane samoocjenjske upitnike: test za procjenu KOPB-a (COPD Assessment Test - CAT) i test za procjenu stupnja zaduhe (modified Medical Reserch Scale - mMRC), upitnik za sveobuhvatnu procjenu kvalitete života povezane sa zdravstvenim stanjem (Short Form -36 - SF-36); upitnik bolnice St. George specifičan za respiratorne bolesti (Saint George Respiratory Questionnaire - SRGQ), te obrazac o životnim uvjetima i navikama koji je posebno napravljen za potrebe ovog istraživanja. Ako u posljednjih 12 mjeseci bolesnicima nije bio učinjen nalaz ultrazvuka (UZV) srca i CT toraksa, isti je dogovoren i učinjen u narednih mjesec dana. Na kraju pregleda svakom je bolesniku uzet uzorak venske krvi za laboratorijsku analizu pokazatelja analiziranih u istraživanju (kompletna krvna slika, IgE ), a uzorak pune venske krvi za određivanje globalne DNA metilacije pohranjen je u hladnjak na -20°C do analize u Laboratoriju za DNA analizu Katedre za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Uključeni bolesnici bili su svih stupnjeva težine opstrukcije prema GOLD-u, od blagog do vrlo teškog (GOLD I - IV), a isto tako pripadali su svim skupinama težine simptoma i rizika od egzacerbacije (GOLD A - D). Kontrolnu skupinu činili su ispitanici iz obaju centara sličnih demografskih karakteristika među kojima je bio podjednak broj pušača i nepušača.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Anamneza i klinički pregled

Na prvom pregledu bolesnicima je uzeta detaljna anamneza i učinjen detaljan klinički pregled. Prikupljeni su podatci o dobi bolesnika, spolu, indeksu tjelesne mase (ITM), trajanju bolesti, dobi početka pušenja, godinama pušenja i broju popušanih cigareta za izračunavanje pušačkih godina (pack / year - PY) prema formuli (prosječan broj dnevno popušanih cigareta × ukupni broj godina pušenja] /20), te dobi prestanka pušenja u bivših pušača. Prikupljeni su također podatci o profesionalnim rizičnim čimbenicima kao i upotrebi bioloških goriva za grijanje i kuhanje u kućanstvima, o simptomima bolesti, o liječenju kao i svim pridruženim bolestima. Zabilježeni su detalji o simptomima kašlja, iskašljavanja, zaduha u mirovanju i tjelesnom naporu, kao i podatci o broju egzacerbacija KOPB-a u posljednjih godinu dana,

njihovu liječenju antibioticima i/ili sistemskim kortikosteroidima odnosno posjetima hitnoj službi i/ili hospitalizacijama.

*Upitnici za procjenu simptoma (CAT upitnik i mMRC skala)*

Osjećaj zaduhe i simptome bolesnika dopunili su bolesnici prigodom kliničkog pregleda samoprocjenom tegoba od strane bolesnika popunjavanjem upitnika, mMRC ljestvicom zaduhe (modified Medical Reserach Council) (101, 102) i CAT testom (COPD Assesement Test) (103) koji su za to namijenjeni. Osjećaj zaduhe bolesnici su vrednovali prema mMRC ljestvici od 0 do 4, pri čemu je  $\geq 2$  predstavlja graničnu vrijednost za težinu zaduhe (102, 104) (Prilog 1). CAT test je osmišljen za mjerenje utjecaja KOPB-a na život bolesnika te praćenje utjecaja bolesti tijekom vremena. Pokazuje odličnu korelaciju s bitno opsežnijim i kompliciranijim SGRQ upitnikom koji je opisan u ovom radu u dijelu o kvaliteti života bolesnika s KOPB-om (105). CAT test sastoji se od osam tvrdnji koje bolesnici boduju od 0 do 5, a rezultat bodovanja se zbraja (Prilog 2). Najveći mogući ukupni zbroj je 40, a graničnom vrijednosti smatra se zbroj  $\geq 10$ . Zbrojevi u CAT testu manji od 10 pokazuju da bolesnici imaju malo simptoma te upućuju da je utjecaj bolesti na život bolesnika mali, dok vrijednosti iznad 20 bodova upućuju na izrazito veliki utjecaj KOPB na tjelesno i mentalno funkcioniranje bolesnika. Zbog svoje jednostavnosti i kratkoće vremena potrebnog da se ispune, ovi upitnici su preporučeni za uporabu u svakodnevnoj kliničkoj praksi kao pokazatelji pogoršanja kao i progresije bolesti, te za procjenu utjecaja simptoma na bolesnike i smatraju se dijelom kliničkog pregleda (106).

*Obrazac o životnim uvjetima i navikama*

Obrazac o životnim uvjetima i navikama napravljen radi lakšeg prikupljanja anamnestičkih podataka i podataka iz medicinske dokumentacije u suradnji s Odjelom za sociologiju Sveučilišta u Zadru. Obrazac (Prilog 3) sadrži podatke o pušenju, stanovanju, grijanju, obrazovanju, zanimanju, radnom okolišu i prehrambenim navikama. Razumljivosti i jasnoća pitanja provjereni su ranije na uzorku ispitanika, a dobiveni podatci uspoređeni s podacima iz povijesti bolesti. Jedan dio obrasca predstavlja ustvari modificirani validirani MDSS (Mediterranean Diet Serving Score) upitnik kojim se procjenjuje kvaliteta prehrane (107). Cilj je bio ispitati navike bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru u pogledu učestalosti konzumiranja pojedinih namirnica (voća, povrća, mesa, ribe, ugljikohidrata, mliječnih

proizvoda i alkohola). U ovom istraživanju nije bilo predviđeno ispitivati izravan utjecaj konzumacije pojedinih namirnica na DNA metilaciju vođenjem dnevnika prehrane, već ponajprije ispitati razlike u prehrambenim navikama između dviju skupina bolesnika te na temelju učestalosti konzumacije pojedinih skupina namirnica od više puta dnevno do jednom mjesečno ili još rjeđe procijeniti kvalitetu prehrane te moguću povezanost s kliničkim karakteristikama bolesti i/ili DNA metilacijom.

#### **4.3.2. Mjerenje plućne funkcije**

Obrada plućne funkcije bolesnicima s KOPB-om učinjena je u funkcionalnom laboratoriju pri Zavodu za pulmologiju KBC Osijek, odnosno Odjelu za pulmologiju OB Zadar. Sve su pretrage izvedene i interpretirane u skladu s aktualnim standardiziranim postupcima Europskog Respiratornog društva i Američkog torakalnog društva (ERS/ATS).

##### *Spirometrija i bronhodilatacijski test salbutamolom*

Spirometrija je standardni neinvazivni test za mjerenje ventilacijske funkcije pluća koja je ključna za dijagnostiku i praćenje kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB) (108). Kriterij za dijagnozu temelji se na omjeru volumena forsiranog izdisaja u jednoj sekundi (FEV1) i forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) dobivenih tijekom maksimalnih manevara forsiranog izdisaja i definiran je kao manje od 0,7 ili FEV1/FVC 70 %, a stupanj opstrukcije GOLD-a određuje se prema vrijednostima FEV1. Spirometrije rađene u Zavodu za pulmologiju KBC Osijek na uređaju VINTU SPIRO/PRO/IOS/ PNEUMO sa softverom SentrySuite  $\geq 2.21$ , verzija 01.00, a u Odjelu za pulmologiju OB Zadar na spirometru Jaeger MasterScreen. Analizirani su spirometrijski pokazatelji nakon bronhodilatacijskoga testa, odnosno 20 minuta nakon primjene 400  $\mu\text{g}$  kratkodjelujućeg inhalacijskog bronhodilatatora salbutamola. Pozitivnim bronhodilatacijskim testom smatrano jer FEV1 ili FVC za  $\geq 12\%$  i  $\geq 200\text{ ml}$ .

##### *Plućna difuzija ili test difuzijskog kapaciteta za ugljikov monoksid*

Plućna difuzija ili test difuzijskog kapaciteta za ugljikov monoksid mjera je za procjenu sposobnosti pluća za prijenos kisika kroz aleveokapilarnu membranu iz udahnutog zraka u krvotok (109). Difuzijski kapacitet karakteristično je smanjen u ljudi s plućnom fibrozom,

emfizemom i poremećajima koji zahvaćaju krvne žile pluća. Ugljični monoksid (CO) slijedi isti put kao kisik te služi za ovaj test zbog svojega visokog afiniteta za hemoglobin (200 do 250 puta veći od kisika). Tijekom deset sekundi zadržavanja daha pri potpunom inspiriju, mjeri unos CO po jedinici vremena po mm pogonskog tlaka CO (cc CO/sec/mm Hg) (110). Rezultati se moraju ispraviti u slučaju smanjenog volumena pluća, anemije, povećane razine ugljičnog monoksida, kod pušača cigareta kao i velike nadmorske visine (111). Difuzijski kapacitet mjeren je u Zavodu za pulmologiju KBC Osijek na uređaju VINTU SPIRO/ PRO IOS/ PNEUMO sa softverom SentrySuite  $\geq$  2.21, verzija 01.00. a u Zadru na Jaeger MasterScreen u funkcionalnoim laboratoriju Odjela za pulmologiju OB Zadar.

*Frakcija izdahnutog dušičnog oksida (eng. Fractional Exhaled Nitric Oxide - FeNO)*

Dušikov oksid (NO) osjetljiv je pokazatelj eozinofilne upale u dišnim putevima. Test mjerenja frakcija izdahnutog dušičnog oksida (FeNO; od eng. Fractional Exhaled Nitric Oxide) prvenstveno se upotrebljava kao biomarker za predviđanje i procjenu odgovora na protuupalno liječenje u astmi (112). Ta pretraga rutinska je u bolesnika s KOPB-om u ovom istraživanju budući da je poznato da mnogi bolesnici s KOPB-om imaju pridruženu astmu, a osim toga eozinofilna upala može biti u nekih bolesnika obilježje KOPB-a i bez prisutnosti astme. U OB Zadar mjerenje frakcije izdahnutog NO rađeno je na Medisoftov Hypair FENO® (Sorinnes, Belgija) uređaju, a u KBC Osijek na Schillerovu uređaju. Uređaji za mjerenje služe se elektrokemijskim senzorom koji koncentraciju plina pretvara u električne signale tako da je izlazni signal izravno proporcionalan tlaku NO, odnosno koncentraciji NO u uzorku. Vrijednosti testa u intervalu 5 - 20 ppb (parts per billion) smatraju se normalnim nalazom, a sve veće vrijednosti od toga zahtijevaju dodatnu obradu. Vrijednosti veće od 70 ppb smatraju se sigurno pozitivnim nalazom u smislu aktivne alergijske bolesti. Dva sata prije pretrage bolesnici su upozoreni da ne konzumiraju hranu bogatu nitritima, a test se izvodio prvi u nizu, prije spirometrija i plućne difuzije.

**4.3.3. Elektrokardiografija i ultrazvuk srca**

Elektrokardiografija (EKG) rutinska je brza, jednostavna i bezbolna skrining metoda bolesnicima s KOPB-om za procjenu kardijalnog stanja kao i povećanog opterećenja desnog srca s obzirom na prisutnost KOPB-a (113). Iako je za bolesnike sa sumnjom na plućnu hipertenziju (PH) uz kliničku evaluaciju, neinvazivne tehnike snimanja, kateterizacija desnog

srca "zlatni standard", u bolesnika sa sumnjom na PH radi se neinvazivna ehokardiografska procjena (114). Svi bolesnici uključeni u istraživanje imali su ultrazvuk (UZV) srca koji je učinjen u posljednjih godinu dana. Svi nalazi učinjeni u navedenom razdoblju upotrijebljeni su za analizu ako su sadržavali potrebne podatke koji su analizirani. U ostalih bolesnika UZV srca sa zatraženom procjenom plućne hipertenzije dogovoren je i učinjen u narednih mjesec dana od inicijalnog pregleda.

#### 4.3.4. Računalna tomografija (CT)

Računalna tomografija (CT) omogućuje kvantificiranje strukture pluća i ranih znakova bolesti. U dijagnostici bronhiektazija i emfizema pluća računalna tomografija (CT) prsnog koša zlatni je standard. Emfizem se dijagnosticira prisutnošću destrukcije alveolarnih septa i proširenjem zračnog prostora, što može biti različito raspodijeljeno. Centrilobularni emfizem se pretežno vidi u gornjim režnjevima, a panacinarni emfizem difuzno u režnjevima. Paraseptalni emfizem obično se javlja u blizini plućnih pukotina i pleure. Oblikovanje divovskih bula može dovesti do kompresije medijastinalnih struktura, dok ruptura pleuralnih mjehurića može izazvati spontani pneumotoraks/pneumomediastinum (115), CT pluća može neinvazivno otkriti i kvantificirati abnormalnosti pluća (116, 117). Rane se promjene u dišnim putovima i plućnom parenhimu mogu prepoznati kod pušača s normalnom plućnom funkcijom prije bilo kakvih znakova oštećenja plućne funkcije, ali osobe s  $FEV_1/FVC < 70\%$ , imaju značajno veći stupanj strukturnih promjena pluća na CT u usporedbi s onima bez ograničenja protoka zraka (118). U CT skenovima, atenuacija se mjeri Hounsfieldovim jedinicama (HU), gdje je atenuacija za vodu definirana kao 0 HU, a za zrak kao -1000 HU. Za područja pluća niska atenuacija, tj.  $\leq 910$  ili HU služi za kvantitativnu procjenu emfizema (51).

U ovom istraživanju analizirani su opisi radiologa u pogledu prisutnosti i opsegu emfizema te prisutnosti bronhiektazija i fibroze u nalazima CT-toraksa bolesnika s KOPB-om koji su učinjeni do 12 mjeseci prije istraživanja. Dominacija emfizema pluća kao i prisutnosti bronhiektazija važna su klinička obilježja i određuju neke od fenotipova bolesnika s KOPB-om. CT znakovi bronhiektazija uključuju razine zraka i tekućine u proširenim bronhima, linearni niz ili skup cista, proširene bronhe na periferiji pluća i zadebljanje stijenke bronha zbog peribronhalne fibroze. Prošireni bronhi moraju se razlikovati od emfizematoznih mjehurića, koji općenito nemaju definiranu debljinu stijenke i prateće žile.

Na temelju radioloških kriterija odnosno interpretacije radiologa KBC Osijek i OB Zadar, nalaz emfizema prema CT-u toraksa klasificiran je kao 1. odsutnost emfizema pluća, 2. manje izražen emfizem i 3. jako izražen emfizem s bulama ili bez prisutnosti bula. U pogledu bronhiektazija nalaze CT-a toraksa klasificirali smo kao odsutnost bronhiektazija i prisutnost bronhiektazija. U KBC Osijek i OB Zadar snimanja CT-a toraksa obavljena su na uređaju Siemens 128.

#### **4.3.5. Upitnici za procjenu kvalitete života**

Pojam kvalitete života podrazumijeva subjektivne i objektivne pokazatelje koji su općenito slabo povezani sve dok objektivni uvjeti ne postanu loši. Narušeno zdravlje odnosno bolest jedan je od najvažnijih događaja koje utječe na život bolesnika i njegovu kvalitetu. Kvaliteta života procjenjuje se validiranim upitnicima koji mjere utjecaj bolesti na zdravstveno stanje bolesnika. Upitnici za procjenu kvalitete života dijele se u dvije osnovne skupine: 1. generičke i 2. upitnike specifične za bolest. Za procjenu kvalitete života povezanu sa zdravstvenim stanjem u ovom istraživanju upotrijebljen je jedan generički upitnik SF-36 (od eng. The Short Form 36 health survey questionnaire) i jedan specifični za respiratorne bolesti SGRQ (od eng. St. George's Respiratory Questionnaire). Oba upitnika su validirana u Hrvatskoj.

#### *Upitnik zdravstvenog statusa Short Form-36 (SF-36)*

SF-36 je najčešće upotrebljavan upitnik za sveobuhvatnu procjenu kvalitete života povezanu sa zdravstvenim stanjem u područjima tjelesnog i emotivnog zdravlja. Sastavljen je od 36 pitanja (čestica) grupiranih u osam konceptualnih kategorija (*fizičko funkcioniranje* (PF), *ograničenje zbog fizičkih poteškoća* (RP), *tjelesni bolovi* (BP), *opće zdravlje* (GH), *socijalno funkcioniranje* (SF), *ograničenja zbog psihičkih poteškoća* (RE), *mentalno zdravlje* (MH) i *osjećaj vitalnosti* (VT). Upitnik je nastao kao rezultat dvaju velikih empirijskih istraživanja, Medical Outcomes study i Health Insurance Experiment (119). Osmišljen je tako da ga bolesnici samostalno ispunjavaju uz pomoć obučenog anketara (120). Uporabljena je hrvatska inačica upitnika koja je 2005. verificirana kao valjana i pouzdana za populaciju u Hrvatskoj (121) (Prilog 4). Prikazane populacijske norme za hrvatsku inačicu SF-36 pokazale su da se SF-36 može koristiti kao valjan i pouzdan instrument u istraživanju subjektivnog zdravlja stanovništva Hrvatske. Bodovanje 36 stavki u SF-36 upitniku provodi se u dvama

koracima (122). Prvo, unaprijed kodirane brojčane vrijednosti se prekodiraju prema ključu za bodovanje. Ocjene na ljestvici predstavljaju prosjek za sve stavke na ljestvici na koje je ispitanik odgovorio. Svaka stavka se boduje u rasponu od 0 do 100 tako da su najniži i najviši mogući rezultati 0 odnosno 100. Bodovi su postotak ukupnog mogućeg postignutog rezultata, visoki rezultat znači povoljnije zdravstveno stanje.

*Upitnik bolnice St George o problemima s disanjem (SGRQ- Saint George Respiratory Questionnaire)*

SGRQ standardizirani je upitnik načinjen za mjerenje utjecaja respiratornih bolesti na cjelokupno zdravlje, svakodnevni život i kvalitetu života (123). SGRQ ima dobre psihometrijske karakteristike, validiran je i široko prihvaćen instrument za procjenu kvalitete života u bolesnika s astmom i KOPB-om. Za bolesnike s KOPB-om uporabljuje se i skraćena inačica SGRQ-c koji se u potpunosti podudara sa SGRQ upitnikom. Upitnik ima 2 dijela i 16 pitanja koja se sastoje od 75 odnosno 50 čestica, a odnosi se na tri područja. Prvim dijelom ispituje se učestalost i težina simptoma bolesnika, a drugim dijelom aktivnosti koje uzrokuju tegobe ili aktivnosti čije je izvođenje onemogućeno u punom opsegu zbog simptoma, te utjecaj bolesti na socijalni život kao i psihološke poteškoće zbog same bolesti. Iz navedenog se izračunavaju zbrojevi za 3 područja, tzv. domenu simptoma, domenu aktivnost i domenu utjecaja bolesti na svakodnevni život, te ukupni rezultat upitnika SGRQ. Bodovi se kreću od 0 do 100, s tim da viši zbroj ukazuju na veća ograničenja odnosno lošije zdravstveno stanje. (Prilog 5). Bolesnici su upitnik ispunjavali samostalno uz mogućnost tumačenja vezano uz moguće nejasnoće.

#### **4.3.6. Laboratorijska dijagnostička obrada**

Uzorak periferne krvi jednokratno je uzet svim ispitanicima. Ukupni IgE određivan je iz seruma dobivenih centrifugiranjem uzoraka venske krvi uzete u epruvete bez antikoagulansa i određen je ECLIA (elektrokemiluminiscencija) metodom na analizatoru Cobas-e801 Roche. Analiza plinova u krvi (ABS) određivana je iz uzoraka radijalne arterijske krvi uzete u heparinizirane šprice na RAPIDLab®348EX Siemens analizatoru. Venska krv uzeta je u epruvetu s K2-EDTA antikoagulansom, upućena je na Odjel za laboratorijsku dijagnostiku OB Zadar i Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek ovisno o mjestu



uzimanja uzorka, a u svrhu određivanja kompletne krvne slike i broja eozinofila na hematološkom analizatoru ADVIA®2120i, Siemens.

#### 4.3.7. *Određivanje globalne DNA metilacije*

Za potrebe mjerenja globalne DNA metilacije bolesnicima je uzet uzorak pune venske krvi s K2-EDTA antikoagulansom koji je pohranjen na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize u Laboratoriju za DNA analizu Katedre za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta u Osijeku (124). DNA je izolirana tako da je najprije izvršena liza stanice inkubacijom uzorka krvi s odgovarajućim puferima i proteinazom K. Liziranoj stanici dodan je potom etanol, te se nakon centrifugiranja DNA s nečistoćama hvata na silikatnu membranu. Učinjeno je potom ispiranje s membrane puferom. Za postupak je uporabljen komercijalni kit NucleoSpin Blood L proizvođača Macherey Nagel iz Njemačke kojim je selektivno pročišćavanje molekule DNA obavljeno pri sobnoj temperaturi. Eluirana DNA stavljena je potom u čistu sterilnu kivetu od 1,5 ml te pohranjena na  $+4$  do sljedećeg koraka, određivanja DNA metilacije pomoću komercijalnog kita Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetic) (ab117128) proizvođača Abcam (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) prema uputama proizvođača.

#### 4.4. **Statistička obrada podataka**

Potrebna veličina uzorka za uočavanje srednjeg učinka u razlici brojčanih varijabli između dviju nezavisnih skupina najmanje je 128 ispitanika s KOPB, odnosno po 64 ispitanika s dijagnozom KOPB u svakom centru, OB Zadar i KB Osijek. Procijenjena kontrolna skupina je 64 ispitanika, po 32 iz svakog centra.

Kategorijski su podatci predočeni apsolutnim i relativnim frekvencijama, a razlike kategorijskih varijabli testirane su Hi kvadrat testom, a po potrebi i Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele brojčanih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Brojčani podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike brojčanih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U test, a u slučaju triju i više nezavisnih skupina Kruskal Wallisovim test (post hoc Conover). Povezanost brojčanih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije  $\rho$  (rho).

Kako bi se predvidjela mogućnost nastanka događaja, uporabljena je metoda analize klastera najvećeg mogućeg očekivanja (Expectation maximisation - EM). Metoda ROC (od

engl. Receiver Operating Characteristic) analiza primijenila se za određivanje optimalne granične vrijednosti, površine ispod ROC krivulje (od engl. area under the curve, AUC), specifičnosti, i osjetljivosti genomske DNA s obzirom na promatrane varijable (125, 126).

Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina je značajnosti postavljena na  $\text{Alpha} = 0,05$ . Za statističku analizu koristio se statistički program MedCalc Statistical Software version MedCalc® Statistical Software version 20.111 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2022) i IBM SPSS ver. 23 (IBM Corp. Released 2015. Armonk, NY: IBM Corp.).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Osnovna obilježja bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika

Istraživanje je provedeno na 136 bolesnika s KOPB-om i 64 kontrolna ispitanika, muškaraca i žena u dobi od 40 do 92 godine. Spolna raspodjela u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika razlikovala se. U uzorku bolesnika s KOPB-om bilo je bitno više muškaraca nego žena, dok je kontrolnoj skupini omjer muškaraca i žena bio manje izražen ( $\chi^2$  test,  $P = 0,04$ ). Medijan dobi bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika, nije se bitno razlikovao. Za bolesnike s KOPB-om iznosio je 71 godinu (interkvartilni raspon 65 - 77), a za kontrolne ispitanike 70 godina (interkvartilni raspon 66 - 74) (Mann Whitney U test,  $P = 0,26$ ) (Tablica 5.1).

Tablica 5.1. Osnovna obilježja bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika

	Kontrola (n=64)	KOPB (n=136)	Ukupno	<i>P</i>
Spol [n (%)]				
Muškarci	35 (55)	95 (70)	130 (65)	<b>0,04*</b>
Žene	29 (45)	41 (30)	70 (35)	
Starosna dob [Medijan (IQR)]	70 (66 – 74)	71 (65 – 77)		0,26 <sup>†</sup>

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Mann Whitney U test

Između bolesnika u Osijeku i bolesnika u Zadru nije bilo statistički bitne razlike u starosnoj dobi, dobi postavljanja dijagnoze, spolnoj raspodjeli i indeksu tjelesne mase (Tablica 5.2). Medijan starosne dobi za bolesnika s KOPB-om u Osijeku iznosio je 72 godine, a za bolesnike u Zadru 71 godinu. Medijan dobi u kojoj je postavljena dijagnoza KOPB za bolesnike u Osijeku iznosio je 56 godina, a za bolesnike u Zadru 59 godina. Indeks tjelesne mase bio je nešto viši u bolesnika u Osijeku (26,85 kg/m<sup>2</sup>), nego u bolesnika u Zadru (25,0 kg/m<sup>2</sup>), ali razlika nije bila statistički bitna.

Tablica 5.2. Osnovna obilježja bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

	Osijek	Zadar	<i>P</i> *
Starosna dob bolesnika s KOPB-om [Medijan (IQR)]	72 (65 – 78)	71 (65 – 76)	0,77
Spol [n (%)]			
Muškarci	50 (72)	45 (67)	0,50 <sup>†</sup>
Žene	19 (28)	22 (33)	
Indeks tjelesne mase (kg/m <sup>2</sup> ) [Medijan (IQR)]	26,85 (22,59 – 30,98)	25,0 (21,35-28,76)	0,11
Dob kod postavljanja dijagnoze [Medijan (IQR)]	56 (50 – 63)	59 (51 – 65)	0,28

\*Mann Whitney U test; <sup>†</sup>  $\chi^2$  test

Među bolesnicima s KOPB-om bio je najveći udio umirovljenika, oko 75 % u obje skupine i nije nađena statistički bitna razlika između bolesnika u Osijeku i Zadru s obzirom na zaposlenost. U pogledu zanimanja u skupini bolesnika u Osijeku su najveći udio činili radnici, a u skupini bolesnika u Zadru službenici (Tablica 5.3). U tom smislu postojala je statistički bitna razlika između tih dvije skupine bolesnika (Fisherov egzakti test,  $P < 0,001$ ).

Tablica 5.3. Radni status i zanimanje bolesnika s KOPB-om

	Broj (%) ispitanika s KOPB			<i>P</i> *
	Osijek	Zadar	Ukupno	
<b>Radni status</b>				
Zaposlen	7 (10,6)	7 (10,4)	14 (10,5)	0,89
Nezaposlen	8 (12,1)	10 (14,9)	18 (13,5)	
Umirovljenik	51 (77,3)	50 (74,6)	101 (75,9)	
<b>Zanimanje</b>				
Poljoprivrednik	6 (9)	4 (6)	10 (8)	<0,001
Radnik	31 (48)	23 (34)	54 (41)	
Službenik	10 (16)	27 (40)	37 (28)	
Obrtnik	1 (1,6)	1 (1,5)	2 (1,5)	
Rukovodeći službenik	8 (12,5)	0	8 (6,1)	
Poduzetnik	1 (1,6)	0	1 (0,8)	
Stručnjak	3 (5)	1 (1)	4 (3)	
Nešto drugo	4 (6)	11 (16)	15 (11)	
Ukupno	64 (100)	67 (100)	131 (100)	

\*Fisherov egzakti test

### 5.1.1. Izloženost okolišnim rizičnim čimbenicima

Skupina bolesnika s KOPB-om imala je veći udio pušača, veći broj pušačkih godina i veći udio onih koji su pušili više od 20 PY, nego skupina kontrolnih ispitanika odnosno bila je jače izložena tom čimbeniku rizika za nastanak KOPB-a. Udio aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača statistički se bitno razlikovao između skupine bolesnika s KOPB-om i skupine kontrolnih ispitanika. U skupini bolesnika s KOPB-om bilo je samo 5 % nepušača, a udio aktivnih pušača i bivših pušača bio je bitno zastupljeniji nego u skupini kontrolnih ispitanika ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ). Medijan indeksa pušenja tzv. pušačkih godine (PY) bio je veći u skupini bolesnika s KOPB-om (45 PY) nego u kontrolnih ispitanika (35 PY), no razlika nije bila statistički bitna (Mann Whitney U test,  $P=0,05$ ). Udio pušača s indeksom pušenja više od 20 PY u odnosu na one koji su imali manje od 20 PY, bio je zastupljeniji i u skupini bolesnika s KOPB-om i u skupini kontrolnih ispitanika, ali u skupini bolesnika s KOPB-om statistički bitno više nego u skupini kontrolnih ispitanika ( $\chi^2$  test,  $P = 0,03$ ) (Tablica 5.4).

Tablica 5.4. Pušački status i pušačke godine (PY) u bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika

	Bolesnici kontrola	KOPB	$P^*$
Pušački status [n (%)]			
Aktivni pušač	14 (22)	50 (37)	<b>&lt; 0,001</b>
Bivši pušač	14 (22)	79 (58)	
Nepušač	36 (56)	7 (5)	
"PY" [Medijan (IQR)]	35 (20 – 55)	45 (30 – 56)	0,05 <sup>†</sup>
Pušačke godine [n (%)]			
PY < 20	5 (18)	6 (5)	<b>0,03</b>
PY ≥ 20	23 (82)	123 (95)	
Ukupno	28 (100)	129 (100)	

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Mann Whitney U test

Medijan dobi u kojoj su bolesnici počeli pušiti u Osijeku je bio 17 godina, a u Zadru 19 godina. Između skupine bolesnika s KOPB-om u Osijeku i skupine bolesnika s KOPB-om u Zadru nije bilo razlike u medijanu pušačkih godina, za obje je skupine 45 PY. U objema skupinama bolesnika s KOPB-om 95 % njih imalo je indeks pušenja preko 20 PY. Bolesnici s KOPB-om u Osijeku i u Zadru nisu se uopće međusobno statistički razlikovali u pušačkim navikama (Tablica 5.5 i Tablica 5.6).

