

Povezanost endotoksina i polimorfizma gena za CD14 i TLR4 u djece s astmom

Kljaić Bukvić, Blaženka

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:403761>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Blaženka Kljaić Bukvić

**Povezanost endotoksina i polimorfizma
gena za CD14 i TLR4
u djece s astmom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2013.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Blaženka Kljaić Bukvić

**Povezanost endotoksina i polimorfizma
gena za CD14 i TLR4
u djece s astmom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena na Odjelu za dječje bolesti,
Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu
u suradnji s
Centre for Respiratory Medicine, Infection and Allergy, Institute of
Inflammation and Repair, University of Manchester,
United Kingdom

Voditelj rada: prof. dr. sc. Neda Aberle, prim. dr. med.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nedi Aberle na uključivanju u projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta „Utjecaj genetičkih i okolišnih činitelja na razvoj astme u djece“ iz kojeg je izrađena doktorska disertacija. Hvala na potpori, pokretačkoj snazi, usmjeravanju i vizionarstvu, bez kojih ovaj rad ne bi bio izveden.

Zahvaljujem profesoru Adnanu Čustoviću MsC, DM, MD, PhD, FRCP na uključivanju ovog istraživanja u međusveučilišni projekt. Hvala na velikoj znanstvenoj i moralnoj podršci koja mi je otvorila vrata u čarobni svijet znanosti. Tijekom studijskog boravka u Centru za respiracijsku medicinu, infekcije i alergiju, pri Sveučilištu u Manchesteru imala sam čast upoznati laboratorijski rad i učiti od uglednih liječnika i znanstvenika. Veliko hvala profesorici Angeli Simpson MB, MD, PhD, MRCP na usmjeravanju u genotipizaciji i korisnim savjetima u obradi podataka. Hvala Susani, Danielle, Jenny, Aidi, Johnu i Jacku na timskom radu i nesebičnoj podjeli znanja. Od početka istraživanje iz kojeg je izrađena disertacija imala sam stalnu stručnu i prijateljsku podršku kolege Maria Blekića kojemu zahvaljujem na pomoći u prikupljanju, obradi i komentiranju rezultata istraživanja.

Hvala svim djelatnicima Odjela za dječje bolesti, Službi transfuzijske medicine, kao i Ravnateljstvu OB „Dr. Josip Benčević“ na tehničkoj pomoći u izvođenju istraživanja. Zahvaljujem i Jadranki Marić na informatičkoj podršci. Na kraju, hvala mojim roditeljima i sestri koji su me podržavali tijekom studiranja i znanstvenog rada.

Hvala mojoj obitelji, Daliboru, Ivani i Petru na velikoj ljubavi i strpljenju..

POPIS OZNAKA I KRATICA

ADAM33	disintegrin i metaloproteinaze 33 gen (<i>od engl. a disintegrin and metalloproteinase 33 gene</i>)
ADRB2	β -2 adrenergički receptor (<i>od engl. adrenergic receptor β-2</i>)
ALOX5	arahidonska 5-lipooksigenaza (<i>od engl. arachidonate 5-lipoxygenase</i>)
aOR	korigirani omjer vjerojatnosti (<i>od engl. adjusted odds ratio</i>)
BSA	albumin iz goveđeg seruma (<i>od engl. bovine serum albumin</i>)
CC5	citokin kemotaksije 5 (<i>od engl. chemotactic cytokine 5</i>)
CCL	kemotaktički ligand citokina (<i>od engl. chemotactic cytokine ligand</i>)
CD14	skup diferencijacije 14 (<i>od engl. cluster of differentiation 14</i>)
CD40L	ligand skupa diferencijacije 40 (<i>od engl. cluster of differentiation 40 ligand</i>)
CI	interval pouzdanosti (<i>od engl. confidence interval</i>)
COL29A1	kolagen XXIX
COX-2	ciklooksigenaza-2 (<i>od engl. cyclooxygenase-2</i>)
CTLA-4	antigen 4 udružen s citotoksičnim T limfocitom (<i>od engl. cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4</i>)
CYFIP2	citoplazmatski, interaktivni protein mentalne retardacije fragilnog X (<i>od engl. cytoplasmatic fragile X mental retardation protein interacting</i>)
DC	dendritička stanica (<i>od engl. dendritic cell</i>)
DC _{reg}	regulacijska dendritička stanica (<i>od engl. regulatory dendritic cells</i>)
DDP10	dipeptidil-peptidaza 11 (<i>od engl. dipeptidyl-peptidase 10</i>)
Der p1	glavni alergen grinje <i>Dermathophagoides pteronissinus</i>

DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DPP10	dipeptidil peptidaza 10 (<i>od engl. dipeptidyl-peptidase 10</i>)
EU	jedinica endotoksina (<i>engl. endotoxin unit</i>)
FcεRI	visoko afinitetni receptor za Fc regiju imunoglobulina E
FcεRIβ	β-lanac visoko afinitetnog receptora za Fc regiju imunoglobulina E
FDR	otkrivanje lažno pozitivnih rezultata (<i>od engl. false discovery rate</i>)
FEF	forsirani protok pri izdisaju (<i>od engl. forced expiratory flow</i>)
FEV ₁	forsirani volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi (<i>od engl. forced expiratory volumen</i>)
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (<i>od engl. fibroblast growth factor</i>)
Foxp3	transkripcijski čimbenik Foxp3 (<i>od engl. forkhead box P3</i>)
FVC	forsirani vitalni kapacitet (<i>od engl. forced vital capacity</i>)
GATA	GATA vežući protein 3 (<i>od engl. GATA-binding protein 3</i>)
GCSF	čimbenik stimulacije rasta granulocitnih kolonija (<i>od engl. granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GINA	opća inicijativa za astmu (<i>od engl. global initiative for asthma</i>)
GPRA	gen za receptor spojenog proteina G (<i>od engl. G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility gene</i>)
GST	glutation-S-transferaza (<i>od engl. glutathione-S-transferases</i>)
HLA-DP,-DQ,-DR	ljudski leukocitni antigen (<i>od engl. human leucocyte antigen-DP, DQ, DR</i>)
HWE	Hardy-Weinberg-ova ravnoteža (<i>od engl. Hardy-Weinberg equilibrium</i>)
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula (<i>od engl. intracellular adhesion molecule-1</i>)
IFN	interferon
IgE	imunoglobulin E

IgG4	imunoglobulin G podklasa 4
IL	interleukin
IL-1R	receptor za interleukin-1 (<i>od engl. interleukin 1-receptor</i>)
IL-4R α	α -lanac IL-4 receptora (<i>od engl. interleukin-4 receptor α</i>)
iPLEX Assay	iPLEX test (<i>od engl. increased plexing efficiency and flexibility assay</i>)
IRAKM	kinaza M receptora za IL-1 (<i>od engl. IL-1 receptor-associated kinase- M</i>)
ISAAC	Međunarodna studija o astmi i alergijama u djetinjstvu (<i>od engl. International study of asthma and allergies in childhood</i>)
LBP	lipolisaharid vežući protein (<i>od engl. lipopolysaccharide binding protein</i>)
LD	neravnoteža povezanosti (<i>od engl. linkage disequilibrium</i>)
LPS	lipopolisaharid (<i>od engl. lipopolysaccharide</i>)
LTA	limfotoksin A
LTC4 sintetaza	sintetaza leukotrijena C4 (<i>od engl. leukotriene C4 synthase</i>)
LY96	limfocitni antigen 96 (<i>od engl. lymphocyte antigen 96</i>)
mAb	monoklonsko protutijelo (<i>od engl. monoclonal antibody</i>)
MAL	regulator sličan proteinu mijelodine diferencijacije 2 (<i>od engl. myeloid differentiation protein 2-adaptor like</i>)
MALDI-TOF MS	matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom-spektrometar masa s vremenom proleta (<i>od engl. Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>)
MD2	protein mijeloidne diferencijacije 2 (<i>od engl. myeloid differentiation protein 2</i>)
MIP	upalni protein makrofaga (<i>od engl. macrophage inflammatory protein</i>)
MMP	metaloproteinaze matriksa (<i>od engl. matrix metalloproteinases</i>)

MyD88	protein primarne mijeloidne diferencijacije 88 (<i>engl. myeloid differentiation primary response protein 88</i>)
NAD(P)H	nitotinamid adenin dinukleotid (fosfat) oksidaza
NF- $\kappa\beta$	nuklearni čimbenik $\kappa\beta$ (<i>engl. nuclear factor- $\kappa\beta$</i>)
NOS	sintetaza dušičnog oksida (<i>od engl. nitric oxide synthase</i>)
PAMP	molekularni uzorak patogena (<i>od engl. pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS-T	puferirana otopina fosfatnih soli Tween (<i>od engl. phosphate buffered saline with Tween</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (<i>od engl. polymerase chain reaction</i>)
PHF11	prstenasti protein 11 osnovne biljne baze (<i>od engl. plant homeodomain finger protein 11</i>)
PRACTALL	alergologija u praksi (<i>od engl. PRACTical ALLergy</i>)
RANTES	izražajnost i sekrecija regulirani aktivacijom normalnih T stanica (<i>od engl. regulated on activation normal T cell expresed and secreted</i>)
RNK	ribonukleinska kiselina
RSV	respiracijski sincicijski virus
RV	rinovirus
SAP	alkalna fosfataza iz škampa (<i>od engl. shrimp alkaline phosphatase</i>)
SNP	jednonukleotidni polimorfizam (<i>od engl. single nucleotide polymorphisms</i>)
SPINK5	inhibitor serin peptidaze Kazal tip 5 (<i>od engl. serine peptidase inhibitor, Kazal type 5</i>)
SPT	kožni ubodni test (<i>od engl. skin prick test</i>)
STAT	prijenosnik signala i aktivator prijepisa (<i>od engl. signal transducer and activator of transcription</i>)
TBX21	transkripcijski čimbenik T 21 (<i>od engl. T-box transcription factor 21</i>)
TBXA2R	receptor tromboksana A2 (<i>od engl. thromboxane A2 receptor</i>)

TGF- β 1	transformirajući čimbenik rasta- β 1 (<i>od engl. transforming growth factor-β1</i>)
Th1	pomoćnički T- limfocit 1 (<i>od engl. T helper 1</i>)
Th2	pomoćnički T- limfocit 2 (<i>od engl. T helper 2</i>)
TIM-1	(<i>od engl. T cell immunoglobulin mucin-like domain-1</i>)
TIMP-1	tkivni inhibitor metaloproteinaza (<i>engl. tissue inhibitor metalloproteinase</i>)
TIRAP	protein vezan uz rezistenciju Toll-IL-1 (<i>od engl. Toll-IL-1 resistance associated protein</i>)
TLR	Toll-u sličan receptor (<i>od engl. Tool like receptor</i>)
TNC	tenascin-C
TNF	čimbenik tumorske nekroze (<i>od engl. tumor necrosis factor</i>)
TRAM	(<i>od engl. Toll-IL-1 resistance (TIR) domain-containing adaptor–inducing IFN-β-related adaptor molecule</i>)
TRIF	(<i>od engl. Toll-IL-1 resistance (TIR) domain-containing adaptor–inducing IFN-β</i>)
VEGF	čimbenik rasta krvožilnog endotela (<i>od engl. vascular endothelial growth factor</i>)

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija	1
1.2. Rizični činitelji za razvoj astme	2
1.3. Međudjelovanje gena i okoline u razvoju astme	12
1.4. Urođena i stečena imunoreakcija u astmi	14
1.5. Osobitosti astme u dječjoj dobi	16
1.6. Higijenska hipoteza	18
1.7. Endotoksin	21
1.8. Nasljeđe i geni urođene imunosti	25
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	45
3. ISPITANICI I METODE	47
3.1. Ispitanici	47
3.2. Upitnik	47
3.3. Kožni test	47
3.4. Mjerenje plućne funkcije	48
3.5. Mjerenje koncentracije okolišnih činitelja	49
3.6. Genotipizacija	51
3.7. Statistička analiza podataka	55
4. REZULTATI	57
5. RASPRAVA	93
6. ZAKLJUČCI	107
7. SAŽETAK	108
8. SUMMARY	109
9. LITERATURA	111
10. ŽIVOTOPIS	145
11. DODATAK	147

1. UVOD

Astma je heterogeni sindrom, složen od više varijanti bolesti koje su obilježene različitom etiologijom i patofiziološkim mehanizmima. Nazivamo ih endotipovima koji se klinički prezentiraju jednakim ili različitim fenotipovima. U oblikovanju endotipova u astmi, značajnu ulogu ima nasljeđe. Međutim, genske promjene koje pridonose pojavi astme su pojedinačno slabe i tek ukoliko djeluju u odgovarajućem okruženju tijekom različitih razdoblja razvoja djeteta, mogu rezultirati kliničkom pojavom astmatskog fenotipa.

1.1. Epidemiologija

Prevalencija astme u svijetu

Astma je najčešća kronična bolest u dječjoj dobi koja značajno narušava kvalitetu života. Međunarodno istraživanje o astmi i alergijama u dječjoj dobi (ISAAC, od engl. *International study of asthma and allergies in childhood*) upućuje na značajne geografske razlike u prevalenciji atopijskih bolesti. Primjenom standardiziranih i uniformiranih metoda prikupljaju se podaci o prevalenciji astme, alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa. Uvidom u podatke dobivene primjenom upitnika ISAAC uočena je visoka prevalencija astme ($\geq 20\%$) u Australiji, Novom Zelandu, Velikoj Britaniji, Irskoj, Islandu, SAD, Panami, Barbadosu, Kosta Riki, Paragvaju, nekim centrima Južne Afrike, dok je niska prevalencija ($\leq 5\%$) zabilježena u Albaniji, Gruziji i Indoneziji. U zemljama poput Portugala, Njemačke, Austrije, Finske, Japana, Rusije Brazila, Čilea i Argentine uočena je prevalencija astme od 10 do 20%, a prevalencija od 5 do 10% zabilježena je u Španjolskoj, Italiji, Belgiji, Švedskoj, Litvi, Estoniji i Kuvajtu.¹

Prevalencija astme u Hrvatskoj

Posljednjih deset godina u različitim županijama Hrvatske provedena su standardizirana epidemiološka istraživanja koja su primjenila ISAAC upitnik za tri dobne skupine djece: 6-7 godina, 10-11 godina i 12-14 godina. Prema objavljenim rezultatima prevalencija astme za dobnu skupinu 6-7 godina je

iznosila 9,7%, u Primorsko-goranskoj² 6,9%, u Međimurskoj³ i 6,17% u Požeško-slavonskoj županiji. Prevalencija astme u dobnoj skupini 12-14 godina bila je niža od one za mlađu dobnu skupinu i iznosila je 8,4% u Primorsko-goranskoj², 5,11% u Međimurskoj³ i 4,3% u Požeško-slavonskoj županiji (*Drkulec V. i sur., Zbornik sažetaka, Prvi kongres hrvatskih alergologa i kliničkih imunologa, Zagreb, 2009.*). Prevalencija astme za dobnu skupinu 10-11 godina u Zagrebačkoj županiji iznosila je 6,0%⁴, a u Brodsko-posavskoj županiji 7,9% (*Aberle N. i sur., Zbornik sažetaka, Prvi kongres hrvatskih alergologa i kliničkih imunologa, Zagreb, 2009.*). U Primorsko-goranskoj županiji provedna je i treća faza ISAAC istraživanja, koja je zabilježila stagnaciju prevalencije za dobnu skupinu od 6-7 godina (9,4%), dok se u skupini djece dobi 13-14 godina, bilježio značajni porast prevalencije koja je iznosila 14%.⁵

Na temelju dobivenih podataka Hrvatska se s prevalencijom astme od 5,11% do 14,3%, ovisno o županiji i dobnim skupinama među kojima je provedeno istraživanje, ubraja u zemlje s umjerenom prevalencijom.

1.2. Rizični činitelji za razvoj astme

Nasljeđe

Nasljeđe ima važnu ulogu u astmi, poligeno je i ne slijedi klasične Mendelove zakone. Do sada se ustvrdila povezanost s preko sto gena,⁶ koji su smješteni u više kromosomskih regija poput 1p13.3, 1q21.3, 1q31-32, 2q21, 5q31-33, 6p21.3, 7, 8q23, 11q13, 12q13.3-24, 13q, 14q11.2, 16p12.1-12.2, 17p11, 17q i 20p13. Snaga genetičke povezanosti vidljiva je kroz ponavljanje istih ili sličnih rezultata u odvojenim studijama, što je uočeno samo za dvadesetak gena. S obzirom na imunološku i funkcionalnu ulogu u patogenezi astme, najčešće replicirani kandidatski geni identificirani u genetičkim studijama udruženosti gena kandidata mogu se svrstati u četiri skupine: geni prirođene imunosti i imunoregulacije, geni koji svojim proteinima stimuliraju alergen specifičnu Th2-imunoreakciju (pomoćnički T-limfocit 2, Th2, od engl. T helper 2), geni izraženi u epitelnim stanicama i geni koji svojim proteinima utječu na razvoj plućne funkcije. Također i geni

identificirani u studijama vezanosti, odnosno dobiveni pozicijskim kloniranjem, smatraju se snažnim kandidatskim genima za astmu, iako njihova funkcija nije u cijelosti poznata, (tablica1).

Tablica 1. Kandidatski geni za astmu i astmi pridružena obilježja identificirani u više od pet nezavisnih istraživanja, modificirano prema Vercelli D. i sur.⁷

Vrsta istraživanja	Uloga ili mjesto djelovanja gena	Geni
Studije udruženosti kandidatskih gena	Urođena imunost, imunoregulacija	<i>CD14, TLR2, TLR4, TLR6, TLR10, NOD1, NOD2, IL10, TGFβ1, STAT3, HLA-DR, -DQ i -DP</i>
	Alergen specifična Th2-imunoreakcija	<i>GATA3, TBX21, IL4, IL4Rα, STAT6, IL12B, IL13, FcεR1β</i>
	Epitelne stanice	<i>CCL5, CCL11, CCL24, CCL26, defenzin-β1, CC16, SPINK5, filagrin</i>
	Plućna funkcija	<i>ADRB2, TNF, TGFβ1, LTC4S, GST, TBXA2R, ALOX5, LTA, TNC, NOS1</i>
Studije vezanosti gena (pozicijsko kloniranje)	Uloga i mjesto djelovanja nisu u cijelosti razjašnjeni	<i>ADAM33, PHF11, DDP10, GPRA, HLA-G, CYFIP2, IRAKM, COL29A1</i>

CD14-skup diferencijacije 14 (*engl. cluster of differentiation 14*); TLR-Toll-u sličan receptor (*engl. Toll-like receptor*); NOD-regija oligomerizacije domena (*engl. nucleotide-binding oligomerization domain*); IL-interleukin; TGFβ- transformirajući čimbenik rasta-β1 (*od engl. transforming growth factor-β1*); STAT- prijenosnik signala i aktivator prijepisa (*od engl. signal transducer and activator of transcription*); HLA-DR, -DQ i -DP- ljudski leukocitni antigen (*od engl. Human leucocyte antigen-DP, DQ, DR*); GATA3-GATA vežući protein 3 (*od engl. GATA-binding protein 3*); TBX21-transkripcijski čimbenik (*od engl. T-box 21*); IL4Rα- α podjedinica receptora za IL-4 (*od engl. interleukin 4 receptor α*); FcεR1β- β lanac visoko afinitetnog receptora za Fc regiju; CCL- kemotaktički ligand citokina (*od engl. chemotactic cytokine ligand*); CC16-protein 16kD specifičan za Clara stanice (*od engl. Clara cell-specific 16kD protein*); SPINK5-inhibitor serin peptidaze Kazal tip 5 (*od engl. serine peptidase inhibitor, Kazal type 5*); ADRB2- β-2 adrenergički receptor (*od engl. adrenergic receptor β-2*); TNF- čimbenik tumorske nekroze (*od engl. tumor necrosis factor*); LTC4S- sintetaza leukotrijena C4 (*od engl. leukotriene C4 synthase*); GST- glutation-S-transferaza (*od engl.*

glutathione-S-transferases); *TBXA2R*-receptor tromboksana A2 (od engl. *thromboxane A2 receptor*; *ALOX5*- arahidonska 5-lipooksigenaza (od engl. *arachidonate 5-lipoxygenase*; *LTA*-limfotoksin A; *TNC*-tenascin-C; *NOS1*-sintetaza dušičnog oksida (od engl. *nitric oxide synthase 1*); *ADAM33*- disintegrin i metaloproteinaze 33 gen (od engl. *a disintegrin and metalloproteinase 33 gene*; *PHF11*- prstenasti protein 11 osnovne biljne baze (od engl. *plant homeodomain finger protein 11*); *DDP10*-dipeptidil-peptidaza11 (od engl. *dipeptidyl-peptidase 10*); *GPRA*-gen za receptor spojenog proteina G (od engl. *G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility gene*); citoplazmatski, interaktivni protein mentalne retardacije fragilnog X (od engl. *cytoplasmatic fragile X mental retardation protein interacting*); *IRAKM*-kinaza M receptora za IL-1 (od engl. *IL-1 receptor-associated kinase-M*); *COL29A1*-kolagen XXIX

Rizični činitelji iz okoline

Iako je nasljeđe važno, varijabilnost pojedinačnih gena može rezultirati kliničkom pojavom astme djelovanjem u odgovarajućem okruženju tijekom djetinjstva. Naročito je važan prenatalni i rani postnatalni period kojemu se pripisuje kritična uloga u pojavi alergijskih bolesti.

Prenatalni rizični činitelji

- *Izloženost duhanskom dimu*

Izlaganje duhanskom dimu *in utero* ometa normalan razvoj fetalnih pluća te povećava rizik za pojavu astme.⁸ Tako duhanski dim oštećuje plućnu funkciju,⁹ povećava bronhalnu hiperreaktibilnost,¹⁰ proizvodnju Th2-citokina¹¹ i narušava imunološki odgovor na uzročnike virusnih infekcija,¹² smanjenjem proizvodnje interferon- γ (IFN- γ), kao i oštećenjem TLR. Duhanski dim utječe i na metabolizam glukoze, inhibiciju proliferacije fibroblasta, oštećenje epitelnih stanica i elastinskih vlakana, što rezultira smanjenjem veličine i broja alveola.¹³ Nikotin, kao sastojak duhanskog dima, prolazi kroz posteljicu, a koncentracija njegova metabolita kotinina podjednaka je u majke i fetusa. Rano izlaganje nikotinu utječe na upalom potaknute remodelirajuće procese. Tijekom prenatalnog razdoblja u kome je dijete izloženo duhanskom dimu, veoma je bitan polimorfizam GST gena u majke,¹⁰ ali i polimorfizam gena u djeteta (TGF β , IL-1R, ADRB2, genski lokusi 1p, 1q43-q44, 4q34, 17p11, 5q, 5p15, 9q,14q32, 17q21, 20p) koji modificiraju djelovanje duhanskog dima na razvoj astme.¹⁴

- *Prenatalna izloženost imunomodulacijskim mikrobnim produktima*

Prenatalna izloženost većoj razini endotoksina, povezana je s manjom učestalošću atopije,¹⁵ astme, alergijskog rinitisa i ekcema.¹⁶

- *Prehrana majke*

Istraživanja koja se odnose na prehranu majke tijekom trudnoće i eventualni utjecaj na razvoj astme pokazuju neujednačene rezultate. Hrana bogata zelenim povrćem ima povoljan utjecaj, koji izostaje ukoliko je hrana tehnološki obrađena. Vitamin E¹⁷ i selen imaju zaštitni učinak, što za vitamin D neke studije nisu potvrdile.¹⁸⁻²⁰ Nadalje, u prevenciji alergijskih bolesti upitan je i zaštitni utjecaj dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina, za koje se smatra da imaju protu-upalni učinak,²¹⁻²⁵ kao i prenatalna primjena prebiotika, probiotika i/ili sinbiotika.²⁶

- *Nedonošenost, korioamnionitis i niska rodna masa*

Rizik za astmu povećan je prema nekim istraživanjima u nedonošene, kao i u hipotrofične donešene novorođenčadi. Nadalje, infekcije majke tijekom trudnoće praćene febrilnim stanjem, osobito s kliničkom slikom korioamnionitisa²⁷ povezuju se s bronhalnom hiperreaktilnošću, remodelacijom i astmom. Istodobno djelovanje infekcije i nedonošenosti ima sinergistički učinak te značajno doprinosi razvoju astme.²⁸

- *Spol*

Muški spol je rizični činitelj za astmu u dječjoj dobi.²⁹ Prevalencija astme je dva puta veća u dječaka nego u djevojčica.³⁰ Nakon 14. godine života razlika među spolovima u učestalosti bolesti se smanjuje, dok djevojčice s prekomjernom tjelesnom težinom češće oboljevaju tijekom adolescencije.³¹

Razlike u hormonskom statusu i izražajnosti gena vezane uz spol djeteta, započinju tijekom embrionalnog razvoja, perzistiraju tijekom cijelog života i smatraju se uzrokom različite prevalencije bolesti između spolova tijekom odrastanja.

Primjena lijekova u trudnoći

Primjena lijekova u majke prije i tijekom trudnoće doprinosi razvoju astme u djece. Liječenje antibioticima, ovisno o dozi, povećava rizik za pojavu astme.³² Epidemiološka istraživanja registriraju sve veću zastupljenost primjene paracetamola tijekom trudnoće, što povećava osjetljivost za astmu putem snižavanja razine antioksidansa-glutaciona, smanjenja febrilnih epizoda te putem utjecaja na proizvodnju prostaglandina E2 i na aktivnost enzima ciklooksigenaza-2 (COX-2, od engl. cyclooxygenase-2).^{33, 34} Djelovanje paracetamola na pojavu astme modificirano je i polimorfizmom gena GST.³⁵ Proestrogeni učinak doprinosi alergijskom imunološkom odgovoru, pa tako primjena oralnih kontraceptiva prije trudnoće povećava rizik za astmu i alergijske bolesti u djece.³⁶

- *Stres*

Stres majke tijekom prenatalnog i postnatalnog razdoblja djeluje na neuroimunoregulacijske mehanizme (hipotalamičko-hipofizno-adrenalnu os) te smanjenom sekrecijom kortizola, potiče sekreciju upalnih citokina i modulira alergijski imunološki odgovor.³⁷

- *Epigenetski utjecaj*

Epigenetika je most između fenotipa i genotipa. Epigenetske promjene karakterizirane su izmjenama u izražajnosti, odnosno funkciji gena s očuvanim redoslijedom nukleotida u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNK). Prenatalno razdoblje i rano djetinjstvo su najosjetljiviji periodi za nastanak ovih promjena. Očituju se nasljeđivanjem kroz nekoliko generacija.³⁸ Inhibicijom epigenetskih mehanizama izostaju učinci okoline³⁹ što upućuje da epigenetika ima ulogu medijatora putem kojeg okolišni utjecaji mogu mijenjati izražajnost gena. Najčešći epigenetski mehanizmi su metilacija DNK, modifikacija histona i nekodirajućih dijelova ribonukleinske kiseline (RNK) s utjecajem na prijelaz gena koji sudjeluju u odgovoru domaćina na izlaganje okolišnim čimbenicima. Prehrana bogata metilnim skupinama, koje utječu na metilaciju gena *Runx3* i smanjenje proizvodnje proteina Runx3,⁴⁰ duhanski dim⁴¹ i policiklički aromatski ugljikovodici⁴² mogu inducirati epigenetske promjene.

Postnatalni rizični činitelji

Izlaganje rizičnim činiteljima iz okoline poput alergena, infekcija, duhanskog dima, onečišćenje zraka i prehrane, predstavlja rizik za pojavu astme, dovodi do pogoršanja i produljenog trajanja simptoma astme u djece s nasljednom sklonošću.

- *Alergeni*

Odnos između razine alergena u okolini, alergijske senzibilizacije i kliničke pojave astme nije recipročan budući da ovisi o vrsti i koncentraciji alergena u okolini, vremenu i načinu izlaganja te nasljednoj sklonosti djeteta.

Najčešći alergeni unutarnjih prostora u područjima s kontinentalnom klimom su alergeni grinja iz kućne prašine među kojima su najzastupljenije vrste *Dermatophagoides pteronyssinus* i *Dermatophagoides farinae*. Njihova povišena razina u okolini povećava rizik za pojavu specifične senzibilizacije.⁴³⁻⁴⁵ Međutim, ustvrđeno je da i vrlo niske razine alergena

(2 µg *Der p1* antigena po gramu prašine) u djece s pozitivnom obiteljskom anamnezom mogu dovesti do senzibilizacije, dok je u djece bez nazočne atopije potreban znatno viša koncentracija izlaganja (80 µg/g).⁴⁶ Ove spoznaje doprinose hipotezi koja upućuje na međudjelovanje gena i okoline. Iako je odnos između djetetovog izlaganja alergenima i senzibilizacije proporcionalan, ipak sama izloženost ne dovodi nužno i do astme.^{44, 47-49}

Nadalje, česti izvor alergena unutarnjeg okoliša su i kućni ljubimci pas i mačka, a specifična senzibilizacija na njihove antigene je važan čimbenik rizika za pojavu astme.⁵⁰ Najveća senzibilizacija javlja se pri umjerenim koncentracijama alergena mačke (1,7-23 µg/g), gdje je odnos između ekspozicije i senzibilizacije sinusoidalan, dok je kod alergena grinje linearan. Međutim, proturječni su rezultati istraživanja o utjecaju izlaganja alergenima kućnih ljubimaca na pojavu specifične senzibilizacije, atopije i razvoj astme: držanje kućnih ljubimaca u domovima djece u ranom djetinjstvu prema različitim studijama povećava,⁵¹ smanjuje rizik ili pak nema utjecaja na razvoj atopije, specifične senzibilizacije i astme.⁵²⁻⁵⁴ Uočene su i razlike između izloženosti alergenima mačke i psa. Tako prisutnost mačke u domu, povećava rizik specifične senzibilizacije tijekom predškolske, ali ne i školske

dobi.⁵⁵ Nazočnost psa nema jačeg utjecaja na razvoj specifične senzibilizacije, a neposredna okruženost psima može čak smanjiti rizik za atopiju.⁵⁵ Kućni ljubimci mogu povećati razinu kućnog endotoksina,⁵⁶⁻⁵⁸ i time zaštitno djelovati na pojavu alergijskih bolesti, iako su neka istraživanja ustvrdila da povoljan utjecaj ne ovisi o koncentraciji endotoksina.^{58, 59} Zaštitno djelovanje mačke na alergijsku senzibilizaciju temelji se pretpostavkom da izlaganje visokim koncentracijama alergena modificira Th2-imunološki odgovor kroz sintezu IgG4 na alergene mačke, ali ne i specifičnih IgE antitijela, što se smatra oblikom tolerancije i radi čega se ne moraju javiti simptomi.⁶⁰

Najčešći alergeni vanjskog okoliša su peludi trava, stabala, korova i gljivica. Alergeni peludi se prenose zrakom, a simptomi se javljaju u vrijeme polinacije. Važna je koncentracija alergena o kojoj ovisi klinička slika, osobito u kombinaciji s genetskom predispozicijom i/ili onečišćenjem zraka. Tako npr. koncentracija peludi ambrozije već od 20 zrnaca/m³ zraka u genetski predisponiranih osoba može dovesti do kliničke slike alergijskog rinitisa i/ili astme; visoke koncentracije od 1500 zrnaca/m³ zraka mogu i u zdravih osoba izazvati simptome, dok u djece s nasljednom sklonošću izazivaju tešku sliku bolesti. Zrnca peludi, osim antigene komponente, sadrže i intrizičnu nitotinamid adenin dinukleotid (fosfat) (NAD(P)H) oksidazu, koja oslobađajući produkte oksidacijskog stresa značajno pridonosi pojavi i održavanju alergijske upale. Klimatske promjene npr. globalno zatopljenje uzrokuju raniji početak proljeća kao i produljenje sezone rasta i cvjetanja biljaka, što dovodi do značajnog porasta u proizvodnji peludi i NAD(P)H oksidaze.⁶¹

- *Infekcije*

Nedavna istraživanja pokazuju da infekcije tijekom rane dječje dobi, osobito dojenačke, imaju značajan utjecaj za razvoj ponavljajućih bronhoopstrukcija i kasnije za pojavu astme.⁶²⁻⁶⁵ Tome pogoduje težina kliničke slike infekcije te varijabilnost gena za IL-8,⁶⁶ ali i polimorfizmi gena za IL-4, IL-10, IL-13, TGFβ, TLR4, IL-4Rα i CCL5.⁶⁷⁻⁷¹ Najčešći uzročnici infekcija dišnih putova u dječjoj dobi su respiracijski sincicijski virus (RSV), rinovirus (RV),

parainfluenca virus, metapneumovirus i virus influence.⁷² Ipak, RSV i RV zauzimaju važno mjesto u patofiziologiji budućih bronhopstrukcija i/ili astme. Uočeno je da akutna antivirusna Th1-imunoreakcija (pomoćnički T limfocit 1, Th1, od engl. T helper 1), putem induciranja receptora za IFN-I, čija izražajnost ovisi o FcεRI na dendritičkim stanicama, stimulira razvoj kronične alergijske astme u miševa. Nadalje, križno vezanje virusa za FcεRI potiče proizvodnju kemokina, CD4+ limfocita, IL-13 te sintezu IgE.⁷³ Već je u krvi iz pupkovine djece s povećanim rizikom za razvoj alergijskih bolesti i/ili astme uočena snižena razina IFN-γ, a sposobnost lučenja tog citokina može biti snižena tijekom ranog djetinjstva.^{74, 75}

Infekcija RSV-om dovodi do promjena u sekreciji niza i Th-1 i Th-2 citokina, poput IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, CCL5, upalnog proteina makrofaga (MIP, od engl. macrophage inflammatory protein), CCL2 i eotaksina).^{76, 77}

Prema recentnim studijama posebno značenje za razvoj atopije i astme ima RV. Nakon inhalacije virus se veže za međustaničnu adhezijsku molekulu-1 (ICAM-1, od engl. intracellular adhesion molecule-1) na staničnoj membrani čime pokreće sintezu niza citokina: IL-6, IL-8, IL-16, čimbenika stimulacije rasta granulocitnih kolonija (GCSF, od engl. granulocyte colony-stimulating factor) i CCL5.⁷⁸ Putem citotoksičnog učinka na epitel bronhalne sluznice i poticanjem čimbenika rasta vaskularnog endotela (VEGF, od engl. vascular endothelial growth factor), RV sudjeluje u remodelaciji dišnih putova.⁷⁹

Uočeno je da virusne infekcije tijekom predškolske dobi mogu utjecati na smanjenje rizika za pojavu astme i atopije u školskoj dobi, putem usmjeravanjem imunološkog odgovora u Th1-smjeru.^{80, 81} Na to utječe i redoslijed izlaganja alergena i virusa; naime, ako infekcija uslijedi nakon izlaganja alergenima, ona ne može spriječiti već razvijenu alergen-specifičnu Th2- imunoreakciju.⁸²

- *Unutarnji i vanjski onečišćivači zraka*

Nazastupljeniji vanjski onečišćivači zraka su dušični oksid, kiseli aerosoli, ozon i sumporni dioksid. Njihova koncentracija ovisi o meteorološkim i lokalnim geografskim prilikama. Povišene vrijednosti u zraku mogu izazvati bronhokonstrikciju, povećati bronhalnu hiperreaktivnost i pojačati alergijsku upalu.^{83, 84} Iako je ustvrđena njihova povezanost sa simptomima astme,

prema dosadašnjim istraživanjima nema sigurnih dokaza da zagađenje zraka uzrokuje porast prevalencije astme.⁸⁵ Međutim, važno je i unutarnje zagađenje zraka, s obzirom da moderan čovjek provede i do 95% vremena u vlastitom domu. Glavni izvori onečišćenja unutar doma su proizvodi energenata za kuhanje i grijanje kao i materijala za uređenje domova te duhanski dim.⁸⁶

- *Duhanski dim*

Procjenjuje se da je polovina dječje populacije u svijetu pasivno izložena negativnim učincima duhanskog dima, a i sve je veći broj adolescenata koji pušenjem cigareta postaju ovisni o nikotinu.⁸⁷ Za sat vremena, dijete koje boravi u zadimljenoj prostoriji s pušačima, inhalira jednaku količinu štetnih tvari kao i pušač koji popuši desetak cigareta.

Duhanski dim sadrži preko 4 500 toksičnih sastojaka od kojih su najzastupljeniji dušik, ugljični dioksid, kisik, nikotin, ugljični monoksid, policiklički aromatski ugljikovodici, metali i cijanovodik. U ljudskom organizmu imaju toksični, kancerogeni i oksidativni učinak. Izlaganje duhanskom dimu uz polimorfizam kandidatskih gena odgovornih za astmu poput gena za GST, TNF- α , ADRB2-adrenoreceptor te genski lokusi 5q, 1p, 9q, 1q43-q44, 4q34, 17p11, 5p15, 14q32, 17q21, 20p), modificira rizik za oštećenje plućne funkcije kao i za samu pojavu astme.⁸⁸⁻⁹¹ Također dovodi do epigenetskih promjena, koje inhibiraju izražajnost gena, a povećavaju rizik za razvoj astme u nekoliko slijedećih generacija.⁴¹ Na respiracijskom epitelu oštećuje integritet sluznice, mukocilijarni aparat i potiče epitelne stanice na proizvodnju proupalnih medijatora. Na imunološki sustav djeluje slabljenjem izvršne uloge alveolarnih makrofaga, smanjenjem odgovora dendritičkih stanica na stimulaciju evolucijski očuvanim strukturama porijeklom od patogenih mikroorganizama (PAMP, od engl. pathogen associated molecular patterns), oslabljenom izražajnošću kostimulacijskih molekula, smanjenom sintezom IL-23 i IL-12, uz posljedičnu stimulaciju alergen-specifične Th2-imunoreakcije.

Duhanski dim povećava razinu imunoglobulina E (IgE), a smanjuje serumsku razinu ostalih imunoglobulina. U plućima potiče nastanak folikula B-limfocita koji pridonose alergijskoj senzibilizaciji.⁹² Duhanski dim pospješuje upalne

promjene, uzrokuje oštećenje plućne funkcije⁸ i porast bronhalne hiperreaktibilnosti¹⁰ što povećava rizik za pojavu astme.

- *Prehrana djeteta*

Povoljan utjecaj prirodne prehrane dojenčadi, koja se preporuča tijekom prvih šest mjeseci života,⁹³ predstavlja zaštitu od respiracijskih i probavnih infekcija te utječe na razvoj emocionalnih veza između majke i djeteta. Dohranu treba započeti nakon četvrtog mjeseca života,^{93, 94} bez obzira na nasljednu sklonost atopiji. Za sada nema čvrstih dokaza da produljeno dojenje i uvođenje dohrane nakon šestog mjeseca štiti dijete od alergijskih bolesti.⁹⁵ Prehrana bogata vitaminima C, D i E, selenom, α - i β -karotenom, β -kriptoksantinom i svježim voćem te povrćem ima zaštitni učinak za razvoj alergijskih bolesti.⁹⁶ Nadalje, protektivno djeluje primjena antioksidansa, dok za čestu konzumaciju ribe još uvijek nema ujednačenih dokaza na bitni utjecaj za pojavu astme.⁹⁷ Pretilost, nadalje predstavlja rizični činitelj budući povišena koncentracija serumskog leptina u pretile djece pridonosi sintezi proupalnih citokina, IgE i razvoju bronhalne hiperreaktibilnosti.

- *Primjena lijekova*

Primjena antibiotika u ranoj dječjoj dobi mijenja crijevnu floru ili tijekom bakterijskih infekcija,⁹⁸ čime izostaju imunološki poticaji Th1-imunoreakcije, što se povezuje s višim rizikom za pojavu astme.⁹⁹ Paracetamol ordiniran u dojenačkom razdoblju ili u školskoj dobi također povećava rizik za astmu, a težina simptoma korelira s dozom.¹⁰⁰

1.3. Međudjelovanje gena i okoline u razvoju astme

U proučavanju složenih bolesti poput astme, naglašava se važnost integrativnog pristupa koji nastoji povezati genetsku varijabilnost s kliničkim fenotipom, u okviru djelovanja bioloških sustava i okolišnih činitelja kroz različita razvojna razdoblja života djeteta. Opisani integrativni model primjenjuje se u istraživanjima o međudjelovanju između gena i okoline. Promjena okolišnih činitelja u međudjelovanju s nasljednom sklonošću, može mijenjati i rizik za pojavnost astme. Međudjelovanje između genetskih promjena i okoline može biti kvantitativno ili kvalitativno. Kvantitativno međudjelovanje obilježeno je dozom izloženosti, odnosno s povećanjem izloženosti, povećava se rizik za astmu, kao što je uočeno na primjeru gena za TLR2 i odrastanja djece na farmama. Kvalitativno je karakterizirano dvosmjernim odnosima u kojima povećanje, odnosno smanjenje izloženosti povećava ili smanjuje rizik za astmu, a najčešći primjer je gen za CD14 i izloženost endotoksinu.¹⁰¹

Najčešće proučavani činitelji iz okoline u genetičkim istraživanjima su duhanski dim, zagađivači zraka, kućni ljubimci, mikroorganizmi, alergeni i primjena lijekova (tablica 2).

Istraživanja o međudjelovanju između gena i okoline naglasila su na važnost uključivanja okoline u genetička istraživanja u astmu te određivanje individualnih okolišnih činitelja i osmišljavanje metoda za njihovo precizno mjerenje. Također, naglašavaju potrebu istraživanja i međudjelovanja između više gena i brojnih utjecaja iz okoline pretraživanjem cijelog genoma.¹⁰²

Tablica 2. Istraživanja o međudjelovanju gena i okoline- činitelji iz okoline u korelaciji s kandidatskim genima

Činitelj iz okoline	Varijabilnost gena
duhanski dim	<i>GST, ADAM33, IL13, IL1R, TNF, CD14, ADRB2</i> , regija 17q21 ^{103-105, 90, 106-110}
zagađivači zraka	<i>GST</i> ^{111, 112}
komponente mikroorganizmima	<i>CD14, TLR2, TLR4</i> ^{101, 113-116}
kućni ljubimci	<i>CD14</i> ¹¹⁷
primjena lijekova	<i>LTC4S</i> ¹¹⁸
tjelesna aktivnost	<i>ADRB2</i> ¹¹⁹
respiracijske infekcije	<i>NOS3, FcεR1, IL4RA</i> ¹²⁰
gastrointestinalne infekcije	<i>TIM-1</i> ¹²¹
alergeni grinje	<i>IL4</i> ¹²²
majčina astma	<i>HLA-G</i> ¹²³
spol	<i>TSLP</i> ¹²⁴

TIM-1-stanični receptor za virus hepatitisa A (od engl. *T-cell membrane protein*);
TSLP-limfopoietin strome timusa (od engl. *thymic stromal lymphopoietin*)

1.4. Urođena i stečena imunoreakcija u astmi

Izlaganje alergenima, u većine ljudi ne uzrokuje kliničke tegobe. Međum, u nekih pojedinaca, izlaganje alergenu narušava stanje tolerancije, započinje alergijsku upalu posredovanu reakcijama urođene i stečene imunosti. Urođena imunost nalazi se na sučelju između okolišnih alergena i stečene imunosti. Na površini stanica prirođene imunosti nalazimo receptore koji prepoznaju uzorke karakterističnih molekularnih struktura (PRR, engl. pattern recognition receptors) na mikroorganizmima, alergenima i auto-antigenima. PRR-i prepoznaju evolucijski sačuvane strukture mikroorganizama (PAMP), ali i egzogeni ili endogeni materijal potencijalno štetan po domaćima (DAMP, engl. danger-associated molecular patterns) proizveden tijekom oštećenja tkiva. Stanice prirođene imunosti poput dendritičkih stanica (DC, engl. dendritic cells), mastocita, granulocita, stanica urođenih ubojica i epitelnih stanica izražavaju brojne PRR, kao što su npr. i TLR-a.

Nakon udisanja, alergene koji izbjegnu eliminaciju iz lumena dišnih putova djelovanjem mukocilijarnog sustava i sekretornih PRR, prepoznaju putem membranskih PRR i eliminiraju procesom endocitoze DC, profesionalne antigen-prezentirajuće stanice, smještene u sluznici respiracijskog sustava. Inhalacijski alergeni pokreću i signale opasosti (DAMP) djelovanjem njihovih proteolitičkih enzima koji narušavaju mehaničku epitelnu barijeru i potpomažu prodor alergena.¹²⁵ U lokalnom limfnom čvoru DC prolaze proces sazrijevanja koji uključuje polarizaciju u DC sposobne za skretanje u smjeru Th2-, Treg i drugih (Th1, Th17) imunoreakcija stečene imunosti. Sazrijevanjem DC pospješuje se prerada alergena i njihovo predočavanje T-limfocitima u sprezi s molekulama drugog razreda tkivne podudarnosti. Pomagački T-limfociti (Th, engl. T-helper) prepoznaju alergene pomoću specifičnih T-receptora. Nakon aktivacije, slijedi polarizacija Th-limfocita, na koju utječe koncentracija i vrsta citokina koju izlučuju DC. Pa tako, polarizaciju u Th2 smjeru potiču CCL2, OX40ligand, IL-25 i IL-33. IL-12, IL-27 i interferoni tipa I usmjeravaju imunoreakciju u Th1-smjeru, dok IL-10 i TGF- β promoviraju razvoj tolerancije (Treg).¹²⁶ Th2-polarizacija je dijelom

i pod epigenetskom regulacijom. Usmjerenje imunoreakcija u Th2-smjeru, rezultira sintezom specifičnog IgE, osnovne značajke atopije koji je odgovoran za pokretanje neposredne alergijske reakcije nakon izlaganja alergenu. Th2-limfociti u sklopu MHC II predočavaju alergen limfocitima-B. U uvjetima dovoljne količine IL-4 i ko-stimulacije putem molekule CD40 i njezinog liganda CD40L, dolazi do izotipskog prekapčanja klase imunoglobulina iz IgM u IgE. IgE se veže za FcεR1 na površini mastocita i bazofila, a križno vezanje alergena za kompleks IgE-FcεR1 aktivira te stanice i pokreće oslabljavanje histamina, leukotrijena i prostaglandina što rezultira akutnim spazmom glatkih mišića bronha, edemom sluznice i hipersekrecijom sluzi.¹²⁷ Unutar nekoliko sati razvija se kasna alergijska reakcija gdje dolazi do pritjecanja upalnih stanica eozinofila, neutrofila, monocita i limfocita u ciljno tkivo i pokreće se kronična upala koja može perzistirati i bez izlaganja alergenima. U nastanku i održavanju kronične upale sudjeluju citokini tipa Th2, kemokini, neurotransmiteri, adenozin, metaloproteinaze matriksa i drugi činitelji¹²⁸ koji u interakciji sa stanicama strome dovode do strukturnih promjena dišnih putova nazvanih remodelacija.¹²⁹ Zadebljanju bronhalnog zida najviše pridonosi infiltracija upalnim stanicama, hipertrofija i metaplazija stanica koje proizvode sluz,¹³⁰ odlaganje kolagena tipa I, III i V, kao i fibronektina i tenascina ispod bazalne membrane u lamini reticularis.¹³¹ Mnogobrojni medijatori i citokini poput IL-6, IL-11, IL-17 i leukotrijena D₄ imaju snažan utjecaj u remodelaciji. TGF stimulira fibroblaste na proizvodnju kolagena tip I, II i fibronektina, dok IL-4 i IL-13 imaju sličan profibrotički učinak. Miofibroblasti koji proizvode kolagen su hiperplastični i hipertrofični što dovodi do trostruko veće mišićne mase. U astmi dolazi do smanjene razgradnje kolagena gdje ključnu ulogu imaju metaloproteinaze matriksa (MMP, od engl. matrix metalloproteinases).¹³² Velikoj obitelji MMP pripadaju i ADAM proteini, od kojih ADAM33 ima značajnu ulogu u epitelno-mezenchimalnoj trofičkoj jedinici tijekom prenatalnog razvoja i u postnatalnim patološkim procesima pluća.