Tablica 5.5. Podatci vezani uz pušenje za bolesnike u Osijeku i Zadru

Bolesnici s KOPB-om	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Osijek	Zadar			
Dob početka pušenja	17 (15 - 20)	19 (16 - 20)	0	0 do 3	0,16
PY (pušačke godine)	45 (32 - 55)	45 (30 - 58)	0	-6 do 8	0,85
Godine od prestanka pušenja za bivše pušače	10 (4 - 17)	10 (5 - 17)	0	-5 do 6	0,86

\*Mann Whitney U test

Tablica 5.6. Raspodjela bolesnika s KOPB-om obzirom na pušački status i indeks pušačkih godina

	Osijek [n (%)]	Zadar [n (%)]	P*
Pušački status			
Aktivni pušač	22 (33,3)	27 (40,3)	0,68
Bivši pušač	40 (60,6)	37 (55,2)	
Nepušač	4 (6,1)	3 (4,5)	
Pušačke godine			
PY < 20	3 (5)	3 (5)	> 0,99 <sup>†</sup>
PY ≥ 20	62(95)	61 (95)	

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup> Fisherov egzakti test

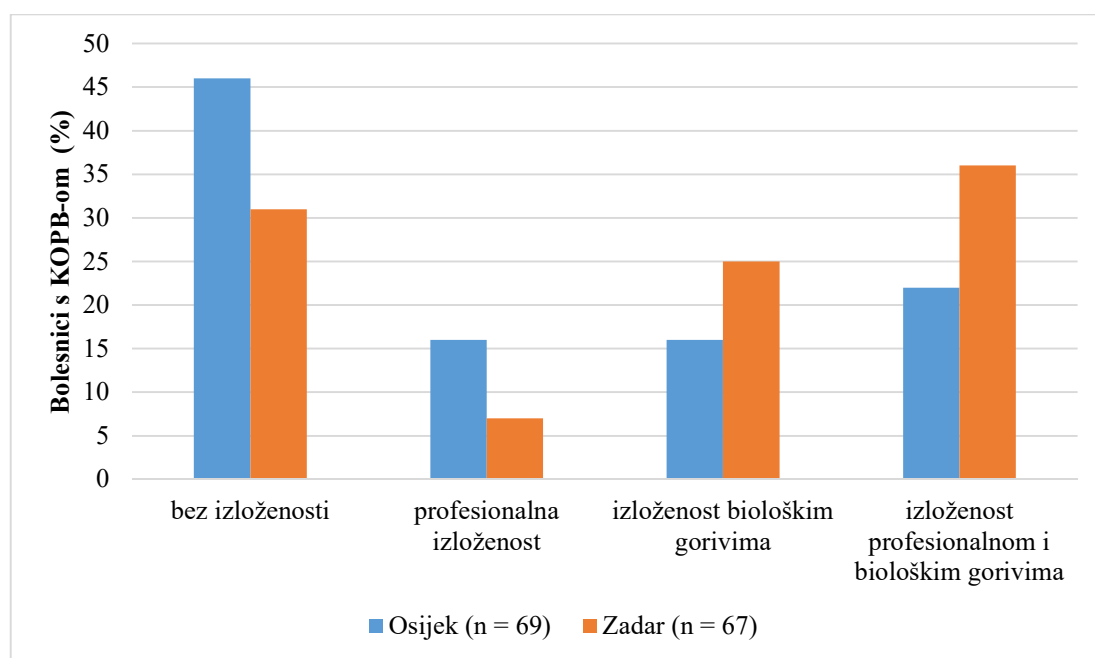
U pogledu izloženosti drugim rizičnim čimbenicima nađeno je da je 43 % bolesnika s KOPB-om bilo izloženo profesionalnim rizičnim čimbenicima, a 63 % produktima sagorijevanja bioloških goriva (grijanje na drva). U pogledu profesionalne izloženosti nije nađena statistički bitna razlika između skupine bolesnika u Osijeku i skupine bolesnika u Zadru. U pogledu izloženosti produktima sagorijevanja bioloških goriva nađena je statistički bitna razlika između dviju skupina bolesnika, odnosno nađeno je da su se bolesnici u Zadru bitno češće grijali na drva od bolesnika u Osijeku ( $\chi^2$  test, P = 0,02) (Tablica 5.7).

Tablica 5.7. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema profesionalnoj izloženosti i izloženosti biološkim gorivima

	Broj (%) bolesnika s KOPB-om			<i>P</i> *
	Osijek	Zadar	Ukupno	
Profesionalna izloženost	28 (42)	29 (43)	57 (43)	0,92
Biološka goriva	27 (41)	41 (61)	68 (51)	<b>0,02</b>

\* $\chi^2$  test

Nađeno je da 46 % bolesnika u Osijeku i 31 % bolesnika u Zadru nije bilo izloženo niti na radnom mjestu, a niti izgaranju bioloških goriva u kućnim uvjetima. Na slici 5.1 prikazani su rezultati analize pojedinačne i združene izloženosti profesionalnim rizičnim čimbenicima i biološkim gorivima. U skupini bolesnika u Zadru više ih je bilo izloženo izgaranju bioloških goriva i združenom učinku oba rizična čimbenika zajedno.



Slika 5.1. Prikaz profesionalne izloženosti, izloženosti produktima sagorijevanja bioloških goriva ili kombinacija obaju rizičnih čimbenika u bolesnika u Osijeku i Zadru

Mann Whitneyim U testom nađeno je da su se bolesnici u Osijeku i Zadru međusobno statistički bitno razlikovali po učestalosti konzumiranja pojedinih namirnica. Bolesnici u Osijeku konzumirali su više voća ( $P=0,002$ ) i povrća ( $P<0,001$ ), a bolesnici u Zadru više ribe ( $P = 0,02$ ) i alkohola ( $P = 0,04$ ) (Tablica 5.8).

Tablica 5.8. Učestalost konzumiranja pojedinih namirnica od strane bolesnika s KOPB-om u Osijeku i u Zadru

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% CI razlike	P*
	Osijek	Zadar			
<b>KOPB</b>					
Voće	2 (2 - 3)	3 (2 - 3)	1	0 do 1	<b>0,002</b>
Povrće	2 (2 - 3)	3 (3 - 3)	0	0 do 1	<b>&lt;0,001</b>
Meso	3 (2 - 3)	3 (2 - 3)	0	0 do 0	0,96
Riba	5 (4 - 6)	4 (3 - 5)	-1	-1 do 0	<b>0,02</b>
Ugljikohidrati	1 (1 - 2)	2 (1 - 2)	0	0 do 0	0,07
Mliječni proizvodi	2 (2 - 3)	2 (2 - 4)	0	0 do 1	0,17
Alkohol	7 (3 - 8)	5 (2 - 7)	-1	-1 do 0	<b>0,04</b>

\*Mann Whitney U test

### 5.1.2. Klinička obilježja bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

Simptom bolesnika s KOPB-om prikazani su u tablici 5.9. Najčešći simptom ispitanih bolesnika s KOPB-om bila je zaduha u tjelesnom naporu (zaduha N) koja je prisutna u većine, ukupno 121 bolesnika (89 %). Zaduha u mirovanju (zaduha M) prisutna je u mnogo manjeg broja, ukupno 29 (21 %). Kašalj je prisutan u 90 bolesnika (66 %), a iskašljavanje u njih 73 bolesnika (54 %). U pogledu prisutnosti simptoma zaduhe kako u naporu tako i u mirovanju nije bilo bitnije razlike između bolesnika u Osijeku i bolesnika u Zadru. Međutim, u pogledu simptoma kašlja i simptoma iskašljavanja nađena je statistički bitna razlika između tih dviju skupina bolesnika. Simptome kašlja i iskašljavanja statistički je bitno viša u bolesnika u Osijeku, u odnosu na bolesnike u Zadru ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$  za oba).

Tablica 5.9. Simptomi bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

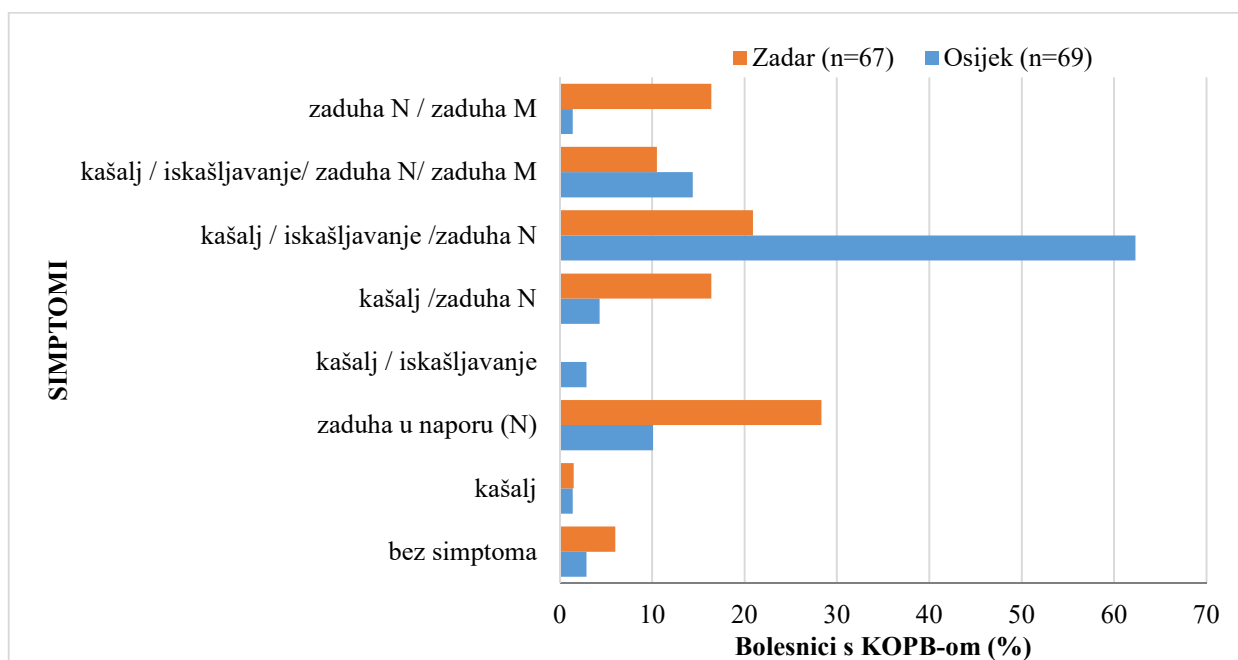
Simptomi	Broj (%) bolesnika s KOPB-om			P*
	Osijek (n=69)	Zadar (n=67)	Ukupno (n=136)	
Kašalj	59 (86)	31 (46)	90 (66)	<b>&lt;0,001</b>
Iskašljavanje	52 (75)	21 (31)	73 (54)	<b>&lt;0,001</b>
Zaduha M	11 (16)	18 (27)	29 (21)	0,12
Zaduha N	63 (91)	58 (87)	121 (89)	0,38

\* $\chi^2$  test Zaduha M (zaduha u mirovanju); zaduha N (zaduha u naporu)

Mnogi bolesnici imali su kombinacije simptoma kašlja, iskašljavanja, te zaduhe u naporu i zaduhe u mirovanju. Čak 60 % bolesnika u Osijeku imalo je kombinaciju kašlja, iskašljavanja i zaduhe u naporu. U bolesnika u Zadru dominirao izolirani simptom zaduhe u



naporu, a mnogo rjeđe bolesnici su imali kombinaciju zaduhe u naporu sa simptomima kašlja, iskašljavanja i/ili zaduhe u mirovanju (Slika 5.2).



Slika 5.2. Raspodjela simptoma i kombinacije simptoma u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.

Simptomi bolesnika s KOPB-om kvantitativno su procijenjeni uporabom CAT upitnika (COPD Assessment Test), a intenzitet zaduhe uporabom mMRC skale zaduhe (Modified Medical Research Council Dyspnea scale). Medijan zbroja u CAT upitniku za bolesnike u Osijeku iznosio je 16 (interkvartilni raspon 13 - 22), a za bolesnike u Zadru 18 (interkvartilni raspon 12 - 22). Nije nađena statistički bitna razlika u rezultatu CAT upitnika između bolesnika u Osijeku i Zadru (Mann Whitneyev U test,  $P = 0,85$ ).

Prema mMRC skali zaduhe nađeno je da najveći broj bolesnika s KOPB-om, njih 66 (49 %) imao stupanj zaduhe 2 (hodaju sporije od osoba iste životne dobi), a njih 36 bolesnika (26,5 %) stupanj zaduhe 3. Nađeno je da se raspodjela zastupljenosti pojedinih stupnjeva zaduhe statistički bitno razlikovala između bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,001$ ). U bolesnika u Zadru bilo je više bolesnika s blažim stupnjevima zaduhe (Tablica 5.10).

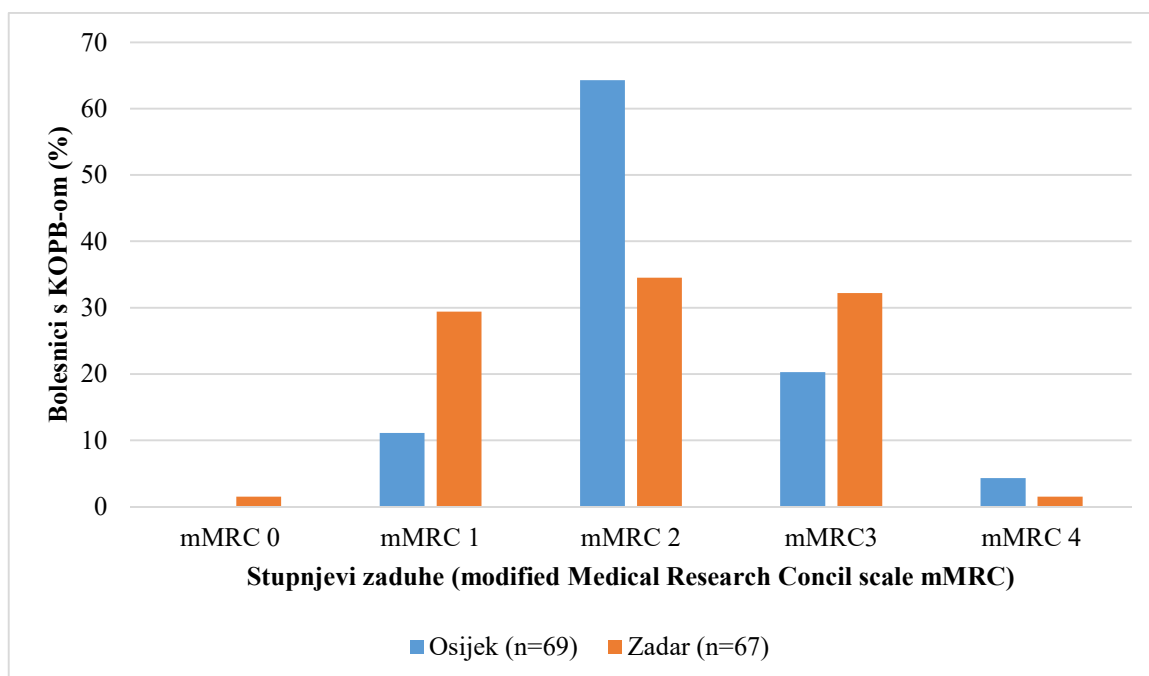
Tablica 5.10. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema stupnjevima mMRC skale

mMRC skala zaduhe	Broj (%) bolesnika s KOPB-om			P*
	Osijek	Zadar	Ukupno	
0 (gotovo bez ograničenja)	0	1 (1)	1 (1)	<b>&lt;0,001</b>
1 (dispneja pri penjanju po stepenicama na 4. kat ili uz brdo)	7 (10)	22 (33)	29 (21)	
2 (hodu po ravnom sporiji od svojih vršnjaka)	44 (64)	22 (33)	66 (49)	
3 (ne mogu hodati više od 100 m bez zaustavljanja)	15 (21,7)	21 (31,3)	36 (26,5)	
4 (nesposoban za izlazak iz kuće zbog nedostatka zraka već pri oblačenju ili hranjenju)	3 (4,3)	1 (1,5)	4 (2,9)	
Ukupno	69 (100)	69 (100)	136 (100)	

\*Fisherov egzaktni test

Mmrc skala zaduhe (eng. *Modified Medical Research Council Dyspnea scale*)

Na slici 5.3 prikazana je raspodjela stupnjeva zaduhe prema mMRC skali prema kojoj se vidi da je u bolesnika u Zadru približno jednako zastupljeni stupanj zaduhe 1, 2 i 3, te da su bili zastupljeniji stupnjevi zaduhe 0 i 1. Među bolesnicima u Osijeku bilo je bitno više onih sa stupnjem zaduhe 2, a bilo je i više bolesnika sa stupnjem zaduhe 4 nego među bolesnicima u Zadru.



Slika 5.3. Raspodjela stupnjeva zaduhe prema mMRC u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

Nije nađena statistički bitna razlika u broju egzacerbacija u posljednjih 12 mjeseci ( $\chi^2$  test,  $P= 0,52$ ) kao ni posjetima hitnoj službi i/ili hospitalizacijama zbog egzacerbacija između bolesnika u Osijeku i bolesnika u Zadru ( $\chi^2$  test,  $P= 0,30$ ). Ukupno 56 bolesnika (41 %) nije uopće imalo egzacerbaciju, a 80 bolesnika (59 %) imalo je jednu ili više egzacerbacija. Oko 30 % bolesnika s KOPB-om (26 % u Osijeku i 34 % u Zadru) zbrinjavano je u hitnoj službi i/ili je hospitalizirano zbog egzacerbacije KOPB-a (Tablica 5.11).

Tablica 5.11. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema broju egzacerbacija i prema posjetima hitnoj službi ili hospitalizaciji u posljednjih 12 mjeseci

	Broj (%) bolesnika s KOPB-om			$P^*$
	Osijek	Zadar	Ukupno	
Broj egzacerbacija				
0	28 (41)	28 (42)	56 (41)	0,52
1	24 (35)	20 (30)	44 (32)	
2	11 (16)	11 (16)	22 (16)	
3	4 (5,8)	8 (11,9)	12 (8,8)	
4	2 (2,9)	0 (0)	2 (1,5)	
Posjeti hitnoj službi / hospitalizacija				
Ne	51 (74)	44 (66)	95 (70)	0,30
Da	18 (26)	23 (34)	41 (30)	
Ukupno	69 (100)	67 (100)	136 (100)	

\* $\chi^2$  test

Nije nađena statistički bitna razlika u raspodjeli stupnjeva opstrukcije dišnih putova po GOLD-u između skupine bolesnika u Osijeku i bolesnika u Zadru ( $\chi^2$  test,  $P = 0,31$ ). Najveći broj bolesnika, oko 80 % u objema skupinama pripadao je umjerenom i teškom stupnju opstrukcije (47 % pripadalo je stupnju GOLD 2, a 34 % stupnju GOLD 3), dok je stupnju GOLD 1 i GOLD 4 pripadao mnogo manji broj bolesnika (Tablica 5.12).

Tablica 5.12. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema GOLD stupnjevima opstrukcije

	Broj (%) bolesnika s KOPB-om			$P^*$
	Osijek	Zadar	Ukupno	
GOLD stupanj opstrukcije				
I (blaga)	9 (13)	3 (4)	12 (9)	0,31
II (umjereni)	31 (45)	34 (51)	65 (47)	
III (teška)	23 (33)	23 (34)	46 (34)	
IV (vrlo teška)	6 (8,7)	7 (10,4)	13 (10)	
Ukupno	69 (100)	67 (100)	136 (100)	

\* $\chi^2$  test

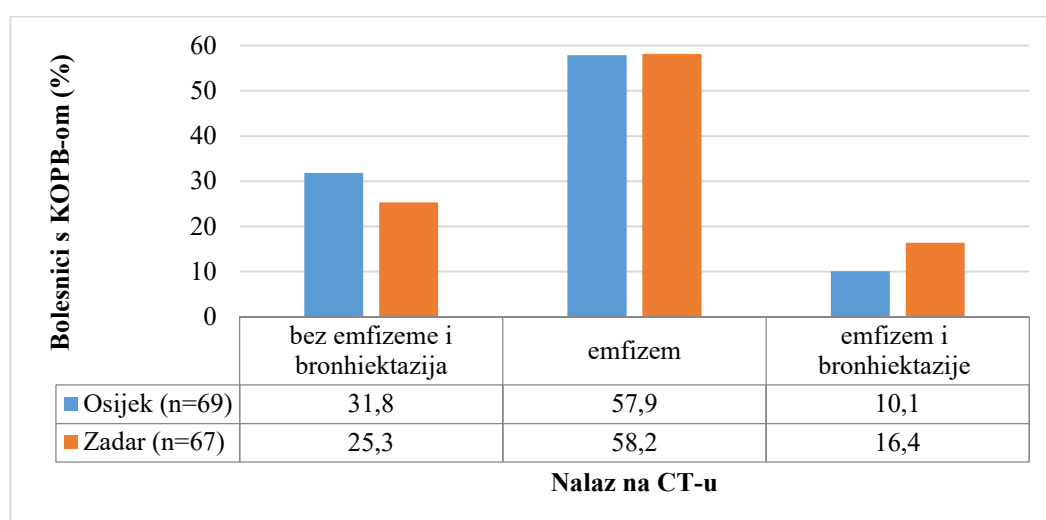
Između bolesnika u Osijeku i Zadru nije nađena statistički bitna razlika u raspodjeli prema GOLD skupinama težine simptoma i rizika budućih egzacerbacija A-D ( $\chi^2$  test,  $P=0,89$ ). Raspodjele bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru pokazala je da oko 85 % bolesnika pripadalo u GOLD skupinu B i D (60 % pripadalo je skupini GOLD B, a 25 % skupini GOLD D) (Tablica 5.13).

Tablica 5.13. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru prema GOLD skupinama rizika

Skupina rizika	Broj (%) bolesnika s KOPB-om			$P^*$
	Osijek	Zadar	Ukupno	
A	9 (13)	9 (13)	18 (13)	0,89
B	40 (58)	42 (63)	82 (60)	
C	1 (1)	1 (1)	2 (1)	
D	19 (27,5)	15 (22,4)	34 (25)	
Ukupno	69 (100)	67 (100)	136 (100)	

\* Fisherov egzaktni test

Analizom nalaza računalne tomografije (CT) toraksa u 31,8 % bolesnika u Osijeku i 25,3 % bolesnika u Zadru nije opisan ni emfizem niti bronhiektazije. Izolirani emfizem ili emfizem u kombinaciji s bronhiektazijama opisan je u 74,6 % u bolesnika u Zadru i 68 % bolesnika u Osijeku (Slika 5.4). Međutim, opsežan emfizem s ili bez bula<sub>bio</sub> je statistički bitno češće opisan u bolesnika u Zadru, u 47 bolesnika (70 %) u Zadru u odnosu na 28 bolesnika (42 %) u Osijeku ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ).



Slika 5.4. Zastupljenost emfizema pluća i bronhiektazija u nalazima CT-a toraksa bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

Bronhiektazije su nađene u 10,1 % bolesnika u Osijeku i 16,4 % bolesnika u Zadru i to isključivo u kombinaciji s emfizemom pluća (Slika 5.4). Nije nađena statistički bitna razlika u nalazu bronhiektazija između bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru ( $\chi^2$  test,  $P = 0,14$ ).

Medijani nalaza pojedinih varijabli spirometrije, plućne difuzije i plinske analize arterijske krvi bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru nisu se statistički bitno razlikovali (Tablica 5.14). Iako u granicama normalnih nalaza, vrijednosti FeNO testa bile su statistički bitno više u bolesnika u Zadru, nego u bolesnika u Osijeku (Mann Whitney U test,  $P = 0,001$ ).

Tablica 5.14. Nalazi pokazatelja plućne funkcije u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% interval pouzdanosti	P*
	Osijek	Zadar			
FVC (%)	75,8 (57 – 85,8)	75,0 (63,3 – 90)	3,6	-4 do 10,4	0,37
FEV <sub>1</sub> (%)	52 (41,4 – 66,4)	51 (39,3 – 67,9)	-0,9	-8 do 5,9	0,82
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	57,5 (46,6 – 62,4)	54 (45 – 63,5)	-0,9	-4,8 do 3	0,63
FENO (ppb)	13 (9 – 20)	20 (12 – 35)	6	2 do 10	<b>0,001</b>
DLCO (%)	52,6 (37 – 63,9)	54 (39,3 – 66,8)	3	-4 do 10	0,38
KCO (%)	70,4 (56,2 – 84,7)	65 (50,3 – 86,5)	-3,9	-12,9 do 4,9	0,40
PaO <sub>2</sub> (kPa)	9,19 (8,3 – 9,8)	9,1 (8,3 – 10,5)	0,18	-0,42 do 0,86	0,59
pCO <sub>2</sub> (kPa)	5,5 (5,1 – 5,9)	5,7 (4,9 – 6,6)	0,24	-0,12 do 0,65	0,18
SpO <sub>2</sub> (%)	94 (92 – 95,2)	94,2 (92,1 – 96)	0,4	-0,7 do 1,4	0,52
HCO <sub>3</sub> (mmol/l)	27 (24,9 – 29,2)	27 (23,8 – 30,9)	0	-1,5 do 1,5	> 0,99

<sup>†</sup>Mann Whitney U test; <sup>‡</sup>Hodges-Lehmann razlika medijana

Medijan nalaza ukupnog IgE-a bio viši u bolesnika u Zadru, ali razlika nije bila statistički bitna. Također nije nađena statistički bitna razlika u nalazima eozinofila u perifernoj krvi u bolesnika s KOPB-om između bolesnika u Osijeku i Zadru (Tablica 5.15).

Tablica 5.15. Nalazi ukupnog IgE i eozinofila u perifernoj krvi u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% interval pouzdanosti	P*
	Osijek	Zadar			
IgE	49 (19 – 231,3)	80 (28,8 – 176,3)	6	-15 do 36	0,67
Eo %	2 (1 – 3)	2 (0,9 – 3,3)	-0,1	-0,5 do 0,6	0,84

<sup>†</sup>Mann Whitney U test; <sup>‡</sup>Hodges-Lehmann razlika medijana

Većina bolesnika s KOPB-om i u Osijeku i Zadru imala je pridružene bolesti tzv. komorbiditete, ali u bolesnika u Osijeku oni su bili bitno više zastupljeniji. Najučestaliji komorbiditeti u ispitanih bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru bile su kardiovaskularne

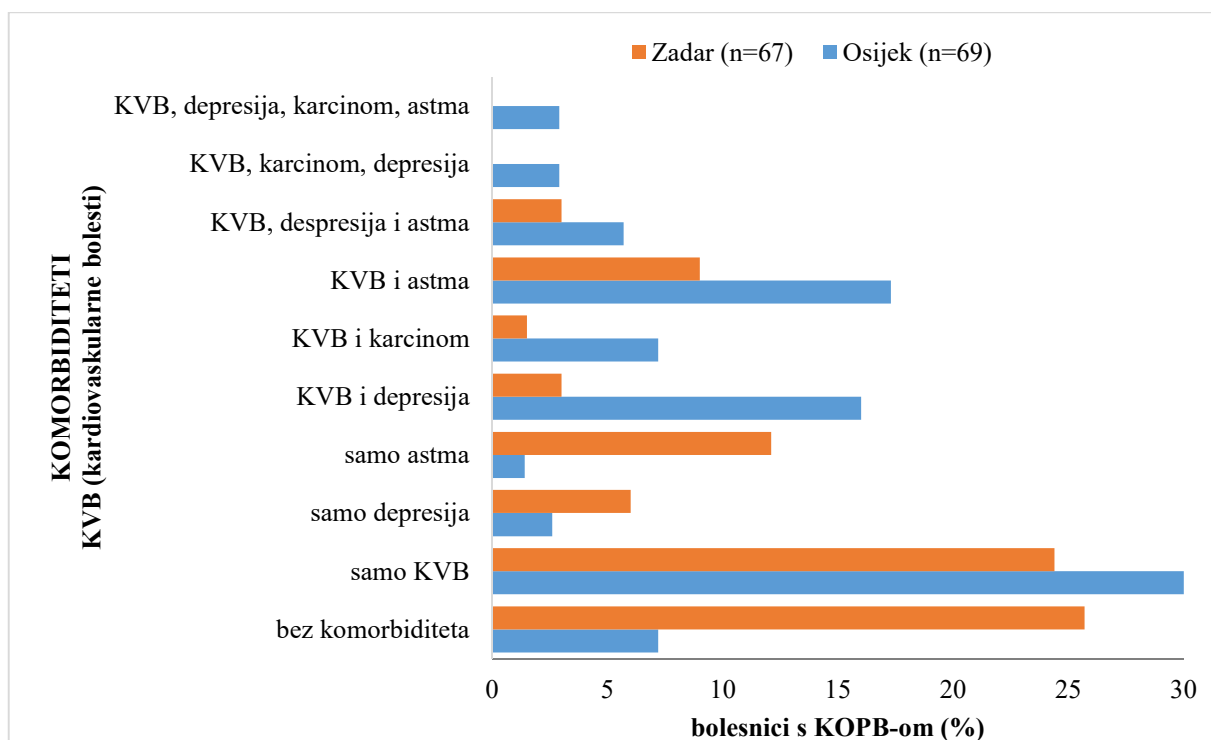
bolesti. U ukupnom uzorku bolesnika kardiovaskularne bolesti (KVB) su bile prisutne u 84 bolesnika (62 %), po učestalosti slijedi kronični gastritis u 45 bolesnika (34 %), astma u 43 bolesnika (32 %) i depresija u 31 bolesnika (23 %), dok su karcinomi i ostali komorbiditeti bili rjeđe zastupljeni. Nađeno je da su bolesnici u Osijeku imali statistički bitno veću zastupljenost kardiovaskularnih komorbiditeta ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ) i depresije ( $\chi^2$  test,  $P = 0,01$ ) u odnosu na bolesnike u Zadru. Za sve ostale komorbiditete nije nađena bitna razlika u zastupljenosti u bolesnika u Osijeku i u bolesnika u Zadru (Tablica 5.16).

Tablica 5.16. Zastupljenost pojedinih komorbiditeta u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i u Zadru

KOMORBIDITETI	Broj (%) bolesnika s KOPB-om			$P^*$
	Osijek	Zadar	Ukupno	
Kardiovaskularni	56 (81)	28 (42)	84 (62)	<b>&lt;0,001</b>
Gastritis	27 (40)	18 (29)	45 (34)	0,18
Depresija	22 (32)	9 (13)	31 (23)	<b>0,01</b>
Astma	23 (34)	20 (30)	43 (32)	0,71
Dijabetes	9 (13)	8 (12)	17 (13)	0,85
Osteoporoza	10 (15)	5 (8)	15 (11)	0,19
Ca pluća	4 (6)	4 (6)	8 (6)	> 0,99 <sup>†</sup>
Ostali karcinomi	6 (9)	7 (7)	13 (16)	0,21 <sup>†</sup>
Tuberkuloza	6 (9)	6 (9)	12 (9)	0,96
Plućna hipertenzija	8 (16)	8 (12)	16 (14)	0,53

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test

U skupini bolesnika s KOPB-om u Osijeku samo 7,2 % bolesnika, a u skupini bolesnika u Zadru njih čak 25,7 % nije imalo ni jednu pridruženu bolest uz KOPB. Samo jedan komorbiditet imalo je 42 % bolesnika u Osijeku i 70 % bolesnika u Zadru. Istovremena prisutnost dvaju ili više komorbiditeta bila je češća u bolesnika u Osijeku. Prisutnost triju ili više komorbiditeta među bolesnicima u Zadru bila je iznimno rijetka (Slika 5.5).



Slika 5.5. Zastupljenost učestalijih pojedinačnih komorbiditeta i njihovih kombinacija u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru.

U ispitanom uzorku bolesnika s KOPB-om nađene su neke razlike u pogledu medikamentoznog liječenja. Najveći broj bolesnika, njih 90 % dobivao je antikolinergike dugog djelovanja (LAMA) kao poseban lijek ili u fiksnim kombinacijama s  $\beta$ 2 agonistima dugog djelovanja (LABA) i/ili inhalacijskim kortikosteroidima (ICS), kao LAMA/LABA ili LABA/LAMA/ICS kombinacija u jednom inhalacijskom uređaju. Nešto manje bolesnika, 88 % koristilo se  $\beta$ 2-agonistima dugog djelovanja (LABA), a 56 % bolesnika uzimalo je inhalacijske kortikosteroide (ICS) (posljednja dva lijeka isključivo u fiksnim kombinacijama). Bolesnici u Osijeku statistički bitno više koristili su se  $\beta$ 2-agonistima dugog djelovanja i  $\beta$ 2-agonistima kratkog djelovanja (SABA) (za oba  $\chi^2$  test,  $P = 0,03$ ). Bolesnici u Zadru više su se koristili kao simptomatskim lijekom antikolinergici kratkog djelovanja (SAMA) ( $\chi^2$  test,  $P = 0,01$ ). Bolesnici u Osijeku bitno su češće pohađali program plućne rehabilitacije nego bolesnici u Zadru ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.17).