Nasljedna sklonost djeteta astmi, očituje se i kroz varijabilnost gena *ADAM33*, koji kroz međudjelovanje s okolinom modificira embrionalno

sazrijevanje pluća, plućnu funkciju i kasniju kroničnu upalu i remodelaciju u astmi. Tijekom kroničnih upalnih procesa, uočava se i vaskularna remodelacija i angiogeneza koja značajno pridonosi promjenama zida dišnih putova, a uzrokovana je proangiogenim djelovanjem niza medijatora (VEGF, FGF, TGF β , MMP, histamin, kemokinima, citokinima i proteazama). Varijabilnost gena *VEGF*, veoma važnog za angiogenezu, značajno pridonosi nasljednoj sklonosti prema astmi, smanjenoj plućnoj funkciji i bronhalnoj hiperreaktivnosti u dječjoj dobi.¹³³

1.5. Osobitosti astme u dječjoj dobi

Simptomi astme najčešće se pojavljuju tijekom ranog djetinjstva, dok promjene unutar imunološkog i respiracijskog sustava specifičnih za astmu nastaju već prenatalno i mogu se očitovati u ranoj novorođenačkoj dobi.¹³⁴ Praćenjem djece od rođenja do u odraslu dob, uočeno je da gotovo polovina djece predškolske dobi ima minimalno jedan napadaj bronhoopstrukcije. Uočena sklonost mijenjanju astme pod utjecajem okoline izraženija je u prvim godinama života, a smanjuje se tijekom odrastanja.¹³⁵ Patofiziološka zbivanja tijekom dojenačke i dječje dobi prezentiraju se kliničkim tegobama poput zviždanja, kašljanja, dispneje, stezanja u prsima i nedostatka zraka. Međutim slični simptomi mogu biti posljedica patoloških promjena u kardiovaskularnom, respiracijskom, probavnom i imunološkom sustavu. Diferencijalna dijagnoza astme, odnosno bronhoopstrukcija u dojenačkoj i dječjoj dobi uključuje: strano tijelo u dišnom sustavu (npr. aspiracija hrane), bronhopulmonalna displazija, cistična fibroza, sindrom primarne cilijarne diskinezije, tuberkuloza, kronični rinosinuitis, ponavljajuće infekcije donjih dišnih putova u zdravih i imunokompromitiranih, kongenitalne srčane bolesti te gastroezofagusni refluks.

Djecu s napadajima ponavljajućeg zviždanja s obzirom na kliničku sliku, atopiju i plućnu funkciju, možemo svrstati u tri (prema Martinezu),¹³⁶ odnosno četiri klinička fenotipa prema PRACTALL-studiji (od engl. practical allergy).¹³⁷ Uočeni fenotipovi mogu se preklapati, a prva dva fenotipa moguće je tek retrospektivno dijagnosticirati.

1. *Rano prolazno zviždanje*- Bronhopstrukcije počinju u dojenačkoj dobi s najvišom prevalencijom između druge i treće godine. Rizični činitelji su nedonošenost, odrastanje u obiteljima sa starijom braćom i sestrama, pohađanje dječjih kolektiva i pušenje majke tijekom trudnoće. Tijekom prve godine života 4/5 svih bronhopstrukcija pripada ovom fenotipu, a obilježava ga odsutnost znakova atopije te smanjena plućna funkcija od novorođenačke do školske dobi.^{29, 138} Nakon treće godine života većina djece nema simptome.
2. *Neatopijsko zviždanje predškolske i rane školske dobi*- Počinje u prve tri godine života, vrhunac prevalencije je između četvrte i pete godine, a kod većine djece prestaje u ranoj školskoj dobi. Znakovi atopije nisu prisutni, ali se može registrirati bronhalna hiperreaktivnost uz niže vrijednosti plućne funkcije. U predškolskoj dobi najčešći uzrok su virusne infekcije dišnih putova (RSV, RV, parainfluenza) koje nakon trinaeste godine života više nemaju utjecaja za nastanak bronhopstrukcije.
3. *Atopijsko zviždanje/astma*- Prvi simptomi trajne astme u više od 50% djece počinju prije treće, te u 80% prije šeste godine života. Razlikujemo dva fenotipa: rano trajno zviždanje s početkom u prve tri godine i kasno trajno zviždanje koje počinje nakon treće godine života. Rano trajno zviždanje javlja se u 14% djece, povezano je s klinički težim oblicima astme te povećanom bronhalnom hiperreaktibilnošću. Djeca imaju znakove atopije poput povišenih vrijednosti IgE, pozitivan kožni test, atopijski dermatitis i simptome rinitisa u odsutnosti prehlade. Plućna funkcija ima je snižena od rane dječje dobi, s tendencijom daljeg pogoršavanja tijekom djetinjstva.^{138, 139} U obiteljima ove skupine djece nalazimo članove oboljele od alergijskih bolesti. Kasno trajno zviždanje javlja se u 15% djece. U djece s ovim fenotipom atopijska senzibilizacija se pojavljuje tek u šestoj godini života, a plućna funkcija ne razlikuje se u odnosu na zdravu djecu.
4. *Teško povremeno zviždanje*- Djeca imaju povremene, no teške napadaje zviždanja, a nemaju simptome između pogoršanja. Također su nazočni znakovi atopije kao što su atopijski dermatitis, specifična senzibilizacija i periferna eozinofilija.¹³⁷

Prospektivnim praćenjem djece s astmom tijekom adolescencije do u odraslu dob, uočilo se da je 40% djece s početkom bolesti počela prije sedme godine života, u odrasloj dobi bilo bez simptoma. U preostalih 60% ispitanika, simptomi astme perzistirali su i u odrasloj dobi u nekom od kliničkih oblika poput povremenog ili trajnog zviždanja.¹⁴⁰

1.6. Higijenska hipoteza

Epidemiološka opažanja u posljednjim desetljećima koja povezuju porast prevalencije astme sa smanjenom izloženošću mikroorganizmima, nazvana su "higijenskom hipotezom". Početke higijenske hipoteze nalazimo u pisanim radovima autora još u 19. stoljeću koji uočavaju veću zastupljenost polenoze među pripadnicima bogatijih društvenih slojeva.¹⁴¹ Paralelna, iako ne i identična opažanja nalazimo i u modernim društvima. Smatra se da porastu prevalencije astme koji je obilježio industrijski razvijenim zemljama u drugoj polovini dvadesetog stoljeća doprinosi značajna promjena okoliša i načina života, budući da se genetska osnova populacije nije bitnije promijenila. Poboljšana higijena u industrijaliziranim zemljama, pojačane javno-zdravstvene mjere, moderna prehrana, primjena antibiotika te procjepljivanje djece, smanjuju učestalost infekcija i reduciraju mikroorganizme iz okoline koji stimuliraju razvoj imunološkog sustava u smjeru suprotnom od atopije. Hipoteza o zaštitnom utjecaju mikrobnog okruženja za pojavu atopijskih bolesti analizirana je u brojnim istraživanjima, a rezultati su kontroverzni.

- *Istraživanja koje potvrđuju higijensku hipotezu*

Strachan i suradnici 1989. godine objavili su intrigantno epidemiološko zapažanje o zaštitnom učinku velikih, brojnih obitelji za pojavu alergijskih bolesti, pretpostavljajući da kontakt sa starijom braćom i sestrama osigurava izloženost infekcijama u ranom djetinjstvu.¹⁴² U slijedećim godinama uslijedio je niz istraživanja koja su povezala smanjenu učestalost alergijske senzibilizacije i astme u određenim životnim okruženjima i kod preboljenja nekih infekcija. Tijekom ranog djetinjstva životne sredine poput dječjih kolektiva ili farmi sa stajskim životinjama i konzumacijom nepasteriziranog

mlijeka, djeluju zaštitno na pojavu alergijskih bolesti.^{81, 143, 144, 145} Manju učestalost alergijskih bolesti, nalazimo i nakon preboljenja respiracijskih infekcija kao što su obična prehlada, crijevne infekcije uzrokovane *Toxoplasmom gondii*, virusom hepatitisa A, parazitima te infekcija s *Mycobacterium tuberculosis*, odnosno BCG cijepljenje.^{146, 147, 148, 149, 150, 151} Zaštitni učinak infekcije virusom ospica, nije jednoznačno dokazan u svim istraživanjima^{142, 152, 153} Crijevna flora bogata laktobacilusom i bifidobakterijama zastupljenija je u djece s nižom incidencijom alergijskih bolesti.¹⁵⁴ Primjena laktobacilusa ima povoljan učinak na poboljšanje ekcema i nutritivnih alergija,^{155, 156} dok je smanjenje njegovih kolonija u crijevima uzrokovano primjena antibiotika, povezano s povećanim rizikom alergijskih bolesti.¹⁵⁷

- *Istraživanja koja opovrgavaju higijensku hipotezu*

Objavljeni su i radovi koji opisuju nepovezanost ili negativan utjecaj infekcija, cijepljenja i nehigijenskih uvjeta na zaustavljanje alergijske reakcije i učestalost alergijskih bolesti. Parazitarne infekcije povezane su s većim rizikom od urtikarije i atopijskog dermatitisa,¹⁵⁸ dok infekcija s *Bordetellom pertusis*¹⁵⁹ ili RSV⁸¹ promovira allergen-specifičnu Th2-imunoreakciju. Visoka procijepljenost djece protiv hripavca pokazala je zaštitno djelovanje.¹⁶⁰ Preboljenje aktivne tuberkuloze nije smanjilo učestalost Th2-bolesti.¹⁶¹ Također, uočena je viša prevalencija astme u siromašnim gradskim domovima razvijenih zemalja.¹⁶² Jedan od nedostataka epidemioloških opažanja koja potkrepljuju higijensku hipotezu je da su oblikovana poput kohortnih ili presječnih, a ne randomiziranih kontroliranih istraživanja. U studijama presjeka ne može se dobiti valjana uzročna povezanost, a i izloženost kohorte nije slučajna, nego je uvjetovana ponašanjem, što nepovoljno utječe na vrijednost rezultata.¹⁶³

- *Imunološka osnova higijenske hipoteze*

Za povezanosti uočene u epidemiološkim istraživanjima koja potkrepljuju higijensku hipotezu nastojali su se utvrditi odgovarajući imunološki mehanizmi. Citokinski profil fetusa i novorođenčeta, karakteriziran je Th-2 predominacijom. Izostajanjem infekcija u perinatalnom, novorođenačkom i dojenačkom razdoblju, koje osiguravaju konverziju citokinskog profila iz Th2

u Th1, omogućavaju jačanje Th2-imunoreakcije i pojavu atopije.¹⁶⁴ Th1-stanice inhibiraju proliferaciju i razvoj Th2- stanica, sintezu IgE i eozinofila.¹⁶⁵ ¹⁶⁶ Smanjena izloženost mikroorganizmima u okolini odgađa sazrijevanje imunološkog sustava zadržavajući ga u Th2 stanju, uzrokuje Th1/Th2 imunološko skretanje koje je činilo temelj početnog objašnjenja higijenske hipoteze. Međutim, daljnja istraživanja uočavaju nedostatke polarizacije imunoreakcije na Th1 ili Th2, s obzirom da Th1-citokini sudjeluju u egzacerbacijama astme, a Th2-imunoreakcija u parazitarnim infekcijama štiti od atopije. Također, uočeni porast prevalencije i Th1- i Th2-bolesti, zajednički rizični činitelji te istodobno pojavljivanje ovih bolesti u iste osobe¹⁶⁷ kao i smanjeni rizik specifične senzibilizacije kod izlaganja visokim koncentracijama alergena mačke,⁶⁰ su daljnji dokazi da isključivo Th1/Th2-imunološko skretanje ne može objasniti higijensku hipotezu.

Novija istraživanja upućuju da osim imunološkog Th1/Th2-skretanja, mikroorganizmi u okolini modificiraju pojavu atopije/alergije djelujući i/ili putem imunološke regulacije, a konačni učinak ovisi o osobinama mikroorganizma, vremenu, trajanju, proširenosti i stupnju infekcije te o genetičkim osobinama domaćima.¹⁶⁸ Smatra se da je imunološka regulacija posredovana indukcijom regulacijskih T-stanica (T_{reg}) koje sintetiziraju IL-10 i TGF- β , a nose CTLA-4, neosjetljivošću izvršnih T-stanica i apoptozom Th2-stanica specifičnih za alergen. U procesu imunološke regulacije važne su dvije vrste T_{reg} : prirodene CD4+CD25+ (obilježene transkripcijskim čimbenikom Foxp3) koje nastaju u timusu i inducibilne koje nastaju u perifernoj krvi iz CD4+ T-limfocita. T_{reg} stanice održavaju homeostazu imunoloških reakcija (imunološka tolerancija) kroz IL-10, TGF- β i CTLA-4, djelovanjem na više razina.¹⁶⁹ Te stanice suprimiraju proupalno djelovanje dendritičkih stanica (DC, od engl. dendritic cells), direktno inhibiraju učinak izvršnih stanica Th1, Th2, Th17 i Th22, direktno i indirektno inhibiraju učinak mastocita, bazofila i eozinofila, inhibiraju dolazak T-stanica u tkiva zahvaćena upalom te suprimiraju B-stanice u proizvodnji alergen-specifičnih IgE i stimuliraju proizvodnju IgG₄.

Smanjena okruženost mikroorganizmima ima, dakle, za posljedicu smanjenu aktivaciju T_{reg} , odnosno smanjenje imunološke regulacije, što dovodi do

pojačane Th1- i Th2-imunoreakcije, dok posljedični nedostatak IL-12 uzrokuje i imunološko skretanje u Th2-smjeru. Smatra se da nadzor nad inhibicijom Th2-imunoreakcije imaju regulacijske dendritičke stanice (DC_{reg}, od engl. regulatory dendritic cells). One induciraju T_{reg} limfocite, apoptozu i anergiju T-stanica.¹⁶⁸

Različite infekcije usmjeravaju DC da postanu ili DC slične Th1 stanicama (DC1) koje promoviraju Th1 i inhibiraju Th2- imunološki odgovor ili DC_{reg} koje induciraju T_{reg} i inhibiraju Th2- imunološku reakciju.

Unatoč dokazima o ulozi DC u regulaciji alergijskih upalnih zbivanja, ostaju otvorena pitanja o mehanizmu kojim različite infekcije uzrokuju diferencijaciju DC u DC1 i DC_{reg} i na koji način ovako usmjerene DC reguliraju imunološke odgovore.

1.7. Endotoksin

Izloženost djelovanju mikroorganizmima može se promatrati kroz nekoliko kategorija poput izloženosti infekcijama, komponentama mikroorganizama, kroz kolonizaciju gastrointestinalnog sustava, te kroz mjere kojima reduciramo mikroorganizme u okolini poput primjene antibiotika, imunizacije i higijenskih mjera.¹⁷⁰ Pouzdan pokazatelj mikrobnog okruženja je endotoksin koji čini veći dio vanjske membrane gram negativnih bakterija. Endotoksin je lipopolisaharid (LPS), građen od tri dijela: hidrofobnog lipida A, kratkog središnjeg oligosaharida i O-antigen polisaharida. Lipid A je bioaktivna domena kojoj se pripisuje imunomodulacijski učinak, a omogućava i stabilnost molekule unutar vanjske membrane bakterija. Endotoksin je otporan na vanjske uvjete, što osigurava njegovo produljeno djelovanje u okolini, a ujedno pikogramske količine su dovoljne za imunostimulirajući učinak.

- *Koncentracija endotoksina u životnom okruženju*

Najviše koncentracije endotoksina zabilježene su u stajama i seoskim kućama, a značajno niže u gradskim domovima.^{171, 172} Javna mjesta poput vrtića, škola, ureda i prijevoznih sredstava (npr. zrakoplovi), imaju i nekoliko

puta veću koncentraciju endotoksina nego unutrašnjost obiteljskih kuća.^{173,}
¹⁷⁴ Uočene su i značajne razlike u koncentracijama endotoksina između različitih gradskih domova¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ što ovisi o držanju kućnih ljubimaca kao što su mačke i psi,¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ centralnoj regulaciji grijanja i hlađenja¹⁷⁸ i primjeni odvlaživača zraka.^{176, 177}

Prepostavka da su duhanski dim, onečišćivači zraka, toplija godišnja doba i broj mlađe djece u domovima povezani s višom koncentracijom endotoksina nije potvrđena u svim istraživanjima,^{176-178, 180, 181} a isto tako različite tehnike čišćenja domova i dječjih kolektiva ne smanjuju značajno razinu endotoksina.^{173, 178}

- *Endotoksin u seoskim domovima i domovima uz farme*

Većina epidemioloških studija^{151, 189-199} pokazuje da za razvoj atopije i alergijskog rinokonjuktivitisa zaštitni učinak ima odrastanje na farmama, dok je učinak na pojavu bronhopstrukcija i razvoj astme kontroverzan.^{144, 182} Neujednačeni rezultati istraživanja posljedica su razlika među farmama raznih zemalja, genetske osjetljivosti pojedinca, kronološke dobi djece budući da je zaštitni učinak na pojavu atopije najizraženiji kod izloženosti *in utero* i tijekom prve godine života, istodobnog djelovanja više neovisnih činitelja, kao i za sada još neprepoznatih utjecaja iz farmerskog okruženja.¹⁸³ Povoljan učinak endotoksina nastaje putem svakodnevnih kontakata sa stajskim životinjama, putem konzumacije nepasteriziranog mlijeka, obrađivanjem zemlje i uzgojem svinja.^{145, 184}

- *Endotoksin u gradskim domovima*

Niža koncentracija endotoksina zabilježena u gradskim domovima, također može djelovati zaštitno na pojavu atopije.¹⁷⁵ Međutim, ako je dijete u ranoj dobi izloženo višim koncentracijama endotoksina unutar svog doma, smanjuje se rizik od pojave ekcema u dojenačkoj dobi^{185, 186} i senzibilizacije te atopijske astme u školskoj dobi.¹⁸⁷ Osim zaštitnog učinka, u nekim studijama višestruko djelovanje endotoksina manifestira se i povećanim rizikom za alergijsku senzibilizaciju,¹⁸⁸ dok druga istraživanja nisu pokazala utjecaj na razvoj atopijskih bolesti.¹⁸⁹⁻¹⁹²

- *Negativni utjecaji endotoksina*

Udisanje endotoksina u zdravih osoba može dovesti do stezanja u prsima, porasta tjelesne temperature i proteina akutne faze upale, pritjecanja neutrofila u pluća, porasta neutrofila, monocita i limfocita u sputumu, pada plućne funkcije i porasta bronhalne hiperreaktivnosti,¹⁹³ dok u osoba s astmom dovodi do egzacerbacije bolesti.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

Učinak endotoksina nije jednak na sve alergijske bolesti. Viša izloženost u gradskim domovima djeluju protektivno na razvoj atopijskog dermatitisa u dojenačkoj dobi.¹⁸⁵ Međutim, povećan je rizik za nastanak bronhopstrukcija tijekom prve godine života,¹⁷⁷ koji se smanjuje nakon četvrte godine života.⁵⁹

- *Činitelji o kojima ovisi djelovanje endotoksina*

Za pojavnost alergijskih bolesti nakon izlaganja endotoksinu važna je kronološka dob djeteta zbog stupnja zrelosti imunološkog sustava, koncentracija endotoksina u okolini, put njegovog unosa u organizam, djelovanje drugih mikroorganizama te genetska sklonost djeteta.

Utjecaj endotoksina s obzirom na kronološku dob je dvojak: u prenatalnom i ranom postnatalnom razdoblju prije razvoja atopijske senzibilizacije i upale, zaštićuje od razvoja astme,^{15, 197-199} dok u starije djece s postojećom astmom pogoršava simptome bolesti. Važna je i njegova količina u okolini, pa tako niske koncentracije endotoksina uz istovremenu izloženost alergenima potiču Th2, dok visoke koncentracije pospješuju Th1-imunološku reakciju i djeluju zaštitno na razvoj alergijskih bolesti.²⁰⁰ Međutim, izrazito visoke razine endotoksina koje su nekoliko tisuća puta veće od kućnih razina, predstavljaju značajan rizik za nastanak atopijskih bolesti. Predmet istraživanja je i optimalni put unosa endotoksina u organizam za razvoj zaštitnog učinka.¹⁷⁰

Nadalje, dijelovi mikroorganizama, poput proteina toplinskog šoka-60, beta (1-3) glukana i bakterijske DNK svojim imunostimulirajućim djelovanjem, mijenjaju učinak endotoksina.^{201, 202}

- *Signalni put za endotoksin*

Nakon ulaska u organizam, endotoksin se opsonizira lipopolisaharid vežućim proteinom (LBP, engl. lipopolysaccharide binding protein) i s njim veže za CD14 receptor. Razlikujemo *membranski CD14* koji je smješten na površini makrofaga, monocita i neutrofila i *slobodni* koji je topiv, a proizvode ga

monociti.²⁰³ CD14 omogućava započinjanje odgovora na endotoksin, ali budući da nema citoplazmatskog dijela, ne može samostalno prenositi signale u stanicu.²⁰⁴ Signalni receptor za LPS je TLR4.²⁰⁵ Za vezanje endotoksina za TLR4, neophodan je protein MD2 koji, koji je smješten uz izvanstanični dio TLR4.^{206, 207}

Kompleks LPS-LBP-CD14 veže se za MD2 i udružuje s TLR4. Vezanje LPS potiče oblikovanje receptora sastavljenog od dvije kopije TLR4-MD2-LPS, kojim započinje prijenos signala u stanicu pri čemu se koristi četiri unutarstanične adapterske molekule: MyD88, TIRAP/MAL, TRIF i TRAM.

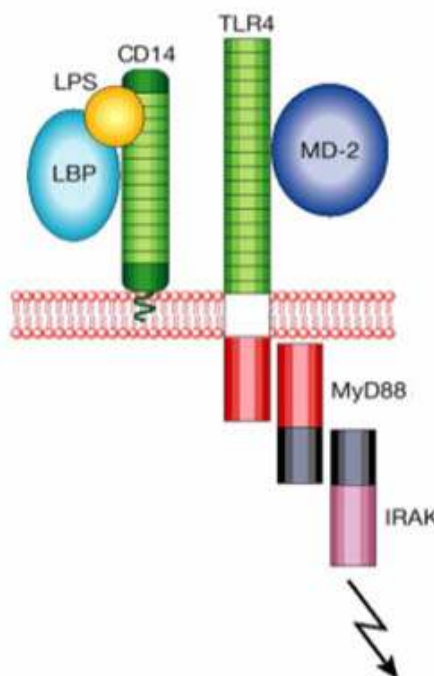
TLR4 tako ima dva signalna puta, MyD88-ovisni i TRIF-ovisni, koji imaju različitu kinetiku. MyD88-ovisni signalni put započinje kada adapterski protein TIRAP (od engl. Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein) premosti TLR4 i MyD88. MyD88 dalje prenosi signal na IRAK-kinaze 4, 2, 1 (od engl. IL-1 receptor associated kinase), TRAF6 (od engl. TNF receptor associated factor 6) te TAB2 i TAB3 (od engl. TAK1 binding protein), koji potom aktiviraju TAK1 (od engl. TGF- β -activated kinase 1). TAK1 se pridružuje IKK-kompleksu i fosforilira IKK β , što dovodi do degradacije I κ B inhibitornih proteina i aktivacije rane faze transkripcijskih čimbenika NF- κ B i MAP kinaza (od engl. mitogen-activated protein kinasa) Erk1, ERK2, p38 i Jun, koje zatim aktiviraju različite transkripcijske čimbenike, uključujući i AP-1. Slijedi endocitoza TLR4 u stanicu gdje na membrani endosoma oblikuje kompleks s TRIF-om i TRAM-om (od engl. TRIF-related adaptor molecule), koji potom aktiviraju TRAF3, TBK1 (od engl. TANK-binding kinase 1) i IKK ϵ te se katalizira fosforilacija IRF3 (od engl. interferon regulatory factor 3), što uzrokuje sintezu interferona tip I.

TRAM –TRIF aktivira TRAF6 i TAK1 neophodne za kasnu fazu aktivacije NF- κ B i MAP kinaza.²⁰⁸

Prema istraživanjima na laboratorijskim životinjama, pretpostavlja se aktivacija MyD88-neovisnog puta kod niske doze endotoksina koji dalje potiče Th2-imunoreakciju. MyD88-ovisni put, prevladava kod izloženosti visokim koncentracijama endotoksina i stimulira sintezu Th1-citokina.^{209, 210}

Utjecaj endotoksina na proupalni odgovor odvija se aktivacijom imunoloških stanica putem TLR4 što dovodi do izražajnosti proupalnih citokina (IFN- α/β ,

TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 i IL-18), sazrijevanja antigen-prezentirajućih stanica i rezultira usmjeravanjem imunološke reakcije više u Th1- nego u Th2-smjeru.²¹¹



Slika 1. Receptori za endotoksin (CD14-TLR4-MD2),
preuzeto iz Akira S i suradnici²⁰⁹

1.8. Nasljeđe i geni urođene imunosti

Nasljeđe ima važan utjecaj na razvoj atopijskih bolesti što su pokazala brojna istraživanja. Obilježavaju ga poligenost, polimorfizmi pojedinačnih gena kao i njihova interakcija. Patofiziološki mehanizmi su veoma složeni, a njihovom razumijevanju su pridonijela novija saznanja o ljudskom genomu.

- *Ljudski genom*

Pojam genotipa podrazumijeva sveukupno nasljeđe organizma, a fenotipom se smatraju sva fiziološka i morfološka obilježja organizma koja su odraz genotipa i djelovanja okoline. Za promjenu fenotipa važna je varijabilnost genoma. Ona se može odvijati na razini *kromosoma* (delecija, duplikacija, inverzija, translokacija) ili *nukleotida* (točkaste mutacije-posljedica insercije, delecije i supstitucije jednog ili više nukleotida unutar DNK). Varijanta koju

osoba nosi na određenom lokusu naziva se alel. Najčešći oblik varijabilnosti genoma je zamjena nukleotida (adenin, timin, citozin, gvanin) i nazivamo ga jednonukleotidnim polimorfizmom (SNP, od engl. single nucleotide polymorphism), a broj polimorfizama najbolje odražava genetičku varijabilnost. U ljudskom genomu otkriveno je i označeno preko 3,7 milijuna SNP, a 70% njih ima frekvenciju u populaciji manju od 5%, te se smatraju rijetkim snp. Većina SNP je smještena u nekodirajućim regijama DNK koje nazivamo introni, dok se samo oko 60 000 nalazi unutar egzona, kodirajućih regija DNK.²¹² Polimorfizmi, smješteni unutar egzona mogu uzrokovati značajne promjene DNK koje onda rezultiraju zamjenom aminokiseline i strukture proteina. Te mutacije mogu biti *tihe* (od engl. silent, synonymous) kada kodiraju istu aminokiselinu pa nema promjene u građi proteina, potom *pogrešne* (od engl. missense, non-synonymous) kada kodiraju različitu aminokiselinu te se mijenja struktura i/ili funkcija proteina ili *besmislene* mutacije kada kodiraju prijevremeni „stop kodon“ te uzrokuju skraćenje i poremećenu funkciju proteina. *Insercija* ili *delecija* pojedinačnog nukleotida može prouzročiti „pomak okvira čitanja“ (od engl. frame-shift) što mijenja genski proizvod. Polimorfizmi u *promotorskoj regiji* mijenjaju izražajnost gena ili količinu proteina koja se proizvodi u različitim uvjetima.

Smatra se da polimorfizmi smješteni u intronima mogu dovesti do značajne promjene proteina putem alternativnog prekrajanja glasničke RNK (od engl. alternative splicing). Nakon transkripcije iz glasničke RNK izrezuju se introni, a tijekom prekrajanja slijedi povezivanje egzona u različitim kombinacijama. To alternativno prekrajanje omogućuje kodiranje više proteina iz jednog gena.²¹³

Hardy-Weinberg pravilo (HWE, od engl. Hardy-Weinberg Equilibrium), naglašava konstantnost frekvencija alela i genotipova iz generacije u generaciju, što se može prikazati formulom: $(p^2) + (2pq) + (q^2) = 1$, u kojoj je p frekvencija dominantnog alela, a q frekvencija recesivnog alela. Frekvencija alela izmjerene genotipa u nesrodnih osoba unutar populacije biti će u korelaciji s frekvencijom genotipa očekivanoj prema Hardy-Weinbergovom pravilu.²¹⁴ Statistički značajno odstupanje od ravnoteže ($p < 0.001$) upućuje ili

na postojanje potomstva srodnih partnera ili pogreške u genotipizaciji. To pravilo važno je u kontroli kvalitete izvođenja genetskih istraživanja.

Neravnoteža povezanosti (LD, od engl. linkage disequilibrium) ili neslučajna udruženost alela označava češće zajedničko pojavljivanje dva alela na kromosomu nego što bi se očekivalo u slučaju neovisnog nasljeđivanja.²¹⁵

Uloga LD u genetičkim istraživanjima primjenjuje se kod razjašnjavanja dobivenih povezanosti. Zapažena povezanost polimorfizma i fenotipa, tj. bolesti ne mora značiti da polimorfizam i uzrokuje bolest, nego da je nasljeđen zajedno s polimorfizmom koji uzrokuje bolest. LD se može izraziti kao D ili kao r^2 koji označavaju kvadrat korelacijskog koeficijenta između alela smještenih na dva lokusa.²¹⁶ Područje kromosoma s visokim LD predstavlja obilježavajući polimorfizam (tag SNP, od engl. tagging SNP) koji omogućavaju jednostavnije otkrivanje genske varijabilnosti, a da se pri tome ne mora u određenoj kromosomskoj regiji pojedinačno genotipizirati svaki polimorfizam.²¹⁷ Na obilježavajući polimorfizam utječe poznavanje LD određene kromosomske regije kao i LD unutar određene populacije.

- *Genetička istraživanja*

Oblici genetičkih istraživanja u bolestima složene patogeneze su studije vezanosti gena i studije udruženosti gena kandidata. U studijama vezanosti gena (od engl. linkage study) istražuje se vjerojatnost povezanosti između pojave bolesti u obitelji s dva ili više oboljela člana i označenog lokusa, odnosno haplotipova koji se nepromijenjeni nasljeđuju kroz nekoliko generacija. Slijedi postupak pozicijskog kloniranja (od engl. positional cloning) kojim se identificira kandidatski gen s obzirom na njegov položaj u genomu. Funkcija novootkrivenog gena ne mora biti poznata. Postupak omogućava identifikaciju novih gena čija uloga u patogenezi astme još nije uočena. U studijama udruženosti gena kandidata (od engl. candidate gene association study) uspoređuje se učestalost alela gena s poznatim djelovanjem u astmi između nesrodnih bolesnika i nesrodnih, zdravih ispitanika. Napredovanjem tehnologije, razvijena su istraživanja u kojima se genotipizira nekoliko stotina tisuća polimorfizama duž cijelog genoma (od engl. genome-wide association study), koja ujedinjuju neka od obilježja prethodno opisanih genetičkih istraživanja.

Gen *CD14*

Gen *CD14*, veličine 2.566 kbp, smješten je u kromosomskoj regiji 5q31.1, za koju je u više istraživanja dokazana povezanost s atopijskim fenotipovima kao što su visoka razina IgE u serumu, eozinofilija i astma.²¹⁸⁻²²⁰ Na tom genu do sada je opisano 116 polimorfizama. Gen sadrži dva eksona koji nose informaciju za sintezu leucinom bogatog proteina CD14 (glikozilfosfatidilinozitol, molekularne težine 55 kDa). Protein CD14 je dimer potkovastog oblika s hidrofobnim udubljenjem na NH₂-završnom dijelu koji je vezno mjesto za većinu molekula endotoksina.²²¹ Nalazimo ga kao topivi u tjelesnim tekućinama (sCD14, od engl. soluble CD14) i kao membranski na površini mononuklearnih fagocita (mCD14, od engl. membrane CD14).

- *Studije udruženosti gena *CD14* i atopijskih fenotipova*

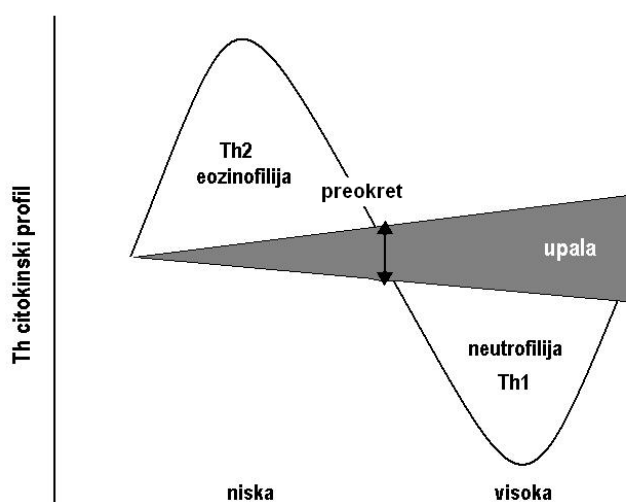
Dosadašnje studije povezanosti atopijskih fenotipova s genom *CD14* su proturječne. Prvo takvo istraživanje objavili su 1999. godine Baldini i sur.²²² Uočili su da je zamjena nukleotida C s nukleotidom T u promotorskom dijelu gena za *CD14* polimorfizma rs2569190 povezana s višim razinama sCD14 i nižim razinama IgE u serumu, pa je alel T zašitan, a alel C rizičan za pojavu atopije.²²³ U narednih desetak godina provedeno je petnaest studija koje su imale za cilj ponoviti istraživanje u različitim populacijama. Međutim, njihovi rezultati nisu jednoznačni (tablica 3). Pet istraživanja iznose opažanja podudarna s rezultatima Baldinija i sur. navodeći rizičnost C alela polimorfizma rs2569190 za pojavu astmatskih i /ili atopijskih obilježja kao što su povišena razina IgE, atopija, astma, bronhalna hiperreaktivnost u različitim populacijama.^{224-227,228} Međutim, Gao,²²⁹ Sengler,²³⁰ Heinzmann²³¹, Kedda²³², Buckova²³³ i Kabesch²³⁴ nisu utvrdili povezanost polimorfizma rs2569190 s razinom IgE, atopijom i alergijskim bolestima u japanskoj, odnosno njemačkoj odrasloj i dječjoj populaciji. Nasuprot rezultatima prethodnih istraživanja, analizirajući populaciju Hutterita, potomaka prvih doseljenika u SAD, koji žive agrarnim načinom života i imaju višu učestalost astme, Ober i sur.²³⁵ iznose rezultate da u ovoj populaciji nositelji alela T polimorfizma rs2569190 imaju veći rizik od alergijske senzibilizacije, što je uočeno i u istraživanjima provedenim u SAD i Tajvanu.^{227, 236, 237, 238}

Tablica 3. Studije o istraživanju povezanosti polimorfizma rs2569190 C/T u genu CD14 i atopijskih obilježja, modificirano prema Simpson A. i sur²³⁹

Istraživanje	Populacija i veličina uzroka (N)	Oblik istraživanja	Astma	Atopija
Baldini ²²²	dječja populacija SAD; N= 481	Prospektivna kohorta od rođenja	Nije opisano	Niža razina IgE u skupini s genotipom TT
Koppelman ²²⁴	odrasla populacija, Nizozemska, N = 317	Ispitanik-kontrola	Nije opisano	Viša razina IgE u skupini s genotipom CC
Leung ²²⁷	dječja populacija, Kina, N = 350	Ispitanik-kontrola	Nije opisano	Viša razina IgE u skupini s genotipom CC
O'Donnell ²²⁶	dob 8-25 godina Australija, N = 305	Kohortno istraživanje	Nije opisano	Povezanost s genotipom CC
Sharma ²²⁸	odrasla populacija, Indija, N=414	Ispitanik-kontrola	Povezanost alela C	alela Povezanost C
Lachheb ²²⁵	dječja populacija, Tunis, N=434	Ispitanik-kontrola	Homozigoti za alel T imaju niži rizik za astmu	Nije opisano
Gao ²²⁹	odrasla populacija, Britanska populacija N=300 Japanska populacija N = 200	Ispitanik-kontrola	Nema povezanosti	Viša koncentracija IgE u skupini s genotipom CC u Britanskoj populaciji U Japanskoj populaciji nema povezanosti
Sengler ²³⁰	dječja populacija, Njemačka, N = 558	Kohortno istraživanje od rođenja	Nema povezanosti	Nema povezanosti
Heinzmann ²³¹	dječja populacija, Njemačka, N = 352	Presječno istraživanje	Nema povezanosti	Nije opisano
Kabesch ²³⁴	dječja populacija, Njemačka, N = 2048	Presječno istraživanje	Nema povezanosti	Nema povezanosti
Kedda ²³²	odrasla populacija, Australija, N=1011	Ispitanik-kontrola	Nema povezanosti	Nema povezanosti
Buckova ²³³	odrasla populacija, Češka, N=882	Ispitanik-kontrola	Nema povezanosti	Povezanost alela C sa senzibilizacijom na plijesni
Ober ²³⁵	Huteriti N = 693	Presječno istraživanje	Nije opisano	Pozitivan kožni test je zastupljeniji među nositeljima alela T
Woo ²³⁶	odrasli i djeca, SAD, N = 175	Ispitanik-kontrola	Povezanost T alela s ne-atopijskom astmom	Nije opisano
Wang ²³⁷	Tajvan N = 190	Ispitanik-kontrola	Nije opisano	Viša razina IgE u skupini djece s astmom nositelja genotipa TT
Litonjua ²³⁸	dječja populacija, SAD, N = 379	Prospektivna kohorta od rođenja	Nije opisano	Niža koncentracija IgE u skupini s genotipom CC

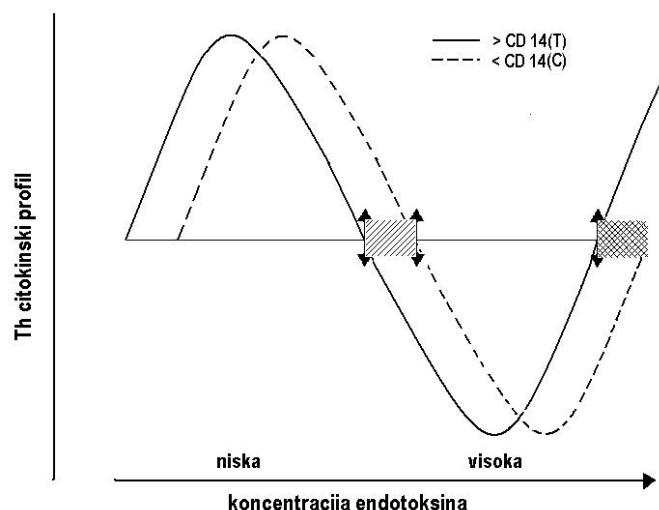
- *Međudjelovanje polimorfizma gena CD14 i okolišnog endotoksina na pojavu atopije/astme*

Pretpostavka za proturječne rezultate navedenih istraživanja o povezanosti polimorfizma gena za CD14 i atopije/astme temelji se na različitim koncentracijama endotoksina u okolišu.²⁴⁰ Niske koncentracije endotoksina, izmjerene u industrijski razvijenim sredinama, usmjeravaju imunološki odgovor prema proizvodnji Th2-citokina, dok izlaganje visokim koncentracijama endotoksina dovodi do Th1-citokinskog odgovora. Nije poznat biološki mehanizam koji potiče djelovanje endotoksina kao usmjerivača imunološkog odgovora. (slika 2)



Slika 2. Endotoksin- usmjerivač imunološkog odgovora, modificirano prema Vercelli D. i suradnici²⁴⁰

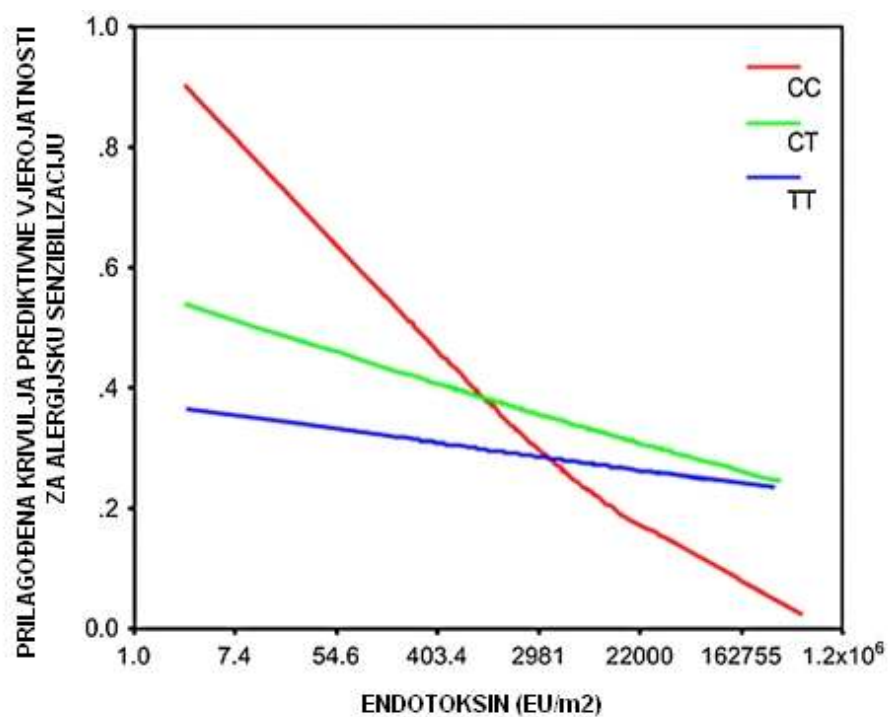
Smatra se da i alel T i alel C polimorfizma rs2569190 gena *CD14* ima svoju krivulju interakcije s endotoksinom i koncentraciju endotoksina na kojoj dolazi do promjene citokinskog profila. Pa tako, nositelji alela T, koji pojačava ekspresiju CD14, trebaju manje količine okolišnog endotoksina za prekretnicu u Th1-odgovor i na taj način su zaštićeniji za pojavu astme/atopije u odnosu na nositelje alela C. (slika 3.)



Slika 3. Zasebne krivulje interakcije alela T i C polimorfizma rs2569190 gena CD14 s endotoksinom iz okoline, modificirano prema Vercelli D. i suradnici²⁴⁰

Neujednačeni rezultati u različitim populacijama temelje se na promjeni koncentracije endotoksina u okolini. Stoga se pretpostavlja da su američka djeca bila izložena nižim razinama endotoksina budući da je u njih uočen protektivni učinak alela T,²²² a njemačka djeca srednje visokim razinama endotoksina jer nije bila uočena povezanost između polimorfizma rs2569190 C/T i astme.²³⁰ Nasuprot predhodnim dvjema populacijama, pretpostavlja se da je populacija Hutterita bila izložena vrlo visokim razinama endotoksina koji stimulira „drugi preokret“ citokinskog odgovora od Th1- u smjeru Th2- imunoreakcije jer je uočen rizični učinak alela T polimorfizma rs2569190 za astmu.²³⁵

Do sada su objavljena četiri istraživanja o utjecaju međudjelovanja polimorfizma rs2569190 CD14 gena i koncentracije okolišnog endotoksina na pojavu atopije i astme, a koja daju potvrdu hipotezi o endotoksinu kao usmjerivaču citokinskog profila.²⁴⁰ Replicirane studije uočavaju rizični učinak genotipa CC polimorfizma rs2569190 za atopiju u okruženju s nižom koncentracijom endotoksina, dok se zaštitni učinak istog genotipa za pojavu atopije otkriva s povećanjem razine endotoksina. Alel T polimorfizma rs2569190 CD14 gena ima suprotan učinak u odnosu na genotip CC.^{101, 114-116, 241} (slika 4, tablica 4)



Slika 4. Odnos koncentracije endotoksina i prediktivne vjerojatnosti za alergijsku senzibilizaciju, preuzeto iz Simpson i sur.²³⁹

Tablica 4. Prikaz četiri replicirane studije o međudjelovanju endotoksina i polimorfizma rs2569190 (C/T) u genu CD14

Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Endotoksin (mjesto uzimanja uzorka i koncentracija)	Povezanost genotipa i ishoda	Povezanost endotoksina i ishoda	Međudjelovanje genotipa i endotoksina
Simpson 2006 ¹⁰¹	Prospektivno praćenje skupine djece od rođenja, a istraživanje je provedeno u dobi od 5 godina u Velikoj Britaniji, N = 442	Pod u dnevnom boravku GM 2856 EU/m2 (16.1 EU/mg)	Atopija, astma i ekcem nema povezanosti.	Porast endotoksina povezan je sa sniženim rizikom za atopiju. Nema povezanosti s astmom i ekcemom	U skupini s genotipom CC visoke razine endotoksina povezane su sa sniženim rizikom od atopije, neatopijskog zviždanja i ekcema.
Zambelli-Weiner, 2005 ¹¹⁶	Bolesnici s astmom i njihova obitelj Potomci afričke rase, europska populacija N = 443	Dnevni boravak (75th percentila), GM 23 144 EU/m2	Kod atopije nema povezanosti. Astma-zaštitno djelovanje s TT genotipom Ekcem- nije opisano	Atopija i astma nemaju povezanosti. Nije opisano za ekcem.	U skupini s genotipom TT visoke razine endotoksina povezane su s povećanim rizikom za astme (genotip CC je zaštićen) Nije objavljeno za atopiju i ekcem.
Williams, 2006 ¹¹⁴	Ispitane su majke (>21g) a njihova djeca su u slijedećoj studiji praćena od rođenja) N = 517	Dom djeteta u dobi od 1 mjeseca GM 16.2 EU/mg	Atopija- zaštitno djelovanje s genotipom TT Astma i ekcem nije opisano.	Kod atopije nema povezanosti. Nije opisano za astmu i ekcem.	U skupini s genotipom CC visoke razine endotoksina povezane su sa sniženim rizikom za atopiju Nije objavljeno za astmu i ekcem.
Williams, 2008	Skupina djece praćena od rođenja (dob 1 godina), N = 90	Dom djeteta u dobi od 6 mjeseci, GM 18.2 EU/mg	Nisu objavljeni rezultati za atopiju, astmu i ekcem.	Nisu objavljeni rezultati za atopiju, astmu i ekcem.	U skupini s genotipom CC visokeražine endotoksina povezane su snižim ukupnim IgE. Nije objavljeno za astmu i ekcem.
Eder, 2005 ¹¹⁵	Djeca koja žive na farmama i kontrolna skupina N = 624	Dječji madrac GM u tercilama (druga tercila 12495-30 046 EU/m2)	Nema povezanosti s atopijom. Nije objavljeno za astmu i ekcem.	Visoka izloženost endotoksinu štiti od atopije. Nije objavljeno za astmu i ekcem.	Zaštitno djelovanje prema atopiji imaju nositelji alela C, ali samo kod izloženosti trećoj tercili endotoksina. Nije objavljeno za astmu i ekcem.