Tablica 5.17. Liječenje bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

	Broj (%) bolesnika s KOPB-om			P*
	Osijek	Zadar	Ukupno	
Terapija				
Antikolinergik dugog djelovanja (LAMA)	65 (94)	58 (87)	123 (90)	0,13
β2-agonist dugog djelovanja (LABA)	65 (94)	55 (82)	120 (88)	<b>0,03</b>
Inhalacijski kortikosteroidi (ICS)	41 (59)	35 (52)	76 (56)	0,40
Teofilin	17 (25)	14 (21)	31 (23)	0,60
Ruflumilast	2 (3)	0	2 (2)	0,50 <sup>†</sup>
Antikolinergik kratkog djelovanja (SAMA)	5 (7)	15 (22)	20 (15)	<b>0,01</b>
β2 agonist kratkog djelovanja (SABA)	45 (65)	31 (46)	76 (56)	<b>0,03</b>
Oksigenoterapija	5 (7)	6 (9)	11 (8)	0,72
Plućna rehabilitacija	37 (54)	1 (2)	38 (28)	<b>&lt;0,001</b>

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test

### 5.1.3. Kvaliteta života bolesnika s KOPB-om

Kvaliteta života povezana sa zdravstvenim stanjem u bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru procjenjivana je s upitnikom SGRQ, specifičnim za respiratorne bolesti i generičkim upitnikom SF-36 za procjenu općeg stanja bolesnika.

Bolesnici s KOPB-om u Osijeku i Zadru imali su vrlo sličan rezultat u ukupnoj skali i pojedinim domenama upitnika SGRQ. Rezultati testa u *Domeni simptoma* i *Domeni aktivnosti* kao i ukupnom SGRQ zbroju bili su bez statistički bitne razlike između osječke i zadarske skupine bolesnika. Nešto bolji rezultat u *Domeni utjecaja bolesti* imali su bolesnici u Zadru (20,3), nego u bolesnici u Osijeku (33,7), ali razlika nije bila statistički bitna (Mann Whitney U test, P=0,07) (Tablica 5.18).

Tablica 5.18. Razlike u domenama i ukupnoj skali SGRQ između bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

SGRQ – upitnik	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% interval pouzdanosti	P*
	Osijek (n = 66)	Zadar (n = 67)			
Domena simptoma	51,3 (33,3 - 73,4)	57,7 (36,3 - 72,1)	2,09	-6,7 do 11,2	0,60
Domena aktivnosti	59,5 (35,6 - 72,9)	59,5 (41,8 - 72,8)	0,89	-5,9 do 12,3	0,54
Domena utjecaja bolesti	33,7 (16,9 - 49,6)	20,3 (10,3 - 42,3)	-6,5	-13,6 do 0,4	0,07
Ukupno skala SGRQ	44,5 (28,7 - 58,3)	40,1 (26,2 - 57,0)	-2,3	-9,2 do 4,9	0,49

\*Mann Whitney U test



U okviru upitnika SF-36 analizirane su pojedine konceptualne kategorije u okviru *domena tjelesnog i mentalnog zdravlja*. Za razliku od SGRQ upitnika, u istom rasponu skale od 0 do 100, veći broj označava bolje zdravstveno stanje odnosa kvalitete života. U bolesnika s KOPB-om u Osijeku u odnosu na bolesnike u Zadru rezultat u upitniku SF-36 za konceptualnu kategoriju *fizičkog funkcioniranja u domeni tjelesnog zdravlja* bio je statistički bitno lošiji (Mann Whitney U test,  $P = 0,04$ ), kao i za kategoriju *ograničenja zbog emotivnih poteškoća u domeni mentalnog zdravlja* (Mann Whitney U test,  $P = 0,03$ ). U drugim konceptualnim kategorijama obje domene kao i u ukupnom rezultatu upitnika SF-36 nije nađena statistički bitna razlika (Tablica 5.19).

Tablica 5.19. Razlike u domenama i ukupnoj skali kvalitete života SF-36 između bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

SF-36 upitnik	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% interval pouzdanosti	P*	
	Osijek (n = 66)	Zadar (n = 67)				
Tjelesno zdravlje	Fizičko funkcioniranje	32,5 (15 - 50)	45 (25 - 65)	10	0 do 20	<b>0,04</b>
	Ograničenja zbog fizičkih poteškoća	25 (0 - 75)	40 (0 - 100)	0	0 do 0	0,35
	Tjelesna bol	55 (32 - 88)	50 (45 - 90)	5	0 do 18	0,14
	Percepcija općeg zdravlja	45 (35 - 50)	40 (30 - 55)	0	-10 do 5	0,69
Tjelesno zdravlje – ukupno		40,6 (23,8 - 61,8)	46,3 (31,3 - 63,8)	5	-3,1 do 12,5	0,20
Mentalno zdravlje	Vitalnost i energija	50 (35 - 60)	50 (40 - 65)	4	-5 do 10	0,43
	Socijalno funkcioniranje	62,5(50 - 78)	50 (50 - 75)	0	-13 do 13	0,87
	Ograničenja zbog emocionalnih poteškoća	66,7 (0 - 100)	100 (33,3 - 100)	0	0 do 0	<b>0,03</b>
	Psihičko zdravlje	64 (52 - 77)	64 (48 - 76)	0	-8 do 6	0,95
Psihičko zdravlje – ukupno		55,2 (36,8 - 76,8)	66 (44,1 - 76,5)	5	-2,1 do 13,3	0,16
<b>SF-36 Kvaliteta života - ukupno</b>		47,3 (29,6 - 60)	54,3 (38,2 - 65,1)	5,4	-1,1 do 12,2	<u>0,08</u>
U usporedbi s prošlom godinom, kako sada ocjenjuju svoje zdravlje		50 (25 - 50)	50 (25 - 75)	0	0 do 25	0,47

\*Mann Whitney U test

Aktivni pušači imali su bitno lošiji rezultat u domeni simptoma u upitniku SGRQ u odnosu na bivše pušače i nepušače (Kruskal Wallis test, Post hoc Conover,  $P = 0,001$ ) (Tablica 5.20).

Tablica 5.20. Razlike u mMRC skali, CAT testu, SGRQ i SF-36 skali u odnosu na naviku pušenja

	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	Pušač (n = 49)	Bivši pušač (n = 79)	Nepušač (n = 6)	
mMRC	2 (2 - 3)	2 (2 - 3)	2 (1 - 2)	0,31
CAT test	18 (14 - 22,25)	15 (11 - 22)	20 (12 - 21)	0,26
Domena simptoma	64,04 (41,89 - 76,11)	44,6 (29,3 - 66,9)	62,3 (33,1 - 84,4)	<b>0,01<sup>†</sup></b>
Domena aktivnosti	59,91 (44,85 - 72,99)	54,4 (35,5 - 73,8)	57,2 (52,8 - 66,5)	0,21
Domena utjecaja bolesti	29,44 (14,31 - 45,26)	26,1 (13,1 - 45,5)	46,9 (9,8 - 65,1)	0,06
Ukupno skala SGRQ	44,41 (31,18 - 57,64)	37,9 (22,9 - 56,6)	53,3 (28,2 - 65,5)	0,06
Fizičko funkcioniranje	35 (20 - 60)	37,5 (15 - 60)	35 (18,8 - 51,3)	0,87
Ograničenja zbog fizičkih poteškoća	0 (0 - 75)	38,8 (0 - 100)	45 (0 - 100)	0,53
Tjelesna bol	55 (45 - 82,5)	52,5 (39,4 - 100)	46,3 (7,5 - 92,5)	0,35
Percepcija općeg zdravlja	45 (35 - 60)	44,4 (30 - 50)	47,9 (27,5 - 70)	0,81
Vitalnost i energija	50 (30,25 - 60)	50 (40 - 65)	45 (37,5 - 60)	0,49
Socijalno funkcioniranje	50 (43,75 - 63,75)	62,5 (50 - 87,5)	62,5 (53,8 - 78,1)	0,14
Ograničenja zbog emocionalnih poteškoća	100 (0 - 100)	100 (0 - 100)	100 (24,8 - 100)	0,72
Psihičko zdravlje	64 (48 - 74)	64 (52 - 80)	68 (48 - 76)	0,97
Tjelesno zdravlje - ukupno	43,1 (26,9 - 58,4)	45,6 (26,3 - 66,1)	34,4 (29,6 - 68,8)	0,46
Psihičko zdravlje - ukupno	54,9 (36,4 - 71,4)	65,3 (40,9 - 81,7)	63,4 (50,5 - 74,7)	0,38
SF-36 - ukupno	52,7 (32,8 - 62,2)	49,4 (36,1 - 64,5)	44 (36,6 - 64,5)	0,63

\*Kruskal Wallisov test (Post hoc Conover);

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  bitno lošija kvaliteta života u pušača u odnosu na bivše pušače, dok se domena simptoma (SGRO) ne razlikuje bitno između bivših pušača i pasivnih/ nepušača

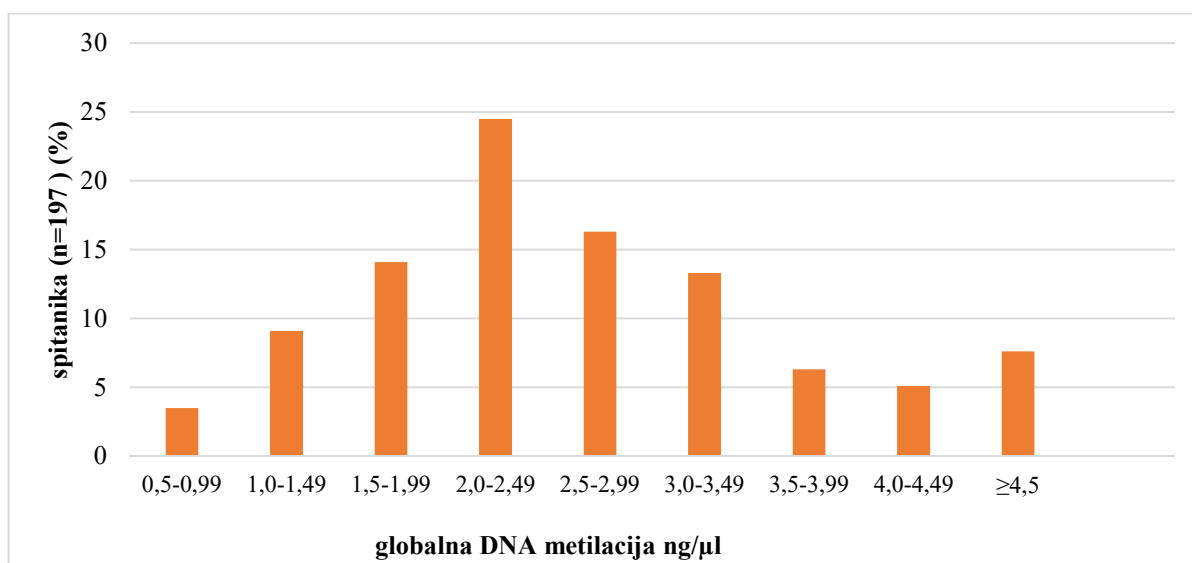
Nađena je statistički bitna povezanost broja egzacerbacija KOPB-a sa svim domenama upitnika SGRQ (*domena simptoma, domena aktivnosti i domena utjecaja bolesti*), te konceptualnim kategorijama *fizičkog funkcioniranja i percepcije općeg zdravlja*, te ukupnom domenom *tjelesnog zdravlja* u uzorku svih bolesnika s KOPB-om i bolesnika u Zadru, dok je u bolesnika u Osijeku ta povezanost bila statistički bitna samo za *domenu simptoma* i ukupan rezultat u SGRQ upitniku (Tablica 5.21).

Tablica 5.21. Povezanost egzacerbacija s mMRC skalom i CAT testom, te SGRQ i SF-36 skalom

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)		
	broj egzacerbacija		
	Svi ispitanici	Osijek	Zadar
mMRC	<b>0,314 (&lt;0,001)</b>	0,189 (0,12)	<b>0,413 (&lt;0,001)</b>
CAT test	<b>0,343 (&lt;0,001)</b>	<b>0,250 (0,04)</b>	<b>0,430 (&lt;0,001)</b>
Domena simptoma	<b>0,436 (&lt;0,001)</b>	<b>0,384 (&lt;0,001)</b>	<b>0,487 (&lt;0,001)</b>
Domena aktivnosti	<b>0,316 (&lt;0,001)</b>	0,196 (0,12)	<b>0,439 (&lt;0,001)</b>
Domena utjecaja bolesti	<b>0,392 (&lt;0,001)</b>	0,241 (0,06)	<b>0,547 (&lt;0,001)</b>
Ukupno skala SGRQ	<b>0,409 (&lt;0,001)</b>	<b>0,276 (0,03)</b>	<b>0,524 (&lt;0,001)</b>
Fizičko funkcioniranje	<b>-0,179 (0,04)</b>	-0,075 (0,55)	<b>-0,262 (0,03)</b>
Ograničenja zbog fizičkih poteškoća	<b>-0,200 (0,02)</b>	-0,223 (0,07)	-0,186 (0,13)
Tjelesna bol	-0,044 (0,62)	0,053 (0,67)	-0,123 (0,32)
Percepcija općeg zdravlja	<b>-0,215 (0,01)</b>	-0,133 (0,29)	<b>-0,262 (0,03)</b>
Vitalnost i energija	-0,173 (0,05)	-0,104 (0,41)	-0,246 (0,05)
Socijalno funkcioniranje	-0,160 (0,07)	-0,112 (0,37)	-0,217 (0,08)
Ograničenja zbog emocionalnih poteškoća	-0,056 (0,52)	-0,015 (0,90)	-0,118 (0,34)
Psihičko zdravlje	-0,070 (0,42)	0,009 (0,94)	-0,148 (0,23)
Tjelesno zdravlje - ukupno	<b>-0,199 (0,02)</b>	-0,114 (0,36)	<b>-0,265 (0,03)</b>
Psihičko zdravlje - ukupno	-0,128 (0,14)	-0,051 (0,68)	-0,196 (0,11)
SF-36 - ukupno	-0,146 (0,09)	-0,016 (0,90)	<b>-0,271 (0,03)</b>

## 5.2. Globalna DNA metilacija

Globalna DNA metilacija izmjerena je u 197 ispitanika u rasponu od 0,6 do 8,3 ng/μl. U jedne četvrtine ispitanika vrijednosti DNA metilacije su bile u rasponu između 2 i 2,5 ng/μl, a nešto više od polovine ispitanika imalo je vrijednosti globalne DNA metilacije između 1,5 i 3 ng/μl (Slika 5.6).



Slika 5.6. Raspodjela vrijednosti globalne DNA metilacije u svih ispitanika (n = 197)

### 5.2.1. Razlike u vrijednostima globalne DNA metilacije između ispitivanih skupina

Na razini cjelokupnog uzorka ispitanika (bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika) Mann Whitneyevim U testom nije nađena statistički bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena, ni između pušača (aktivnih i bivših) i nepušača, kao ni između kontrolnih ispitanika i bolesnika s KOPB-om, te između ispitanika u Osijeku i ispitanika u Zadru (Tablica 5.22).

Tablica 5.22. Razlika u globalnoj DNA metilaciji između četiriju skupina u uzorku svih ispitanika (n =197)

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Svi ispitanici (bolesnici s KOPB-om i kontrolni)				
gDNA metilacija	muškarci n = 127 2,40 (1,9 - 3,2)	žene n = 70 2,40 (1,9 - 3,3)	0,1	-0,3 do 0,4	0,73
gDNA metilacija	Pušači n = 54 2,40 (1,9 - 3,2)	Nepušači N = 43 2,60 (1,7 - 3,8)	0,2	-0,2 do 0,6	0,41
gDNA metilacija	Osijek n = 98 2,40 (2,0 - 3,0)	Zadar n = 99 2,40 (1,90 - 3,20)	0	-0,3 do 0,3	0,97
gDNA metilacija	Kontrola n = 64 2,45 (1,70 - 3,85)	KOPB n = 133 2,40 (1,98 - 3,10)	-0,10	-0,5 do 0,2	0,49

\*Mann Whitney U test

Nije nađena statistički bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena niti u jednoj ispitivanoj skupini, u uzorku svih ispitanika, u skupini bolesnika s KOPB-om, u skupini kontrolnih ispitanika, te unutar podskupina ispitanika iz Osijeka i Zadra odvojeno, kao niti u skupinama aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača (Tablice 5.23, 5.24 i 5.25).

Tablica 5.23. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena u uzorku svih ispitanika, u uzorku ispitanika u Osijeku i Zadru i obzirom na pušački status.

SVI ISPITANICI	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Muškarci	Žene			
Svi (n = 128/69)	2,4 (1,9 – 3,2)	2,4 (1,9 – 3,3)	0,1	-0,3 do 0,4	0,73
Aktivni pušači (40/23)	2,4 (2 – 3,2)	2,5 (2,2 – 3,1)	0,2	-0,3 do 0,6	0,39
Bivši pušači (67/25)	2,4 (1,7 – 3,1)	2,25 (1,7 – 3,0)	-0,1	-0,6 do 0,4	0,76
Nepušači /21/21)	2,9 (1,85 – 3,8)	2,6 (1,5 – 3,8)	-0,25	-1,1 do 0,7	0,67
OSIJEK (n = 68/30)	2,35 (1,9 – 3,0)	2,35 (1,9 – 2,8)	0	-0,4 do 0,3	0,85
Aktivni pušači (20/14)	2,15 (1,9 – 2,9)	2,5 (2,2 – 2,8)	0,3	-0,2 do 0,7	0,30
Bivši pušači (35/8)	2,5 (1,9 – 3,1)	2,15 (1,9 – 2,8)	-0,2	-0,9 do 0,5	0,53
Nepušači (13/8)	2,1 (1,6 – 2,9)	1,7 (1,3 – 2,8)	-0,3	-1,1 do 0,6	0,47
ZADAR (n = 60/39)	2,45 (1,9 – 3,8)	2,6 (2,0 – 4,1)	0,1	-0,5 do 0,6	0,73
Aktivni pušači (20/9)	3,0 (2,2 – 3,6)	2,6 (2,2 – 4,1)	0,2	-0,8 do 1,1	0,64
Bivši pušači (32/17)	2,3 (1,7 – 2,9)	2,4 (1,5 – 3,4)	0	-0,7 do 0,8	0,91
Nepušači (8/13)	4,5 (3,4 – 5,6)	3,3 (2,2 – 4,3)	-1,1	-2,6 do 0,6	0,17

\*Mann Whitney U test

Tablica 5.24. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena u bolesnika s KOPB-om

BOLESNICI S KOPB-om	Medijan (interkvartilni raspon) Globalna DNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Muškarci	Žene			
Svi (n = 93/40)	2,4 (1,9 – 3,1)	2,4 (2,0 – 2,9)	0	-0,3 do 0,4	0,85
Aktivni pušači (33/16)	2,5 (2 – 3,2)	2,7 (2,3 – 3,1)	0,2	-0,3 do 0,7	0,48
Bivši pušači (57/20)	2,4 (1,8 – 3,0)	2,3 (1,7 – 2,8)	-0,1	-0,6 do 0,4	0,60
Nepušači (3/4)	3,1 (n=1)	2,5 (2,1 – 3,7)	-0,4	-	0,86
OSIJEK (n = 48/18)	2,45 (2,0 – 3,0)	2,4 (2,0 – 2,8)	0	-0,4 do 0,4	0,94
Aktivni pušači (14/8)	2,1 (2,0 – 2,9)	2,8 (2,3 – 3,0)	0,3	-0,2 do 0,9	0,26
Bivši pušači (32/8)	2,6 (1,9 – 3,1)	2,2 (1,9 – 2,8)	-0,25	-0,9 do 0,5	0,45
Nepušači (2/2)	2,95	2,25	-0,7	-	0,67
ZADAR (n = 45/22)	2,3 (1,9 – 3,2)	2,4 (2,0 – 2,9)	0,1	-0,5 do 0,6	0,69
Aktivni pušači (19/8)	2,8 (2,2 – 3,6)	2,5 (2,2 – 3,5)	0,1	-1 do 1,1	0,87
Bivši pušači (25/12)	2,2 (1,7 – 2,7)	2,4 (1,4 – 2,8)	0,1	-0,8 do 0,7	0,85
Nepušači (1/2)	3,1	3,5	-	-	-

\*Mann Whitney U test

Tablica 5.25. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena u kontrolnih ispitanika

KONTROLNI ISPITANICI	Medijan (interkvartilni raspon) Globalna DNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Muškarci	Žene			
Svi (n=35/29)	2,4 (1,7 – 3,6)	2,4 (2,0 – 2,9)	0	-0,7 do 0,5	0,87
Aktivni pušači (7/7)	2,3 (1,9 – 3,4)	2,5 (2,1 – 3,7)	0,2	-0,9 do 1,0	0,52
Bivši pušači (10/5)	2,2 (1,5 – 4,2)	2,9 (1,7 – 4,7)	0,2	-	0,83
Nepušači (18/17)	2,7 (1,7 – 4,1)	2,8 (1,4 – 3,8)	-0,3	-1,4 do 0,9	0,68
OSIJEK (n = 20/12)	2,1 (1,6 – 2,9)	2,2 (1,4 – 2,7)	0	-0,7 do 0,7	0,98
Aktivni pušači (6/6)	2,3 (1,9 – 3,4)	2,4 (2,0 – 2,5)	0,2	-1,1 do 1	0,57
Bivši pušači (3/0)	1,9 (1,3 – 3,4)	-	-	-	-
Nepušači (11/6)	2,1 (1,5 – 2,8)	1,5 (1,2 – 3,0)	-0,4	-1,4 do 0,9	0,51
ZADAR (n = 15/17)	4,1 (1,9 – 5,3)	3,4 (1,8 – 4,2)	-0,5	-1,8 do 0,7	0,33
Aktivni pušači (1/1)	3,2	4,1	-	-	-
Bivši pušači (7/5)	2,4 (1,6 – 4,9)	2,9 (1,7 – 4,7)	-0,1	-	0,85
Nepušači (7/11)	4,9 (3,8 – 5,7)	3,3 (1,9 – 4,3)	-1,5	-2,8 do 0,5	0,12

\*Mann Whitney U test

U tablicama 5.26, 5.27 i 5.28 prikazane su razlike u globalnoj DNA metilaciji između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača u uzorku svih ispitanika, u skupini bolesnika i skupini kontrolnih ispitanika. Uočeno je da nepušači u Zadru u svim podskupinama imaju više vrijednosti globalne DNA metilacije, za razliku od ispitanika u Osijeku gdje nepušači imaju niže vrijednosti globalne DNA metilacije od aktivnih pušača. Nađena je statistički bitna razlika između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača samo u Zadru u uzorku svih ispitanika (bolesnika i kontrolnih ispitanika) i uzorku muškaraca (Kruskal Wallis test (post hoc Conover),  $P = 0,01$ ;  $P = 0,02$ ) (Tablica 5.26). U svim drugim skupinama nije nađena statistički bitna razlika u DNA metilaciji između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača. Uočeni su također viši medijani globalne DNA metilacije za kontrolne ispitanike u Zadru i aktivne pušače u Zadru u odnosu na sve druge skupine ispitanika, ali razlika nije bila statistički bitna.

Tablica 5.26. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača u uzorku svih ispitanika (n =197)

SVI ISPITANICI	Medijan (interkvartilni raspon) Globalna DNA metilacija			P*
	Aktivni	Bivši	Nepušači	
Svi (63/92/42)	2,5 (2,0 – 3,2)	2,4 (1,7 – 3,1)	2,6 (1,7 – 3,8)	0,24
Muškarci (40/67/21)	2,4 (2,0 – 3,2)	2,4 (1,7 – 3,1)	2,9 (1,9 – 3,8)	0,44
Žene (23/25/21)	2,5 (2,2 – 3,1)	2,3 (1,7 – 3,0)	2,6 (1,5 – 3,8)	0,38
Osijek (34/43/21)	2,4 (2,0 – 2,9)	2,4 (1,9 – 3,1)	2,1 (1,4 – 2,9)	0,20
Muškarci (20/35/13)	2,2 (1,9 – 2,9)	2,5 (1,9 – 3,1)	2,1 (1,6 – 2,9)	0,55
Žene (14/8/8)	2,5 (2,2 – 2,8)	2,2 (1,9 – 2,8)	1,7 (1,3 – 2,8)	0,15
Zadar (29/49/21)	2,8 (2,2 – 3,7)	2,3 (1,6 – 2,9)	3,8 (2,3 – 4,9)	<b>0,01<sup>†</sup></b>
Muškarci (20/32/8)	3,0 (2,2 – 3,6)	2,3 (1,7 – 2,9)	4,5 (3,4 – 5,6)	<b>0,02<sup>‡</sup></b>
Žene (9/17/13)	2,6 (2,2 – 4,1)	2,4 (1,5 – 3,4)	3,3 (2,2 – 4,3)	0,39

\*Kruskal Wallis test (post hoc Conover); <sup>†</sup>na razini P<0,05 bitno su više vrijednosti nepušača u odnosu na bivše pušače; <sup>‡</sup> na razini P<0,05 bitno su više vrijednosti nepušača u odnosu na aktivne i bivše pušače

Tablica 5.27. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača u skupini bolesnika s KOPB-om

BOLESNICI S KOPB-om	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija			P*
	Aktivni	Bivši	Nepušači	
Svi (49/77/7)	2,6 (2,1 – 3,2)	2,4 (1,8 – 3,0)	2,6 (2,2 – 3,6)	0,20
Muškarci (33/57/3)	2,5 (2,0 – 3,2)	2,4 (1,8 – 3,0)	3,1 (2,4 – 3,6)	0,39
Žene (16/20/4)	2,7 (2,3 – 3,1)	2,3 (1,7 – 2,8)	2,5 (2,1 – 3,7)	0,27
Osijek (22/40/4)	2,6 (2,0 – 2,9)	2,4 (1,9 – 3,1)	2,4 (2,1 – 3,2)	0,99
Muškarci (14/32/2)	2,1 (2,0 – 2,9)	2,6 (1,9 – 3,1)	2,9 (2,2 – 3,7)	0,52
Žene (8/8/2)	2,8 (2,3 – 3,0)	2,2 (1,9 – 2,8)	2,3 (1,9 – 2,6)	0,35
Zadar (27/37/3)	2,6 (2,2 – 3,6)	2,3 (1,6 – 2,7)	3,1 (2,5 – 4,3)	0,09
Muškarci (19/25/1)	2,8 (2,2 – 3,6)	2,2 (1,7 – 2,7)	3,1 (3,1 – 3,1)	0,21
Žene (8/12/2)	2,5 (2,2 – 3,5)	2,4 (1,4 – 2,8)	3,5 (2,3 – 4,7)	0,58

\*Kruskal Wallis test (post hoc Conover)

Tablica 5.28. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača u skupini kontrolnih ispitanika

KONTROLNI ISPITANICI	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija			P*
	Aktivni	Bivši	Nepušači	
Svi (14/15/35)	2,4 (2,0 – 3,4)	2,2 (1,5 – 4,2)	2,8 (1,5 – 3,9)	0,98
Muškarci (7/10/18)	2,3 (1,9 – 3,4)	2,2 (1,5 – 4,2)	2,7 (1,7 – 4,1)	0,94
Žene (7/5/17)	2,5 (2,1 – 3,7)	2,9 (1,7 – 4,7)	2,8 (1,4 – 3,8)	0,91
Osijek (12/3/17)	2,3 (2,0 – 3,0)	1,9 (1,5 – 3,03)	1,9 (1,4 – 2,9)	0,20
Muškarci (6/3/11)	2,3 (1,9 – 3,4)	1,9 (1,5 – 3,0)	2,1 (1,5 – 2,8)	0,56
Žene (6/0/6)	2,4 (2 – 2,5)	-	1,5 (1,2 – 3,0)	0,20
Zadar (2/12/18)	3,7 (3,2 – 4,1)	2,4 (1,6 – 4,9)	3,8 (2,3 – 4,9)	0,74
Muškarci (1/7/7)	3,2 (3,2 – 3,2)	2,4 (1,6 – 4,9)	4,9 (3,8 – 5,7)	0,29
Žene (1/5/11)	4,1 (4,1 – 4,1)	2,9 (1,7 – 4,7)	3,3 (1,9 – 4,3)	0,83

\*Kruskal Wallis test (post hoc Conover)

U tablicama 5.29, 5.30. i 5.31. prikazane su razlike između pojedinih podskupina ispitanika u Osijeku i Zadru obzirom na pušačke navike i spol. Nađena je statistički bitna razlika u DNA metilaciji između kontrolnih ispitanika u Osijeku i Zadru (Mann Whitney U test;  $P = 0,001$ ), te nepušača u uzorku svih ispitanika ( $P \leq 0,001$ ), uzorku svih muškaraca ( $P = 0,003$ ) i uzorku svih žena ( $P = 0,04$ ).

Tablica 5.29. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između ispitanika u Osijeku i Zadru u uzorku svih ispitanika

Svi ispitanici	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	$P^*$
	Osijek	Zadar			
Svi (n = 98/99)	2,40 (2,0 – 3,0)	2,40 (1,90 – 3,20)	0	-0,3 do 0,3	0,97
Aktivni pušači (34/29)	2,4 (2 - 2,9)	2,8 (2,2 - 3,7)	0,3	-0,1 do 0,8	0,12
Bivši pušači (43/49)	2,4 (1,9 - 3,1)	2,3 (1,5 - 3)	-0,1	-0,6 do 0,3	0,49
Nepušači (21/21)	2,1 (1,4 - 3)	3,8 (2,3 - 4,9)	1,6	0,7 do 2,4	<b>&lt;0,001</b>
Muškarci (68/60)					
Aktivni pušači (20/20)	2,2 (1,9 - 2,9)	3 (2,2 - 3,6)	0,4	-0,2 do 1,1	0,12
Bivši pušači (35/32)	2,5 (1,9 - 3,1)	2,3 (1,6 - 3)	-0,2	-0,7 do 0,3	0,39
Nepušači (13/8)	2,1 (1,6 - 3)	4,5 (3,3 - 5,7)	2,3	1,0 do 3,5	<b>0,003</b>
Žene (30/39)					
Aktivni pušači (14/9)	2,5 (2,2 - 2,9)	2,6 (2,2 - 4,1)	0,1	-0,4 do 1,3	0,61
Bivši pušači (8/17)	2,2 (1,9 - 2,9)	2,4 (1,4 - 3,7)	0,1	-0,9 do 1,3	0,78
Nepušači (8/13)	1,7 (1,3 - 2,9)	3,3 (2 - 4,4)	1,3	0 do 2,7	<b>0,04</b>

\*Mann Whitney U test



Tablica 5.30. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između ispitanika u Osijeku i Zadru u skupini bolesnika s KOPB-om

BOLESNICI (KOPB)	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Osijek	Zadar			
Svi (n = 66/67))	2,4 (2 – 3)	2,4 (1,9 – 3,2)	0	-0,3 do 0,3	0,97
Aktivni pušači (22/27)	2,6 (2 - 2,9)	2,6 (2,2 - 3,6)	0,3	-0,3 do 0,8	0,28
Bivši pušači (40/37)	2,4 (1,9 - 3,1)	2,3 (1,6 - 2,8)	-0,3	-0,7 do 0,2	0,20
Nepušači (4/3)	2,4 (2 - 3,4)	3,1 (2,3 - 4,7)	0,7	-	0,40
Muškarci (48/45)					
Aktivni pušači (14/19)	2,1 (2 - 2,9)	2,8 (2,2 - 3,6)	0,4	-0,3 do 1,1	0,17
Bivši pušači (32/25)	2,6 (1,9 - 3,1)	2,2 (1,7 - 2,8)	-0,3	-0,8 do 0,2	0,17
Nepušači (2/1)	3 (1,7 - 3,1)	3,1	-	-	-
Žene (18/22)					
Aktivni pušači (8/8)	2,8 (2,3 - 3,1)	2,5 (2,1 - 3,8)	-0,2	-0,8 do 1,3	0,87
Bivši pušači (8/12)	2,2 (1,9 - 2,9)	2,4 (1,4 - 2,8)	0,1	-1 do 0,9	0,88
Nepušači (2/2)	2,3 (1,4 - 2,5)	3,5 (1,7 - 3,9)	1,3	-	0,67

\*Mann Whitney U test

Tablica 5.31. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između ispitanika u Osijeku i Zadru u skupini kontrolnih ispitanika

KONTROLNI ISPITANICI	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Osijek	Zadar			
Svi (n = 32/32)	2,1 (1,5 – 2,9)	3,8 (1,8 – 4,9)	1,3	0,5 – 2,1	<b>0,001</b>
Aktivni pušači (12/2)	2,3 (2 - 3,2)	3,7 (2,4 - 3,4)	1,2	-	0,14
Bivši pušači (3/12)	1,9 (1,3 - 3,4)	2,4 (1,5 - 5,1)	0,5	-	0,35
Nepušači (17/18)	1,9 (1,4 - 3)	3,8 (2,2 - 5)	1,9	0,7 do 2,8	<b>0,001</b>
Muškarci (20/15)					
Aktivni pušači (6/1)	2,3 (1,8 - 3,4)	3,2	-	-	-
Bivši pušači (3/7)	1,9 (1,3 - 3,4)	2,4 (1,5 - 5,1)	0,5	-	0,42
Nepušači (11/7)	2,1 (1,4 - 2,9)	4,9 (3,7 - 5,8)	2,7	1,2 do 3,7	<b>0,005</b>
Žene (12/17)					
Aktivni pušači (6/1)	2,4 (2 - 2,9)	4,1	-	-	-
Bivši pušači (0/5)	-	2,9 (1,5 - 5,1)	-	-	-
Nepušači (6/11)	1,5 (1,1 - 3)	3,3 (1,7 - 4,3)	1,3	0 do 3	0,05

\*Mann Whitney U test

U tablicama 5.32, 5.33 i 5.34. analizirana je razlika u DNA metilaciji između kontrolnih ispitanika i bolesnika s KOPB-om te su uočene razlike između ispitanika s obzirom na zemljopisno područje. Uočeno je da su kontrolni ispitanici u Osijeku imali niži medijan globalne DNA metilacije nego bolesnici s KOPB-om i u skupini muškaraca i u skupini žena, ali razlika nije bila statistički bitna ni u jednoj od te dvije skupine. U ispitanika u Zadru kontrolni ispitanici imali su viši medijan globalne DNA metilacije nego bolesnici s KOPB-om i u skupini muškaraca i u skupini žena, a razlika je bila statistički bitna samo u skupini muškaraca (Mann Whitney U test,  $P=0,03$ )

Nije nađena statistički bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika u skupini aktivnih pušača, ni u skupini bivših pušača kao niti u skupini nepušača, kako u Osijeku tako i u Zadru.