GM-aritmetička sredina (od engl. geometric mean)

Gen *TLR4*

Gen *TLR4* veličine 17.301 bp, smješten je u kromosomskoj regiji 9q33.1, s do sada opisanih 226 polimorfizama. Nosi informaciju za sintezu istoimenog proteina koji pripada obitelji Toll-u sličnih receptora. Nazivamo ih još i receptorima prirođene imunosti s obzirom da su važni u započinjanju prirođene imunološke reakcije, iako oni osiguravaju i signale za pokretanje specifične imunosti.²¹¹ Involvirani su u patogenezu autoimunih, kroničnih upalnih i infektivnih bolesti.²⁴²

- *Istraživanja o biološkom učinku polimorfizama gena *TLR4**

Polazeći od postulata higijenske hipoteze, brojna istraživanja imala su za cilj istražiti gene prirođene imunosti poput gena *TLR4* i otkriti polimorfizme koji imaju biološki učinak. Arbour i suradnici su 2000. godine²⁴³ objavili rezultate prve studije o utjecaju polimorfizama *TLR4*. Uočili su da dvije česte kosegregacijske mutacije pogrešnog smisla gena *TLR4* (rs4986790, zamjena A-G/Asp299Gly i rs4986791, zamjena C-T/Thr399Ile) mijenjaju izvanstaničnu proteinsku domenu receptora i uzrokuju smanjeni odgovor na endotoksin. Slijedećih godina objavljena su istraživanja od kojih neka,²⁴⁴⁻²⁴⁶ ali ne i sva²⁴⁷⁻²⁴⁹ repliciraju rezultat navedenog istraživanja o biološkom učinku mutacija u odgovoru na endotoksin.

- *Studije povezanosti polimorfizama gena *TLR4* i atopijskih obilježja*

Nakon studija o biološkom djelovanju, slijedio je niz studija povezanosti gena *TLR4* i atopijskih obilježja. Većina studija istražila je povezanost kosegregacijskih mutacija,^{225, 250-260} a samo nekoliko povezanost i drugih polimorfizama gena *TLR4*.²⁶¹⁻²⁶⁷ (tablica 5)

Usporedbom objavljenih rezultata, samo dvije studije nalaze povezanost između polimorfizama s biološkim učinkom i atopije i/ili astme i astmi pridruženih obilježja. Tako, Fageras Bottcher i sur. povezuju prisutnost major alela sa zaštitom od astme,²⁴⁵ dok Adjers i sur. isti zaštitni učinak povezuju s minor alelom.²⁶⁸ Veći je broj istraživanja koja nisu uočila povezanost polimorfizama gena *TLR4* s astmom.^{225, 250-252, 254-256, 260, 262, 264, 266, 267, 269-272}

Nekoliko istraživanja je uočilo povezanost i drugih polimorfizama gena *TLR4* s astmom, odnosno atopijom.^{260, 267}

Do sada su objavljene dvije studije koje su analizirale međudjelovanje između polimorfizama *TLR4* i mikrobnog okruženja. Werner i suradnici²⁷³ uočili su zaštitni učinak za pojavu astme i bronhalne hiperreaktivnosti u nositelja minora alela polimorfizama rs4986790 i rs4986791 kod izlaganja višim koncentracijama endotoksina. Rezultati istraživanja koje su proveli Smit i sur. upućuju na zaštitni učinak seoskog okruženja u djetinjstvu za pojavu astme, ali samo za nositelje minor alela polimorfizma rs11536889 i homozigote za major alel polimorfizma rs7045953 gena *TLR4*.²⁶²

Tablica 5. Prikaz studija o povezanosti polimorfizma gena *TLR4* i atopijskih fenotipova

STUDIJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA <i>TLR4</i> I ATOPIJSKIH FENOTIPOVA									
Ishod i povezanosti									
Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Oblik Istraživanja	Analizirani SNP	Astma	Plućna funkcija	BHR	Atopija	Ostalo	Komentar
Raby 2002 ²⁶¹	Istraživanje CAMP etnički različite populacije obitelji s članom oboljelim od astme N=589 obitelji Quebec, N=167 obitelji	TDT FBAT Analiza haplotipa	-6142A G -5749T C -5723T C rs4986790 rs4986791	Nema povezanosti	Nema povezanosti	Nema povezanosti	Nema povezanosti	Nema povezanosti broj eozinofila	Prvo istraživanje koje je analiziralo <i>TLR4</i> kao kandidatski gen za astmu Nije uočena povezanost ni za jedan analizirani ishod
Werner 2003 ²⁵¹	Istraživanje ECHRS odrasla njemačka populacija, N=334	Ispitanik-kontrola	rs4986790 rs4986791	Nema povezanosti	Nije opisano	Nema povezanosti	Nema povezanosti	Nema povezanosti AR, AD	Prvo istraživanje koje opisuje interakciju između endotoksina i funkcijskog polimorfizma <i>TLR4</i> za pojavu astme i BHR. Manji rizik za astmu kod nositelja minor alela pri izlaganju visokim razinama endotoksina.
		Ispitanik-kontrola interakcija s endotoksinom	rs4986790 rs4986791	rs4986790 (A) rs4986791 (C) Visoka razina endotoksina-nositelji minor alela imaju manji rizik za astmu	Nije opisano	rs4986790 (A) rs4986791 (C) Visoka razina endotoksina-nositelji minor alela imaju manju BHR	Nema povezanosti	Nema povezanosti AR, AD	

TDT - test transmisijskog disekvilibrjuma; FBAT - test povezanosti u obiteljima; Rizični aleli-prikazani su u zagradi uz SNP; AR-alergijski rinitis, BHR-bronhalna hiperreaktivnost

AD-atopijski dermatitis, CAMP - Childhood Asthma Management Program; ECRHS - European Community Respiratory Health Survey

STUDIJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA <i>TLR4</i> I ATOPIJSKIH FENOTIPOVA									
Ishod i povezanosti									
Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Oblik Istraživanja	Analizirani SNP	Astma	Plućna funkcija	BHR	Atopija	Ostalo	Komentar
Yang 2004 ²⁵²	Engleske obitelji s ≥2 člana s astmom N=336 Kontrole N=179	TDT Ispitanik-kontrola	rs4986790	Nema povezanosti	Nema povezanosti	Nema povezanosti	rs4986790 (G) Viši indeks atopije bolesnika s astmom u nositelja minor alela	Nema povezanosti AD	Prvo istraživanje koje dokazuje povezanost funkcijski polimorfizam <i>TLR4</i> i težine atopije u bolesnika s astmom
Böttcher 2004 ²⁴⁵	Švedska djeca N=115	Ispitanik-kontrola	rs4986790	rs4986790 (G) 4x viši rizik za astmu 7x viši rizik za atopijsku astmu u heterozigota (nije bilo homozigota za minor alel)	Nije opisano	Nije opisano	Nema povezanosti	Nema povezanosti AR	Dokazali povezanost astme, posebno atopijske astme s funkcijskim polimorfizmom
Ådjers 2005 ²⁵³	Finska odrasla populacija N=245 bolesnika s astmom i N=405 kontrola	Ispitanik-kontrola	rs4986790	Nema povezanosti Žene nositelji minor alela na rs4986790 i rs2243250 na <i>IL-4</i> genu imaju povećan rizik za astmu	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Istraživanje pokazuje epistatski učinak minor alela <i>TLR4</i> i <i>IL-4</i> na rizik za astmu u žena koje su nositelji ovih alela

TDT - test transmisijskog disekvilibrjuma; Rizični aleli-prikazani su u zagradi uz SNP; AR-alergijski rinitis, AD-atopijski dermatitis

STUDIJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA <i>TLR4</i> I ATOPIJSKIH FENOTIPOVA									
Ishod i povezanosti									
Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Oblik Istraživanja	Analizirani SNP	Astma	Plućna funkcija	BHR	Atopija	Ostalo	Komentar
Sačkesen, 2005 ²⁵⁴	N=613 Turske djece s astmom	Ispitanik-kontrola	rs4986790 rs4986791	Nema povezanosti rs4986790 (A) rs4986791 (C) Povezanost s težinom astme	Nema povezanosti	NR	Nema povezanosti	Nema povezanosti	Minor alel je povezan samo s blagom astmom.
LeVan, 2005 ²⁵⁵	N=97 odraslih pripadnika bijele rase iz SAD	Ispitanik-kontrola	rs4986790	Nema povezanosti	Nema povezanosti	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	
Weidinger, 2006 ²⁷⁰	N=275 njemačkih obitelji	TDT	rs2770150 rs6478317	Nema povezanosti	Nije opisano	Nije opisano	Nema povezanosti	Nema povezanosti AD, AR	
Smit, 2007 ²⁵⁰	Danska odrasla populacija N=100 ispitanika s astmom N=88 kontrola	Ispitanik-kontrola	rs1927911 rs2149356 rs4986790 rs4986791 rs7873784 rs1927906 rs4986790 rs4986791	Nema povezanosti	Nije opisano	Nije opisano	Nema povezanosti	Nije opisano	
Lachheb, 2008 ²⁷⁴	Tunis N=210 djece s astmom i N=224 kontrola 80 obitelji s astmom	Ispitanik-kontrola TDT	rs4986790 rs4986791	Nema povezanosti	Nije opisano	Nije opisano	Nema povezanosti	Nije opisano	

TDT - test transmisijskog disekvilibrijuma; Rizični aleli-prikazani su u zagradi uz SNP; AR-alergijski rinitis, AD-atopijski dermatitis

STUDIJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA TLR4 GENA I ATOPIJSKIH FENOTIPOVA Ishod i povezanosti									
Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Oblik Istraživanja	Analizirani SNP	Astma	Plućna funkcija	BHR	Atopija	Ostalo	Komentar
Senthilselvan 2008 ²⁵⁶	Kanada, odrasla populacija N=842	Ispitanik-kontrola	rs4986790 rs4986791	Nema povezanosti	Nije opisano	Nije opisano	rs4986790 (A) rs4986791 (C) Minor allel povezan s manje atopije u ženskih ispitanika	rs4986790 (A) rs4986791 (C) AR	
Smit, 2009 ²⁶²	odrasla populacija N=239 ispitanika s astmom N=596 kontrola N=192 obitelji s jednim članom oboljelim od astme	Ispitanik-kontrola FBAT	rs4986791 rs10759930 rs2737191 rs7869402 rs11536889 rs1927906 rs1554973 rs913930 rs1927905 rs7045953	Nema povezanosti rs11536889 (G) interakcija s seoskom sredinom snižava rizik od astme i atopijske astme u nositelja minor alela rs7045953 (G) seoska sredina smanjuje rizik za astmu kod homozigota za major alel	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Druga studija koja opisuje interakciju <i>TLR4</i> i okoline (seoska sredina).
Hsieh, 2009 ²⁶⁹	Tajvan, N=117 djece s astmom, N=60 kontrola	Ispitanik-Kontrola	rs10983755 rs1927914	Nema povezanosti	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	
Kang, 2009 ²⁶⁴	Korea, odrasla populacija, N=440 ispitanika s AR i N=528 kontrola	Ispitanik-kontrola	5216 G>C	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Nema povezanosti	Nema povezanosti broj eozinofila	

TDT - test transmisijskog disekvilibriruma; FBAT - test povezanosti u obiteljima; Rizični aleli-prikazani su u zagradi uz SNP; HMA-homozigoti za minor alel, AR-alergijski rinitis, AD-atopijski dermatitis

STUDIJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA <i>TLR4</i> I ATOPIJSKIH FENOTIPOVA									
Ishod i povezanosti									
Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Oblik Istraživanja	Analizirani SNP	Astma	Plućna funkcija	BHR	Atopija	Ostalo	Komentar
Pacheco, 2008 ²⁵⁷	N=355 Sjeverno-američkih istraživača na životinjama	Ispitanik-kontrola	rs4986790 rs4986791	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	rs4986790 (G) rs4986791 (T) senzitivizacija na lab. životinja i atopija	Nije opisano	
Tewfik, 2009 ²⁷⁵	Kanada N=206 ispitanika s kroničnim rinosinuitisom N=227 obitelji s astmom	Ispitanik-kontrola FBAT	rs10983754 rs10759930 rs10759932 rs2149356 rs4986790 rs4986791 rs11536889 rs11536898 rs1554973 rs7860896 rs7037225 rs2183016	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Nema povezanosti	Nije opisano	
Pahwa, 2009 ²⁵⁸	Kanada N=1725 odraslih ispitanika	Ispitanik-Kontrola	rs4986790	Nije opisano	Nema povezanosti	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	
Oh, 2009 ²⁷⁶	Njemačka, N=136 odrasla ispitanika s AD i N=129 kontrola	Ispitanik-kontrola	rs4986790 rs4986791	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Nije opisano	Nema povezanosti AD	

FBAT - test povezanosti u obiteljima; Rizični aleli-prikazani su u zagradi uz SNP, AD-atopijski dermatitis

STUDIJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA <i>TLR4</i> I ATOPIJSKIH FENOTIPOVA									
Ishod i povezanosti									
Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Oblik Istraživanja	Analizirani SNP	Astma	Plućna funkcija	BHR	Atopija	Ostalo	Komentar
Daley, 2009 ²⁶⁰	N=644 ispitanika s astmom i N=751 kontrola iz 4 različite populacije (GWAS)	Ispitanik-kontrola	rs10759930 rs2737191 rs2770150 rs1927914 rs1927911 rs11536878 rs1927907 rs11536889 rs7873784 rs11536897 rs1927906 rs1554973 rs913930 rs1927905 rs7045953	Nema povezanosti	Nije opisano	Nema povezanosti	Nema povezanosti		GWAS analizira ranije objavljene kandidatske gene za astmu
Genuneit, 2009 ²⁶⁶	N=1105 s bronhopstrukcijama i N=3137 kontrola iz 13 zemalja (ISAAC)	Ispitanik-Kontrola	rs1927914 rs11536891 rs11536896 rs11536898	rs11536891 (C) rs11536896 (C) rs11536898 (A)	Nije opisano	Nije opisano	rs11536896 (C) kožni test rs11536891 (C) rs11536896 (C) rs11536898 (A) spec.IgE	Nema povezanosti AD	

Rizični aleli-prikazani su u zagradi uz SNP; AD-atopijski dermatitis; GWAS-Genome Wide Association Study

STUDIJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA <i>TLR4</i> I ATOPIJSKIH FENOTIPOVA									
Ishod i povezanosti									
Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Oblik Istraživanja	Analizirani SNP	Astma	Plućna funkcija	BHR	Atopija	Ostalo	Komentar
Reijmerink, 2010 ²⁶⁷	Nizozemska N=3062 djece iz kohorti praćenih od rođenja: PIAMA, PREVASC i KOALA	Ispitanik-kontrola	rs4986790 rs4986791 rs2770150 rs6478317 rs10759932 rs11536878 rs11536889 rs1927911 rs10759931	Nema povezanosti	Nije opisano	Nije opisano	rs2770150 (C) viši ukupni IgE HMA rs1927911 (C) slgE jaje + KM u HMA rs6478317 (G) slgE jaje u HMA rs4986790 (G) HMA za TLR4 i nositelji alela A na IL1R1 rs10208293 imaju niži slgE na unutrašnje alergene (dob 6-8 godina)	Nije opisano	

HMA-homozigoti za minor alel, KM-kravlje mlijeko

Gen *MD2*

Gen *MD2* [sinonimi MD-2 (od engl. myeloid differentiation), LY96 (od engl. lymphocyte antigen)], smješten je u kromosomskoj regiji 8q21.11, veličine je 37.72 kbp, a do sada su opisana 362 polimorfizma.

Gen *MD2* nosi informaciju za sintezu istoimenog sekretornog glikoproteina koji je građen od 160 aminokiselina, a nalazimo ga kao topivi u tjelesnim tekućinama i kao membranski protein vezan uz TLR4. Izvanstanični oblik MD2 najčešće je nazočan u obliku velikih, disulfidima vezanih multimernih glikoproteina te manjih oligo i momomera^{277, 278}

MD2-protein nema membranski dio, a ima sve osobitosti obitelji izvanstaničnih lipid-vežućih proteina.²⁷⁹ Iako je TLR4 signalni receptor za endotoksin, uočeno je da on ne veže endotoksin niti njegove analoge.

Endotoksin se veže samo za monomerne oblike topivog MD2²⁸⁰ koji se potom fizički povezuje s izvanstaničnim dijelom TLR4,^{206, 207} vjerojatno kao koreceptor za endotoksin s TLR4.²⁸¹ Istraživanja kristalne strukture MD2-proteina i stvaranje kompleksa s antagonistom lipida A, koji inhibira odgovor na endotoksin potvrđuje vezanja endotoksina za MD2.²⁸² Istraživanja su uočila ulogu MD2-proteina kao opsonina i proteina akutne faze.²⁸³

Važnost uloge MD2-proteina u odgovoru na endotoksin potvrđena je u istraživanjima koja demonstriraju neosjetljivost na endotoksin onih stanica koje imaju samo TLR4 ili TLR4 i mutirani MD2. Iste stanice nakon dodavanja topljivog MD2-proteina ponovno postaju osjetljive na endotoksin.²⁸⁴ Međutim, kompleks TLR4-MD2 prepoznaje i veže endotoksin samo ako je endotoksin vezan za CD14,²⁸⁵ čime se uočava važnost i neophodnost sve tri molekule u započinjanju odgovora na endotoksin. Kompleks sastavljen od molekula CD14, TLR4 i MD2 i čini srž odgovora prirođene imunosti na endotoksin.

- *Istraživanja o biološkom učinku polimorfizama gena MD2*

Na genu *MD2* identificirani su brojni polimorfizmi, ali je malo podataka o njihovom biološkom djelovanju. Gu i suradnici²⁸⁴ uočili su važnost polimorfizama promotorskog dijela gena *MD2* na ekspresiju njegove mRNK i proizvodnju TNF- α .²⁸⁴

U studiji Gray i suradnika²⁸⁶ uočeno je da polimorfizmi u intronu 1 i intronu 2 mogu uzrokovati alternativno prekrajanje koje dovodi do sinteze izmijenjene varijante MD2-proteina. Tako promijenjeni protein negativnom povratnom spregom inhibira učinkoviti imunološki odgovor na endotoksin.

- *Studije udruženosti gena MD2*

Do sada su objavljene tri studije koje istražuju povezanost varijabilnosti gena *MD2* i atopijskih/astmatskih obilježja.^{267, 272, 287} Veliko istraživanje u Nizozemskoj (3062 djece) nije ustvrdilo statistički značajnu povezanost polimorfizama gena *MD2* s atopijom/astmom, ali je dokazan učinak na koncentraciju serumskog IgE, međusobnom interakcijom više gena, uključivši i *MD2*, koji sudjeluju u signalnom putu za endotoksin.²⁶⁷ Nadalje, na niže koncentracije IgE značajan utjecaj ima epistaza polimorfizama u genima *MD2* i *TLR10*.²⁸⁷ Također, varijabilnost gena *MD2* u međudjelovanju s udahnutim endotoksinom utječe na rizik od pojave neatopijskih bronhopneumonija.²⁷² Uloga varijabilnosti ovog gena proučavana je i u infekcijama²⁸⁸⁻²⁹⁰ te u imunološkim reakcijama tijekom infekcija²⁸⁴ i nakon cijepljenja.²⁹¹

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza

Nasljeđe koje uvjetuje sklonost alergijskoj senzibilizaciji i/ili astmi u okruženju tijekom ranog djetinjstva snažno određuje kliničku izražajnost astme te razinu plućne funkcije koja će se dostići tijekom djetinjstva i odrasle dobi. Otkrivanje i modificiranje okolišnih i genetskih činitelja koji doprinose ovim promjenama može biti značajno za prevenciju astme kao i kronične opstrukcije dišnih putova.

Proturječna je uloga ranog izlaganja endotoksinu u patogenezi atopije i astme. Tromolekularni kompleks sastavljen od receptora prirođene imunosti CD14/MD2/TLR ima vodeću ulogu u započinjanju odgovora i prijenosu signala u stanicu nakon izlaganja endotoksinu. Neka, ali ne i sva istraživanja uočila su povezanost varijabilnosti gena *CD14*, *MD2* i *TLR* s astmom. Na temelju do sada poznatih činjenica o utjecaju endotoksina i receptora prirođene imunosti na astmu u dječjoj dobi te s obzirom na proturječne rezultate istraživanja koja su analizirala isključivo utjecaj okoline ili nasljeđa, otvorena je mogućnost hipoteze o prisutnom međudjelovanju okolišnog endotoksina i polimorfizma gena za CD14, MD2 i TLR4. Pretpostavljena interakcija uključuje mogućnost modulacije imunološkog odgovora nakon izlaganja endotoksinu i utjecaj na ekspresiju astme i atopije.

Cilj istraživanja je bio ustvrditi:

1. rizične činitelje za astmu u ispitivane djece (pozitivna obiteljska anamneza za astmu, uvjeti stanovanja, izloženost duhanskom dimu, veličina obitelji)
2. koncentraciju endotoksina u madracu ispitanika i utjecaj na alergijsku senzibilizaciju i astmu
3. koncentraciju alergena *Der p1* u madracu ispitanika i utjecaj na alergijsku senzibilizaciju i astmu

4. povezanost variabilnosti gena *CD14* s astmom te njegovo medudjelovanje s endotoksinom
5. povezanost variabilnosti gena *TLR4* s astmom te njegovo medudjelovanje s endotoksinom
6. povezanost variabilnosti gena *MD2* s astmom te njegovo medudjelovanje s endotoksinom

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je uključilo 423 djece, dobi 5-18 godina, kojima je u Alergološkoj ambulanti Odjela za dječje bolesti, Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“, liječnik specijalist pedijatrije dijagnosticirao astmu, a koja su u prethodnih dvanaest mjeseci imala kliničke simptome i zbog toga uzimala lijekove za liječenje astme. Kontrolnu skupinu činilo je 414 zdrave djece koja su odabrana pri sistematskim pregledima ili elektivnim operacijskim zahvatima (npr. fimoze, hernije), a koja su imala negativnu anamnezu za alergijske bolesti. S obzirom na mjesto stanovanja, ispitanici su podijeljeni na skupinu djece iz urbanih te ruralnih naselja.

3.2. Upitnik

Roditelji svih ispitanika popunili su upitnik koji je sastavljen prema standardiziranom upitniku ISAAC. Upitnik je sastavljen od 127 pitanja koja se odnose na tri životna razdoblja: prije rođenja, tijekom dojenačke dobi i u trenutku provođenja istraživanja, a donosi informaciju od obilježjima djetetovog doma poput držanja kućnih ljubimaca, unutarnjih onečišćivača vlažnosti doma i mjestu stanovanja. Pitanja iz upitnika su se odnosila i na obilježja djetetove obitelji, pojavnost alergijskih bolesti u roditelja, respiracijske simptome tijekom djetinjstva te na simptome i liječenje alergijskih bolesti.

3.3. Kožni test

Za izvođenje kožnog ubodnog testa (od engl. skin prick test, SPT) primijenili smo standardizirane alergenske pripravke (Stallergenes, Antony, Francuska). Pet dana prije izvođenja testa prekinuta je primjena lijekova koji bi mogli utjecati na rezultate.²⁹² Korišteni su slijedeći pripravci: *Dermatophagoides pteronyssinus*, epitel mačke, epitel psa, mješavina peludi trava (*Phelum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Lolium perenne*, *Anthroxanthum odoratum*), pelud breze (*Betulla alba*), pelud ambrozije (*Ambrosia elatior*), kikiriki i jaje. Primjenjena je negativna kontrola (fiziološka otopina, 50%

glicerin) za otkrivanje traumatskih reaktivnost izazvanih primjenom lancete za izvođenje kožnog testa i za identifikaciju osoba s dermatografizmom. Pozitivna kontrola, histamin dihidroklorid 10 mg/ml, korištena je za procjenu reaktivnosti normalne kože i otkrivanje supresije izazvane lijekovima ili bolešću. Ispitivanja su provedena samo na zdravoj koži. Na volarnoj površini kože podlaktice, najmanje 5 cm od ručnog zgloba i 3 cm od kubitalne jame, uz međusobnu udaljenost od 2 cm, primjenjena je mala kapljica alergena. Korištene su lancete Stallerpoint (Stallergens, Antony, Francuska). Primjenom lancetom koža je ubodena kroz otopinu pod kutom od 90 stupnjeva na površinu kože. Nakon 15 minuta reakcija na koži je očitana i zabilježena. Srednji promjer urtike je mjereno u milimetrima (mm) kao srednja vrijednost najdužeg i na njega okomitog promjera urtike. Pozitivnim rezultatom kožnog test smatrali smo veličinu urtike koja je 3mm veća od negativne kontrole.