Tablica 5.32. Razlike u gDNA metilaciji između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika u uzorku svih ispitanika

Svi ispitanici	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Kontrole	Bolesnici			
Svi (n = 64/133)	2,45 (1,70 - 3,85)	2,40 (1,98 - 3,10)	-0,10	-0,5 do 0,2	0,49
Aktivni pušači (14/49)	2,4 (2 - 3,4)	2,6 (2,1 - 3,2)	0	-0,5 do 0,5	0,94
Bivši pušači (15/77)	2,2 (1,5 - 4,4)	2,4 (1,8 - 3)	-0,2	-1,3 do 0,05	0,59
Nepušači (35/7)	2,8 (1,5 - 4)	2,6 (2,2 - 3,7)	0,2	-1,1 do 1,2	0,67
Muškarci (35/93)					
Aktivni pušači (7/33)	2,3 (1,9 - 3,4)	2,5 (2 - 3,2)	0	-0,7 do 0,7	0,93
Bivši pušači (10/57)	2,2 (1,5 - 4,4)	2,4 (1,8 - 3)	-0,1	-1,3 do 0,7	0,83
Nepušači (18/3)	2,7 (1,7 - 4,3)	3,1	0,25	-	0,61
Žene (29/40)					
Aktivni pušači (7/16)	2,5 (2 - 4,1)	2,7 (2,2 - 3,1)	0,1	-0,7 do 0,8	0,69
Bivši pušači (5/20)	2,9 (1,5 - 5,1)	2,3 (1,6 - 2,8)	-0,6	-	0,56
Nepušači (17/4)	2,8 (1,4 - 3,9)	2,5 (2 - 4,2)	0,4	-	0,77

\*Mann Whitney U test

Tablica 5.33. Razlike u g DNA metilaciji između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika u skupini ispitanika u Osijeku

Osijek	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Kontrole	Bolesnici			
Svi (n = 32/66)	2,1 (1,5-2,9)	2,4 (2 - 3)	0,3	-0,1 do 0,7	0,09
Aktivni pušači (12/22)	2,3 (2,0 – 3,0)	2,6 (2,0 – 2,9)	0,1	-0,5 do 0,6	0,84
Bivši pušači (3/40)	1,9 (1,5 – 3,03)	2,4 (1,9 – 3,1)	0,4	-	0,57
Nepušači (17/4)	1,9 (1,4 – 2,9)	2,4 (2,1 – 3,2)	0,7	-	0,19
Muškarci (20/48)	2,1 (1,6 – 2,9)	2,5 (2,0 – 3,0)	0,3	-0,2 do 0,8	0,19
Aktivni pušači (6/14)	2,3 (1,8 - 3,4)	2,6 (1,9 - 3,1)	-0,1	-1,1 do 0,6	0,80
Bivši pušači (3/32)	1,9 (1,3 - 3,4)	3 (1,7 - 3,1)	0,4	-	0,58
Nepušači (11/2)	2,1 (1,4 - 2,9)	2,8 (2,3 - 3,1)	0,8	-	0,17
Žene (12/18)	2,2 (2,0 – 2,8)	2,4 (2,0 – 2,8)	0,3	-0,3 o 1,0	0,33
Aktivni pušači (6/8)	2,4 (2 - 2,9)	2,8 (1,9 - 2,9)	0,3	-0,7 do 0,8	0,36
Bivši pušači (0/8)	-	2,3 (1,4 - 2,5)	-	-	-
Nepušači (6/2)	1,5 (1,2 - 3)	2,3	0,6	-	0,64

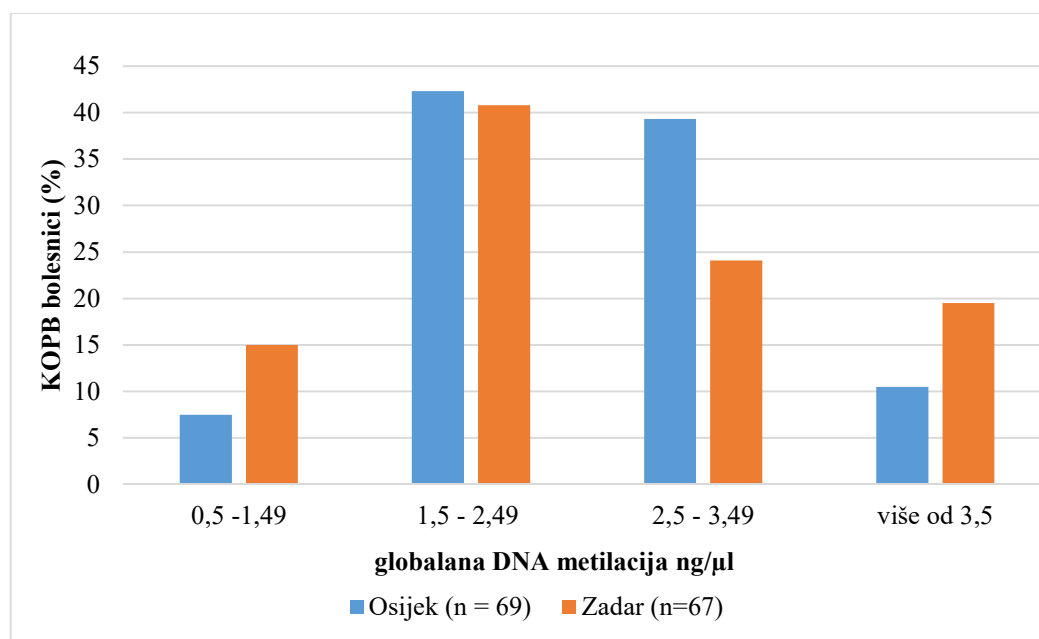
\*Mann Whitney U test

Tablica 5.34. Razlike u g DNA metilaciji između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika u skupini ispitanika u Zadru

Zadar	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Kontrole	Bolesnici			
Svi (n = 32/67)	3,8 (1,8 – 4,9)	2,4 (1,9 – 3,2)	-0,9	-1,7 do -0,2	<b>0,02</b>
Aktivni pušači (2/27)	3,7 (3,2 – 4,1)	2,6 (2,2 – 3,6)	-0,9	-1,1 do 0,5	0,20
Bivši pušači (12/37)	2,4 (1,6 – 4,9)	2,3 (1,6 – 2,7)	-0,5	-2,1 do 0,5	0,39
Nepušači (18/3)	3,8 (2,3 – 4,9)	3,1 (2,5 – 4,3)	-0,3	-0,5 do 0,4	0,67
Muškarci (15/45)	4,1 (1,9 – 5,3)	2,3 (1,9 – 3,2)	-1,4	-2,4 do -0,1	<b>0,03</b>
Aktivni pušači (1/19)	3,2	2,8 (2,2 – 3,6)	-	-	-
Bivši pušači (7/25)	2,4 (1,6 – 4,9)	2,2 (1,7 – 2,7)	-0,5	-2,6 do 0,7	0,55
Nepušači (7/1)	4,9 (3,8 – 5,7)	-	-	-	-
Žene (17/22)	3,4 (1,8 – 4,2)	2,4 (2,0 – 2,9)	-0,6	-1,69 do 0,6	0,34
Aktivni pušači (1/8)	4,1	2,5 (2,2 – 3,5)	-	-	-
Bivši pušači (5/12)	2,9 (1,7 – 4,7)	2,4 (1,4 – 2,8)	-0,6	-	0,54
Nepušači (11/2)	3,3 (1,9 – 4,3)	3,5	0,5	-	0,79

\*Mann Whitney U test

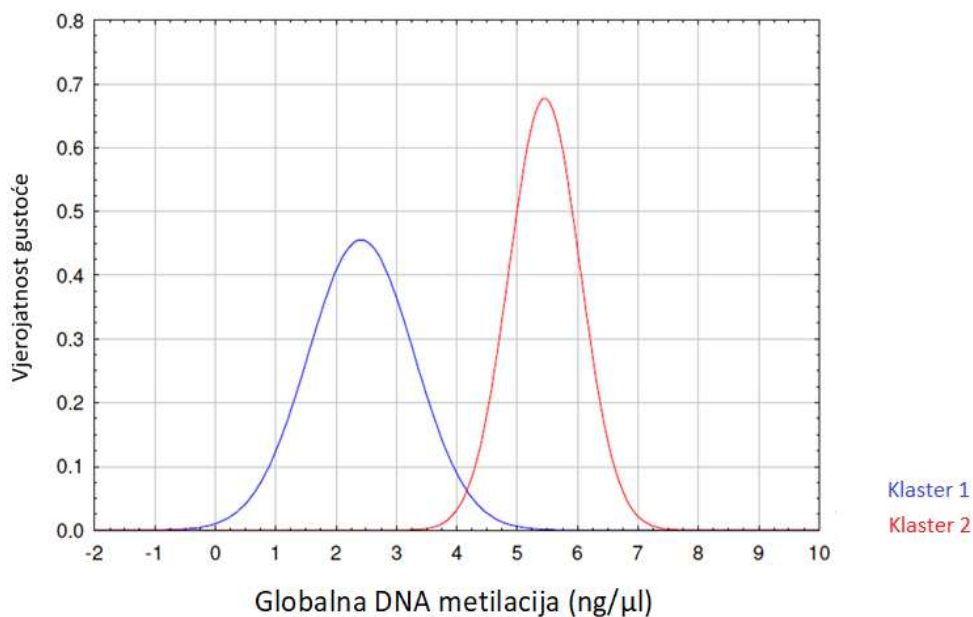
Oko 40 % bolesnika kako u Osijeku tako i u Zadru imali su vrijednosti globalne DNA metilacije između 1,5 i 2,49 ng/ $\mu$ , a gotovo jednako toliko bolesnika u Osijeku imalo je vrijednosti globalne DNA metilacije između 2,5 i 3,49 ng/ $\mu$ l. Udio onih s nižim i višim vrijednostima je manji, a među bolesnicima u Osijeku i nema onih koji imaju vrijednosti veće od 4,5 ng/ $\mu$ l za razliku od bolesnika u Zadru gdje je 10 % bolesnika ima vrijednosti veće od 4.5 ng/ $\mu$ l. Među bolesnicima u Zadru nešto je veći udio onih koji su imali vrijednosti globalne DNA metilacije ispod 1,5 i iznad 3,5 ng/ $\mu$ l. Među bolesnicima u Osijeku nema onih koji su imali vrijednosti globalne DNA metilacije iznad 4,5 ng/ $\mu$ l (Slika 5.7).



Slika 5.7. Raspodjela vrijednosti globalne DNA metilacije u bolesnika u Osijeku i Zadru

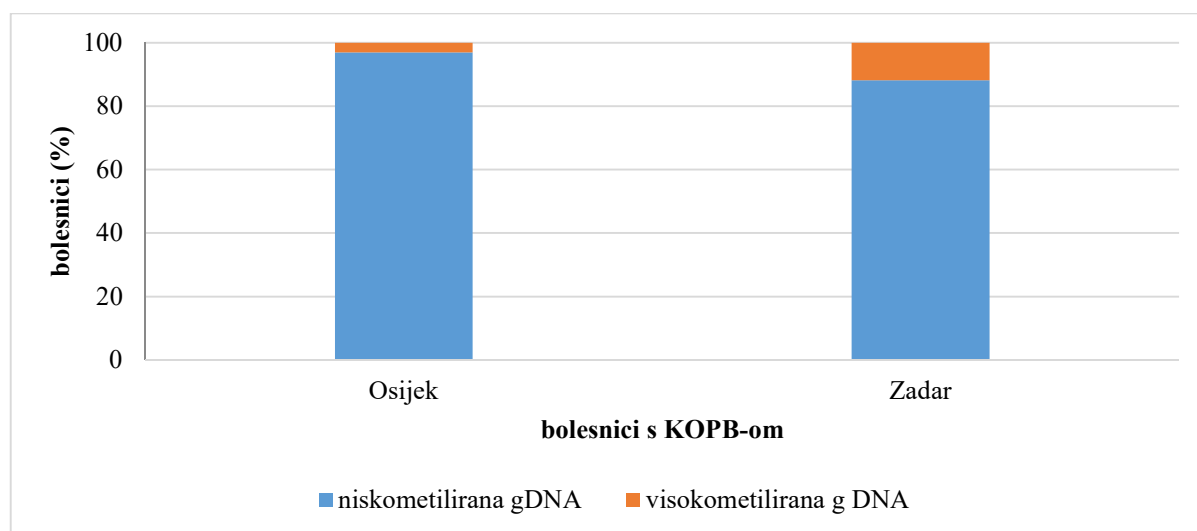
### 5.2.2. Klasteri bolesnika s niskometiliranom i visokometiliranom globalnom DNA metilacijom

Kako uobičajenim statističkim analizama nije nađena razlika u globalnoj DNA metilaciji između ispitivanih skupina učinjena je analiza klastera EM (*Expectation Maximisation Cluster Analyses*). Nađeno je da se vrijednosti globalne DNA metilacije svih ispitanika mogu razvrstati u dva osnovna klastera, klaster 1 u kojem je veći broj uzoraka (169) s niskometiliranom globalnom DNA i klaster 2 s visokometiliranom globalnom DNA metilacijom u kojem je manji broj uzoraka (28) (Slika 5.8).



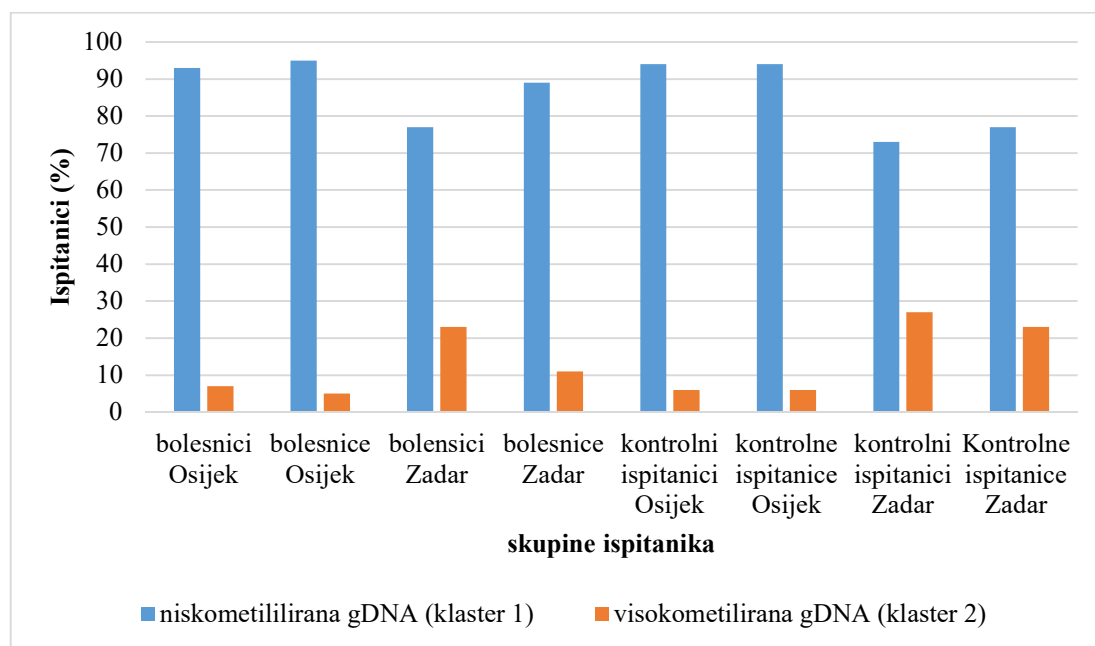
Slika 5.8. Raspodjela vrijednosti globalne DNA metilacije u dva klastera: klaster 1 (niskometilirana globalna DNA) i klaster 2 (visokometilirana globalna DNA) u cjelovitom uzorku ispitanika (n=197)

Klaster 1 dominantno je bio zastupljen u svih bolesnika, kako u Osijeku tako i u Zadru, te u kontrolnih ispitanika u Osijeku. Međutim, raspodjela bolesnika koji imaju visokometiliranu ili niskometiliranu globalnu DNA u Osijeku i Zadru se bitno razlikovala. Među bolesnicima u Zadru bio je veći udio bolesnika s visokometiliranom DNA koji su pripadali klasteru 2 (Slika 5.9).



Slika 5.9. Udio niskometiliranih (klaster 1) i visokometiliranih (klaster 2) uzoraka globalne DNA metilacije u bolesnika u Osijeku i Zadru

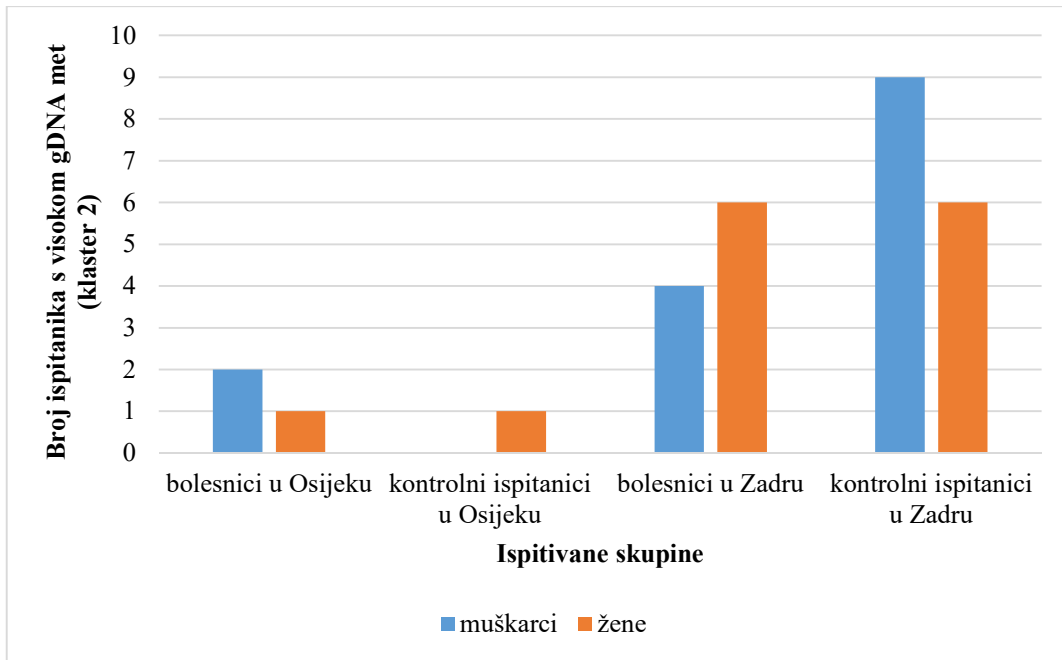
Raspodjela niskometiliranih i visokometiliranih uzoraka globalne DNA metilacije (klastera 1 i klastera 2) unutar ispitivanih skupina pokazala je da je udio visokometiliranih uzoraka (klaster 2) bitno manje zastupljen u svim ispitanim skupinama. Visokometilirana DNA odnosno klaster 2, bio je bitno zastupljeniji u svim ispitivanim skupinama u Zadru nego u Osijeku. Među muškarcima s KOPB-om, te kontrolnim ispitanicima oba spola u Zadru udio ispitanika koji su pripadali klasteru 2 bio je veći od 20 % (Slika 5.10).



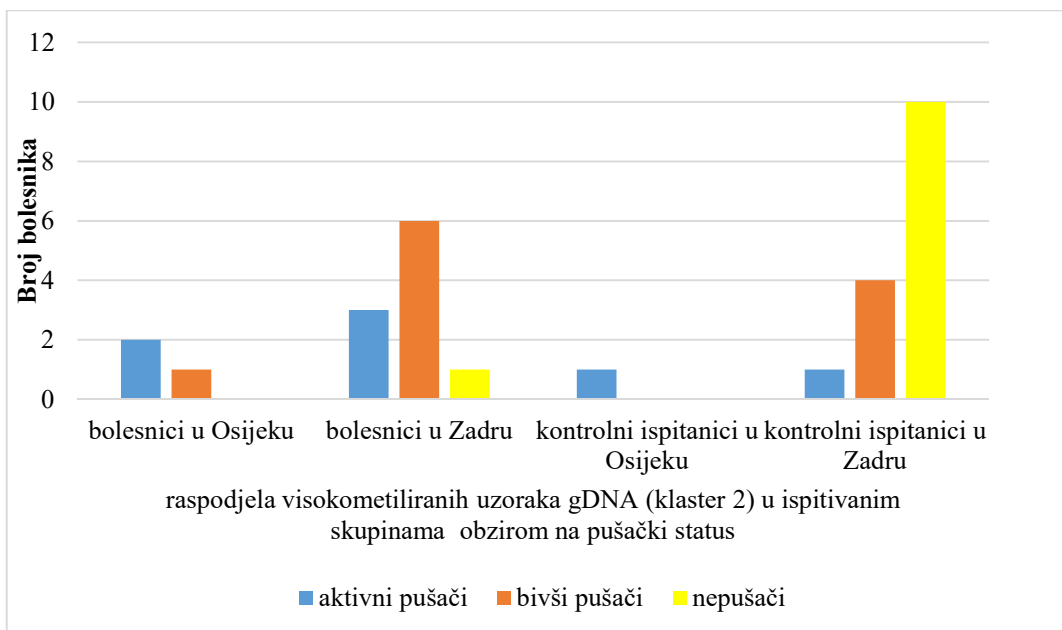
Slika 5.10. Raspodjela klastera 1 i klastera 2 unutar ispitivanih podskupina bolesnika i kontrolnih ispitanika prema spolu.

Među ispitanicima u Zadru u odnosu na ispitanike u Osijeku, kako u skupini bolesnika s KOPB-om tako i u skupini kontrolnih ispitanika bilo je više onih s višim vrijednostima globalne DNA metilacije koji pripadaju u klaster 2. Među bolesnicima u Osijeku bilo ih je ukupno troje, a među kontrolnim ispitanicima samo jedna žena, dok je u Zadru u objema skupinama ukupni broj bio mnogo veći, muškaraca i žena zajedno među bolesnicima 10, a među kontrolnim ispitanicima čak 15 (Slika 5.11).

Visokometilirana globalna DNA bila je najzastupljenija u nepušača kontrolnih ispitanika u Zadru, a potom u bivših pušača bolesnika s KOPB-om. U Osijeku je bilo vrlo malo ispitanika s visokometiliranom globalnom DNA, kako među bolesnicima tako i među kontrolnim ispitanicima (Slika 5.12).



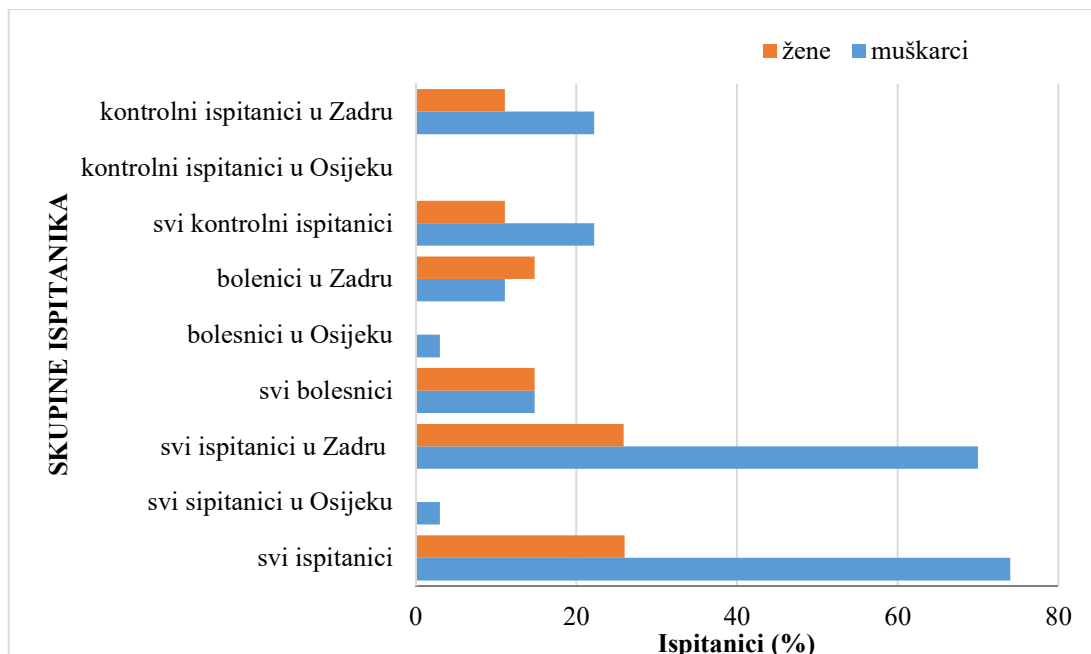
Slika 5.11. Raspodjela ispitanika s visokim vrijednostima globalne DNA metilacije (klaster 1) u ispitivanim podskupinama s obzirom na spol



Slika 5.12. Raspodjela ispitanika s visokometiliranim vrijednostima globalne DNA (klaster 2) prema ispitivanim skupinama s obzirom na pušački status

Klaster visokometilirane globalne DNA, klaster 2, bio je dominantno zastupljen u ispitanika u Zadru kako među bolesnicima, tako i među kontrolnim ispitanicima. Među

ispitanicima u Osijeku bilo je vrlo malo pripadnika klastera 2, a niti jedan pripadnik nije bio među kontrolnim ispitanicima oba spola kao niti među ženama, bolesnicama s KOPB-om (Slika 5.13).



Slika 5.13. Zastupljenost klastera 2 u ispitivanim podskupinama obzirom na spol

Mann Whitneyevim U testom nađeno je da su se bolesnici s KOPB-om koji su pripadali klasteru 1 i bolesnici koji su pripadali klasteru 2 statistički bitno razlikovali s obzirom na pušenje ( $P = 0,03$ ), broj pušačkih godina ( $P = 0,002$ ), kašlja ( $P = 0,001$ ), iskašljavanja ( $P = 0,01$ ) i zaduhu u naporu ( $P = 0,007$ ).

### 5.2.3. Povezanost globalne DNA metilacije i obilježja bolesnika s KOPB-om

Spearmanovim koeficijentom korelacije nije nađena povezanost DNA metilacije sa starosnom dobi, dobi kod postavljanja dijagnoze, proteklom vremenu od prestanka pušenja, indeksom tjelesne mase i pušačkim godinama. Nađena je statistički bitna negativna povezanost s dobi početka pušenja za bolesnike u Osijeku ( $Rho = -0,260$ ;  $P = 0,04$ ) (Tablica 5.35).



Tablica 5.35. Povezanost DNA metilacije sa starosnom dobi bolesnika, dobi postavljanja dijagnoze, dobi početka pušenja, razdobljem od prestanka pušenja za bivše pušače, pušačkim godinama i indeksom tjelesne mase

	Spearmanov koeficijent korel. Rho (P vrijednost) gDNA metilacije u bolesnika s KOPB		
	Svi bolesnici	Osijek	Zadar
Starosna dob ispitanika s KOPB	0,073 (0,40)	0,045 (0,72)	0,082 (0,51)
Dob kod postavljanja dijagnoze	0,135 (0,12)	0,092 (0,46)	0,156 (0,21)
Dob u kojoj su počeli pušiti	-0,074 (0,41)	<b>-0,260 (0,04)</b>	0,106 (0,41)
Godine od prestanka pušenja (bivši)	0,306 (0,09)	0,125 (0,65)	0,434 (0,09)
PY	-0,130 (0,14)	-0,103 (0,43)	-0,169 (0,17)
ITM	0,068 (0,44)	-0,086 (0,49)	0,198 (0,11)

Nije nađena statistički bitna razlika u DNA metilaciji s obzirom na profesionalnu izloženost kao i izloženost biološkim gorivima kako u uzorku svih bolesnika, tako i u skupini bolesnika u Osijeku i skupini bolesnika u Zadru. Uočena je razlika u globalnoj DNA metilaciji s obzirom na profesionalnu izloženost kada su gledani svi bolesnici zajedno, ali nije dostigla statističku bitnost (Tablica 5.36).

Tablica 5.36. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na profesionalnu izloženost i izloženost biološkim gorivima

	Medijan (interkvartilni raspon) DNA metilacije prema izloženosti		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Nema	Ima			
Svi bolesnici					
Profesionalno	2,3 (1,9 – 2,9)	2,7 (2,2 – 3,2)	0,3	0 do 0,6	0,06
Biološka goriva	2,4 (1,9 – 2,9)	2,4 (2,0 – 3,2)	0,1	-0,2 do 0,4	0,42
Osijek					
Profesionalno	2,1 (1,9 – 2,9)	2,8 (2,2 – 3,1)	0,3	-0,1 do 0,7	0,11
Biološka goriva	2,4 (1,9 – 2,9)	2,4 (2,0 – 3,1)	0,1	-0,3 do 0,4	0,68
Zadar					
Profesionalno	2,3 (1,9 – 3,2)	2,4 (2,1 – 3,5)	0,1	-0,6 do 0,7	0,64
Biološka goriva	2,4 (1,9 – 2,9)	2,4 (1,9 – 3,2)	0,2	-0,3 do 0,8	0,41

\*Mann Whitney U test

Globalna DNA metilacija bila je statistički bitno niža u bolesnika koji kašlju u odnosu na bolesnike koji ne kašlju (Mann Whitney U test, P = 0,04). Bolesnici koji iskašljavaju i koji imaju zaduhu u naporu također imaju niže vrijednosti globalne DNA metilacije, ali razlika nije bila statistički bitna (Tablica 5.37).