3.4. Mjerenje plućne funkcije

Testovi plućne funkcije uključivali su određivanje FVC, FEV₁, FEV1%prediktivnog, FEF_{25%}, FEF_{50%} i FEF_{75%}, primjenom spirometra (Jaeger, Würzburg, Njemačka) prema metodologiji opisanoj u smjernicama Europskog respiracijskog društva.²⁹³⁻²⁹⁵ Prvi korak je uključivao brzi i potpuni udah od funkcionalnog rezidualnog kapaciteta do ukupnog plućnog kapaciteta. Nakon 1 do 2 sekunde slijedio je pokušaj izvođenja FVC (snažno i brzo izdahne zrak i potom izdiše sav zrak iz pluća do rezidualnog volumena). Mjerenje je završeno kada krivulja protok-volumen nije pokazivala promjene u volumenu (≤ 0.025 l) u jednoj sekundi, a ispitanik je pokušao izdisati tijekom ≥ 6 sekundi. Test je ponavljan sve dok nisu dobivena tri tehnički ispravna FVC (dvije najviše vrijednosti FVC i/ili FEV₁ su bile unutar 0,150 L - varijabilnost od 5%). Nakon tri ponovljena mjerenja najviše zabilježene vrijednosti dinamičkih i statičkih plućnih volumena unijete su u bazu podataka. Pri izračunu predviđenih vrijednosti za svakog ispitanika (ovisne o visini, dobi i spolu u bijeloj rasi) korištene su jednadžbe objavljene prema referenci Miller i suradnika,^{293, 294} a zabilježene su i vrijednosti udjela dobivenih mjerenjem u odnosu na one predviđenih vrijednosti (%).

3.5. Mjerenje koncentracije okolišnih činitelja

3.5.1. Prikupljanje uzoraka prašine

Uzorci prašine iz madraca dječjih spavaonica prikupljeni su standardiziranim načinom. Po tri uzorka prašine za svakog ispitanika dobivena su usisavanjem površine od 1m² dječjeg madraca tijekom dvije minute uređajem Medivac uz protok zraka 45 l/s (Medivac Plc, Wilmslow, Cheshire, Velika Britanija). Na Medivac uređaj postavljena je glava za uzorkovanje koja sadrži mrežaste filtere, za uklanjanje čestica većih od 300 µm promjera, a omogućava česticama fine prašine prolaz i nakupljanje na porama vinilskog filtera veličine 5µm (Plastok Associates Ltd, Wirral, Velika Britanija). Odmah nakon prikupljanja, uzorak prašine je prebačen u prethodno izvaganu Petrijevu zdjelica. Petrijeva zdjelica ispunjena uzrokom prašine je ponovno izvagana da bi se mogla izračunati ukupna količina uzorka prašine. Nakon svakog uzorkovanja glava usisivača je očišćena 70% izopropilnim alkoholom. Prikupljeni uzorak prašine podijeljen je u dva dijela: jedan za mjerenje alergena i drugi za mjerenje endotoksina. Uzorak za endotoksin je odvojen u staklenu ekstrakcijsku epruvetu (Endosafe, Charles River Laboratories), prekriven je s dva sloja parafilma prije testa kako bi se spriječilo onečišćenje i pohranjen na sobnoj temperaturi. Preostala količina uzorka prašine iz Petrijeve zdjelice namijenjena za analizu alergena, do ekstrakcije je pohranjena na temperaturi 4 °C.

3.5.1.1. Analiza alergena *Der p1*

Uzorak od 100 mg prašine, potrebnog za daljnju analizu *Der p1*, dobiven je rotiranjem s 2ml Na-borat-HCL pufera 0,1% Tween 20, pH = 8,0, na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata. Slijedio je postupak centrifugiranja 20 minuta na 2500 okretaja/min na 4 °C. Supernatant je pohranjen na -20 °C do analize sadržaja alergena. U svima uzorcima analiziran je sadržaj glavnog alergena *Der p1* primjenom monoklonskih protutijela (mAb, od engl. monoclonal antibody) na temelju enzimskog imunotesta-ELISA (Indoor Biotechnologies, Ceshire, Velika Britanija), a prema metodi koju je opisala Luczynska i

suradnici.²⁹⁶ Rezultati su izraženi kao nanogram alergena po miligramu prikupljene prašine (ng/mg).

Za pripremu uzoraka korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica (Immulon II Dynatech, Chanilly, Virginia, SAD) koji su prekriveni s 1 μ l mAb 5H8 (0,1ml od razrjeđenja 1/1000 5H8 u 50 mM karbonatno-bikarbonatnog pufera, pH 9,6), i ostavljeni preko noći na temperaturi od 4 °C. Jažice su zatim isprane u dva navrata s puferiranom otopinom fosfatnih soli Tween (PBS-T, od engl. phosphate buffered saline with Tween) i osušene, nakon čega je uslijedilo dodavanje 0,1ml albumina iz goveđeg seruma (BSA, od engl. bovine serum albumin) u svaku jažicu i inkubacija 1 sat na sobnoj temperaturi. Svaka jažica je potom dva puta isprana s PBS-T prije dodavanja 0,1ml odgovarajućeg uzorka i inkubacije 1 sat na sobnoj temperaturi. Jažice su ponovno isprane pet puta otopinom PBS-T, a zatim inkubirane tijekom sat vremena s 0,1ml (razrjeđenje 1/1000) biotinom označenih mAb 4CI (ekvivalent 16ng 4CI). Slijedilo je ponovno ispiranje u pet navrata i potom inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta s 0,1ml otopine streptavidin peroksidaze (Sigma S5512, St.Louis, Missouri, SAD) 0.25mg u 1ml destilirane vode i BSA PBS-T (razrjeđenje 1/1000). Nakon ispiranja u pet navrata, dodano je 0,1ml otopine 1mM azino-di (3 etilbenztiazolin sulfonska kiselina) u 70mM citratnog fosfatnog pufera, pH 4,2. Uzorci u pločicama su očitani korištenjem optičkog čitača Biorad 3550 (Biorad Laboratories, Berkeley, Kalifornija, SAD) kada je apsorbancija (405 nm) dosegla 2,0 do 2,4. Kvantifikacija testa, odnosno rezultata ovisi o standardima ekstrakta grinje za koje je poznata koncentracija *Der p1*. Standard koji je primjenjivan za određivanje kontrolne krivulje za *Der p1* test (UVA 93/02) sadrži 2500 ng

Der p1/ml (u odnosu na standard Svjetske zdravstvene organizacije i Međunarodnog udruženja imunoloških društava *D. pteronyssinus* standard NIBSC 82/518, koji sadrži 12,5 g *Der p1* po ampuli). Udvostručena razrjeđenja (250-0,5 ng/ml) ekstrakta ovog standarda su korištena za izradu kontrolne krivulje za svaki pojedini test. Očitane apsorbancije prikazane su linearnom skalom na istom polu-logaritamskom papiru kao i koncentracija *Der p1*. Ovaj graf je primijenjen za izračunavanje sadržaja *Der p1* svakog prikupljenog uzorka na temelju očitane apsorbancije. Rezultati su iskazani

kao koncentracija *Der p1* u svakom uzorku (ng/ml), a kasnije su prikazani kao količina *Der p1* u ng po miligramu sakupljene prašine (ng/mg). Očitavanja su uzeta samo iz linearnog dijela kontrolne krivulje. Svaki prikupljeni uzorak ispitan je u duplikatu, na 1/5, 1/25, 1/125 razrjeđenja (BSA s PBS-T). Ukoliko na ovim razrjeđenjima rezultat nije slijedio linearni dio kontrolne krivulje, slijedilo je ponovno testiranje na odgovarajućim razrjeđenjima (1/500, 1/2.500 i 1/12.500). Donja granica detekcije za *Der p 1* je bila 0,05 ng/mg.

3.5.1.2. Analiza endotoksina

Kinetički Limulus-test primijenjen je u analizi sadržaja endotoksina u prikupljenim uzorcima.^{297, 298} Pedeset mg fine prašine ekstrahirano je trešnjom u epruvetama bez pirogena uz dodatak 5ml vode bez endotoksina (Charles River Endosafe, Charleston, Južna Karolina, SAD) tijekom 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja (3000 okretaja/min, 30 min), 100µl uzorka u razrjeđenima 1:100-1:100,000 prenesene su na mikrotitarsku pločicu uz dodatak 100 µl Limulus amebocitnog lizata (Charles River Endosafe, Charleston, Južna Karolina, SAD). Optička gustoća očitavana je svakih 30s na 405 nm tijekom 1 sat (BIO-TEK Instruments, Winooski, SAD). Rezultati su izračunati iz standardne krivulje svake mikrotitarske pločice korištenjem Biolise softvera (Charles River Endosafe, Charleston, Južna Karolina, SAD) i prikazani kao koncentracija endotoksina u mg prašine (jedinica endotoksina (EU, od engl. endotoxin unit) EU/mg), odnosno kao koncentracija endotoksina po 1m² usisavane površine (EU/m²).

3.6. Genotipizacija

3.6.1. Kriteriji za odabir gena i jednonukleotidnih polimorfizama

Za istraživanje smo odabrali gene *CD14* i *TLR4* koji s obzirom na biološki učinak svojih proteina imaju moguću ulogu u patogenezi astme, odnosno u ranijim istraživanjima uočena je njihova povezanost s astmom. S obzirom na važnost receptora MD2 u odgovoru na izlaganje endotoksinu, naknadno je genotipiziran gen *MD2* koji nosi informaciju za sintezu istoimenog receptora. Pri odabiru polimorfizama koristili smo slijedeće javno dostupne baze

podataka s kartama varijabilnosti ljudskog genoma Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (od engl. National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/), Međunarodnog HapMap projekta (www.HapMap.org), Programa za genetičku primjenu Seattle SNPs (od engl. Programs for Genomic Applications SeattleSNPs, <http://pga.gs.washington.edu/>) i Poslužitelja za genetsku varijabilnost (od engl. Genome Variation Server, <http://gvs.gs.washington.edu/GVS/>).

Za odabir tagSNP korišten je algoritam (od engl. LD select)²⁹⁹ koji je dostupan u GVS-u, a odabir se temeljio na podacima za europsku populaciju te je uspoređen s podacima iz ovog istraživanja. Kontrola kvalitete genotipiziranja provedena je isključivanjem polimorfizama čiji je uspjeh genotipiziranja ispod 85% i/ili su statistički značajna odstupanja od Hardy-Weinberg-ovog pravila ($p < 0.001$). Preostali polimorfizmi su naknadno isključeni iz analize nakon procjene LD unutar populacije.

3.6.2. Opis genotipizacije

Genotipizacija je provedena primjenom sustava Sequenom® MassARRAY® iPLEX™ Gold (San Diego, California, SAD). Primjenjeni sustav kombinira jednostavnu metodu produljivanja pojedinačne baze (od engl. Single Base Extension Method) s MALDI-TOF spektrometrijom masa.^{300, 301} Ta genotipizacijska platforma koristi višestruke reakcije lančane reakcije polimeraze, omogućavajući testove na više istodobnih kompleksa. Metoda se sastoji od nekoliko koraka:

- *Oblikovanje testova za SNP* - Korišteni su bioinformatički program MassARRAY® Assay Design, ProxSNP, PreXTEND i PleXTEND (www.realSNP.com) te početnice proizvođača Metabion, Martinsried, Njemačka
- *Umnažanje DNK uzorka* - Lančana reakcija polimeraze izvedena je u ukupnom uzorku od 5 µl s 2,5 ng genomske DNK i reagensima koji su nabrojeni u slijedećoj tablici. Korišteni su reagensi i enzim polimeraza Taq proizvođača Hotstar Taq® (Qiagen, Hilden, Njemačka). Uzorci su promiješani u mješalicama za više epruveta, a potom postavljeni u PCR uređaj tijekom 1 sat i 45 min (tablica 6).

Tablica 6. Reagensi primjenjeni u lančanoj reakciji polimeraze

Reagens	Koncentracija u 5ml	Volumen (μl)
PCR pufer s MgCl ₂ (10x)	1,25x	0,625
MgCl ₂ (25 mmol)	1,625 mmol	0,325
četiri deoksiribonukleotida (25 mmol)	500 μmol	0,100
mješavina početnica (500 nmol)	100 nmol	1,000
enzim Taq polimeraza (5 U/μl)	0,5 U/reakciji	0,100
H ₂ O		2,850

- *Uklanjanje suvišnih fosfatnih skupina iz DNK* - U proizvod dobiven lančanom reakcijom polimeraze dodana je 2μl mješavine alkalne fosfataze iz škampa (SAP) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscatama, New York, SAD). Sadržaj epruveta je promiješan mješalicama, nakon čega je slijedila inkubacija u PCR-uređaju na 37 °C tijekom 20 minuta uz dodatni korak inaktivacije SAP na 85 °C u trajanju od 5 minuta, (tablica 7).

Tablica 7. Reagensi upotrijebljeni za uklanjanje suvišnih fosfatnih skupina iz DNK

Reagens	Volumen reakcije (μl)
SAP pufer (10x)	0,170
SAP enzim (1U/μl)	0,300
H ₂ O	1,530

- *iPLEX reakcija produljavanja* - metoda produljavanja pojedinačne baze nakon koje slijedi terminacija. Budući da je razlika u masi pojedinačnih proizvoda metode produljavanja pojedinačne baze mala (9-40 Da), iPLEX-reakcija primjenjuje terminatore promjenjive mase koji osiguravaju da se zamjena pojedinačne baze može registrirati spektrometrijom masa. iPLEX mješavina je dodana PCR proizvodima.

Nakon što su uzorci promiješani, slijedilo je izvođenje iPLEX-reakcije u PCR-uređaju, (tablica 8).

Tablica 8. Reagensi primjenjeni u iPLEX reakciji produljivanja

Reagens	Koncentracija u 9 (μl)	Volumen reakcije (μl)
iPLEX pufer (10x)	0,222x	0,200
iPLEX mješavina terminatora	1x	0,200
Mješavina početnica (7 μmol:14 μmol)	0,625 μmol:1,25 μmol	0,804
iPLEX enzim	1x	0,041
H ₂ O		0,755

- *Čišćenje smolama* - Proizvodi reakcija PCR umnažanja i iPLEX produljavanja podvrgnuti su postupku desalinizacije. U svaku reakciju produljenja pojedinačne baze dodano je 16 μl vode upotrebom Multimek 96 kanalne auto-pipete (AFAB Lab, Frederick, SAD), što je povećalo ukupni volumen na 25 μl. U svaku reakciju je potom dodano 6 mg smole. Posudice s uzorkom su pokrivene i okrenute tijekom slijedećih 30 minuta. Reakcija čišćenja završava se centrifugiranjem uzoraka na 4000 okretaja/minuti.
- *MALDI-TOF MS*- Nakon kratkog centrifugiranja (1600 okretaja/minuti tijekom pet minuta) 10nl reakcijske otopine podijeljeno je na 384 jažice SpectroCHIP ® (Sequenom, San Diego, California, SAD) uz pomoć uređaja za dijeljenje- Spectropoint Nanodispenser ® (Sequenom, San Diego, California, SAD). Podaci iz SpectroCHIP ® prenošeni su potom na MALDI-TOF. Uspješnost genotipizacije izražava se kao postotak odziva (engl. call rate, hit rate), a dobiveni su računalnim programom MassARRAY ® Typer Analyser.

3.7. Statistička analiza podataka

Astma i alergijska senzibilizacija su definirane kao kvalitativne, dihotomne varijable (0=nema astmu, odnosno negativan kožni test, 1=ima astmu, odnosno pozitivan kožni test). Izloženost duhanskom dimu je analizirana kao dihotomna, kvalitativna varijabla (0=nema izloženosti duhanskom dimu, 1=izloženi duhanskom dimu). Svi parametri plućne funkcije slijedili su log normalnu distribuciju, pa su rezultati prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti (od engl. 95% Confidence Interval, 95%CI).

Primjenom χ^2 testa analizirano je odstupanje polimorfizama od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže. Primjenom metoda kontrole kvalitete isključeni su SNP-ovi s uspješnošću genotipiziranja (od engl. call rate) manjom od 85% i/ili p vrijednošću HWE manjom od 0,001.

Za statističku analizu podataka koristili smo Statistički program za društvene znanosti verzija 15 (od engl. Statistical Software for Social Sciences version 15, Inc. Chicago, SAD) kao i statistički program za analizu SNP (od engl. SNP and Variation Suite, version 7.2.3, Golden Helix, Inc., SAD)

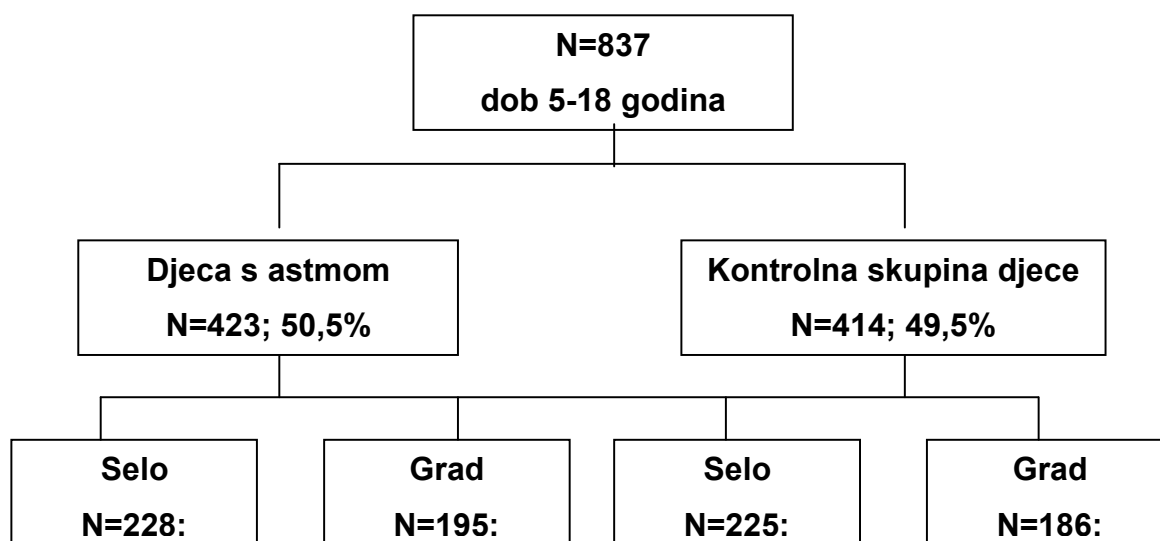
Ovo istraživanje je oblikovano po tipu uspoređivanja ispitanika-bolesnika i zdravih kontrola. Po završetku uključivanja ispitanika u istraživanje, uočena je statistički značajna razlika u spolu ispitanika i njihovih kontrola. Stoga je sva statistička analiza podataka korigirana za spol primjenom multivarijantne logističke regresije, s ciljem isključivanja utjecaja spola na dobivene rezultate. U prikazu podataka genotipiziranih polimorfizama, koristili smo izraze minor i major alel. Minor alel je alel s nižom učestalošću pojavljivanja (D), dok major alel ima višu učestalošću pojavljivanja u ispitivanoj populaciji (d). Povezanost genetske varijabilnosti i astme analizirana je primjenom dominantnog i recesivnog genetskog modela. Dominantni model uspoređuje nositelje minor alela (DD+Dd) s homozigotima za major alel (dd). Taj model analizira povezanost astme s nositeljima jednog minor alela D (homozigoti za minor alel DD ili heterozigoti dD) u odnosu na preostale sudionike ispitivane skupine koji ne nose minor alel. Recesivni model uspoređuje homozigote za minor alel (DD) s nositeljima major alela (dd+Dd). Ovaj model analizira povezanost astme s homozigotima za minor alel u odnosu na nositelje jednog major alela u istraživanoj skupini.

U analizi povezanosti astme i SNP-ova koristili smo χ^2 test i test korelacije te multivarijantnu logističku regresiju. Dobiveni rezultati prikazani su kroz p vrijednost, koja predstavlja omjer vjerojatnosti korigiran za spol (od engl. Adjusted for Gender Odds Ratio, aOR) i 95% interval pouzdanosti (od engl. 95% Confidence Interval). Major alel je korišten kao referentna kategorija u svim analizama.

Primjenom multivarijantne logističke regresije analiziran je utjecaj međudjelovanja polimorfizma gena i okolišnog endotoksina na astmu. U model su uključene varijable: razina endotoksina, SNP u dominantnom ili recesivnom modelu i međudjelovanje između endotoksina i SNP. Zbog nepodudaranja ispitanika i kontrola po spolu, u model je uključivan i spol. Ukoliko je p vrijednost međudjelovanja iznosila manje od 0,05, registrirano je statistički značajno međudjelovanje polimorfizma gena i endotoksina. Rezultati su prikazani kao p vrijednost, aOR i 95%CI. Sve analize povezanosti polimorfizama kao i međudjelovanje polimorfizama i endotoksina u odnosu na astmu su korigirane zbog višestrukog testiranja primjenom metode za otkrivanje lažno pozitivnih rezultata (FDR, od engl. False Discovery Rate) koju su opisali Benjamini i Hochberg.^{302, 303} Korištena je razina značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 837 djece s potpisanim informiranim pristankom roditelja ili skrbnika. U skupini djece s astmom bilo je 423 (50,5%), od kojih je 228 (53,9%) stanovalo u selu, a 195 (46,1%) u gradu. U kontrolnoj skupini ispitanika bilo je 414 (49,5%) djece, od kojih je 186 (45,3%) stanovalo u gradu, a 225 (54,7%) u gradu, (slika 5).



Slika 5. Prikaz ispitanika

Prema planu izvođenja istraživanja, roditelji i ispitanici zajednički su trebali ispuniti standardizirani upitnik, a svim ispitanicima planirano je izvođenje kožnog ubodog testa na inhalacijske i nutritivne alergene, uzimanje uzoraka krvi za DNK analizu, uzoraka prašine iz madraca spavaonica (analiza koncentracije alergena *Der p1* i endotoksina), a djeci s astmom i mjerenje plućne funkcije, (tablica 9).

Tablica 9. Broj ispitanika prema prikupljenim podacima u istraživanju

	Broj djece s prikupljenim uzorcima		
	Djeca s astmom (N)	Kontrolna skupina djece (N)	Ukupno (N)
Upitnik	423	411	834
Kožni ubodni test	423	412	835
Uzorci krvi za genetiku	417	407	824
Mjerenje alergena Der p1	397	390	787
Mjerenje endotoksina	380	380	760
Spirometrija	410	-	410

Analiza dobi ispitanika pokazala je statistički značajnu razliku između djece s astmom (aritmetička sredina 11,08 godina, 95%CI 10,8-11,4) i kontrolne skupine djece (aritmetička sredina 12,26 godina, 95%CI 11,9-12,6), $p < 0,01$ (tablica 9). Djeca s astmom i djeca iz kontrolne skupine nisu se podudarali po spolu; bilo je više dječaka u skupini djece s astmom (58,6%), a djevojčica u kontrolnoj skupini (57%). Razlika po spolu statistički je značajna, $p < 0,01$, stoga su rezultati statističke analize koja slijedi, korigirani su za spol, (tablica 10).

Tablica 10. Dob i spol ispitanika

		Djeca s astmom	Kontrolna skupina djece	p
DOB /u godinama/ aritmetička sredina, 95%CI		11,08 (10,8-11,4)	12,26 (11,9-12,6)	<0,01
SPOL	Dječaci N (%)	248 (58,6%)	178 (43,0%)	<0,01
	Djevojčice N (%)	175 (41,4%)	236 (57,0%)	

p<0,05

Nije bilo statistički značajne razlike prema mjestu stanovanja između ispitanika s astmom i kontrolne skupine djece. To se odnosilo na mjesto stanovanja tijekom samog istraživanja, ali i na mjesto stanovanja gdje su ispitanici živjeli tijekom svoje prve godine života, (tablica 11).

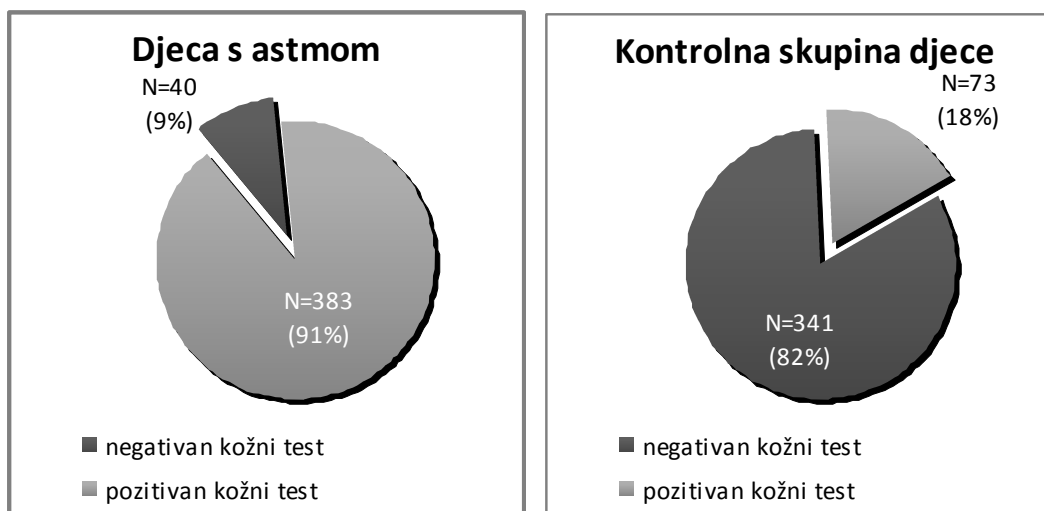
Tablica 11. Mjesto stanovanja

Mjesto stanovanja		Djeca s astmom N (%)	Kontrolna skupina djece N (%)	p
Tijekom istraživanja	urbano	195 (46,1%)	186 (45,3%)	0,81
	ruralno	228 (53,9%)	225 (54,7%)	
Tijekom prve godine života	urbano	196 (46,3%)	182 (44,3%)	0,55
	ruralo	227 (53,7%)	229 (55,7%)	

p<0,05

Od ukupnog broja ispitanika (N=837) u 460 (55%) djece zabilježen je pozitivan kožni test na jedan od ispitivanih alergena.

U skupini djece s astmom (N=423) pozitivan kožni test je imalo 383 (90,5%) djece. U kontrolnoj skupini ispitanika (N=414) pozitivan kožni test je imalo 73 (17,7%) djece, (slika 6).



Slika 6. Zastupljenost pozitivnog kožnog ubodnog testa u ispitivane djece

Atopijske bolesti imaju svoj slijed i često se u određenim životnim periodima i preklapaju. U ovom istraživanju uočeno je da je tijekom djetinjstva 290 (68.6%) djece od ukupnog broja ispitanika s astmom (N=423) imalo pridružene simptome alergijskog rinitisa, dok ih je 282 (66.7%) simptome alergijskog rinitisa imalo i tijekom posljednjih 12 mjeseci.

Atopijski dermatitis tijekom djetinjstva u ispitanika s astmom, imalo je 108 (25.5%) djece, a recidive u posljednjih 12 mjeseci imalo je 37 (8.7%).

Simptome astme, alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa tijekom djetinjstva imalo je 88 (20.8%) djece.

U procjeni kliničkog statusa ispitanika s astmom uvršteno je ispitivanje plućne funkcije. Podatci za parametre plućne funkcije prikupljeni su za 410 ispitanika. Analizirane su vrijednosti FVC, FEV₁, FEV₁%prediktivnog, FEV₁/FVC i protoci (FEF_{25%}, FEF_{50%}, FEF_{75%}). Svi parametri plućne funkcije imaju normalnu distribuciju, dok distribucija FEV₁/FVC i FEF_{75%} značajno odstupa od normale, (tablica 12).

Tablica 12. Opis mjerenih parametara plućne funkcije u skupini djece s astmom

	FVC (L)	FEV ₁ (L/s)	FEF ₂₅ (L/s)	FEF ₅₀ (L/s)	FEF ₇₅ (L/s)	FEV ₁ % prediktivnog	FEV ₁ / FVC
N	410	410	410	410	410	410	410
Aritmetička sredina*	2,62	2,38	4.17	2,96	1,58	98,11	0,92
Median	2,42	2,2	3,98	2,77	1,45	98,92	0,92
Standardna devijacija	1,07	0,92	1,5	1,14	0,75	15,57	0,07
Minimum	0,83	0,83	1,14	0,84	0,3	37,95	0,66
Maksimum	7,39	5,57	9,92	6,41	5,7	147,89	1.000

*aritmetička sredina (od engl. mean)

Rezultati rizičnih činitelja za astmu

- *obiteljska anamneza za astmu*

Pozitivnu obiteljsku anamnezu za astmu (isključivo za majku i/ ili oca) imalo je 75 (9%) djece. Statistički je značajna učestalost astme onih roditelja čija djeca imaju astmu, u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika ($p < 0,05$). Prisutnost astme u samo jednog roditelja (majka ili otac), povećava rizik za pojavu astme u njihove djece (aOR 5,06, 95%CI 2,73-9,4, $p < 0,01$). Majčina astma značajno povećava rizik za pojavu astme, čak devet puta više nego u djece kontrolne skupine (aOR 9,05, 95%CI 3,18-25,74, $p < 0,01$), dok je rizik za astmu manji ukoliko otac ima astmu (aOR 3,09, 95%CI 1,43-6,71, $p < 0,01$), (tablica 13).

Tablica 13. Obiteljska anamneza za astmu

Pozitivna obiteljska anamneza		Djeca s astmom N (%)	Kontrolna skupina djece N (%)	aOR*(95%CI)**	p***
Astma	majka ili otac	62 (14,7%)	13 (3,2%)	5,06 (2,73-9,4)	<0,01
	majka	37 (8,7%)	4 (1,0%)	9,05 (3,18-25,74)	<0,01
	otac	27 (6,4%)	9 (2,2%)	3,09 (1,43-6,71)	<0,01

*aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (engl. *adjusted Odds Ratio*)

**95%CI-95% interval pouzdanosti (od engl. *Confidence Interval*)

*** $p < 0,05$

- *Izloženost duhanskom dimu*

Utjecaju duhanskog dima u svom domu tijekom djetinjstva bilo je izloženo 615 (73,7%) ispitanika. Prenatalna izloženost registrirana je u 533 (64,1%) djece. Tijekom prve godine života duhanskom dimu u svom domu izloženo je 566 (67,9%) ispitanika, a za vrijeme samog istraživanja 538 (64,5%) djece. Nije uočena statistički značajna razlika između djece s astmom koja su izložena duhanskom dimu tijekom prenatalnog, postnatalnog perioda, razdoblja djetinjstva i adolescencije u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika ($p>0,05$), (tablica 14).

Tablica 14. Izloženost djece duhanskom dimu unutar doma

Izloženost djece duhanskom dimu	Djeca s astmom N (%)	Kontrolna skupina djece N (%)	Ukupno	aOR*(95%CI)**	p***
tijekom djetinjstva	304 (71,9%)	311 (75,7%)	615 (73,7%)	0,83 (0,61-1,14)	0,25
<i>in utero</i>	268 (63,7%)	265 (64,5%)	533 (64,1%)	0,98 (0,74-1,31)	0,89
tijekom prve godine života	282 (66,7%)	284 (69,1%)	566 (67,9%)	0,91 (0,68-1,23)	0,54
tijekom istraživanja	265 (62,6%)	273 (66,4%)	538 (64,5%)	0,88 (0,66-1,17)	0,38

*aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

**95%CI-95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

*** $p<0,05$

- *Uvjeti stanovanja*

Vlažnim zidovima na kojima je bilo i vidljivih plijesni tijekom prve godine života naših ispitanika bilo je izloženo 152 djece s astmom (35,9%) i 101 (24,6%) dijete iz kontrolne skupine ispitanika. Razlika između uspoređivanih grupa je statistički značajna (vlažni zidovi aOR 1,75, 95%CI 1,29-2,37, $p < 0,01$; plijesni na zidovima aOR 1,76, 95%CI 1,3-2,39, $p < 0,01$).

Nadalje, tijekom samog istraživanja analizirala se nazočnost vlage i plijesni u domovima djece te zagrijavanje kućanstva centralnim grijanjem.

Nije uočena razlika između skupine djece s astmom i kontrolne skupine ispitanika s obzirom na prisutnost vlažnosti/pljesnivosti zidova kao ni u zagrijavanju kućanstava ($p > 0,05$), (tablica 15).

Tablica 15. Prikaz uvjeta stanovanja ispitanika

	Djeca s astmom N (%)	Kontrolna skupina djece N (%)	aOR* (95%CI)**	p***
Vlažnost zidova				
Tijekom istraživanja	93 (22%)	98 (23,8%)	0,88 (0,63-1,22)	0,43
Tijekom prve godine života	152 (35,9%)	101 (24,6%)	1,75 (1,29-2,37)	<0,01
Plijesni na zidovima				
Tijekom istraživanja	105 (24,8%)	105 (25,5%)	0,96 (0,7-1,32)	0,81
Tijekom prve godine života	150 (35,5%)	99 (24,1%)	1,76 (1,3-2,39)	<0,01
Centralno grijanje				
Tijekom istraživanja	198 (46,8%)	202 (49%)	0,96 (0,7-1,32)	0,45
Tijekom prve godine života	112 (26,5%)	130 (31,6%)	0,78 (0,57-1,05)	0,09

*aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

**95%CI-95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

*** $p < 0,05$

- *Način kuhanja i grijanja u kućanstvima*

Istražujući u kućanstvima izvore energije za kuhanje, za vrijeme istraživanja, uočena je češća primjena drva u domovima djece iz kontrolne skupine (aOR 0,23, 95%CI 0,09-0,59, p=0,02).

Analiza korištenja izvora energije za grijanje u kućanstvima naših ispitanika tijekom njihove prve godine života i za vrijeme istraživanja, pokazala je da su plin, električna struja, drva i lož ulje podjednako korištena u domovima djece s astmom, kao i u kontrolnoj skupini djece, (tablica 16).

Tablica 16. Vrsta goriva za kuhanje i grijanje u domovima ispitanika

	Djeca s astmom N (%)	Kontrolna skupina djece N (%)	aOR* (95%CI)**	p***
Gorivo za kuhanje				
Tijekom istraživanja				
struja	281 (66,4%)	235 (57,2%)		
plin	31 (7,3%)	25 (6,1%)	0,93 (0,53-1,64)	0,81
drvo	8 (1,9%)	28 (6,8%)	0,23 (0,09-0,59)	0,02
kombinacija	103 (24,3%)	123 (29,9%)	0,65 (0,36-1,17)	0,15
Tijekom prve godine života				
struja	229 (54,1%)	208 (50,6%)		
plin	39 (9,2%)	34 (8,3%)	0,98 (0,59-1,61)	0,91
drvo	34 (8%)	46 (11,2%)	0,66 (0,35-1,26)	0,21
kombinacija	121 (28,6%)	123 (29,9%)	0,87 (0,51-1,48)	0,60
Gorivo za grijanje				
Tijekom istraživanja				
struja	139 (32,9%)	136 (33,1%)		
plin	4 (0,9%)	1 (0,2%)	3,81(0,41-35,1)	0,24
drvo/lož ulje	274 (64,8%)	264 (64,2%)	1,01 (0,76-1,37)	0,91
kombinacija	6 (1,4%)	10 (2,4%)	0,63 (0,22-1,81)	0,39
Tijekom prve godine života				
struja	58 (13,7%)	71 (17,3%)		
plin	5 (1,2%)	6 (1,5%)	1,02 (0,29-3,56)	0,98
drvo/lož ulje	352 (83,4%)	324 (79%)	1,37 (0,93-2,02)	0,11
kombinacija	7 (1,7%)	9 (2,2%)	0,98 (0,34-2,82)	0,97

*aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (engl. *adjusted Odds Ratio*)

**95%CI-95% interval pouzdanosti (od engl. *Confidence Interval*)

***p<0,05

- Veličina obitelji (broj i redoslijed braće i sestara)

Analizom broja i redoslijeda braće i sestra u obitelji, uočeno je da zdrava djece (116, 28,2%) imaju češće dva ili više starijih braće i/ili sestara u odnosu na djecu s astmom (87, 20,6%), međum razlika nije bila statistički značajna ($p=0,06$). Nije uočena statistički značajna razlika u broju mlađih braće i sestara između ispitanika i kontrola, (tablica 17).

Tablica 17. Broj i redoslijed braće i sestara u obitelji ispitanika

		Djeca s astmom N (%)	Kontrolna skupina djece N (%)	aOR* (95%CI)**	p***
Broj mlađih braće i/ili sestara	0	170 (40,2%)	173 (42,1%)		
	1	211 (49,9%)	188 (45,7%)	1,19 (0,89-1,59)	0,25
	2 ili više	42 (9,9%)	50 (12,2%)	0,89 (0,56-1,42)	0,61
Broj starijih braće i/ili sestara	0	185 (43,7%)	170 (41,4%)		
	1	151 (35,7%)	125 (30,4%)	1,08 (0,78-1,48)	0,64
	2 ili više	87 (20,6%)	116 (28,2%)	0,72 (0,51-1,02)	0,06

*aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

**95%CI-95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

*** $p<0,05$

- Alergijska senzibilizacija

Usporedba pozitivnih kožnih testova na pojedinačne alergene, osim jaja, pokazuje statistički značajniju zastupljenost u skupini djece s astmom u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika ($p<0,01$), (tablica 18).

Tablica 18. Uspredba pozitivnih kožnih testova na pojedinačne alergene između djece s astmom i kontrolne skupine ispitanika

Pozitivan kožni ubodni test ≥ 3 mm	Ukupno N (%)	Djeca s astmom N (%)	Kontrolna skupina djece N (%)	aOR* (95%CI)**	p***
Atopija	456 (54.5%)	383 (90,5%)	73 (17,7%)	43,7 (28,86-66,16)	<0,01
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	375 (44,7%)	332 (78,5%)	43 (1%)	30,72 (20,71-45,55)	<0,01
Epitel psa	56 (6.7%)	50 (11,8%)	6 (1,5%)	8,73 (3,68-20,67)	<0,01
Epitel mačke	58 (6,9%)	54 (12,8%)	4 (1%)	15,19 (5,43-42,53)	<0,01
<i>Betulla alba</i>	62 (7.4%)	55 (13%)	7 (1,7%)	8,47 (3,8-18,92)	<0,00
<i>Ambrosia elatior</i>	196 (23,4%)	176 (41,6%)	20 (4,9%)	13,57 (8,3-22,17)	<0,01
Mješavina peludi trava	150 (17,9%)	131 (31%)	19 (4,6%)	9,51 (5,72-15,83)	<0,01
Jaje	31 (3,7%)	21 (5%)	10 (2,4%)	1,99 (0,92-4,32)	0,08
Kikiriki	32 (3,8%)	28 (6,6%)	4 (1%)	6,4 (2,21-18,53)	<0,01

*aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (engl. *adjusted Odds Ratio*)

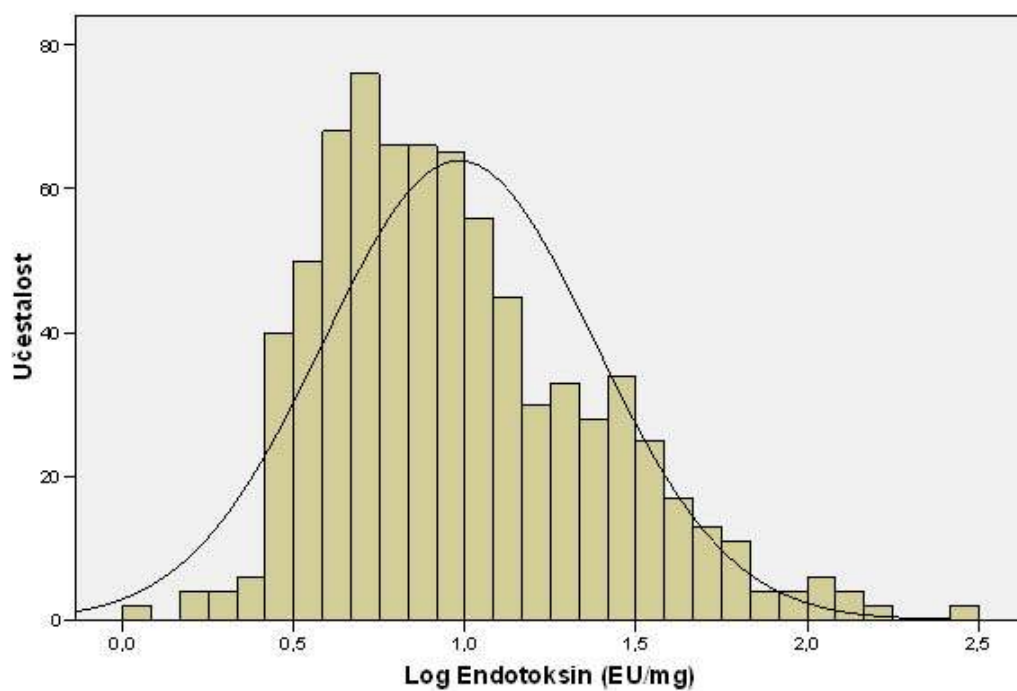
**95%CI-95% interval pouzdanosti (od engl. *Confidence Interval*)

***p<0,05

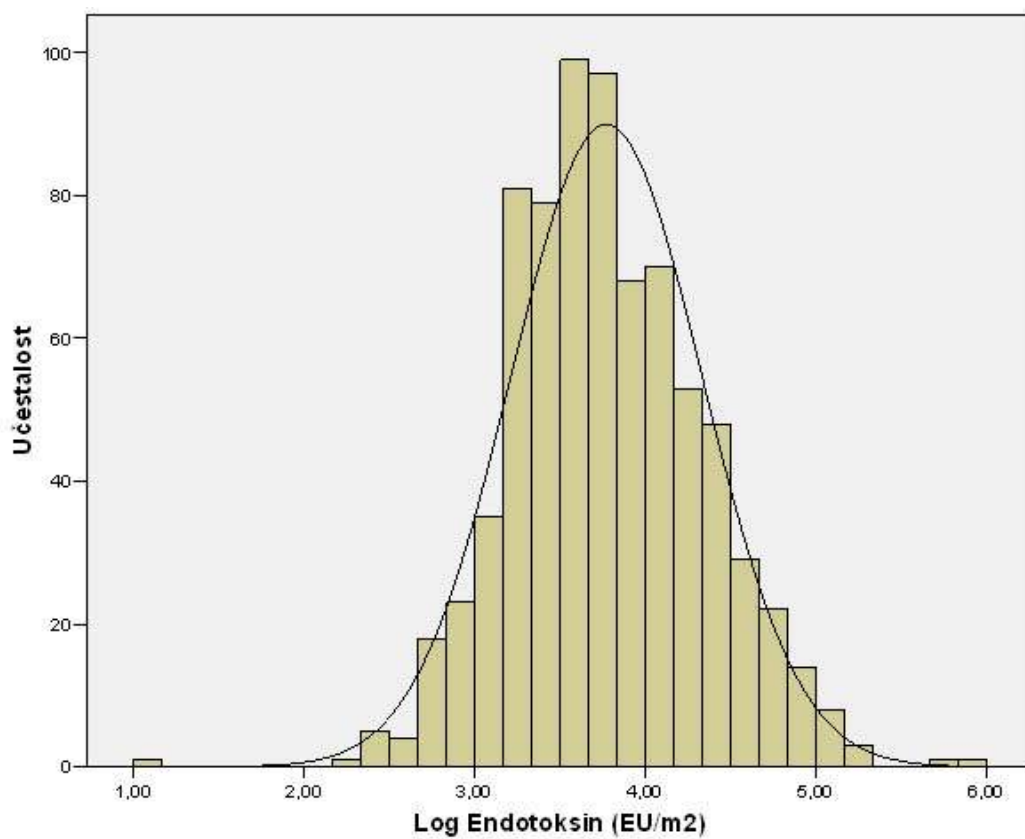
Okolišni činitelji

- *Endotoksin*

Izmjerene vrijednosti endotoksina u madracima ispitanika nisu slijedile normalnu distribuciju te je učinjena logaritamska pretvorba, (slika 7 i 8).



Slika 7. Raspodjela endotoksina (EU/mg) u madracu ispitanika



Slika 8. Raspodjela endotoksina (EU/m²) u madracu ispitanika

Prikupljeno je ukupno 792 uzorka prašine iz madraca dječjih spavaonica. U 32 uzorka prašine razina endotoksina je bila ispod praga mjerljivosti, stoga je endotoksin izmjeren u 760 prikupljenih uzoraka prašine, a vrijednosti su iskazane kao masena koncentracija (EU/mg) i koncentracija po jedinici usisavane površine (EU/m²).

Uočena je značajna korelacija ($r=0,7$, $p<0,01$) u izražavanju koncentracije endotoksina kao EU/m², odnosno kao EU/mg. Izmjerena aritmetička sredina endotoksina u madracima dječjih spavaonica iznosila je 9,15 EU/mg, 95% CI 9,01-10,26 EU/mg, odnosno 5 888,63 EU/m², 95% CI 5 370,56-6 456,67 EU/m², (tablica 19).

Tablica 19. Izmjerene vrijednosti endotoksina iz madraca 760 ispitanika

	Aritmetička sredina*	Raspon	95% CI**
Endotoksin (EU/mg)	9,15	1,07-311,92	9,01-10,26
Endotoksin (EU/m ²)	5 888,63	11,12-904 568	5 370,56-6 456,67

*aritmetička sredina (*od engl. mean*)

**95%CI- 95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

Nađena je statistički značajna razlika u vrijednosti endotoksina ovisno o mjestu stanovanja. U seoskim domovima izmjerena je viša koncentracija endotoksina u madracima ispitanika u odnosu na domove u gradu (*selo* 10,83 EU/mg, 95%CI 9,98-11,75; *grad* 8,31 EU/mg, 95%CI 7,49-9,22, $p=0,04$), (tablica 20).