Tablica 5.37. Razlike u globalnoj DNA metilaciji obzirom na prisutnost simptoma KOPB-a

Svi ispitanici s KOPB	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacije obzirom prisutnost simptome		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Ne	Da			
	Kašalj	2,6 (2,1 – 3,5)			
Iskašljavanje	2,5 (2,0 – 3,5)	2,3 (1,9 – 2,9)	-0,3	-0,6 do 0	0,08
Dispneja M	2,4 (2,0 – 3,0)	2,4 (1,9 – 3,4)	0,1	-0,3 do 0,5	0,71
Dispneja N	2,6 (2,1 – 3,6)	2,4 (1,9 – 3,0)	-0,3	-0,9 do 0,3	0,36

\*Mann Whitney U test

Nije nađena bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji između bolesnika s obzirom na prisutnost i zastupljenosti emfizema, bronhiektazija i fibroze prema opisu nalaza CT-a toraksa (Tablica 5.38).

Tablica 5.38. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na opis nalaza CT-a toraksa

	Medijan (interkvartilni raspon) DNA metilacije prema nalazu CT toraksa			P*
	Nema	Malo izražen	Mnogo izražen	
	Ukupno s KOPB			
Emfizem	2,7 (2,1 - 3,3)	2,2 (1,9 - 3,1)	2,3 (1,9 - 2,9)	0,88
Bronhiektazije	2,4 (1,9 - 3)	2,2 (1,8 - 3,3)	2,8 (2,2 - 4,2)	0,21
Fibroza	2,5 (1,9 - 3,2)	2,4 (2,0 - 3,1)	2,3 (1,8 - 3)	0,60
Slavonija				
Emfizem	2,55 (2,08 - 3,05)	2,4 (2,1 - 3,1)	2,4 (1,9 - 2,9)	0,48
Bronhiektazije	2,45 (2,03 - 3)	2 (1,75 - 3)	2,55 (1,5 - 2,83)	0,56
Fibroza	2,7 (2,1 - 3,2)	2,2 (1,93 - 2,8)	2,6 (2,1 - 3)	0,46
Dalmacija				
Emfizem	2,9 (2,3 - 4,2)	1,9 (1,3 - 2)	2,3 (1,8 - 3,0)	0,12
Bronhiektazije	2,3 (1,83 - 3,15)	2,8 (1,9 - 3,5)	2,8 (2,33 - 5,08)	0,68
Fibroza	2,4 (1,75 - 3,13)	2,6 (2,3 - 3,45)	2,2 (1,18 - 4,73)	0,17

\*Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Nije nađena statistički bitna povezanost globalne DNA metilacije s rezultatima u mMRC skali i CAT upitniku kao ni s brojem egzacerbacija kako u uzorku svih bolesnika, tako i skupinama bolesnika u Osijeku i Zadru (Tablica 5.39).

Tablica 5.39. Povezanost globalne DNA metilacije sa simptomima (mMRC skala, CAT upitnik) i brojem egzacerbacija

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost) gDNA metilacija		
	Svi bolesnici	Osijek	Zadar
mMRC	0,016 (0,85)	0,204 (0,10)	-0,122 (0,32)
CAT	-0,052 (0,55)	0,005 (0,97)	-0,079 (0,53)
Broj egzacerbacija	-0,070 (0,43)	0,094 (0,45)	-0,182 (0,14)

Nađena je statistički bitna negativna povezanost globalne DNA metilacije s vrijednostima FeNO testa (Rho = -0,255, P = 0,04) i eozinofila u perifernoj krvi (Rho = 0,319; P = 0,02) u bolesnika u Osijeku, dok u bolesnika u Zadru ova povezanost nije bila statistički bitna (Tablica 5.40).

Tablica 5.40. Povezanost DNA metilacije s pokazateljima plućne funkcije

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost) DNA metilacije u skupini ispitanika s KOPB		
	Svi bolesnici (N=136)	Osijek (N=69)	Zadar (N=67)
FVC (%)	-0,079 (0,37)	0,018 (0,89)	-0,159 (0,20)
FEV <sub>1</sub> (%)	0,053 (0,54)	0,133 (0,29)	0,001 (0,99)
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	0,079 (0,37)	0,023 (0,86)	0,145 (0,24)
FeNO (ppb)	-0,085 (0,34)	<b>-0,255 (0,04)</b>	0,033 (0,79)
DLCO (%)	0,119 (0,18)	0,135 (0,31)	0,101 (0,42)
KCO (%)	0,160 (0,08)	0,129 (0,34)	0,190 (0,14)
pO <sub>2</sub> (kPa)	-0,028 (0,77)	0,032 (0,81)	-0,092 (0,53)
pCO <sub>2</sub> (kPa)	0,049 (0,61)	0,016 (0,90)	0,100 (0,49)
SO <sub>2</sub> (%)	-0,035 (0,71)	0,063 (0,62)	-0,160 (0,27)
HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	-0,001 (0,99)	-0,058 (0,66)	0,040 (0,78)
IgE (IU/L)	-0,136 (0,14)	-0,184 (0,18)	-0,110 (0,38)
Eo (%)	-0,129 (0,16)	<b>-0,319 (0,02)</b>	-0,012 (0,93)

FVC (forsirani vitalni kapacitet); FEV<sub>1</sub> (forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi); FeNO (frakcija izahnutog dušikovog oksida); DLCO (difuzijski kapacitet za ugljični monoksid); PaO<sub>2</sub> (parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi); pCO<sub>2</sub> (parcijalni tlak ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi); SO<sub>2</sub> (zasićenost kisikom); HCO<sub>3</sub> (bikarbonati); IgE (Imunoglobulin E); Eo (eozinofili u perifernoj krvi)

Nije nađena razlika u globalnoj DNA metilaciji između bolesnika koji su pripadali različitim stupnjevima težine prema GOLD klasifikaciji od I do IV (Tablica 5.41), tako ni između bolesnika koji su pripadali različitim skupinama težine simptoma i rizika od A do D (Tablica 5.42).

Tablica 5.41. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na GOLD klasifikaciju

	Medijan (interkvartilni raspon) DNA metilacije				P*
	GOLD I	GOLD II	GOLD III	GOLD IV	
Svi ispitanici	2,4 (2,1 – 3,1)	2,6 (2,1 – 3,2)	2,2 (1,8 – 2,9)	2,5 (2,0 – 2,8)	0,43
Osijek	2,4 (2,1 – 3,1)	2,7 (2,1 – 3,1)	2,0 (1,7 – 2,8)	2,8 (2,3 – 2,9)	0,27
Zadar	3,0 (2,3 – 3,2)	2,58 (1,9 – 3,5)	2,3 (1,8 – 3,1)	2,4 (1,6 – 2,5)	0,88

\*Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Tablica 5.42. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na skupine rizika

	Medijan (interkvartilni raspon) DNA metilacije prema skupini rizika				P*
	A	B	C	D	
Svi ispitanici	2,6 (1,9 – 3,2)	2,4 (2,0 – 3,1)	3,9 (2,4 – 5,5)	2,3 (1,8 – 2,9)	0,61
Osijek	2,6 (1,9 – 3,3)	2,4 (2,0 – 2,8)	2,4 (2,4 – 2,4)	2,9 (2,0 – 3,2)	0,71
Zadar	2,6 (1,7 – 3,2)	2,5 (2,0 – 3,5)	5,5 (5,5 -5,5)	2,3 (1,7 – 2,4)	0,15

\*Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistički bitna razlika u DNA metilaciji s obzirom na prisutnost komorbiditeta nađena je samo za depresiju u skupini ispitanika u Osijeku. Medijan globalne DNA u bolesnika s KOPB-om i depresijom bio je statistički bitno viši u odnosu na bolesnike s KOPB-om koji nemaju depresiju (2,8 vs 2,2) (Mann Whitney U test,  $P = 0,04$ ). Uočena je također razlika u globalnoj DNA metilaciji za kardiovaskularne bolesti u bolesnika u Osijeku, ali nije bila statistički bitna ( $P = 0,06$ ). U pogledu svih drugih komorbiditeta nije nađena razlika u globalnoj DNA metilaciji (Tablica 5.43).

Tablica 5.43. Razlike u DNA metilaciji s obzirom na prisutnost komorbiditeta

BOLESNICI	Medijan (interkvartilni raspon) gDNA metilacija prisutnost komorbiditeta		Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	Nema	Ima			
	<b>Svi</b>				
n = 136					
Kardiovaskularni	2,3 (1,9 – 2,9)	2,4 (2,0 – 3,1)	0,1	-0,2 do 0,4	0,59
Dijabetes	2,4 (1,9 – 3,0)	2,7 (2,4 – 3,2)	0,3	-0,1 do 0,8	0,14
Depresija	2,3 (1,9 – 3,0)	2,6 (2,2 – 3,2)	0,2	-0,1 do 0,6	0,18
Gastritis	2,4 (1,9 – 3,1)	2,5 (2,1 – 3,1)	0,1	-0,3 do 0,4	0,66
Astma	2,4 (2,0 – 3,1)	2,4 (1,9 – 3,0)	-0,1	-0,4 do 0,3	0,73
<b>Osijek</b>					
n = 66					
Kardiovaskularni	2,1 (1,9 – 2,7)	2,6 (2,1 – 3,1)	0,1	0 do 0,9	0,06
Dijabetes	2,4 (2,0 – 2,9)	2,9 (2,4 – 3,3)	0,4	-0,2 do 0,9	0,17
Depresija	2,2 (1,9 – 2,9)	2,8 (2,4 – 3,2)	0,4	0 do 0,8	<b>0,04</b>
Gastritis	2,4 (2,0 – 2,9)	2,7 (2,1 – 3,0)	0,1	-0,3 do 0,6	0,46
Astma	2,6 (2,1 – 3,0)	2,2 (1,9 – 2,9)	-0,2	-0,6 do 0,2	0,35
<b>Zadar</b>					
n = 67					
Kardiovaskularni	2,4 (2,1 – 2,9)	2,3 (1,6 – 3,4)	-0,2	-0,8 do 0,4	0,48
Dijabetes	2,3 (1,9 – 3,2)	2,5 (2,3 – 3,2)	0,2	-0,6 do 0,9	0,46
Depresija	2,4 (1,9 – 3,2)	2,3 (1,8 – 3,4)	0	-1 do 0,9	0,93
Gastritis	2,4 (1,9 – 3,2)	2,4 (2,0 – 3,2)	0	-0,6 do 0,6	0,93
Astma	2,3 (1,9 – 3,2)	2,4 (2,1 – 3,5)	0,1	-0,6 do 0,7	0,64

\*Mann Whitney U test

#### 5.2.4. Uloga DNA metilacije u predviđanju obilježja ispitanika i obilježja bolesti (ROC analiza)

Metoda izračuna ROC krivulje kojom je stupnjevito mijenjana vrijednost točke razlučivanja (engl. cut-off point) globalne DNA metilacije koja najbolje razlučuju bolesnike i kontrolne ispitanike pokazala je da određivanje globalne DNA metilacije ne bi bio dobar dijagnostički pokazatelj u razlikovanju bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika (Tablica 5.44). Međutim, nađeno je da bi se prema vrijednosti globalne DNA metilacije mogao razlikovati u bolesnika s obzirom na kašalj i pušački indeks (PY).

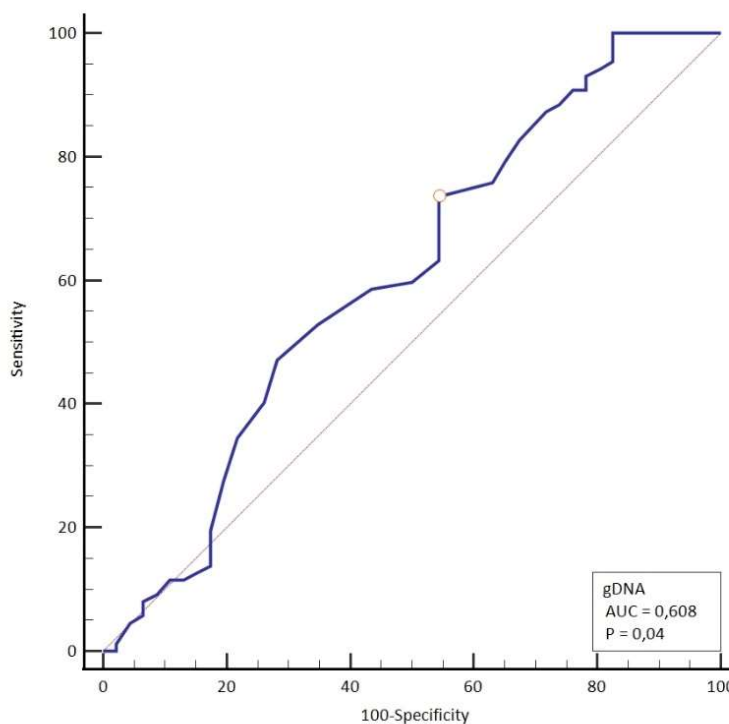
Tablica 5.44. Vrijednosti ROC analize - kontrolni ispitanici vs bolesnici s KOPB

Čimbenik	Površina ispod krivulje (AUC)	95% CI	senzitivnost	specifičnost	cut off	Youden indeks	P
Globalna DNA metilacija	0,530	0,458 – 0,602	83,5	34,4	≤ 3,3	0,178	0,53

Ukoloko su vrijednosti globalne DNA metilacije ≤ 2,8 veća je vjerojatnost da bolesnici imaju simptom kašlja (P = 0,04) (Tablica 5.45) (Slika 5.14).

Tablica 5.45. Vrijednosti ROC analize - kašalj u bolesnika s KOPB-om

Čimbenik	Površina ispod krivulje (AUC)	95% CI	senzitivnost	specifičnost	cut off	Youden indeks	P
Globalna DNA metilacija	0,608	0,519 – 0,691	73,6	45,7	≤ 2,8	0,192	<b>0,04</b>

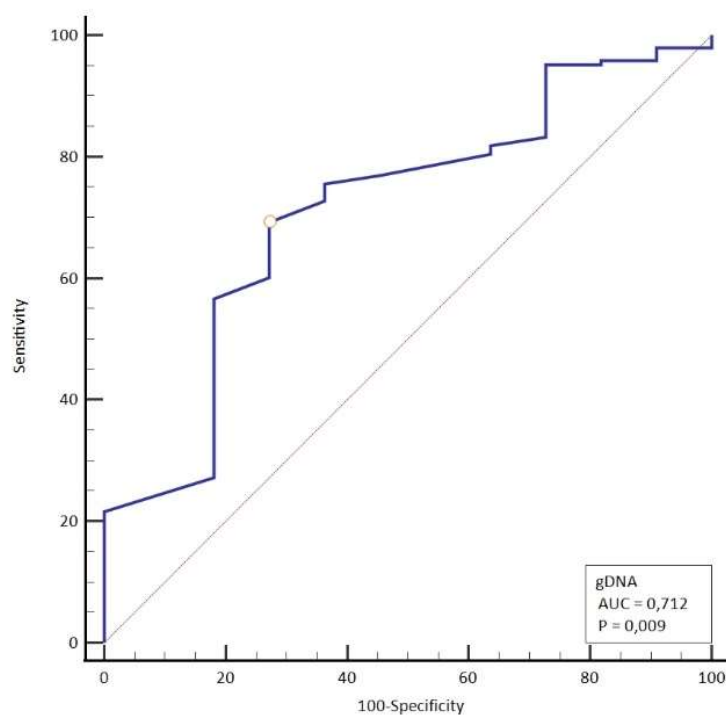


Slika 5.14. Površina ispod krivulje (AUC) gDNA s obzirom na prisutan kašalj

Ukoliko su vrijednosti globalne DNA metilacije  $\leq 2,8$  veća je vjerojatnost i da je riječ o bolesniku s KOPB-om koji ima pušački indeks više od 20 PY (Tablica 5.46) (Slika 5.15).

Tablica 5.46. Vrijednosti ROC analize - pušačke godine PY (< 20 PY vs.  $\geq 20$  PY)

Čimbenik	Površina ispod krivulje (AUC)	95 % CI	senzitivnost	specifičnost	<i>cut off</i>	Youden indeks	<i>P</i>
gDNA met	0,712	0,553 – 0,871	69,2	72,7	$\leq 2,8$	0,420	<b>0,009</b>



Slika 5.15. Površina ispod krivulje (AUC) gDNA s obzirom na trajanje pušačkih godina

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Kliničke različitosti bolesnika s KOPB-om u Osijeku i Zadru

KOPB je vrlo složena i heterogena bolest koju karakteriziraju kronični respiratorni simptomi, abnormalnosti strukture i funkcije pluća, te često prisutni klinički bitni komorbiditeti (3). U ovom istraživanju ispitivane su različitosti bolesnika s KOPB-om s obzirom na moguće epigenetske utjecaje u dvama različitim hrvatskim zemljopisnim područjima, kontinentalnoj i primorskoj Hrvatskoj, odnosno u ispitanika koji gravitiraju KBC Osijek i OB Zadar. Iako se demografske karakteristike, trajanje i težina KOPB-a u bolesnika u Osijeku i Zadru nisu bitno razlikovale, nađene su klinički zanimljive razlike u osobitostima bolesti, rizičnim čimbenicima, pridruženim bolestima i kvaliteti života između tih dviju populacija bolesnika.

U bolesnika u Zadru dominirao je izolirani simptom zaduhe u tjelesnom naporu, a u bolesnika u Osijeku kombinacije različitih simptoma uključujući i zaduhu. Osjećaj zaduhe nije nužno odraz težine KOPB-a već je subjektivan osjećaj i podložan je brojnim čimbenicima uključujući psihološke i emotivne čimbenike (127). Iako se težina bolesti procijenjena GOLD stupnjevima opstrukcije i GOLD skupinama težine simptoma i rizika nije bitno razlikovala između bolesnika u Osijeku i bolesnika u Zadru, nađeno je da su bolesnici u Zadru bolje podnosili osjećaj zaduhe. U bolesnika u Zadru zabilježeni su bitno blaži stupnjevi zaduhe (mMRC 1, 2 i 3), a bilo je i onih bez osjećaja zaduhe. Nasuprot tome bolesnici iz Osijeka imali su teže stupnjeve zaduhe, te bitno jače izražene simptome kašlja i iskašljavanja odnosno imali su dominantna obilježja kroničnog bronhitisa. S druge strane, bolesnici u Zadru u odnosu na bolesnike u Osijeku, imali su u nalazima CT-a toraksa bitno češće opisane opsežne emfizematozne promjene i bule. Oboje, kronični bronhitis i emfizem, obilježja su KOPB-a, koja u pojedinih bolesnika s KOPB-om mogu biti različito zastupljena. Nekada poznate kao dvije zasebne bolesti, danas su ubrojene među glavne fenotipove KOPB-a, tzv. fenotip s dominantnim emfizemom (nekada nazivan ružičasti puhaljko; engl. pink puffer) i tzv. fenotip s dominantnim kroničnim bronhitisom (nekada nazivan plavi naduvenko; engl. blue bloater) (43). Novija istraživanja pokazuju da u patogenezi hipersekrecije (128) i emfizema (129) koji su glavna obilježja ova dva fenotipa, postoje složene epigenetske modifikacije. Kašalj i iskašljavanje simptomi su koji dovode do pogoršanja plućne funkcije i pojave egzacerbacija, te anksioznosti i u velikoj mjeri narušavaju zdravstveno stanje bolesnika koje se odražava pogoršanjem ukupne kvalitete života (130).



KOPB se tradicionalno smatra bolešću koja je samoizazvana pušenjem u genetski osjetljivih osoba. Pušačke navike između bolesnika u Osijeku i Zadru nisu se bitno razlikovale, a skoro svi ispitanici u obama centrima bili su pušači s pušačkim indeksom više od 20 pušačkih godina (PY). S obzirom na činjenicu da od KOPB-a ne oblijevaju svi pušači, te da svoju ulogu u nastanku bolesti imaju i drugi čimbenici, stavovi o etiopatogenezi KOPB-a posljednjih su se godina korjenito promijenili (6). U pušača cigareta događaju se kronične, ponavljajuće ozlijede plućnog tkiva kroz procese oksidativnog stresa i upale tijekom dugog niza godina pušenja. Milijuni vrlo sitnih čestica promjera manjeg od 0,45  $\mu\text{m}$ , od kojih se svaka sastoji od mješavine velikog broja toksičkih kemijskih čestica duhana i kemijskih dodataka, dovode do oštećenja različitih struktura pluća, osobito terminalnih bronhiola, alveola i plućne cirkulacije, i to najvjerojatnije kroz različite patogenetske mehanizme (39). Pušenje se i dalje smatra glavnim rizičnim čimbenikom, ali ne i jedinim. Brojni drugi čimbenici također imaju svoju ulogu, a smatra se da vjerojatno utječu i na fenotip i na tijek bolesti (9). Među bolesnicima s KOPB-om u Zadru bilo je bitno više onih koji su tijekom života bili izloženi izgaranju bioloških goriva zbog načina grijanja na drva tijekom zime, nego što je to bio slučaj među bolesnicima u Osijeku. Udio bolesnika koji je istovremeno bio izložen i profesionalnim rizičnim čimbenicima i produktima izgaranja bioloških goriva bio je također veći u Zadru. Istraživanja su pokazala da je izloženost tim rizičnim čimbenicima bitna za razvoj KOPB i uz minimalnu izloženost (131) ili čak bez izloženosti duhanskom dimu (132), kako u zemljama u razvoju tako i u visokorazvijenim zemljama (133). Međutim, usprkos kumulativno većoj izloženosti i većem broju poznatih vanjskih rizičnih čimbenika za razvoj bolesti, zdravstveno stanje bolesnika s KOPB-om u Zadru nije bilo lošije, a bolesnici su imali blaže simptome i bolje su podnosili tjelesni napor od bolesnika u Osijeku što ukazuje da izloženost okolišnim čimbenicima rizika zasigurno nije jedino što utječe na razvoj i kliničku sliku KOPB-a.

Rezultati upitnika za procjenu kvalitete života povezane sa zdravstvenim stanjem pokazali su da je kvaliteta života bolesnika s KOPB-om u Osijeku bitno lošija nego u bolesnika u Zadru. U bolesnika u Osijeku u odnosu na bolesnike u Zadru u generičkom upitniku SF-36 ističu se kao bitno lošije kategorija fizičkog funkcioniranja u domeni tjelesnog zdravlja i kategorija ograničenja zbog emotivnih poteškoća u domeni mentalnog zdravlja, a u respiratorno specifičnom upitniku SGRQ domena simptoma, kao i ukupno lošiji rezultat cijelog upitnika SGRQ. Pokazalo se da su aktivni pušači imali lošije rezultate kvalitete života u usporedbi s bivšim pušačima i nepušačima. Bolesnici koji su imali učestale egzacerbacije također su pokazali lošije rezultate u testovima kvalitete života u odnosu na bolesnike koji

nisu imali egzacerbacije. Bolesnici s KOPB-om često imaju kvalitetu života nerazmjerno lošiju u odnosu na stupanj ograničenja protoka zraka odnosno oštećenje plućne funkcije. U istraživanju Leea i suradnika loš rezultat kvalitete života u SGRQ-C upitnika u bolesnika s teškim do vrlo teškim KOPB-om bio je povezan s iskašljavanjem i zaduhom, a u slučaju prisutnosti izvanplućnih komorbiditeta loš rezultat imali su i bolesnici s blažim oblicima KOPB-a neovisno o simptomima (134). Slično, bolesnici s KOPB-om u Osijeku, koji su imali više simptoma i više komorbiditeta u odnosu na bolesnike iz Zadra, imali su i lošiju kvalitetu života povezanu sa zdravstvenim stanjem.

Istraživanja rađena na bolesnicima s KOPB-om potvrdila su da je dobro uravnotežena prehrana bogata antioksidansima važna kako za poboljšanje funkcije dišnog sustava, tako i za smanjenje upalnog odgovora, a time i za prevenciju egzacerbacija, razvoja i progresije KOPB-a te smanjenje metaboličkih i kardiovaskularnih rizika (135). Cilj ovog istraživanja nije bio ispitati izravan utjecaj pojedinih namirnica kroz unošenje podataka u obrasce koji bilježe količine, omjere, raznolikost ili kombinaciju različitih namirnica i pića u prehrani, već pokazati orijentacijski okvir za procjenu mogućih razlika u prehranbenim navikama između bolesnika u Osijeku i Zadru. U drugim istraživanjima nađena je osobito snažna recipročna povezanost unosa voća i povrća s razvojem KOPB u pušača, dok to nije bio slučaj u nepušača. Procijenjeno je da ako su pušači konzumirali veće količine voća i povrća, rizik od razvoja KOPB-a je bio čak 35-40 % manji (136). Istraživanja nekoliko kohortnih studija govore o povezanosti većeg unosa hrane bogate antioksidantima sa sporijim padom funkcije pluća i nižom incidencijom KOPB (89). Bolesnicima s KOPB-om preporučuje se konzumacija svježeg voća, povrća, cjelovitih žitarica, biljnih ulja i ribe, kao i mala konzumacija alkohola (po mogućnosti vina), uz izbjegavanje prerađene, rafinirane hrane s visokim sadržajem zasićenih masnoća, slatkiša, suhomesnatih proizvoda (137). Usporedbom prehranbenih navika između bolesnika iz Osijeka i Zadra nađeno je da su bolesnici u Osijeku konzumirali nešto veće količine voća i povrća, dok su bolesnici u Zadru konzumirali nešto više ribe i alkohola. Učinak ukupne prehrane kao i pojedinih namirnica na KOPB i zdravstveno stanje bolesnika nije moguće procjenjivati s obzirom na različite kombinacije hrane, te postavljene ciljeve u okviru ovog istraživanja. Međutim, nađene razlike u prehranbenim navikama bolesnika u Osijeku i Zadru upućuju da razlike u prehrani bolesnika postoje, te da ih treba imati u vidu kao mogući epigenetski utjecaj na kliničke različitosti kao i tijekom KOPB-a, te kao moguću točku za terapijske intervencije.

Nadalje poznato je da se incidencija kroničnih nezaraznih bolesti povećava sa starenjem, a u bolesnika s KOPB-om učestalija je nego u ostaloj populaciji (138). Istraživanje

Lichera i sur. u prospektivnoj Rotterdamskoj studiji pokazalo je da su glavni čimbenici rizika za nezarazne kronične bolesti pušenje, hipertenzija i prekomjerna tjelesna težina, a njihova odsutnost povezana je s 9-godišnjom odgodom bolesti. Rizik razvoja druge kronične nezarazne bolesti u osobe koja je oboljela od jedne kronične nezarazne bolesti je 90 %, pa čak i u odsutnosti triju glavnih rizičnih čimbenika, iako je ukupni očekivani životni vijek za one koje su ih imali bio šest godina kraći (139). Komorbiditeti su jedno od najvažnijih obilježja bolesnika s KOPB-om, a utječu na zdravstveno stanje i kvalitetu života, kao i ukupnu prognozu ovih bolesnika. U ovom istraživanju nađeno je da su bolesnici s KOPB-om u Osijeku imali ukupno mnogo više komorbiditeta nego bolesnici u Zadru, osobito kardiovaskularnih bolesti i depresije. S druge strane, među bolesnicima u Zadru, veći broj bolesnika nije imao ni jednu pridruženu bolest, a prisutnost triju ili više komorbiditeta u bolesnika u Zadru bila je rijetkost u usporedbi s bolesnicima u Osijeku. Takve razlike u komorbiditetima bile su neočekivane s obzirom da je poznato da 90 % bolesnika s KOPB-om ima barem jednu pridruženu bolest, a čak polovica dvije ili više njih (64).

Rezultati drugih istraživanja pokazuju da su kardiovaskularnim komorbiditetima podložniji bolesnici s KOPB-om koji imaju veći indeks tjelesne mase i kronični bronhitis (79) što odgovara profilu bolesnika u Osijeku, dok su manje podložni bolesnici koji imaju emfizem (140), a što odgovara profilu bolesnika u Zadru. Camiciottoli i sur. također izvještavaju da u različitim fenotipovima KOPB-a prevladavaju specifični komorbiditeti, u kroničnom bronhitisu kardiovaskularni i metabolički, a u emfizemu sarkopenija i osteoporoza (79).

S obzirom na više simptoma kašlja i iskašljavanja kao i bitno veći broj kardiovaskularnih komorbiditeta i depresije postavlja se pitanje koji su to ključni čimbenici koji su utjecali na uočeni teži izražaj bolesti u osječkih bolesnika. Ono što se nedvojbeno razlikuje je okoliš u kojem žive osječki i zadarski bolesnici, tj. podneblje prvenstveno u meteorološkom, a posljedično i duhovnom značenju. Ravničarski dio kontinentalne Hrvatske ima blage razlike u srednjoj godišnjoj temperaturi zraka uz prevladavajuću temperaturu zraka oko 11°C, dok je u primorskom dijelu Hrvatsku zbog zagrijavajućega utjecaja mora prevladavajuća temperatura zraka 14,8 °C. Iako se u primorskom dijelu Hrvatske stvara velika količina vodene pare u zraku, zbog viših temperatura i utjecaja bure, zasićenje zraka vlagom je 65 % i 75 % s najpovoljnijim varijacijama upravo u zadarskom području. U ravničarskom dijelu kontinentalne Hrvatske relativna vlažnost zraka kreće se u rasponu 75 % do 85%, a godišnje temperaturne razlike ili amplitude među najvećima. Hrvatsko se primorje svrstava među najsunčanije dijelove Europe. Vremensko trajanje sijanja sunca u Dalmaciji je veće od

2000 sati godišnje (7,4 sati/dan), dok je u ravničarskom dijelu kontinentalne Hrvatske i Slavonije 1825 sati (5 sati/dan) (141).

Nepovoljniji klimatski uvjeti u Slavoniji zasigurno utječu na tijek i kliničku sliku bolesnika u Osijeku. Istraživanje Mua i sur. pokazalo je da visoka vlažnost predstavlja rizik za razvoj KOPB-a, a niska temperatura zraka predstavlja rizični čimbenik pogoršanja stanja bolesnika s KOPB-a (142). Istraživanja Baoa i sur. pokazalo je da sinergijski učinak visoke relativne vlažnosti zraka (više od 59 %) i niske temperature (manje od 11°) može utjecati na rizik razvoja bolesti, pogoršanje simptoma i povećanu smrtnost bolesnika s KOPB-om (143). S druge strane, dokazano je da smanjena izloženost suncu i nedostatak vitamina D može loše utjecati na imunološku funkciju i povećati osjetljivost na infekcije respiratornog trakta, kao i sklonost kašljanju (144). Imunomodulatorna uloga vitamina D kao epigenetskog regulatora gena potvrđena je u razvoju KOPB-a (145), a očituje se i u prevenciji umjerenih i teških egzacerbacija KOPB (146) koje su jedan od najvažnijih prognostičkih čimbenika za loše ishode KOPB-a. Također, potvrđena su protuupalna i druga protektivna svojstva vitamina D u krvožilnom sustavu i povezanost njihovog nedostatka u razvoju kardiovaskularnih bolesti (147). Depresija i poremećaj mentalnog zdravlja opaža se u područjima svijeta koja su manje izložena izravnoj sunčevoj svjetlosti (148, 149). Bolesnici s KOPB-om u Osijeku imaju dominantni kronični bronhitis, bitno više kardiovaskularnih komorbiditeta i depresije u odnosu na bolesnike u Zadru, što jasno govori o utjecajima podneblja, osobito izloženosti suncu kao bitnim čimbenicima u razvoju KOPB-a, ako ne i drugih nezaraznih kroničnih bolesti.

S obzirom na dosadašnje spoznaje, KOPB je jasno definiran skup medicinskih znakova i simptoma koji su međusobno povezani, no postalo je jasno da ta bolest nema zajedničku prepoznatljivu patogenezu. Chelli i sur. predložili su novu definiciju ove bolesti prema kojoj je KOPB klinički sindrom karakteriziran kroničnim respiratornim simptomima, strukturnim plućnim abnormalnostima i/ili oštećenjem plućne funkcije nastao kao rezultat međudjelovanja različitih okolišnih i genetskih čimbenika (150). Štoviše, pretpostavlja se da je KOPB posljedica brojnih različitih dinamičkih i kumulativnih međudjelovanja genoma i okoliša koji se odvijaju tijekom cijelog života od intrauterine dobi. Utjecaj brojnih čimbenika uključujući inhalirane toksičnih čestica, prijevremeno rođenje, respiratorne infekcije, manjkavu prehranu i pothranjenost, te autoimunost oblikuje održavanje i funkciju pluća, a često ugrožava jedan ili oba ključna fiziološka procesa u nastanku KOPB-a, razvoj i starenje pluća (9, 39). U međudjelovanju gena i okoliša ključnom stavkom smatra se vrijeme. Dob osobe u trenutku kada se događaju određena međudjelovanja gena i okoliša, kao i kumulacija svih ranijih

suodnosa gena i okoliša što ih osoba sakuplja tijekom života, mogu utjecati na konačne biološke i kliničke ishode zdravlja i bolesti (6).

## **6.2. Globalna DNA metilacija u bolesnika s KOPB-om**

U svakodnevnoj kliničkoj praksi postoji velika potreba za biološkim markerima koji bi bili korisni u dijagnozi i prognozi KOPB-a. Studije koje se provode na cijelom genomu, poput COPDGene i drugih, identificirale su brojne genetske lokusa povezane sa složenim osobinama bolesti, ali za njihovo tumačenje potrebne su opsežne i dugotrajne integrativne analize s brojnim biološkim i tehnološkim resursima koji ih za sada ne čine metodom izbora u molekularnoj dijagnostici u kliničkoj praksi.

Metilacija DNA ima važnu ulogu u održavanju genomske stabilnosti sprječavanjem oštećenja DNA i regulacijom ekspresije gena. U istraživanje Hea i sur. niže razine DNA metilacije bile su povezane s prisutnošću KOPB-a, te je istaknuto da bi DNA metilacija u KOPB-u mogla biti važna kao potencijalni biomarker (6, 151) koji je toliko potreban za dijagnostiku ove bolesti. Qui i sur. su u svom istraživanju našli povezanost između DNA metilacije i težih oblika KOPB-a (94). U istraživanju Zinella i sur. nađeno je da je globalna DNA metilacija bila niža u bolesnika s blagim i umjereno teškim stabilnim KOPB-om. Ovi autori su pretpostavili da je globalna DNA metilacija povezana s težinom bolesti i oksidativnim stresom za koji smatraju da je glavni razlog niske DNA metilacije u bolesnika s KOPB-om, ali bolesnici s teškim KOPB-om nisu bili uključeni u njihovo istraživanje, a vezu DNA metilacije s oksidativnim stresom nisu potvrdili (88, 89). Istraživanje Weina i sur. pokazalo je da je DNA metilacija u plućima bila više povezana s pušenjem u blagom i umjerenom KOPB-u nego u teškoj bolesti što ukazuje da su patogenetski mehanizmi u različitim oblicima KOPB-a vjerojatno različiti (152). Nadalje, rezultati objavljenih studija pokazuju i da stare osobe i osobe s nezaraznim kroničnim bolestima imaju globalnu DNA metilaciju nižu u odnosu na mlađe i zdrave ispitanike (153). Globalna hipometilacija u starijima osoba utječe na genomsku nestabilnost i povećava stopu mutacije (154). Opetovane epigenetske promjene predstavljaju jedan od načina popravka DNA, ali mogu rezultirati oštećenjem DNA što se i događa osobito u starijih ljudi zbog čega su skloniji razvoju različitih bolesti. Međutim, točan mehanizam do sada je ostao nepoznat (155).

U najvećeg broja bolesnika s KOPB-om uključenih u ovo istraživanje, prevladavale su umjereno niske vrijednosti globalne DNA metilacije koje su bile niže u kontrolnih ispitanika, ali ne statistički bitno, osim u skupini ispitanih muškaraca u Zadru. Kao što je već više puta

naglašeno KOPB se manifestira u starijoj životnoj dobi, te često prepoznaje kasno u uznapredovaloj fazi bolesti. Pored toga prevalencija pridruženih bolesti u KOPB-u mnogo je veća nego u osoba koje nemaju KOPB (3). Dobiveni rezultati ispitivanja globalne DNA metilacije u ovom istraživanju bi mogli biti povezani sa životnom dobi uključenih bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika (medijan dobi oko 70 godina), a ne samo s prisutnošću KOPB-a i komorbiditeta.

U ovom istraživanju nije nađena statistički bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji između ispitivanih skupina bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika, ni između pušača (aktivnih i bivših) i nepušača, niti između muškaraca i žena, kao ni između ispitanika u Osijeku i ispitanika u Zadru na razini cjelokupnog uzorka od 197 ispitanika. Vrijednosti globalne DNA metilacije u ispitanika kretale su se u širokom rasponu, u oko četvrtine ispitanika vrijednosti su bile između 2 i 2,5 ng/ $\mu$ l (25 %), a čak nešto više od polovine ispitanika imalo je vrijednosti globalne DNA metilacije između 1,5 i 3 ng/ $\mu$ l. Većina ispitanika svrstana je u skupinu s niskometiliranom globalnom DNA metilacijom odnosno pripadala je tzv. klasteru 1, dok je samo manji dio ispitanika imao visokometiliranu globalnu DNA i pripadao klasteru 2. Međutim, detaljnim statističkim analizama jasno je nađeno da su više vrijednosti globalne DNA metilacije, odnosno klaster 2 bio gotovo isključivo zastupljen u nepušača, kontrolnih ispitanika i ispitanika u Zadru.

U ovom istraživanju također je nađeno je da su bolesnici u Osijeku, koji su prema kriterijima uobičajenim u kliničkoj praksi bili gotovo jednake težine bolesti kao i bolesnici u Zadru, imali bitno lošije zdravstveno stanje, ponajprije zbog karakteristika simptoma i pridruženih bolesti. Pri tome se nije našlo da su stupnjevi težine bolesti, bilo prema težini opstrukcije ili težini simptoma i rizika, na bilo koji način bili povezani s razinom globalne DNA metilacije.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je poremećaj DNA metilacije uključen u nastanak mnogih bolesti, a najbolje je istražen u malignim bolestima. Geni poput tumorskih supresorskih, za regulaciju rasta i adhezijskih molekula, obično su utišani epigenetskom inaktivacijom preko hipermetilirane DNA. Novija istraživanja upućuju na činjenicu da su otkriveni specifični obrasci metilacije za karcinome različitih organa, ali da isto tako i benigne i upalne bolesti također imaju vrlo specifične obrasce metilacije cirkulirajuće DNA koji se razlikuju od obrazaca metilacije kod malignih tumora. U mnogim malignim bolestima, ali i drugim bolestima u kojima je potvrđena povezanost poremećaja DNA metilacije određenih gena s bolesti, globalna DNA metilacija ne odražava metilaciju specifičnih CpG mjesta pojedinih gena (156, 157). U mnogih hematoloških i drugih malignih bolesti (158), kao i

kardiovaskularnih bolesti (159) nađeno je da bolesnici imaju niže vrijednosti globalne DNA metilacije nego kontrolni ispitanici, te da nalazi globalne DNA metilacije mogu biti pokazatelj aktivnost bolesti ili učinka liječenja. Može se pretpostaviti da su na niže vrijednosti globalne DNA metilaciju u bolesnika s KOPB-om u Osijeku u odnosu na bolesnike u Zadru, između ostalog, vjerojatno utjecali i bitno brojniji kardiovaskularni komorbiditeti. S druge strane, globalna DNA-a metilacija u bolesnika u Osijeku bila je povezana s depresijom, odnosno bila je bitno viša u bolesnika s depresijom, što je u skladu s ranijim istraživanjem Reszka i sur. u kojem je nađeno da su žene s depresijom imale višu globalnu DNA metilaciju od kontrolne skupine (160). Statistička bitnost dobivena samo za određene podskupine ispitanika najvjerojatnije je posljedica velike heterogenosti KOPB-a i relativno male veličine uzorka ispitanika.

Nadalje, nađena je statistički bitna povezanost DNA metilacije s dobi početka pušenja u bolesnika s KOPB-om u Osijeku. U Osijeku je bilo bolesnika koji su počeli pušiti sa sedam i devet godina, dok u Zadru nije bilo bolesnika koji su počeli pušiti u tako ranoj životnoj dobi. U cijelogenomskim studijama ECLIPSE (161) istražena je povezanost gena s povijesti pušenja u odnosu na osjetljivost prema razvoju KOPB-a, te različite osobitosti bolesti i podtipove KOPB-a u pušača koji su već razvili KOPB. Rezultati studija ECLIPSE ukazali su na nekoliko genetskih lokusa koji su bili povezani s dobi početka pušenja u populaciji aktivnih i bivših pušača. U literaturi nisu nađena druga klinička istraživanja koja su se bavila povezanošću dobi početka pušenja s epigenetskim promjenama povezanim s početkom i duljinom pušenja, ponajprije jer takva istraživanja nisu praktički moguća. U idealnom istraživanju trebalo bi detaljno pratiti sveobuhvatnu izloženost svim mogućim čimbenicima rizika, te detaljna mjerenja svih potencijalnih biomarkera, kao i svih fenotipskih i endotipskih obilježja ispitanika već od vremena trudnoće i rođenja, pa tijekom cijelog života sve do smrti, a što vjerojatno nikada neće realno biti moguće (6). Niže vrijednosti globalne DNA metilacije nađene su u pušača u odnosu na nepušače ali isključivo u Zadru. U Osijeku su svi ispitanici neovisno o pušačkom statusu, kako bolesnici s KOPB-om tako i kontrolni ispitanici imali podjednako niske, te općenito mnogo niže vrijednosti globalne DNA metilacije u odnosu na ispitanike u Zadru. U istraživanju Baglietta i sur. najnižu DNA metilaciju periferne krvi imali su aktivni pušači, a prestankom pušenja vrijednosti DNA metilacije su s protokom vremena rasle (162). U istraživanju Princea i sur. nađeno je da je utjecaj aktivnog pušenja adolescenata vrlo brzo dovodio do hipometilacije većeg broja CpG pozicija u više genskih regija, pa čak i među pojedincima koji su pušili vrlo kratko vrijeme (163). Rezultati Qiu i sur. pokazuju da pušenje cigareta i genske varijante utječu na različite razine metilacije DNA, ali se oni za sada

još ne mogu povezati s učincima pušenja na zdravlje (164). Pušenje cigareta ima širok utjecaj na metilaciju u cijelom genomu, koja na mnogim lokusima traje mnogo godina nakon prestanka pušenja (165), a u kombinaciji s individualnim čimbenicima pojedinaca vjerojatno rezultira različitim stupnjevima globalne metilacije koja je za sada nepredvidiva.

Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da neke skupine ispitanika, pripadnici tzv. klastera 2, odskaku po neočekivano visokim vrijednostima globalne DNA metilacije, te da su ti ispitanici iz Zadra, dok ih u Osijeku gotovo i nema. Postavlja se pitanje što je moglo utjecati na pojavu hipermetilacije DNA, odnosno bitno više vrijednosti globalne DNA metilacije u ovih ispitanika u Zadru i kakvo je značenje toga. Radi li se o protektivnim mehanizmima ili odgovoru razine globalne DNA metilacije na neke slučajne utjecaje. Nije uočeno da su malobrojni bolesnici ili kontrolni ispitanici s neočekivano visokim vrijednostima imali neke aktivne bolesti ili druge osobitosti koje bi se mogle povezati s tim. Kontrolni ispitanici anamnestički nisu imali KOPB, ali niti druge aktivne bolesti po kojima bi se razlikovali od bolesnika s KOPB-om. Međutim u ovom istraživanju kontrolni ispitanici nisu posebno obrađivani u sklopu istraživanja, odnosno podaci o odsutnosti aktivne i/ili nekontrolirane bolesti dobiveni su anamnestički i iz povijesti bolesti, a učinjena im je samo obrada koja je bila neophodna kako bi zadovoljili kriterije i bili odgovarajuća kontrolna skupina bolesnicima s KOPB-om. Teško je pretpostaviti što je u pripadnika klastera 2, među kojima su bili i bolesnici s KOPB-om i kontrolni ispitanici prvenstveno iz Zadra, moglo utjecati na više vrijednosti globalne DNA metilacije, kao i na one ekstremno visoke vrijednosti globalne DNA metilacije koje su bile ipak mnogo rjeđe.

Iako je ovo istraživanja pokazalo da postoje razlike u osobitostima između bolesnika s KOPB-om iz dvaju različitih zemljopisnih područja s drugačijim podnebljem i različitim utjecajima iz okoliša, nije nađena jasna povezanost epigenetskih utjecaja s globalnom DNA metilacijom. Očigledno je da bi u istraživanje trebalo uključiti mnogo veći broj ispitanika kako bi se razjasnila otvorena pitanja o nađenim povezanostima globalne DNA metilacije nađene samo u nekih podskupina ispitanika. Istraživanja drugih autora pokazala su da na metilaciju DNA može utjecati izloženost, ali i varijacija genske sekvence, a relativni utjecaj svakog od njih na epigenom je nepoznat (94). Međutim, smatra se da KOPB, jednako kao i karcinom pluća, vjerojatno predstavlja epigenetski okvir obilježen nakupljanjem metilacije tijekom dugog razdoblja (151). Do sada najveća pojedinačna studija cijelog epigenoma bavila se istraživanjem diferencijalne metilacije (DMSs – engl. Differentially Methylated Sites) povezane s fenotipovima KOPB-a. Identificirano je 28 DMS-ova povezanih s respiratornom funkcijom i/ili KOPB-om koji bi trebali pružiti uvid u molekularne mehanizme vezano za



predviđanje odgovora na okolišne rizične čimbenike, te njihov utjecaj na plućnu funkciju i kliničke različitosti (166). Nova istraživanja na cijelom genomu pokazuju da se klasični model interpretacije molekularnih mehanizmima povezanih s promjenama DNA metilacije, kao i njihova moguća primjena u liječenja intenzivno preispituju (167, 168).

### **6.3. Zaključci rasprave**

Razlike u kliničkim obilježjima osječkih i zadarskih bolesnika s KOPB-om koji su bili izloženi različitim utjecajima podneblja zemljopisnog područja u kojem su živjeli i bili liječeni ukazuju na jasan epigenetski utjecaj u oblikovanja kliničkih i fenotipskih obilježja KOPB-a kao i prisutnost različitih komorbiditeta. Ovim istraživanjem nije potvrđeno da je globalna DNA metilacija prikladan i pouzdan biomarker u KOPB-u. Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja globalne DNA metilacije u KOPB-u kao i pojedini rezultati ovog istraživanja na podskupovima podataka daju naznake da bi globalna DNA metilacija ipak mogla biti od važnosti kao epigenetski marker u nekim obilježjima KOPB-a kao što su pušenje i kašalj. Niže vrijednosti globalne DNA metilacije vjerojatnije su u bolesnika koji kašlju i imaju pušački indeks veći od 20 PY. Daljnja istraživanja ne samo globalne DNA metilacije, nego i metilacije pojedinih dijelova genoma mogla bi doprinijeti razvoju preciznijih biomarkera za otkrivanje i dijagnozu, te predviđanje odgovora na liječenja kao i prognozu ishoda mnogih bolesti uključujući i KOPB-a.

## 7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Usporedbom bolesnika s KOPB-om u dvama hrvatskim zemljopisnim područjima koji se liječe u dvama središtima, Osijeku i Zadru nije nađena bitna razlika u pogledu plućne funkcije, težine simptoma procijenjene upitnikom CAT kao i rizika budućih egzacerbacija. Međutim, nađeno je da su se bolesnici iz tih dvaju hrvatskih zemljopisnih područja bitno razlikovali u obilježjima KOPB-a i pridruženim bolestima.
  - Neovisno o rezultatu upitnika CAT bolesnici u Osijeku imali su više simptoma KOPB-a. U bolesnika iz Osijeka simptomi kašlja i iskašljavanja bili su bitno zastupljeniji, a najčešća je bila kombinacija simptoma kašlja, iskašljavanja i zaduhe u naporu. U bolesnika iz Zadra dominirao je izolirani simptom zaduhe u naporu, mnogo rjeđe u kombinaciji s kašljem i iskašljavanjem. U bolesnika u Zadru bili su zastupljeniji blaži stupnjevi zaduhe (mMRC 0, 1, 2), odnosno bolesnici u Zadru bolje su podnosili tjelesni napor od bolesnika u Osijeku. S druge strane opsežan emfizem s bulama ili bez njih u nalazima CT-a prsnog koša bio je statistički bitno češće opisan u bolesnika iz Zadra.
  - Bolesnici u Osijeku imali su bitno veću zastupljenost kardiovaskularnih komorbiditeta i depresije u odnosu na bolesnike u Zadru. Bolesnici u Osijeku češće su imali dvije pridružene bolesti, pa i više od dviju, dok je to bila rijetkost u bolesnika iz Zadra.
  - Kvaliteta život bolesnika s KOPB-om iz Osijeka bila je lošija od kvalitete života bolesnika iz Zadra osobito prema rezultatima generičkog upitnika SF-36 kategoriji *Fizičkog funkcioniranja* u domeni tjelesnog zdravlja i kategoriji *Ograničenja zbog emocionalnih poteškoća* u domeni mentalnog zdravlja. Rezultati kvalitete života u upitniku SGRQ, specifičnom za bolest, također su bili lošiji u bolesnika iz Osijeka, ali bez statističke bitnosti.
2. Vrijednosti globalne DNA metilacije, kako u bolesnika tako i u kontrolnih ispitanika, varirale su u širokom rasponu. Oko polovine ispitanika imalo je vrijednosti između 1,5 i 3 ng/ $\mu$ l. Na razini cjelokupnog uzorka ispitanika nije nađena bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji između muškaraca i žena, između pušača (aktivnih i bivših) i nepušača, između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika, kao ni između ispitanika iz Osijeku i ispitanika iz Zadru.

- Niže vrijednosti globalne DNA metilacije (niskometilirana DNA) bile su zastupljene više u bolesnika s KOPB-om, u pušača i ispitanika u Osijeku. Bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji između bolesnika i kontrolnih ispitanika nađena je samo u podskupini ispitanika iz Zadra, i to u uzorku ispitanika oba spola kao i u uzorku muškaraca iz Zadra. Bitna razlika između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača nađena je također samo u podskupini ispitanika u Zadru, i to u uzorku ispitanika oba spola kao i u uzorku muškaraca. Bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji između ispitanika iz Osijeka i Zadra nađena je samo u skupini kontrolnih ispitanika.
  - Raspodjelom niskometiliranih i visokometiliranih uzoraka globalne DNA metilacije u klastera nađena je veća zastupljenost klastera 1 s niskometiliranom globalnom DNA u 169 ispitanika, dok je klaster 2 s visokometiliranom globalnom DNA bio bitno manje zastupljen, samo u 28 ispitanika. Udio klastera 2 bio je uglavnom zastupljen u ispitanika iz Zadra i to nepušača i kontrolnih ispitanika.
3. U ovom istraživanju nije nađena povezanost globalne DNA metilacija s rizičnim čimbenicima i načinom života bolesnika s KOPB-om. S obzirom na pripadnost klasteru 1 i klasteru 2 ispitanici su se bitno razlikovali u pogledu navike pušenja, broja pušačkih godina, te simptome kašlja, iskašljavanja i zaduhe u naporu.
- Nađeno je da je globalna DNA metilacija bila statistički bitno niža u bolesnika koji kašlju u odnosu na bolesnike koji ne kašlju.
  - U bolesnika koji iskašljavaju i imaju zaduhu globalna DNA metilacija također je bila niža u odnosu na bolesnike koji nemaju ove simptome, ali razlika nije bila statistički bitna.
  - Bitna razlika u globalnoj DNA metilaciji s obzirom na prisutnost komorbiditeta nađena je samo u podskupini ispitanika u Osijeku koji su imali depresiju.
  - Globalna DNA metilacije ne bi bila dobar dijagnostički pokazatelj ili biomarker u razlikovanju bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika, ali ukoliko su vrijednosti globalne DNA metilacije bolesnika  $\leq 2,8$  postoji veća vjerojatnost da bolesnici imaju jače izražen simptom kašlja te da imaju pušački indeks veći od  $\geq 20$  PY.

## 8. SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Ispitati razlike u kliničkim obilježjima i globalnoj DNA-metilaciji u bolesnika s KOPB-om iz dvaju zemljopisno različitih hrvatskih područja.

**Ustroj studije:** Presječno istraživanje

**Ispitanici i metode:** Uključeno je 136 bolesnika s KOPB-om i 64 kontrolna ispitanika obaju spolova starosti od 40 do 92 godine. Klinička i fenotipska obilježja KOPB-a analizirana su spirometrijom, bronhodilatacijskim testom, CT-om pluća, plućnom difuzijom, CAT-upitnikom, mMRC-skalom, laboratorijsko-dijagnostičkom obradom, EKG-om i UZV-om srca. Kvaliteta života ispitana je pomoću SF-36 i SGRQ upitnika. Globalna DNA-metilacija određivana je iz periferne krvi ispitanika.

**Rezultati:** Usporedbom bolesnika nađeno je da su osječki bolesnici bitno više kašljali i iskašljavali ( $P < 0,001$ ), imali teže stupnjeve zaduhe ( $P < 0,001$ ), više kardiovaskularnih komorbiditeta ( $P < 0,001$ ) i depresije ( $P = 0,01$ ) u odnosu na zadarske bolesnike. Zadarski bolesnici češće su imali emfizem ( $P < 0,001$ ) i blaže stupnjeve zaduhe (mMRC- 0, 1, 2) nego osječki bolesnici. Kvaliteta života osječkih bolesnika bila je lošija je u odnosu na zadarske bolesnike. Globalna DNA-metilacija nije se bitno razlikovala između bolesnika s KOPB-om i kontrolne skupine te između osječkih i zadarskih bolesnika. Bolesnici s KOPB-om, pušači te ispitanici iz Osijeka imali su niže vrijednosti globalne DNA-metilacije. Bitna razlika u globalnoj DNA-metilaciji nađena je samo u zadarskih ispitanika, između bolesnika i kontrolne skupine u skupini svih ispitanika ( $P = 0,02$ ) i skupini muškaraca ( $P = 0,03$ ), te između aktivnih pušača, bivših pušača i nepušača ( $P = 0,01$ ). Bitna razlika u DNA-metilaciji između osječkih i zadarskih ispitanika nađena je u skupini kontrolnih ispitanika ( $P = 0,001$ ). Vrijednosti globalne DNA-metilacije, razvrstane u dva klastera, pokazale su da je klaster 2 (visokometilirana DNA) bitno manje zastupljen od klastera 1 (niskometilirana DNA) i pretežno nađen u zadarskih ispitanika. S obzirom na pripadnost klasteru, bolesnici s KOPB-om su se bitno razlikovali prema pušenju ( $P = 0,03$ ), pušačkim godinama ( $P = 0,002$ ), kašlju ( $P = 0,001$ ), iskašljavanju ( $P = 0,01$ ) i zadusi u naporu ( $P = 0,007$ ). Globalna hipometilacija DNA bila je zastupljenija u bolesnika koji su kašljali ( $P = 0,04$ ), te manje zastupljena u

bolesnika s depresijom ( $P = 0,04$ ). Vrijednosti globalne DNA-metilacije  $\leq 2,8$  ukazuju na veću vjerojatnost kašlja ( $P = 0,04$ ) i pušački indeks  $\geq 20$  PY ( $P = 0,009$ ).

**Zaključak:** Razlike u kliničkim obilježjima bolesnika s KOPB-om u kontinentalnoj i primorskoj Hrvatskoj povezane su kako s okolišnim čimbenicima rizika tako i zaštitnim učincima okoliša. Ovim istraživanjem nije potvrđeno da je određivanje globalne DNA-metilacije prikladan i pouzdan biomarker u KOPB-u, ali ima naznaka da bi ona mogla biti važna kao epigenetski marker u nekim karakteristikama kao što je su pušenje i kašalj.

**Ključne riječi:** epigenetika, fenotipovi, globalna DNA metilacija, KOPB, kvaliteta života, način života, težina bolesti

## 9. SUMMARY

**Research objectives:** To examine the differences in the clinical characteristics and global DNA methylation in patients with COPD from two geographically different Croatian regions.

**Study-design:** Cross-sectional research

**Subjects and methods:** 136 COPD patients and 64 control subjects of both sexes aged 40-92 were included. Clinical and phenotypic characteristics of COPD were analyzed by spirometry, bronchodilation test, lung CT, pulmonary diffusion, CAT questionnaire, mMRC-scale, laboratory-diagnostic processing, ECG and ultrasound of the heart. Quality of life was examined by using the SF-36 and SGRQ questionnaire. Global DNA methylation was determined from the subjects' peripheral blood.

**Results:** By comparing the patients, it was found that patients from Osijek coughed harder and expectorated ( $P < 0,001$ ), had more severe degrees of shortness of breath ( $P < 0,001$ ), more cardiovascular comorbidities ( $P < 0,001$ ) and depression ( $P = 0,01$ ), compared to Zadar patients. Patients from Zadar more often had emphysema ( $P < 0,001$ ) and milder degrees of dyspnea (mMRC- 0, 1, 2), than patients from Osijek. The quality of life of Osijek patients was worse compared to Zadar patients. Global DNA methylation did not significantly differ from COPD and controls, and between patients from Osijek and Zadar. Patients with COPD, smokers and subjects from Osijek had lower values of global DNA methylation. A significant difference in global DNA methylation was found only in subjects from Zadar, between patients and controls in the group of all subjects ( $P = 0,02$ ) and the group of men ( $P = 0,03$ ), and between smokers, ex-smokers and non-smokers. A significant difference in DNA methylation between subjects from Osijek and Zadar was found in control subjects ( $P = 0,001$ ). Global DNA methylation values, classified into two clusters, showed that cluster-2 (low-methylated DNA) was significantly less represented than cluster-1 (high-methylated DNA), and was predominantly found in Zadar subjects. Considering the cluster membership, patients with COPD differed significantly according to smoking ( $P = 0,03$ ), smoking years ( $P = 0,002$ ), cough ( $P = 0,001$ ), expectoration ( $P = 0,01$ ) and shortness of breath in exertion ( $P = 0,007$ ). Global hypomethylation of DNA was more common in patients who coughed ( $P = 0,04$ ), and less common in patients with depression ( $P = 0,04$ ). Global DNA-methylation

values of  $\leq 2,8$  indicate a higher probability of cough ( $P = 0,04$ ) and a smoking index greater than  $\leq 20$  PY ( $P = 0,009$ ).

**Conclusion:** Differences in the clinical features of COPD are associated with environmental risk factors and protective effects of the environment in coastal versus continental Croatia. This research did not confirm that the determination of global DNA methylation is a suitable and reliable biomarker in COPD, but there are indications that it could be important as an epigenetic marker in some characteristics of the disease such as smoking and cough.

**Key words:** COPD, epigenetics, global DNA methylation, lifestyle, phenotypes, quality of life, severity of disease

**10. LITERATURA**

1. World Health Organisation. Dostupno na [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)). Datum pristupa 17.10.2022.
2. Sørheim IC, Johannessen A, Gulsvik A, Bakke PS, Silverman EK, DeMeo DL. Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men? *Thorax*. 2010 Jun;65(6):480-5. doi: 10.1136/thx.2009.122002.
3. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Dostupno na: [www.gold.copd.org](http://www.gold.copd.org) / World Health Organisation.<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> .Datum pristupa 17.10.2022.
4. Friedlander AL, Lynch D, Dyar LA, Bowler RP. Phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2007;4(4):355-84. doi: 10.1080/15412550701629663.
5. Kan M, Shumyatcher M, Himes BE. Using omics approaches to understand pulmonary diseases. *Respir Res* 2017;18, 149 doi: 10.1186/s12931-017-0631-9
6. Agustí A, Melén E, DeMeo DL, Breyer-Kohansal R, Faner R. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: understanding the contributions of gene-environment interactions across the lifespan. *Lancet Respir Med*. 2022;10(5):512-524. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00555-5.
7. Sidhaye VK, Nishida K, Martinez FJ. Precision medicine in COPD: where are we and where do we need to go? *Eur Respir Rev* 2018;27(149):180022. doi: 10.1183/16000617.0022-2018.
8. Brandsma CA, Van den Berge M, Hackett TL, Brusselle G, Timens W. Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: from disease mechanisms to precision medicine. *J Pathol*. 2020; 250:624-35. doi.:10.1002/path.5364
9. Agustí A, Faner R. COPD beyond smoking: new paradigm, novel opportunities. *Lancet Respir Med*. 2018; 6(5):324-326. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30060-2.
10. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D i sur. Committee on Nonsmoking COPD, Environmental and Occupational Health Assembly. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(5):693-718. doi: 10.1164/rccm.200811-1757ST.



11. Salvi S.S, Barnes P.J. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*. 2009; 374: 733-743. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61303-9.
12. Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, Welte T, Nizankowska-Mogilnicka E. i sur. BOLD Collaborative Research Group. COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest*. 2011; 139(4):752-763. doi: 10.1378/chest.10-1253.
13. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schau B. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med*. 2005 ;118(12):1364-72. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.06.041.
14. Chen BH, Hong CJ, Pandey MR, Smith KR. Indoor air pollution in developing countries. *World Health Stat Q*. 1990;43(3):127-38.
15. Martinez FD. Early-Life Origins of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 2016; 375(9):871-8. doi: 10.1056/NEJMra1603287.
16. Oxman AD, Muir DC, Shannon HS, Stock SR, Hnizdo E, Lange HJ. Occupational dust exposure and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic overview of the evidence. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148(1):38-48. doi: 10.1164/ajrccm/148.1.38.
17. Pope CA 3rd, Bates DV, Raizenne ME. Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ Health Perspect*. 1995; 103(5):472-80. doi: 10.1289/ehp.95103472.
18. Varraso R, Fung TT, Hu FB, Willett W, Camargo CA. Prospective study of dietary patterns and chronic obstructive pulmonary disease among US men. *Thorax*. 2007;62(9):786-91. doi: 10.1136/thx.2006.074534.
19. Mead J. Dysanapsis in normal lungs assessed by the relationship between maximal flow, static recoil, and vital capacity. *Am Rev Respir Dis*. 1980;121(2):339-42. doi: 10.1164/arrd.1980.121.2.339.
20. Koo HK, Vasilescu DM, Booth S, Hsieh A, Katsamenis OL, Fishbane N i sur. Small airways disease in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. *Lancet Respir Med*. 2018; 6(8):591-602. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30196-6.
21. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, i sur. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health*. 2019; 7(1):e37-e46. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30451-0.

22. Mercado N, Ito K, Barnes PJ. Accelerated ageing of the lung in COPD: new concepts. *Thorax*. 2015; 70:482-489. doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-206084.
23. Brandsma CA, de Vries M, Costa R, Woldhuis RR, Königshoff M, Timens W. Lung ageing and COPD: is there a role for ageing in abnormal tissue repair? *Eur Respir Rev*. 2017;26(146):170073. doi: 10.1183/16000617.0073-2017.
24. Selman M, Martinez FJ, Pardo A. Why Does an Aging Smoker's Lung Develop Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Not Chronic Obstructive Pulmonary Disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 199(3):279-285. doi: 10.1164/rccm.201806-1166PP.
25. Kukrety SP, Parekh JD, Bailey KL. Chronic obstructive pulmonary disease and the hallmarks of aging. *Lung India*. 2018; 35(4):321-327. doi: 10.4103/lungindia.lungindia\_266\_17.
26. Hardin M, Cho MH, Sharma S, Glass K, Castaldi PJ, McDonald ML, i sur. COPD Gene and Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-Points Investigators. Sex-Based Genetic Association Study Identifies CELSR1 as a Possible Chronic Obstructive Pulmonary Disease Risk Locus among Women. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017; 56(3):332-341. doi: 10.1165/rcmb.2016-0172OC.
27. Hardin M, Silverman EK. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Genetics: A Review of the Past and a Look Into the Future *Chronic Obstr Pulm Dis* 2014; 1(1): 33-46. doi: <http://doi.org/10.15326/jcopdf.1.1.2014.0120>
28. Pérez-Rubio G, Córdoba-Lanús E, Cupertino P, Cartujano-Barrera F, Campos MA, Falfán-Valencia R. Role of Genetic Susceptibility in Nicotine Addiction and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Rev Invest Clin* 2019; 71(1):36-54. doi: 10.24875/RIC.18002617.
29. Zuo Q, Wang Y, Yang D, Guo S, Li X, Dong J, i sur. Identification of hub genes and key pathways in the emphysema phenotype of COPD. *Aging* . 2021; 13(4): 5120-5135. doi:10.18632/aging.202432.
30. Ingebrigtsen T, Thomsen SF, Vestbo J, et al. Genetic influences on chronic obstructive pulmonary disease-a twin study. *Respir Med* 2010;104:1890-5.
31. Uffelmann, E, Huang QQ, Munung NS, de Vries J, Okaida Y, Martin AR, i sur. Genome-wide association studies. *Nat Rev Methods Primers* .2021;59. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>.
32. Cho MH, Hobbs BD, Silverman EK. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease: understanding the pathobiology and heterogeneity of a complex disorder. *Lancet Respir Med*. 2022;10(5):485-496. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00510-5.

33. Silverman EK. Genetics of COPD. *Annu Rev Physiol.* 2020; 10;82:413-431. doi: 10.1146/annurev-physiol-021317-121224.
34. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2011; 6:413-21. doi: 10.2147/COPD.S10770.
35. Barnes PJ, Burney PG, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, i sur. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15076. doi: 10.1038/nrdp.2015.76.
36. Nam HS, Izumchenko E, Dasgupta S, Hoque MO. Mitochondria in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: where are we now? *Biomark Med* 2017;11(6):475-489. doi: 10.2217/bmm-2016-0373.
37. Alfahad AJ, Alzaydi MM, Aldossary AM, Alshehri AA, Almughem FA, Zaidan NM, et al. Current views in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis and management. *Saudi Pharm J.* 2021; 29 (12):1361-1373. doi: 10.1016/j.jsps.2021.10.008.
38. Agustí A, Hogg JC. Update on the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2019; 381(13):1248-1256. doi: 10.1056/NEJMra1900475
39. BTS guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS. *Thorax.* 1997;52 Suppl 5(Suppl 5):S1-28.
40. Calverley P, Bellamy D. The challenge of providing better care for patients with chronic obstructive pulmonary disease: the poor relation of airways obstruction? *Thorax* 2000;55:78-82. doi: 10.1136/thorax.55.1.78
41. Celli BR, MacNee W; ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 2004; 23(6):932-46. doi: 10.1183/09031936.04.00014304. Erratum in: *Eur Respir J.* 2006 ;27(1):242.
42. Manian P. Chronic obstructive pulmonary disease classification, phenotypes and risk assessment. *J Thorac Dis.* 2019; 11(Suppl 14):S1761-S1766. doi: 10.21037/jtd.2019.05.10.
43. Anon. Blue bloater: pink puffer. *Br Med J.* 1968; 2(5606):677.
44. Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, i sur. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182(5):598-604. doi: 10.1164/rccm.200912-1843CC.

45. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, i sur. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2010; 363(12):1128-38. doi: 10.1056/NEJMoa0909883.
46. Halpin DM, Decramer M, Celli B, Kesten S, Liu D, Tashkin DP. Exacerbation frequency and course of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012; 7:653-61. doi: 10.2147/COPD.S34186.
47. Burge S, Wedzicha JA. COPD exacerbations: definitions and classifications. *Eur Respir J Suppl*. 2003; 41:46s-53s. doi: 10.1183/09031936.03.00078002.
48. Soler-Cataluña JJ, Cosío B, Izquierdo JL, López-Campos JL, Marín JM, Agüero R i sur. Consensus document on the overlap phenotype COPD-asthma in COPD. *Arch Bronconeumol*. 2012; 48(9):331-7. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arbres.2011.12.009. Epub 2012 Feb 15.
49. Mekov E, Nuñez A, Sin DD, Ichinose M, Rhee CK, Maselli DJ, i sur. Update on Asthma-COPD Overlap (ACO): A Narrative Review. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2021;16:1783-1799. doi: 10.2147/COPD.S312560.
50. Fletcher CM, Pride NB. Definitions of emphysema, chronic bronchitis, asthma, and airflow obstruction: 25 years on from the Ciba symposium. *Thorax*. 1984; 39(2):81-5. doi: 10.1136/thx.39.2.81.
51. Karimi R, Tornling G, Forsslund H, Mikko M, Wheelock Å, Nyrén S, i sur. Lung density on high resolution computer tomography (HRCT) reflects degree of inflammation in smokers. *Respir Res*. 2014; 15(1):23. doi: 10.1186/1465-9921-15-23.
52. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(2 Pt 1):341-57. doi: 10.1164/ajrccm.156.2.9611013.
53. Laurin C, Moullec G, Bacon SL, Lavoie KL. Impact of anxiety and depression on chronic obstructive pulmonary disease exacerbation risk. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(9):918-23. doi: 10.1164/rccm.201105-0939PP.
54. Xu W, Collet JP, Shapiro S, Lin Y, Yang T, Platt RW, i sur. Independent effect of depression and anxiety on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations and hospitalizations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178(9):913-20. doi: 10.1164/rccm.200804-619OC.
55. Mirza S, Benzo R. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes: Implications for Care. *Mayo Clin Proc*. 2017; 92(7):1104-1112. doi: 10.1016/j.mayocp.2017.03.020.

56. Pinto LM, Alghamdi M, Benedetti A, Zaihra T, Landry T, Bourbeau J. Derivation and validation of clinical phenotypes for COPD: a systematic review. *Respir Res.* 2015;16(1):50. doi: 10.1186/s12931-015-0208-4.
57. Sidhaye VK, Nishida K, Martinez FJ. Precision medicine in COPD: where are we and where do we need to go? *Eur Respir Rev.* 2018; 27(149):180022. doi: 10.1183/16000617.0022-2018.
58. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 2009; 33(5):1165-85. doi: 10.1183/09031936.00128008.
59. Fabbri LM, Luppi F, Beghé B, Rabe KF. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 2008; 31(1):204-12. doi: 10.1183/09031936.00114307.
60. Koskel J, Kilpeläinen M, Kupiainen HE, Mazur W, Sintonen H, Boezen M i sur. Co-morbidities are the key nominators of the health related quality of life in mild and moderate COPD. *BMC Pulm Med* 2014;14, 102 <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-102>
61. Negewo NA, Gibson PG, McDonald VM. COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms. *Respirology.* 2015;20(8):1160–71. doi: 10.1111/resp.12642.
62. Brassington K, Selemidis S, Bozinovski S, Vlahos R. New frontiers in the treatment of comorbid cardiovascular disease in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Sci (Lond).* 2019; 133(7):885-904. doi: 10.1042/CS20180316.
63. Rabinovich RA, MacNee W. Chronic obstructive pulmonary disease and its comorbidities. *Br J Hosp Med (Lond)* 2013; 72. doi:10.12968/hmed.2011.72.3.137.
64. Smith MC, Wrobel JP. Epidemiology and clinical impact of major comorbidities in patients with COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014; 9:871-88. doi: 10.2147/COPD.S49621.
65. Terzano C, Romani S, Conti V, Paone G, Oriolo F, Vitarelli A. Atrial fibrillation in the acute, hypercapnic exacerbations of COPD. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(19):2908-17.
66. Laratta CR, van Eeden S. Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: cardiovascular links. *Biomed Res Int.* 2014;2014:528789. doi: 10.1155/2014/528789.
67. Donaldson GC, Hurst JR, Smith CJ, Hubbard RB, Wedzicha JA. Increased risk of myocardial infarction and stroke following exacerbation of COPD. *Chest.* 2010;137(5):1091-7. doi: 10.1378/chest.09-2029.

68. Abusaid GH, Barbagelata A, Tuero E, Mahmood A, Sharma G. Diastolic dysfunction and COPD exacerbation. *Postgrad Med.* 2009;121(4):76-81. doi: 10.3810/pgm.2009.07.2033.
69. Baum C, Ojeda FM, Wild PS, Rzayeva N, Zeller T, Sinning CR, i sur. Subclinical impairment of lung function is related to mild cardiac dysfunction and manifest heart failure in the general population. *Int J Cardiol.* 2016;218:298-304. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.05.034.
70. Chen YW, Ramsook AH, Coxson HO, Bon J, Reid WD. Prevalence and Risk Factors for Osteoporosis in Individuals With COPD: A Systematic Review and Meta-analysis. *Chest.* 2019 Dec;156(6):1092-1110. doi: 10.1016/j.chest.2019.06.036.
71. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J.* 2008; 32(4):962-9. doi: 10.1183/09031936.00012408.
72. Mete B, Pehlivan E, Gülbaş G, Günen H. Prevalence of malnutrition in COPD and its relationship with the parameters related to disease severity. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018; 13:3307-3312. doi: 10.2147/COPD.S179609.
73. Tkacova R. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: may adipose tissue play a role? Review of the literature and future perspectives. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:585989. doi: 10.1155/2010/585989.
74. Eapen MS, Hansbro PM, Larsson-Callerfelt AK, Jolly MK, Myers S, Sharma P, i sur. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: Underlying Pathophysiology and New Therapeutic Modalities. *Drugs.* 2018; 78(16):1717-1740. doi: 10.1007/s40265-018-1001-8.
75. Yohannes AM, Alexopoulos GS. Depression and anxiety in patients with COPD. *Eur Respir Rev.* 2014; 23(133):345-9. doi: 10.1183/09059180.00007813.
76. Lee AL, Goldstein RS. Gastroesophageal reflux disease in COPD: links and risks. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015; 10:1935-49. doi: 10.2147/COPD.S77562.
77. Brown JP, Martinez CH. Chronic obstructive pulmonary disease comorbidities. *Curr Opin Pulm Med* 2016; 22 (2):113-8. doi: 10.1097/MCP.0000000000000241
78. Joppa P, Petrasova D, Stancak B, Tkacova R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest.* 2006;130(2):326-33. doi: 10.1378/chest.130.2.326.
79. Camiciottoli G, Bigazzi F, Magni C, Bonti V, Diciotti S, Bartolucci M, i sur. Prevalence of comorbidities according to predominant phenotype and severity of chronic obstructive

- pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:2229-2236. doi: 10.2147/COPD.S111724.
80. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)*. 2010;105(1):4-13. doi: 10.1038/hdy.2010.54.
  81. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med*. 2009;27(5):351-7. doi: 10.1055/s-0029-1237423
  82. Hassler MR, Redl E, Hudson QJ, Miller WJ, Egger G. Basic epigenetic mechanisms and phenomena. *Drug Discovery in Cancer Epigenetics*. Academic Press; 2016.
  83. Li Y. Modern epigenetics methods in biological research. *Methods* 2021; 187:104-113. doi: 10.1016/j.ymeth.2020.06.022.
  84. Chen X, Yan F, Lin X, Shi L, Wang X, Zeng Y. DNA Methylation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1255:83-98. doi: 10.1007/978-981-15-4494-1\_7.
  85. Song Q, Chen P, Liu XM. The role of cigarette smoke-induced pulmonary vascular endothelial cell apoptosis in COPD. *Respir Res*. 2021;22(1):39. doi: 10.1186/s12931-021-01630-1.
  86. Avcı E, Sarvari P, Savai R, Seeger W, Pullamsetti SS. Epigenetic Mechanisms in Parenchymal Lung Diseases: Bystanders or Therapeutic Targets? *Int J Mol Sci*. 2022;23(1):546. doi: 10.3390/ijms23010546.
  87. Biémont C. From genotype to phenotype. What do epigenetics and epigenomics tell us? *Heredity (Edinb)*. 2010;105(1):1-3. doi: 10.1038/hdy.2010.66.
  88. Scoditti E, Massaro M, Garbarino S, Toraldo DM. Role of Diet in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Prevention and Treatment. *Nutrients*. 2019;11(6):1357. doi: 10.3390/nu11061357.
  89. Varraso R, Shaheen S O. Could a healthy diet attenuate COPD risk in smokers? *Thorax* 2017;n2:491-492. <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209608>
  90. Benincasa G, DeMeo DL, Glass, K, Silverman EK, Napoli C. Epigenetics and pulmonary diseases in the horizon of precision medicine: a review. *Eur Respir J* 2021; 57 (6):2003406; doi: 10.1183/13993003.03406-2020
  91. de Vries M, Nedeljkovic I, van der Plaat DA, Zhernakova A, Lahousse L, Brusselle GG i sur. DNA methylation is associated with lung function in never smokers. *Respir Res*. 2019;20(1):268. doi: 10.1186/s12931-019-1222-8.

92. Sakao S, Tatsumi K. The importance of epigenetics in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2011;16(7):1056-63. doi: 10.1111/j.1440-1843.2011.02032.
93. den Dekker HT, Burrows K, Felix JF, Salas LA, Nedeljkovic I, Yao J, i sur. Newborn DNA-methylation, childhood lung function, and the risks of asthma and COPD across the life course. *Eur Respir J*. 2019; 53(4):1801795. doi: 10.1183/13993003.01795-2018.
94. Qiu W, Baccarelli A, Carey VJ, Boutaoui N, Bacherman H, Klanderman B, i sur. Variable DNA methylation is associated with chronic obstructive pulmonary disease and lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(4):373-81. doi: 10.1164/rccm.201108-1382OC.
95. Zong DD, Ouyang RY, Chen P. Epigenetic mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(5):844-56.
96. Chen R, Qiao L, Li H, Zhao Y, Zhang Y, Xu W, i sur. Fine Particulate Matter Constituents, Nitric Oxide Synthase DNA Methylation and Exhaled Nitric Oxide. *Environ Sci Technol*. 2015; 49(19):11859-65. doi: 10.1021/acs.est.5b02527.
97. Du,X, Yuan L, Wu M, Men M, He R, Wang L, i sur. Variable DNA methylation of aging-related genes is associated with male COPD. *Respir Res* 2020; 20: 243 doi:10.1186/s12931-019-1215-7
98. Zinellu A, Sotgiu E, Fois AG, Zinellu E, Sotgia S, Ena S, i sur. Blood global DNA methylation is decreased in non-severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. *Pulm Pharmacol Ther*. 2017; 46:11-15. doi: 10.1016/j.pupt.2017.08.006.
99. Zinellu E, Zinellu A, Fois AG, Carru C, Pirina P. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Respir Res*. 2016; 17(1):150. doi: 10.1186/s12931-016-0471-z.
100. Regan EA, Hersh CP, Castaldi PJ, DeMeo DL, Silverman EK, Crapo JD, i sur. Omics and the Search for Blood Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Insights from COPDGene. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019; 61(2):143-149. doi: 10.1165/rcmb.2018-0245PS.
101. Bestall JC,Paul EA,Garrod,et al.Usefulness of Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease.*Thorax* 1999;54:581-6
102. Natori H, Kawayama T, Suetomo M, Kinoshita T, Matsuoka M, Matsunaga K, i sur. Evaluation of the Modified Medical Research Council Dyspnea Scale for Predicting Hospitalization and Exacerbation in Japanese Patients with Chronic Obstructive



- Pulmonary Disease. *Intern Med.* 2016; 55(1):15-24. doi: 10.2169/internalmedicine.55.4490.
103. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WH, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur Respir J.* 2009; 34(3):648-54. doi: 10.1183/09031936.00102509.
  104. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1999; 54(7):581-6. doi: 10.1136/thx.54.7.581.
  105. Jones P, Shukla S, Tombs L, Ismaila A, Martin A, Midwinter D, i sur. Predicting SGRQ score based on CAT score: post-hoc analysis of the IMPACT trial. *Eur Respir J*; 2021; 58 (suppl 65) PA794; DOI: 10.1183/13993003.congress-2021.PA794
  106. Pisi R, Aiello M, Calzetta L, Frizzelli A, Tzani P, Bertorelli G, i sur. The COPD assessment test and the modified Medical Research Council scale are not equivalent when related to the maximal exercise capacity in COPD patients. *Pulmonology* 2021; Dostupno online 5 July 2021, in press. , Datum pristupa 19.10.2022. doi: 10.1016/j.pulmoe.2021.06.001.
  107. Marendić M, Polić N, Matek H, Oršulić L, Polašek O, Kolčić I. Mediterranean diet assessment challenges: Validation of the Croatian Version of the 14-item Mediterranean Diet Serving Score (MDSS) Questionnaire. *PLoS One.* 2021 Mar 1;16(3):e0247269. doi: 10.1371/journal.pone.0247269.
  108. Johns DP, Walters JA, Walters EH. Diagnosis and early detection of COPD using spirometry. *J Thorac Dis.* 2014; 6(11):1557-69. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.08.18. PMID: 25478197; PMCID: PMC4255165.
  109. Graham BL, Brusasco V, Burgos F, Cooper BG, Jensen R, Kendrick A, i sur. 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J.* 2017; 49(1):1600016. doi: 10.1183/13993003.00016-2016. Erratum in: *Eur Respir J.* 2018;52(5).
  110. Modi P; Cascella M. Diffusing Capacity Of The Lungs For Carbon Monoxide. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556149/>. Datum pristupa: 19.10.2022.
  111. Goldman L. *Goldman Cecil Medicine.* 24. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. Dostupno na: <http://www.us.elsevierhealth.com/Medicine/Internal-Medicine/book/9781437716047/Goldmans-Cecil-Medicine/>. Datum pristupa 19.10.2022.

112. Maniscalco M, Vitale C, Vatrella A, Molino A, Bianco A, Mazzeo G. Fractional exhaled nitric oxide-measuring devices: technology update. *Med Devices (Auckl)*. 2016;9:151-60. doi: 10.2147/MDER.S91201.
113. Henkens IR, Scherptong RW, van Kralingen KW, Said SA, Vliegen HW. Pulmonary hypertension: the role of the electrocardiogram. *Neth Heart J*. 2008; 16(7-8):250-4. doi: 10.1007/BF03086156.
114. Howard LS, Grapsa J, Dawson D, Bellamy M, Chambers JB, Masani ND i sur. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: standard operating procedure. *Eur Respir Rev* 2012; 21(125):239-48. doi: 10.1183/09059180.00003912. Erratum in: *Eur Respir Rev*. 2012; 21(126):370.
115. O'Brien C, Guest PJ, Hill SL, Stockley RA. Physiological and radiological characterisation of patients diagnosed with chronic obstructive pulmonary disease in primary care. *Thorax*. 2000; 55(8):635-42. doi: 10.1136/thorax.55.8.635.
116. Falaschi F, Miniati M, Battolla L, Filippi E, Sostman HD, Laiolo E, i sur. Quantificazione dell'enfisema polmonare mediante Tomografia Computerizzata. Confronto tra diversi metodi [Quantification of pulmonary emphysema with computerized tomography. Comparison with various methods]. *Radiol Med*. 1995; 90(1-2):16-23.
117. Bankier AA, Madani A, Gevenois PA. CT quantification of pulmonary emphysema: assessment of lung structure and function. *Crit Rev Comput Tomogr*. 2002; 43(6):399-417.
118. Mohamed Hoesein FA, de Jong PA, Lammers JW, Mali WP, Schmidt M, de Koning HJ, i sur. Computed tomography structural lung changes in discordant airflow limitation. *PLoS One*. 2013; 8(6):e65177. doi: 10.1371/journal.pone.0065177.
119. RAND Health Care. 36-Item Short Form Survey (SF-36). Dostupno na adresi: [https://www.rand.org/health-care/surveys\\_tools/mos/36-item-short-form.html](https://www.rand.org/health-care/surveys_tools/mos/36-item-short-form.html). Datum pristupa 19.10 2022.
120. Burholt V, Nash P. Short Form 36 (SF-36) Health Survey Questionnaire: normative data for Wales. *J Public Health (Oxf)*. 2011; 33(4):587-603. doi: 10.1093/pubmed/fdr006.
121. Maslić Sersić D, Vuletić G. Psychometric evaluation and establishing norms of Croatian SF-36 health survey: framework for subjective health research. *Croat Med J*. 2006; 47(1):95-102.
122. Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*. 1992; 30(6):473-83.

123. Jones PW, Quirk FH, Baveystock CM, Littlejohns P. A self-complete measure of health status for chronic airflow limitation. The St. George's Respiratory Questionnaire. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145(6):1321-7. doi: 10.1164/ajrccm/145.6.1321.
124. Gosselt HR, Griffioen PH, van Zelst BD, Oosterom N, de Jonge R, Heil SG. Global DNA (hydroxy)methylation is stable over time under several storage conditions and temperatures. *Epigenetics.* 2021;16(1):45-53. doi: 10.1080/15592294.2020.1786318.
125. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. *Statistical methods in medical research.* 4. Wiley-Blackwell. 2001.
126. Daniel W.W. Cross CL. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences.* 10. John Wiley & Sons, Inc. 2012.
127. Grosbois JM, Gephine S, Kyheng M, Henguelle J, Le Rouzic O, Saey D, i sur. Physical and affective components of dyspnoea are improved by pulmonary rehabilitation in COPD. *BMJ Open Respir Res* 2022; 9:e001160. doi: 10.1136/bmjresp-2021-001160
128. Nie YC, Wu H, Li PB, Luo YL, Zhang CC, Shen JG, i sur. Characteristic comparison of three rat models induced by cigarette smoke or combined with LPS: to establish a suitable model for study of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 2012; 25(5):349-56. doi: 10.1016/j.pupt.2012.06.004.
129. Karrasch S, Holz O, Jörres RA. Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respiratory Medicine* 2008; 102:1215-30 doi:10.1016/j.rmed.2008.04.013.
130. Niu S, Wang S. Xu X et Yu L. Is the Symptom of Cough in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Important? *J COPD* 2021; 18:123:8. doi: 10.1080/15412555.2020.1856803
131. Burney P, Jithoo A, Kato B, Janson C, Mannino D, Nizankowska-Mogilnicka E, i sur. Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study. Chronic obstructive pulmonary disease mortality and prevalence: the associations with smoking and poverty--a BOLD analysis. *Thorax.* 2014; 69(5):465-73. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-204460.
132. Tan WC, Sin DD, Bourbeau J, Hernandez P, Chapman KR, Cowie R, i sur. Characteristics of COPD in never-smokers and ever-smokers in the general population: results from the CanCOLD study. *Thorax.* 2015;70(9):822-9. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-206938.
133. Rokoff LB, Koutrakis P, Garshick E, Karagas MR, Oken E, Gold DR, i sur. Wood Stove Pollution in the Developed World: A Case to Raise Awareness Among Pediatricians.

- Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2017; 47(6):123-141. doi: 10.1016/j.cppeds.2017.04.001.
134. Lee H, Jhun BW, Cho J, Yoo KH, Lee JH, Kim DK, i sur. Different impacts of respiratory symptoms and comorbidities on COPD-specific health-related quality of life by COPD severity. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017; 12:3301-3310. doi: 10.2147/COPD.S145910.
  135. Rawal G, Yadav S. Nutrition in chronic obstructive pulmonary disease: A review. *J Transl Int Med*. 2015; 3(4):151-154. doi: 10.1515/jtim-2015-0021.
  136. Kaluza J, Larsson SC, Orsini N, Linden A, Wolk A. Fruit and vegetable consumption and risk of COPD: a prospective cohort study of men. *Thorax*. 2017; 72(6):500-509. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207851.
  137. Scoditti E, Massaro M, Garbarino S, Toraldo DM. Role of Diet in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Prevention and Treatment. *Nutrients*. 2019; 11(6):1357. doi: 10.3390/nu11061357.
  138. Negewo NA, Gibson PG, McDonald VM. COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms. *Respirology*. 2015;20(8):1160-71. doi: 10.1111/resp.12642.
  139. Licher S, Heshmatollah A, van der Willik KD, Stricker BHC, Ruitter R, de Roos EW, i sur. Lifetime risk and multimorbidity of non-communicable diseases and disease-free life expectancy in the general population: A population-based cohort study. *PLoS Med*. 2019; 16(2):e1002741. doi: 10.1371/journal.pmed.1002741.
  140. Takahashi S, Betsuyaku T. The chronic obstructive pulmonary disease comorbidity spectrum in Japan differs from that in western countries. *Respir Investig* 2015; 53: 259–270.
  141. Zaninović K, Gajić-Čopka M, Perčec Tadić M, Vučević M, Milković J, Bojić A i sur. Klimatski atlas Hrvatske/Climate atlas of Croatia 1961-1990,1971-2000. Zagreb: Državni hidrometeorološki zavod; 2008.
  142. Mu Z, Chen PL, Geng FH, Ren L, Gu WC, Ma JY, i sur. Synergistic effects of temperature and humidity on the symptoms of COPD patients. *Int J Biometeorol*. 2017;61(11):1919-1925. doi: 10.1007/s00484-017-1379-0
  143. Bao HR, Liu XJ, Tan EL, Shu J, Dong JY, Li S. [Effects of temperature and relative humidity on the number of outpatients with chronic obstructive pulmonary disease and their interaction effect in Lanzhou, China]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2020 ;52(2):308-316. Chinese. doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2020.02.019.

144. Walker J, Gilchrist F, Carroll W. Less sun, more cough: Annual hours of sunshine are inversely associated with hospital admissions for children with lower respiratory tract infection. *Eur Respir J* 2019; 54: OA4970; DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.OA4970
145. Janssens W, Decramer M, Mathieu C, Korf H. Vitamin D and chronic obstructive pulmonary disease: hype or reality? *Lancet Respir Med*. 2013;1(10):804-12. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70102-4.
146. Skaaby T, Husemoen LL, Thuesen BH, Pisinger C, Jørgensen T, Fenger RV, i sur. Vitamin D status and chronic obstructive pulmonary disease: a prospective general population study. *PLoS One*. 2014; 9(3):e90654. doi: 10.1371/journal.pone.0090654.
147. Danik JS, Manson JE. Vitamin d and cardiovascular disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2012; 14(4):414-24. doi: 10.1007/s11936-012-0183-8.
148. Wacker M, Holick MF. Sunlight and vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol*. 2013; 5(1):51-108. doi:10.4161/derm.24494.
149. Penckofer S, Kouba J, Byrn M, Estwing Ferrans C. Vitamin D and depression: where is all the sunshine?. *Issues Ment Health Nurs*. 2010; 31(6):385-393. doi:10.3109/01612840903437657.
150. Celli BR, Agustí A. COPD: time to improve its taxonomy? *ERJ Open Res* 2018; 4(1):00132-2017. doi: 10.1183/23120541.00132-2017.
151. He LX, Tang ZH, Huang QS, Wei-Hong L. DNA Methylation: A Potential Biomarker of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front. Cell Dev. Biol*. 2020. doi:10.3389/fcell.2020.00585.
152. Wain LV, Shrine N, Miller S, Jackson VE, Ntalla I, Soler Artigas M, i sur. Novel insights into the genetics of smoking behaviour, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease (UK BiLEVE): a genetic association study in UK Biobank. *Lancet Respir Med*. 2015; 3(10):769-81. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00283-0.
153. Mutirangura A. A Hypothesis to Explain How the DNA of Elderly People Is Prone to Damage: Genome-Wide Hypomethylation Drives Genomic Instability in the Elderly by Reducing Youth-Associated Gnome-Stabilizing DNA Gaps. Meccariello R. *Epigenetics [Internet]*. London: IntechOpen; 2018. doi: 10.5772/intechopen.83372. Dostupno na adresi: <https://www.intechopen.com/chapters/65059>. Datum pristupa 19.10.2022.
154. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*. 1998; 395(6697):89-93. doi: 10.1038/25779.

155. Ou HL, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood*. 2018; 131(5):488-495. doi: 10.1182/blood-2017-07-746396.
156. Rodger EJ, Almomani SN, Ludgate JL, Stockwell PA, Baguley BC, Eccles MR, i sur. Comparison of Global DNA Methylation Patterns in Human Melanoma Tissues and Their Derivative Cell Lines. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(9):2123. doi: 10.3390/cancers13092123.
157. Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, i sur. Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull*. 2016; 42(2):406-14. doi: 10.1093/schbul/sbv074.
158. Rüter B, Wijermans PW, Lübbert M. DNA methylation as a therapeutic target in hematologic disorders: recent results in older patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2004; 80(2):128-35. doi: 10.1532/ijh97.04094.
159. Ramos RB, Fabris V, Lecke SB, Maturana MA, Spritzer PM. Association between global leukocyte DNA methylation and cardiovascular risk in postmenopausal women. *BMC Med Genet* 2016; 17: 71. doi: 10.1186/s12881-016-0335-x
160. Reszka E, Jabłońska E, Lesicka M, Wiczorek E, Kapelski P, Szczepankiewicz A, i sur. An altered global DNA methylation status in women with depression. *J Psychiatr Res*. 2021;137:283-289. doi: 10.1016/j.jpsychires.2021.03.003.
161. Faner R, Tal-Singer R, Riley JH, Celli B, Vestbo J, MacNee W, i sur. ECLIPSE Study Investigators. Lessons from ECLIPSE: a review of COPD biomarkers. *Thorax*. 2014; 69(7):666-72. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-204778
162. Baglietto L, Ponzi E, Haycock P, Hodge A, Bianca Assumma M, Jung CH, i sur. DNA methylation changes measured in pre-diagnostic peripheral blood samples are associated with smoking and lung cancer risk. *Int J Cancer*. 2017; 140(1):50-61. doi: 10.1002/ijc.30431.
163. Prince C, Hammerton G, Taylor AE, Anderson EL, Timpson NJ, Davey Smith G, Munafò MR, Relton CL, Richmond RC. Investigating the impact of cigarette smoking behaviours on DNA methylation patterns in adolescence. *Hum Mol Genet*. 2019 Jan 1;28(1):155-165. doi: 10.1093/hmg/ddy316.
164. Qiu W, Wan E, Morrow J, Cho MH, Crapo JD, Silverman EK, DeMeo DL. The impact of genetic variation and cigarette smoke on DNA methylation in current and former smokers from the COPDGene study. *Epigenetics*. 2015; 10(11):1064-73. doi: 10.1080/15592294.2015.1106672.

165. Joehanes R, Just AC, Marioni RE, Pilling LC, Reynolds LM, Mandaviya PR, i sur. Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016 Oct; 9(5):436-447. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001506.
166. Bermingham ML, Walker RM, Marioni RE, Morris SW, Rawlik K, Zeng Y, i sur. Identification of novel differentially methylated sites with potential as clinical predictors of impaired respiratory function and COPD. *EBioMedicine*. 2019; 43:576-586. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.072.
167. Nishiyama A, Nakanishi M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends Genet*. 2021; 37(11):1012-1027. doi: 10.1016/j.tig.2021.05.002.
168. Levenson VV. DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010; 10(4):481-8. doi: 10.1586/erm.10.17.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Eugenija Basioli Kasap

Datum i mjesto rođenja: 30.3.1971. Zadar, Hrvatska

Nacionalnost: Hrvatica

Državljanstvo: Hrvatsko

Bračni status: udana, majka dvoje djece ( Jure r. 2000., Lucija r. 2005.)

Adresa: Domovinskog rata 8, Zadar, Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Telefon: +385 98 33 22 10

Email: eugenija.kasap@gmail.com

### ŠKOLOVANJE

- 2018. upisala Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i Zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Sveučilište J.J. Strossmayera, Osijek Smjer: Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i Zdravstvo
- 2018. završila tečaj spirometrije Europskog respiratrnog društva
- 2013. na Sveučilištu u Zadru završila sam Program stručnog usavršavanja visokoškolskih nastavnika
- 2009. položila sam subspecijalističi ispit iz pulmologije na Klinici za plućne bolesti Jordanovac, Klinički bolnički centar Zagreb u Zagrebu
- 2005. položila sam specijalistički ispit iz interne medicine u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu
- 1995. završila sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i stekla zvanje doktora medicine
- 1989. završila sam Gimnaziju Jurija Barakovića u Zadru i stekla zvanje kemijski tehničar



## RADNO ISKUSTVO

- 2022. izabrana za nastavno suradničko zvanje asistenta iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti, znanstvene grane interne medicine na Katedri za kliničku medicinu Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek
- Od 2009. radim kao internist - pulmolog na Odjelu za plućne bolesti Opće bolnice Zadar. Od 2018. Voditelj Poliklinike za interne bolesti , Službe za interne bolesti
- Od 2008. do 2015. radila sam kao asistent na Farmakologiji, Odjela za zdravstvene studije Sveučilišta u Zadru
- Od 2000. do 2005. dio specijalizacije iz Interne medicine, za Opću bolnicu Zadar, provela sam na KB Sestre Milosrdnice, a potom od 2007 do 2009. subspecijalizaciju nastavila na KB Jordanovac KCB Zagreb.
- Od 1998. do 2000. radila sam kao liječnik - sekundarac na Odjelu za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju Opće bolnice Zadar
- Od 1996. do 1998. obavila sam staž u KB Merkur u Zagrebu

## POPIS RADOVA I AKTIVNO SUDJELOVANJE NA SKUPOVIMA

1. Grle SP, Lampalo M, Cincar SŠ, Kardum LB, Gudelj I, Kasap EB et al. Attitudes of Croatian pulmonologists concerning obstacles to earlier, more appropriate use of biologics in severe asthma: Survey results. PLoS ONE. 2021;16. doi:10.1371/journal.pone.0253468
2. Alić J, Basioli Kasap E, Jenko Miholić S. Relationship between students physical activity and self- perceived health status. Med. Jad. 2021; 51(4) 347-355
3. Škrinjarić - Cincar S, Basioli Kasap E. Prepoznajemo li bolesnika s KOPB-om i astmom na vrijeme? Medicus 2021; 30(2):145-8.
4. Škrinjarić - Cincar S, Basioli Kasap E. Važnost personaliziranog akcijskog plana u liječenju astme. Pliva med net 2021.
5. Pavliša G, Alfrević- Ungarov T, Kasap E. Neinvazivna mehanička ventilacija u bolesnika s kroničnom opstruktivnom bolesti pluća. Med. Jad. 2011; 41:135-141.

6. Včev A, Begić I, Ražov-Radas M, Klarin I, Patrk J, Basioli Kasap E. Tumori jednjaka. *Medix* 2009; 82.
7. Dokoza M, Pavić I, Basioli Kasap E. Plućni sekvestar. 6. kongres Hrvatskog pulmološkog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem. Dubrovnik 2014.
8. Basioli Kasap E, Matas Z, Dokoza. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration in diagnosing and staging of lung cancer. 5. kongres Hrvatskog torakalnog društva Torax. Zagreb 2015. (poster)
9. Šatalić L, Basioli Kasap E. Kašalj kao simptom. XII Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije s međunarodnim sudjelovanjem. Komiža 2017.
10. Popović-Grle S, Basioli Kasap E. Reslizumab i teška astma-odabir pravog pacijenta. Prikaz slučaja. 8. Kongres Hrvatskog torakalnog društva Toraks. Zagreb 2018.
11. Basioli Kasap E, Dokoza M, Tolić A. Mislimo li na pluća dok liječimo upalne bolesti crijeva? XIV poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije. Komiža 2019.
12. Basioli Kasap E. Škola kašlja. Hrvatsko torakalno društvo. Zagreb 2020.
13. Basioli Kasap E. Case reports. 2nd South Eastern European Joint meeting on severe asthma. Severe asthma Forum SAF. Zagreb 2019.
14. Basioli Kasap E; Tolić A, Dokoza M, Karamarković Lazaraušić N. Limfangioleiomiomatoza s tuberoznom sklerozom ili bez nje. XV. poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije. Komiža 2022.
15. Kasap E. Koliko dugo primjenjivati biološku terapiju u astmi - sigurnosni aspekti. 52.godišnji stručno-znanstveni skup Hrvatskog pulmološkog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem. Rovinj 2021.
16. Basioli Kasap E, Škrinjarić Cincar S, Dokoza M, Posavi A. Mogući utjecaj podneblja na karakteristike bolesnika s KOPB-om; 12. kongres Hrvatskog torakalnog društva Torax. Zagreb 2022. (poster)
17. Basioli Kasap E, Benček F, Dokoza M, Morović D, Lisica –Šikić Nataša. Spontani pneumotoraks - prvi znak karcinoma pluća. 8. kongres Hrvatskog pulmološkog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem. Dubrovnik 2022.
18. Basioli Kasap E, Glavaš Obrovac LJ, Mihaljević I, Posavi A, Škrinjarić Cincar S. Difference in clinical characteristics of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Osijek and Zadar and possible association with global DNA-methylation as an epigenetic biomarker. *Acta Clinica Croatica* - rad prihvaćen za objavu

19. Popović Grle S, Vrbica Ž, Škrinjarić- Cincar S, Bulat Kardum LJ, Miculinić N, Basioli Kasap E, Lampalo M, Ljubičić Đ, Mladinov S, Gomerčić Palčić M: Hrvatske smjernice za liječenje astme. HPD HLZ. 2022.

#### ČLANSTVA:

European Respiratory Society

Hrvatsko pulmološko društvo (HPD) - od 2022. član upravnog odbora društva

Hrvatsko torakalno društvo (HTD)

#### VJEŠTINE

Računalne vještine: MS Office paketa

Strani jezici: Govorim engleski jezik i služim se talijanskim jezikom

Vozačka dozvola: A1 ,A2 ,B, F, G kategorije

**12. PRILOZI**

1. Test za procjenu stupnja zaduhe (mMRC- modified Medical Reserch Scale)
2. Test za procjenu KOPB-a (CAT- COPD Assessment Test)
3. Obrazac o uvjetima i načinu života
4. Upitnik za sveobuhvatnu procjenu kvalitete života povezane sa zdravstvenim stanjem (SF-36- Short Form -36)
5. Upitnik bolnice St. George specifičan za respiratorne bolesti (SRGQ- Saint George Respiratory Questionnaire)

Test za procjenu stupnja zaduhe (mMRC- modified Medical Reserch Scale)

<b>Modificirana ljestvica zaduhe britanskoga Medicinskog istraživačkog vijeća</b>	
<b>Stupanj</b>	<b>Opis zaduhe</b>
<b>mMRC Stupanj 0</b>	Imam problem s nedostatkom daha kod napornog vježbanja.
<b>mMRC Stupanj 1</b>	Imam nedostatak zraka kada hodam brzo na ravnom tlu ili pri blagoj uzbrdici.
<b>mMRC Stupanj 2</b>	Na ravnom hodam sporije od osoba iste dobi zbog nedostatka zraka ili se zaustavim i uhvatim dah kad hodam određenom brzinom po ravnom.
<b>mMRC Stupanj 3</b>	Ostajem bez daha i zaustavljam se nakon šetnje od 100 metara ili nakon nekoliko minuta hodanja na ravnoj površini.
<b>mMRC Stupanj 4</b>	Ostajem bez daha u tolikoj mjeri da ne izlazim iz kuće ili ostajem bez daha kod odijevanja ili razodijevanja.

## Test za procjenu KOPB-a (CAT- COPD Assessment Test)



### Kako je Vaša KOPB? Ispunite Test za procjenu KOPB™ (CAT)

Ovaj će upitnik pomoći Vama i Vašemu zdravstvenom djelatniku u mjerenju utjecaja KOPB (kronične opstruktivne plućne bolesti) na Vaše tjelesno i mentalno zdravlje te svakodnevno funkcioniranje. Vaši će odgovori, kao i ukupan rezultat na testu, koristiti Vama i Vašemu zdravstvenom djelatniku kao pomoć u poboljšanju zbrinjavanja Vaše KOPB i dobivanju najveće moguće koristi od liječenja.

Ukoliko želite ispuniti upitnik ispunjavajući odgovore rukom na papir, **kliknite ovdje** te isprintajte upitnik.

Za svaku tvrdnju navedenu ispod, označite (znakom X) kućicu koja Vas TRENUTNO najbolje opisuje. Pazite da za svako pitanje odaberete samo jedan odgovor.

**Primjer:** Jako sam sretan/sretna  0  1  2  3  4  5 Jako sam tužan/tužna

REZULTAT

Nikada ne kašljem	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Stalno kašljem	<input type="radio"/>
Uopće nemam sekreta (sluzi) u plućima	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Moja su pluća u cijelosti puna sekreta (sluzi)	<input type="radio"/>
Uopće ne osjećam stezanje u prsnom košu	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Osjećam jako stezanje u prsnom košu	<input type="radio"/>
Kada se penjem uzbrdo ili po stepenicama ne nedostaje mi zraka	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Kada se penjem uzbrdo ili po stepenicama jako mi nedostaje zraka	<input type="radio"/>
Nisam ograničen/ograničena u obavljanju bilo kojih kućanskih aktivnosti	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Vrlo sam ograničen/ograničena u obavljanju kućanskih aktivnosti	<input type="radio"/>
S povjerenjem izlazim iz kuće bez obzira na svoju plućnu bolest	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Uopće nemam povjerenja kad izlazim iz kuće zbog svoje plućne bolesti	<input type="radio"/>
Čvrsto spavam	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Ne spavam čvrsto zbog svoje plućne bolesti	<input type="radio"/>
Imam puno energije	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Uopće nemam energije	<input type="radio"/>
<b>UKUPAN REZULTAT</b>			<input type="radio"/>

## Obrazac o uvjetima i načinu života

### OBRAZAC O UVJETIMA I NAČINU ŽIVOTA

Datum:

Godina rođenja:

Dob u kojoj je prvi put dijagnosticiran KOPB:

Spol:

1. Ženski
2. Muški

Tjelesna težina:

Tjelesna visina:

BMI:

U OVOM OBRASCU NAVEDENA SU PITANJA KOJA SE ODOSE NA UVJETE ŽIVOTA I ŽIVOTNE NAVIKE SVAKO PITANJE PAŽLJIVO PROČITAJTE I ISKRENO ODGOVORITE. ISPUNJAVANJE JE ANONIMNO I KORISTI ĆE SE U ZNANSTVENE SVRHE.

- Koji ste najviši stupanj obrazovanja postigli:

1. Nezavršena osnovna škola
2. Osnovna škola
3. Srednja škola
4. Viša ili visoka škola
5. Magisterij, doktorat znanosti

- Što ste po zanimanju:

1. Poljoprivrednik
2. Radnik
3. Službenik
4. Obrtnik
5. Rukovodeći službenik
6. Poduzetnik
7. Stručnjak
8. Slobodna profesija
9. Nešto drugo

- Kakav je Vaš radni status:

1. Zaposlen
2. Nezaposlen
3. Umirovljen

- Gdje živite:

1. Grad
2. Selo

- Da li ste tijekom života Vi osobno, Vaš otac i Vaša majka radili na niže navedenim poslovima (radno mjesto):

Vi

Otac

Majka

1. Rad na strojevima za obradu metala (radnici u rudnicima i kamenolomima, na metalurškim pećima i strojevima za obradu metala)
  2. Rad na strojevima i uređajima za proizvodnju kemijskih proizvoda i foto-materijala
  3. Rad na strojevima za preradu gume, plastike, papira, drva, tekstila, kože i krzna
  4. Rad na građevinskim i srodnim zanimanjima (zidari, kamenoklesari, keramičari, stolari, vodoinstalateri, soboslikari)
  5. Proizvodnja i prerada prehrambenih proizvoda (pekari, slastičari, mesari)
  6. Vatrogasci
- Jeste li se tijekom života selili:
    1. Nisam se selio
    2. Da, u drugo mjesto unutar županije
    3. Da, u drugu županiju



4. Da, u drugu državu
- Kako bi procijenili uvijete u kojima stanujete:
    1. Dosta lošije nego kod većine
    2. Nešto lošije nego kod većine
    3. Kao kod većine
    4. Nešto bolje nego kod većine
    5. Dosta bolje nego kod većine
  
  - Čime se grijete kod kuće:
    1. Na drva
    2. Na struju
    3. Na drva i na struju
    4. Ostalo
  
  - Ovdje su navedena neka pitanja o vašim prehrambenim navikama. Odgovorite koliko često konzumirate navedene skupine namjernica tako da zaokružite broj ispod ponuđenog odgovore:

Namirnica	Nekoliko puta dnevno	Svaki dan	Nekoliko Puta tjedno	Jedan put tjedno	Nekoliko puta mjesečno	Jednom mjesečno	Rijetko	Nikad
VOĆE	1	2	3	4	5	6	7	8
POVRĆE	1	2	3	4	5	6	7	8
MESO	1	2	3	4	5	6	7	8
RIBA	1	2	3	4	5	6	7	8
UGLJIKO-HIDRATI	1	2	3	4	5	6	7	8
MLIJEČNI PROIZVODI	1	2	3	4	5	7	7	8
ALKOHOL	1	2	3	4	5	7	7	8

- Jeste li pušač?
  1. Aktivni pušač
  2. Bivši pušač
  3. Nepušač
  
- Ako ste pušač koliko cigareta prosječno popišite u jednom danu? Ako ste prestali pušiti koliko ste cigareta u prosijeku pušiti u jednom danu?
  1. Nisam pušio
  2. Jednu
  3. 3-5
  4. 6-10
  5. 11-20
  6. Više od 20
  
- S koliko ste godina počeli pušiti? \_\_\_\_\_
  
- Ako ste prestali s koliko godina? \_\_\_\_\_
  
- Imate li alergije (rinitis, konjuktivitis, dermatitis) ?
  1. Da
  2. Ne
  
- Da li vam je dijagnosticirana astma prije 40-te godine života?
  1. Da
  2. Ne
  
- Imate li zaduhu u naporu?
  1. Da
  2. Ne



A. Ukoliko ste imali pogoršanje KOPB-a, jeste li bili hospitalizirani i/ili pregledani u hitnoj službi:

1. Da
2. Ne

B. Ukoliko ste imali pogoršanje KOPB-a, jeste li uzimali oralne kortikosteroide i/ili antibiotike

1. Da
2. Ne

- Da li ste imali upalu pluća u posljednjih 12 mjeseci?

1. Da
2. Ne

- Da bolujete od nekih niže navedenih bolesti:

- |                         |       |       |
|-------------------------|-------|-------|
| 1. Karcinom pluća       | 1. Da | 2. Ne |
| 2. Drugi karcinomi      | 1. Da | 2. Ne |
| 3. Tuberkuloza pluća    | 1. Da | 2. Ne |
| 4. Zatajenje srca       | 1. Da | 2. Ne |
| 5. Fibrilacija atrijska | 1. Da | 2. Ne |
| 6. Hipertenzija         | 1. Da | 2. Ne |
| 7. Hiperlipidemija      | 1. Da | 2. Ne |
| 8. Koronarna bolest     | 1. Da | 2. Ne |
| 9. Moždani udar         | 1. Da | 2. Ne |
| 10. Demencija           | 1. Da | 2. Ne |
| 11. Depresija           | 1. Da | 2. Ne |
| 12. Anksioznost         | 1. Da | 2. Ne |
| 13. Ulkusna bolest/GERB | 1. Da | 2. Ne |
| 14. Šećerna bolest      | 1. Da | 2. Ne |
| 15. Bolesti jetre       | 1. Da | 2. Ne |
| 16. Bubrežne bolesti    | 1. Da | 2. Ne |
| 17. Anemija             | 1. Da | 2. Ne |

Upitnik za sveobuhvatnu procjenu kvalitete života povezane sa zdravstvenim stanjem (SF-36-Short Form -36)

-1-

**UPITNIK SF - 36**

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

Sada ću Vam postaviti nekoliko pitanja o Vašem zdravlju, te o onome što radite. Čitajte polako, slijedite tekst i ponovite ako je potrebno. Zaokružite točne odgovore.

1. Općenito, biste li rekli da je Vaše zdravlje : (zaokružite jedan odgovor)

izvrsno	1
vrlo dobro	2
dobro	3
zadovoljavajuće	4
loše	5

2. U usporedbi s prošlom godinom, kako biste sada ocijenili svoje zdravlje?  
(zaokružite jedan odgovor)

puno bolje nego prije godinu dana	1
malo bolje nego prije godinu dana	2
otprilike isto kao i prije godinu dana	3
malo lošije nego prije godinu dana	4
puno lošije nego prije godinu dana	5

Sljedeća pitanja se odnose na aktivnosti kojima se možda bavite tijekom jednog tipičnog dana.

Ograničava li Vas trenutno Vaše zdravlje u obavljanju tih aktivnosti?

Ako DA, u kojoj mjeri?

(zaokružite jedan broj u svakom redu)

AKTIVNOSTI	DA puno	DA malo	NE nimalo
3. fizički naporne aktivnosti, kao što su trčanje, podizanje teških predmeta, sudjelovanje u napornim sportovima	1	2	3
4. umjereno naporne aktivnosti, kao što su pomicanje stola, vožnja biciklom, bočanje i sl.	1	2	3
5. podizanje ili nošenje torbe s namirnicama	1	2	3
6. uspinjanje uz stepenice (nekoliko katova	1	2	3
7. uspinjanje uz stepenice (jedan kat)	1	2	3
8. saginjanje, klečanje ili pregibanje	1	2	3
9. hodanje više od 1 kilometra	1	2	3
10. hodanje oko pola kilometra	1	2	3
11. hodanje 100 metara	1	2	3
12. kupanje ili oblačenje	1	2	3

-2-

Jeste li u protekla 4 tjedna u svom radu ili drugim redovitim dnevnim aktivnostima imali neki od slijedećih problema zbog svog fizičkog zdravlja?

(zaokružite jedan broj u svakom redu)

	DA	NE
13. skratili ste vrijeme provedeno u radu i drugim aktivnostima	1	2
14. obavili ste manje nego što ste željeli	1	2
15. niste mogli obaviti neke poslove ili druge aktivnosti	1	2
16. imali ste poteškoća pri obavljanju posla ili nekih drugih aktivnosti (npr. morali ste uložiti dodatni trud)	1	2

Jeste li u protekla 4 tjedna imali neke od dolje navedenih problema na poslu ili pri obavljanju nekih drugih svakodnevnih aktivnosti zbog bilo kakvih emocionalnih problema (npr. osjećaj potištenosti ili tjeskobe)?

(zaokružite jedan broj u svakom redu)

	DA	NE
17. skratili ste vrijeme provedeno u radu ili drugim aktivnostima	1	2
18. obavili ste manje nego što ste željeli	1	2
19. niste obavili posao ili druge aktivnosti onako pažljivo kao obično	1	2

20. U kojoj su mjeri u protekla 4 tjedna Vaše fizičko zdravlje ili Vaši emocionalni problemi utjecali na Vaše uobičajene društvene aktivnosti u obitelji, s prijateljima, susjedima ili drugim ljudima?

(zaokružite jedan odgovor)

uopće ne	1
u manjoj mjeri	2
umjereno	3
prilično	4
izrazito	5

21. Kakve ste tjelesne bolove imali u protekla 4 tjedna?

(zaokružite jedan odgovor)

nikakve	1
vrlo blage	2
blage	3
umjerene	4
teške	5
vrlo teške	6

22. U kojoj su Vas mjeri ti bolovi u protekla 4 tjedna ometali na Vašem uobičajenom radu (uključujući rad izvan kuće i kućne poslove)?  
(zaokružite jedan odgovor)

uopće ne	1
malo	2
umjereno	3
prilično	4
izrazito	5

Sljedeća pitanja govore o tome kako se osjećate i kako ste se osjećali u protekla 4 tjedna. molim Vas da za svako pitanje odaberete po jedan odgovor koji će najbliže odrediti kako ste se osjećali.  
Koliko ste (se) vremena u protekla 4 tjedna:  
(zaokružite jedan odgovor u svakom redu)

	stalno	skoro uvijek	dobar dio vremena		povremeno	rijetko	nikada
23. osjećali puni života?	1	2	3		4	5	6
24. bili vrlo nervozni?	1	2	3		4	5	6
25. osjećali tako potištenim da Vas ništa nije moglo razvedriti?	1	2	3		4	5	6
26. osjećali spokojnim i mirnim?	1	2	3		4	5	6
27. bili puni energije?	1	2	3		4	5	6
28. osjećali malodušnim i tužnim?	1	2	3		4	5	6
29. osjećali iscrpljenim?	1	2	3		4	5	6
30. bili sretni?	1	2	3		4	5	6
31. osjećali umornim?	1	2	3	4		5	6

32. Koliko su Vas vremena u protekla 4 tjedna Važe fizičko zdravlje ili emocionalni problemi ometali u društvenim aktivnostima (npr. posjete prijateljima, rodbini i sl.)

stalno	1
skoro uvijek	2
povremeno	3
rijetko	4
nikada	5

Koliko je u Vašem slučaju TOČNA ili NETOČNA svaka od dolje navedenih tvrdnji?

(zaokružite jedan odgovor u svakom redu)

	potpuno tačno	uglavnom tačno	ne znam	uglavnom netočno	potpuno netočno
33. čini mi se da se razbolim lakše nego drugi ljudi	1	2	3	4	5
34. zdrav sam kao i bilo tko drugi koga poznam	1	2	3	4	5
35. mislim da će mi se zdravlje pogoršati	1	2	3	4	5
36. zdravlje mi je odlično	1	2	3	4	5

**HVALA**

PCS	PF _____	MCS	VT _____
	RP _____		SF _____
	BP _____		RE _____
	GH _____		MH _____
	2 _____		



Upitnik bolnice St. George specifičan za respiratorne bolesti (SRGQ- Saint George Respiratory Questionnaire)

**ST GEORGE'S RESPIRATORY QUESTIONNAIRE**

**UPITNIK BOLNICE ST. GEORGE O PROBLEMIMA S DISANJEM (SGRQ)**

*Ovaj upitnik oblikovan je kako bismo saznali mnogo više o vašim smetnjama s disanjem i o tome kako one ometaju vaš život. Koristimo ga kako bismo saznali koji vam oblici bolesti uzrokuju najviše problema, za razliku od onoga što liječnici i medicinske sestre misle da su vaši problemi.*

*Molimo vas pročitajte pažljivo upute i pitajte ako nešto ne razumijete. Nemojte puno razmišljati o vašem odgovoru.*

*Prije nego što popunite ostatak upitnika:*

*Molimo označite kvadratić koji najbolje opisuje vaše sadašnje zdravstveno stanje:*

Vrlo dobro    Dobro    Osrednje    Loše    Vrlo loše  
               

**Copyright reserved**  
P.W. Jones, PhD FRCP  
Professor of Respiratory Medicine,  
St. George's Hospital Medical School,  
Jenner Wing,  
Cranmer Terrace,  
London SW17 0RE, UK.

Tel. +44 (0) 20 8725 5371  
Fax +44 (0) 20 8725 5955

**Croatia / Croatian version**

1

*nastavlja se na sljedećoj stranici*

## Upitnik bolnice St. George o problemima s disanjem 1. DIO

### Pitanja o tome koliko ste imali problema s disanjem u zadnja 4 tjedna.

Molimo označite (X) jedan kvadratić za svako pitanje:

- |  | Većinu dana u tjednu     | Nekoliko dana u tjednu   | Nekoliko dana u mjesecu  | Samo za vrijeme infekcije u prsima | Bez smetnji              |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1. U zadnja 4 tjedna, kašljao/kašljala sam:  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>           | <input type="checkbox"/> |
| 2. U zadnja 4 tjedna, iskašljavao/iskašljavala sam sluz (ispljuvak):                       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>           | <input type="checkbox"/> |
| 3. U zadnja 4 tjedna, imao sam «kratak dah»:   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>           | <input type="checkbox"/> |
| 4. U zadnja 4 tjedna, imao/imala sam «zviždanje» u prsima:                                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>           | <input type="checkbox"/> |
| 5. U zadnja 4 tjedna, koliko ste puta imali teških ili vrlo neugodnih problema s disanjem? |                          |                          |                          |                                    |                          |

Molimo označite (X) jedan:

- Više od 3 napada   
3 napada   
2 napada   
1 napad   
Bez napada

6. Koliko dugo je trajao najteži problem s disanjem?  
(Ako niste imali teških problema s disanjem, idite na 7. pitanje)

Molimo označite (X) jedan:

- Tjedan ili više   
3 ili više dana   
1 ili 2 dana   
Manje od dana

7. U zadnja 4 tjedna, u za vas uobičajenom tjednu, koliko ste imali dobrih dana (s malo problema s disanjem)?

Molimo označite (X) jedan:

- Nije bilo dobrih dana   
1 ili 2 dobra dana   
3 ili 4 dobra dana   
Skoro svaki dan je dobar   
Svaki dan je dobar

8. Ako imate «zviždanje» u prsima, je li vam teže ujutro čim ustanete?

Molimo označite (X) jedan:

- Ne   
Da

## Upitnik bolnice St. George o problemima s disanjem 2. DIO

### 1. odlomak

Kako biste opisali vaše probleme s disanjem?

Molimo označite (X) *jedan*:

- To je najvažniji problem koji imam
- Stvara mi puno problema
- Stvara mi nekoliko problema
- Ne stvara mi problema

Ako ste ikad bili zaposleni.

Molimo označite (X) *jedan*:

- Potpuno sam prestao/prestala raditi zbog problema s disanjem
- Problemi s disanjem smetaju mom poslu ili su bili uzrok promjene vrste posla
- Problemi s disanjem nisu nikad ometali moj posao

### 2. odlomak

**Pitanja o tome koje aktivnosti obično uzrokuju da ostanete bez daha ovih dana.**

Molimo označite (X) *svaki kvadratić* koji se odnosi na vas *ovih dana*:

	Točno	Netočno
Mirno sjedenje ili mirno ležanje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pranje ili oblačenje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kretanje po kući/stanu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Šetanje vani na ravnom tlu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Penjanje na jedan kat stepenicama	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Penjanje uzbrdicom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bavljenje sportom ili fizičkim aktivnostima	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Upitnik bolnice St. George o problemima s disanjem 2. DIO

### 3. odlomak

**Još nekoliko pitanja o vašem kašlju i ostajanju bez daha ovih dana.**

Molimo označite (X) **svaki kvadratić** koji se odnosi na vas **ovih dana**:

	Točno	Netočno
Boli me kad kašljem	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kašalj me umara	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ostajem bez daha kad govorim	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ostajem bez daha kad se sagnem	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kašalj ili disanje ometa mi san	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Brzo se iscrpim	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### 4. odlomak

**Pitanja o ostalim mogućim posljedicama vaših problema s disanjem ovih dana.**

Molimo označite (X) **svaki kvadratić** koji se odnosi na vas **ovih dana**:

	Točno	Netočno
Sramim se mog kašlja ili disanja kad sam na javnom mjestu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Moji problemi s disanjem smetnja su mojoj obitelji, prijateljima ili susjedima	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hvata me strah ili panika kada ne mogu doći do daha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Osjećam da ne mogu kontrolirati svoje probleme s disanjem	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ne očekujem nikakvo poboljšanje disanja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Postao sam ovisan/Postala sam ovisna o tuđoj pomoći ili invalid zbog svojih problema s disanjem	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Naprezanje je rizično za mene	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sve mi se čini prevelikim naporom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### 5. odlomak

**Pitanja o vašoj terapiji, a ako ne primete terapiju idite na 6. odlomak.**

Molimo označite (X) **svaki kvadratić** koji se odnosi na vas **ovih dana**:

	Točno	Netočno
Terapija mi puno ne pomaže	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sramim se uzimati terapiju na javnom mjestu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Imam neugodne smetnje od terapije	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Terapija jako smeta mom životu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Upitnik bolnice St. George o problemima s disanjem 2. DIO

### 6. odlomak

*Ovo su pitanja o tome kako vaše disanje možda ometa vaše aktivnosti.*

Molimo označite (X) **svaki kvadratić** koji se odnosi na vas **zbog vašeg disanja**:

	Točno	Netočno
Treba mi puno vremena za pranje ili oblačenje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ne mogu se okupati ili istuširati, ili mi za to treba puno vremena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hodam sporije od ostalih ljudi, ili stanem da se odmorim	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Za poslove kao što su kućanski poslovi treba mi puno vremena, ili moram stati da se odmorim	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ako se penjem na jedan kat stepenicama, moram ići polako ili stati	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ako žurim ili brzo hodam, moram stati ili usporiti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disanje mi otežava aktivnosti kao što su hodanje uzbrdo, nošenje stvari uz stepenice, lagani poslovi u vrtu kao čupanje korova, plesanje ili boćanje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disanje mi otežava aktivnosti kao što su nošenje teških tereta, kopanje u vrtu, čišćenje snijega, brzo hodanje (8 km/sat) ili plivanje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disanje mi otežava aktivnosti kao što su težak fizički rad, trčanje, vožnja bicikla, brzo plivanje ili naporni sportovi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### 7. odlomak

*Željeli bismo znati kako vaši problemi s disanjem obično ometaju vaš svakodnevni život.*

Molimo označite (X) **svaki kvadratić** koji se odnosi na vas **zbog vaših problema s disanjem**:

	Točno	Netočno
Ne mogu se baviti sportom ili fizičkim aktivnostima	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ne mogu izlaziti radi zabave ili rekreacije	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ne mogu izlaziti iz kuće radi kupovine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ne mogu obavljati kućanske poslove	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ne mogu se udaljiti od kreveta ili stolice	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Upitnik bolnice St. George o problemima s disanjem

**Ovdje je popis ostalih aktivnosti koje možda ne možete raditi zbog problema s disanjem. (Ne morate ih označiti, one su tu samo da vas podsjetu na koje vas načine može ometati ostajanje bez daha):**

Odlazak u šetnje ili šetanje psa  
Obavljanje poslova u kući/stanu ili u vrtu  
Seksualni odnos  
Odlazak u crkvu, kafić, gostionu ili mjesto za zabavu  
Izlazak po lošem vremenu ili ulazak u zadimljene prostorije  
Posjećivanje obitelji ili prijatelja, ili igranje s djecom

Molimo vas napišite bilo koje ostale važne aktivnosti koje možda više ne možete obavljati zbog vaših problema s disanjem:

.....  
.....  
.....  
.....

Sada vas molimo da označite kvadratić (samo jedan) za koji mislite da najbolje opisuje kako vas problemi s disanjem ometaju:

- Ne sprečavaju me da radim ono što bih želio/željela
- Sprečavaju me da radim jednu ili dvije stvari koje bih želio/željela
- Sprečavaju me da radim većinu stvari koje bih želio/željela
- Sprečavaju me da radim sve što bih želio/željela

*Hvala vam što ste ispunili ovaj upitnik. Prije nego što završite, molimo vas provjerite da li ste odgovorili na sva pitanja.*