Tablica 20. Koncentracija endotoksina u madracima 760 ispitanika u odnosu na mjesto stanovanja

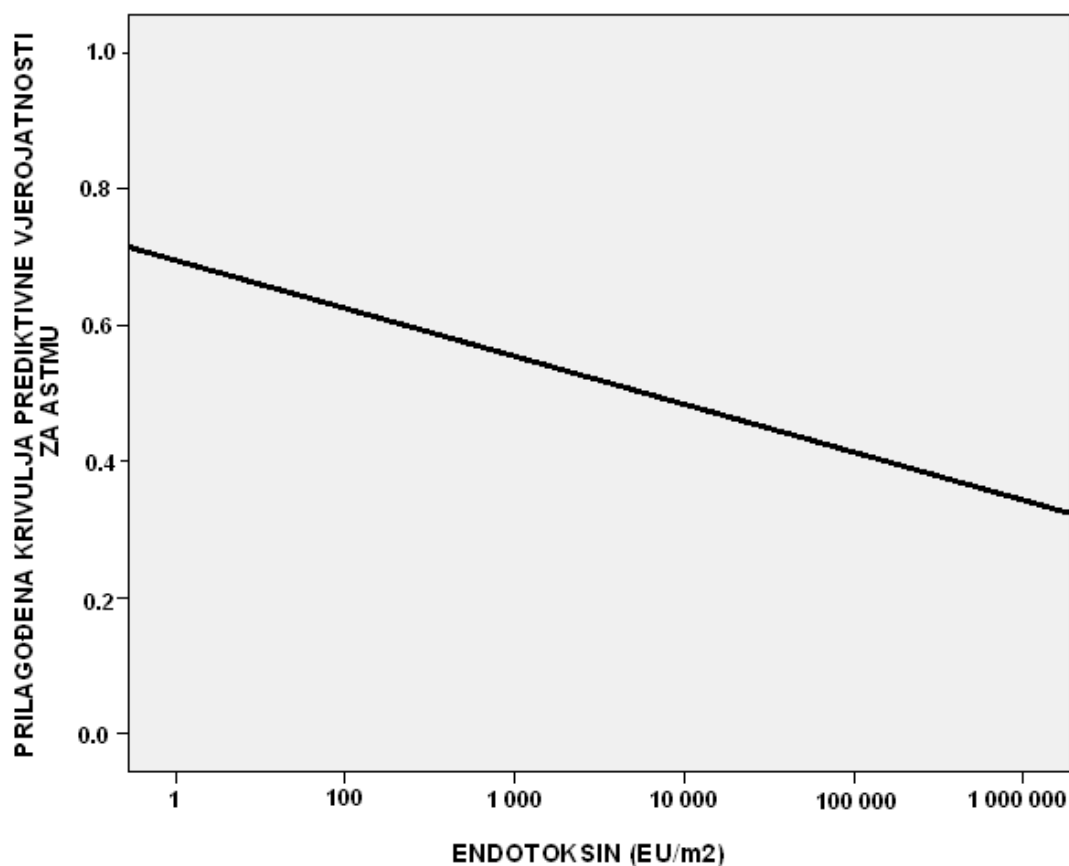
Endotoksin (EU/mg)	Aritmetička sredina*	95% CI**	p***
grad	8,31	7,49-9,22	
selo	10,83	9,98-11,75	0,04

*aritmetička sredina (*od engl. mean*)

**95%CI- 95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

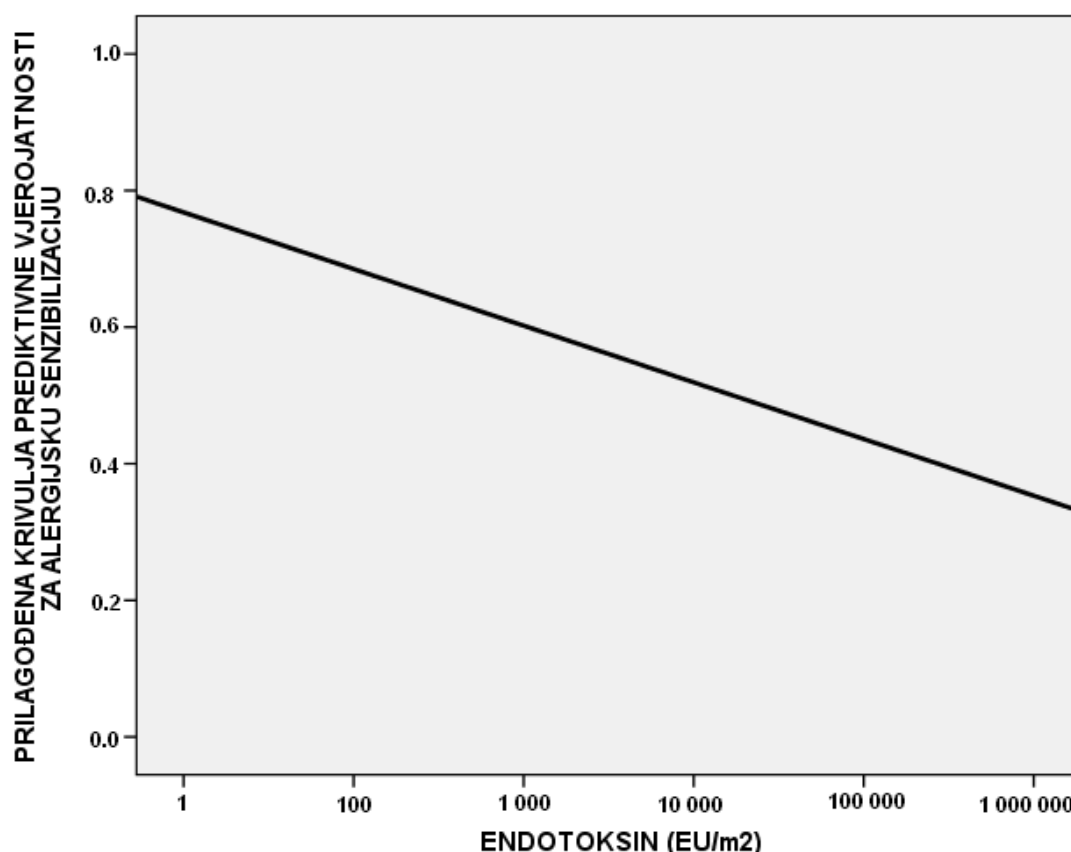
*** $p<0,05$

Analizirajući razlike u koncentraciji endotoksina po jedinici usisavane površine madraca, između ispitanika s astmom i kontrolne skupine djece, uočeno je smanjenje rizika za astmu s povećanjem koncentracije endotoksina (aOR 0,75, 95% CI 0,58–0,98, $p=0,03$), (slika 9).



Slika 9. Povezanost koncentracije endotoksina u madracima 760 ispitanika i prediktivne vjerojatnosti za astmu dobiven regresijskom analizom

Zaštitni učinak endotoksina uočen je i u odnosu na alergijsku senzibilizaciju. S povećanjem koncentracije endotoksina smanjuje se rizik za alergijsku senzibilizaciju (aOR 0,61, 95%CI 0,46-0,82, $p<0,01$), (slika 10).



Slika 10. Povezanost koncentracije endotoksina u madracima 760 ispitanika i prediktivne vjerojatnosti za alergijsku senzibilizaciju dobiven regresijskom analizom

- *Koncentracija alergena grinje (Der p1) u okolini*

Izmjerena koncentracija alergena grinje, *Der p1*, u dječjim madracima je slijedila logaritamski pretvorenu raspodjelu. Iz ukupnog broja prikupljenih uzoraka prašine (N=792), prvo su uzete količine prašine potrebne za mjerenje endotoksina. U pet prikupljenih uzoraka, količina prašine bila je dovoljna samo za endotoksin. Stoga je za početnu analizu *Der p1* bilo dostupno 787 uzoraka, od kojih je u 49 uzoraka koncentracija *Der p1* bila ispod granice mjerenja (0,05 ng/mg). Aritmetička sredina *Der p1* u madracima dječjih spavaonica dobivena mjerenjem iznosila je 4,57 ng/mg, 95% CI 4,07-5,25 ng/mg, odnosno 2 454,71 ng/m², 95% CI 2 137,96-2 884,03 ng/m², (tablica 21).

Tablica 21. Izmjerene koncentracije alergena *Der p1* u
madracima 787 ispitanika

	Aritmetička sredina*	95%CI**	Broj uzoraka ispod praga mjerenja/ ukupan broj uzoraka
<i>Der p1</i> (ng/mg)	4,57	4,07-5,25	49/787
<i>Der p1</i> (ng/m ²)	2 454,71	2 137,96-2 884,03	49/787

*aritmetička sredina (od engl. mean)

**95%CI- 95% interval pouzdanosti (od engl. Confidence Interval)

U daljnjoj analizi istražili smo učinak izmjerenih vrijednosti alergena *Der p1*, u dječjim madracima u odnosu na astmu i alergijsku senzibilizaciju na *Dermatophagoides pteronyssinus*. Nije uočena povezanost promjene koncentracije alergena *Der p1* i rizika za astmu (aOR 1,01, 95% CI 0,91-1,32, p=0,33). Također, nije bilo utjecaja na pozitivan kožni ubodni test na *Dermatophagoides pteronyssinus* (aOR 1,11, 95% CI 0,92-1,34, p=0,28). Ispitanike s prikupljenim uzorcima prašine iz madraca dječjih spavaonica podijelili smo na one čija je koncentracija alergena *Der p1* bila iznad 2 ng/mg i na one, čija je koncentracija alergena *Der p1* bila ispod 2 ng/mg. Izloženost iznad 2 ng/mg smatra se dovoljnom za senzibilizaciju. Od ukupnog broja posjećenih domova s prikupljenim uzorcima prašine (N=787) u 593 (76%) madraca registrirana je koncentracija *Der p1* iznad 2ng/mg. S povećanjem koncentracije *Der p1* nije uočen rizik za specifičnu senzibilizaciju (aOR 1,01, 95% CI 0,86-1.2, p=0,89), (tablica 22).

Tablica 22. Odnos između koncentracije Der p1 u madracu i specifične senzibilizacije na alergene grinje

Koncentracija alergena	N (%) u skupini	N (%) pozitivnih kožnih testova na <i>Dermatophagoide s pteronyssinus</i>	aOR, 95% CI, p
<i>Der p1</i> >2 ng/mg	593 (76%)	268 (45,3%)	
<i>Der p1</i> <2 ng/mg	194 (24%)	85 (43,8%)	1,01(0,86-1,2), 0,89

*aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (engl. *adjusted Odds Ratio*)

**95%CI-95% interval pouzdanosti (od engl. *Confidence Interval*)

***p<0,05

Gen CD14

- *Genotipiziranje*

Genotipizirano je pet polimorfizama u genu *CD14*. Analizirani polimorfizmi zadovoljili su mjere kontrole kvalitete s obzirom na uspješnost genotipiziranja iznad 90% i Hardy-Weinberg-ovu ravnotežu $p > 0,001$, a nasljeđivanje im je bilo neovisno ($r^2 < 90$) (slika 11, tablica 23).

Tablica 23. Prikaz analiziranih polimorfizama u genu *CD14*

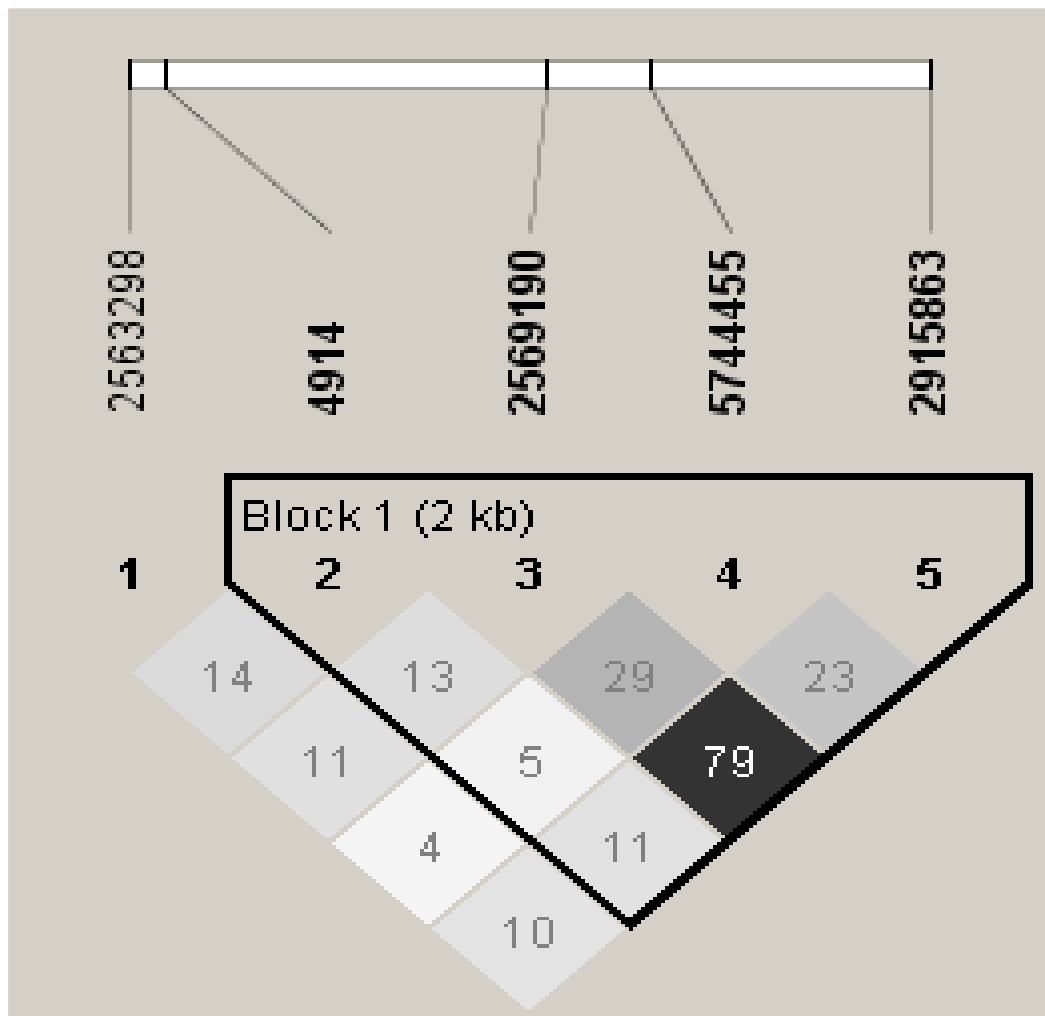
	Položaj	Tip/ funkcija SNP	Aleli	Učestalost minor alela (MAF*)	Objavljena MAF	Call Rate**	HWE p kontrole
rs2563298	139991498	3- kraj gena	C/A	0,28	0,24	0,95	0,46
rs4914	139991651	tiha mutacija	C/G	0,14	0,1	0,98	0,36
rs2569190	139993099	intron, promotorska regija	C/T	0,46	0,48	0,92	0,24
rs5744455	139993490	5-kraj gena	C/T	0,26	0,01	0,96	0,38
rs2915863	139994560	5-kraj gena	T/C	0,41	0,5	0,95	0,55

* SNP-jednonukleotidni polimorfizam (od engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*)

**MAF-učestalost minor alela (od engl. *Minor Allele Frequency, MAF*)

***Call Rate- uspjeh genotipizacije (od engl. *Call Rate*)

****HWE $p > 0,001$ (od engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE*)



Slika 11. Grafički prikaz LD (r^2) genotipiziranih polimorfizama gena CD14 za ispitanu skupinu djece (N=837)

- *Povezanost varijabilnosti gena CD14 s astmom*

Nije uočena statistički značajna povezanost s astmom za svih pet genotipiziranih polimorfizama gen *CD14* ($p > 0,05$), (tablica 24).

Tablica 24. Analiza povezanosti varijabilnosti gena CD14 s astmom

	genotip	broj nositelja genotipa	aOR (95% CI)	p
rs2563298a*	AA+AC	384	1,08 (0,81-1,43)	0,59
	CC	413		
rs2563298b**	TT	57	0,92 (0,53-1,59)	0,76
	TC+CC	740		
rs4914a	GG+GC	216	0,97 (0,71-1,33)	0,84
	CC	602		
rs4914b	GG	13	1,39 (0,45-4,37)	0,56
	GC+CC	805		
rs2569190a	AA+AG	551	0,83 (0,61-1,16)	0,28
	GG	217		
rs2569190b	AA	153	1,17 (0,81-1,67)	0,40
	AG+GG	615		
rs5744455a	TT+TC	365	1,17 (0,88-1,55)	0,28
	CC	435		
rs5744455b	TT	49	1,15 (0,64-2,06)	0,64
	TC+CC	751		
rs2915863a	CC+CT	522	0,84 (0,63-1,14)	0,26
	TT	274		
rs2915863b	CC	129	0,81 (0,56-1,19)	0,29
	CT+TT	667		

*a- dominantni model- uspoređuje nositelje minor alela s homozigotima za major alel

**b- recesivni model –uspoređuje homozigote za minor alele u odnosu na nositelje major alela

aOR- omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

95%CI- 95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

$p < 0,05$

- *Povezanost međudjelovanja između gena CD14 i endotoksina iz madraca djece s astmom*

Nije uočena statistički značajna povezanost između varijabilnosti gena *CD14* i koncentracije endotoksina u dječjim madracima u odnosu na astmu ($p>0,05$), (tablica 25).

Tablica 25. Međudjelovanje između polimorfizama gena CD14 i endotoksina iz madraca 760 ispitanika u odnosu na astmu

	genotip	broj nositelja genotipa	aOR (95% CI)	p
RS2563298a*	AA+AC	347	1,60 (0,94-2,74)	0,08
	CC	374		
RS2563298b**	AA	50	1,28 (0,412-3,90)	0,66
	AC+CC	671		
RS4914a	GG+GC	200	1,49 (0,85-2,63)	0,16
	CC	541		
RS4914b	GG	12	0,8 (0,17-3,74)	0,77
	GC+CC	729		
RS2569190a	TT+TC	504	1,19 (0,64-2,22)	0,57
	CC	191		
RS2569190b	AA	135	1,02 (0,51-2,02)	0,95
	AG+GG	560		
RS5744455a	TT+TC	328	0,68 (0,40-1,16)	0,15
	CC	396		
RS5744455b	TT	41	0,90 (0,31-2,64)	0,85
	TC+CC	683		
RS2915863a	CC+CT	476	1,39 (0,78-2,47)	0,25
	TT	243		
RS2915863b	CC	115	1,40 (0,69-2,84)	0,34
	CT+TT	604		

*a- dominantni model- uspoređuje nositelje minor alela s homozigotima za major alel

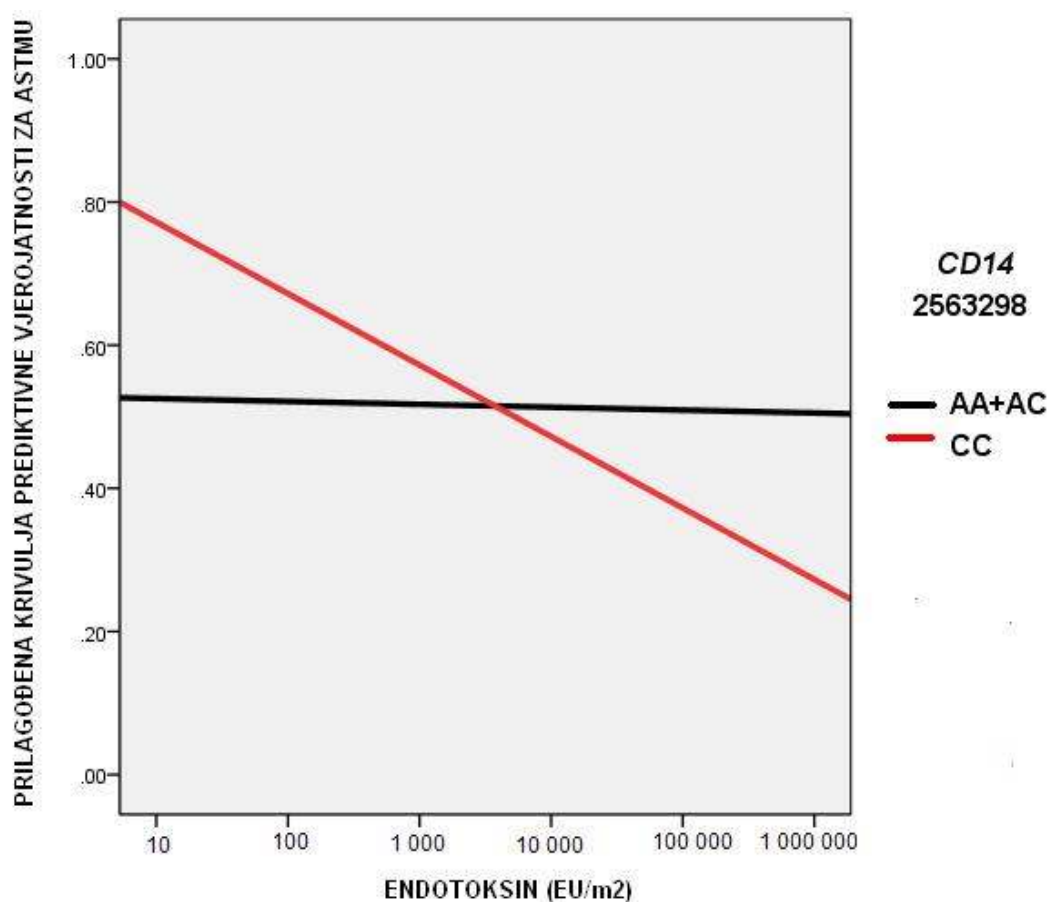
**b- recesivni model –uspoređuje homozigote za minor alele u odnosu na nositelje major alela

aOR- omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

95%CI- 95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

$p<0,05$

U navedenim rezultatima važno je napomenuti, da je međudjelovanje između polimorfizma rs2563298 i endotoksina, utjecalo na rizik za astmu, iako nije uočena statistička značajnost (aOR 1,6, 95%CI 0,94-2,74, $p_{\text{međudjelovanja}}=0,08$). Kod homozigota za alel C polimorfizma rs256329 koji su bili izloženi višim koncentracijama endotoksina uočen je snižen rizik za astmu (aOR 0,66, 95%CI 0,46-0,97, $p=0,03$), dok promjena koncentracije endotoksina među djecom nositeljima alela A nije mijenjala rizik za astmu (aOR 0,98, 95%CI 0,68-1,43, $p=0,93$), (slika 12).



Slika 12. Prilagođena krivulja prediktivne vjerojatnosti za astmu u djece s genotipovima AA+AC i CC rs2563298 u genu CD14 u odnosu na izloženost endotoksinu iz madraca dobivena regresijskom analizom

Gen *TLR4*

- *Genotipiziranje*

Genotipizirano je 16 tag polimorfizama gena *TLR4*, koji su svi zadovoljili kriterije za kvalitetu kontrole, tj. uspješnost genotipiziranja je bila iznad 90%; a Hardy-Weinberg-ova ravnoteža $p > 0,001$, (tablica 26).

Tablica 26. Prikaz genotipiziranih polimorfizama u genu *TLR4*

	Položaj	Tip/ funkcija SNP	Aleli	Učestalost minor alela (MAF*)	Objavljena MAF	Call Rate**	HWE p kontrole
rs11536857	119503956	između gena 5. kraj	C/T	0,08	0,06	0,95	0,29
rs10759931	119503967	gena	G/A	0,42	0,38	0,95	0,75
rs11536869	119509652	intron	A/G	0,03	0,16	0,96	0,70
rs1927911	119509874	intron	C/T	0,23	0,29	0,96	0,76
rs11536878	119511373	intron	C/A	0,12	0,13	0,96	0,20
rs12377632	119512550	intron	T/C	0,41	0,36	0,95	0,37
rs1927907	119512584	intron	G/A	0,09	0,14	0,95	0,86
rs2770146	119513158	intron	A/G	0,28	0,34	0,94	0,88
rs2149356	119514019	intron	C/A	0,31	0,29	0,96	0,16
rs4986790	119515122	mutacija pogrešnog	A/G	0,07	0,07	0,96	0,42
rs4986791	119515422	smisla	C/T	0,08	0,03	0,96	0,10
rs11536889	119517951	3-UTR***	G/C	0,13	0,12	0,96	0,32
rs7873784	119518756	3-UTR***	G/C	0,15	0,16	0,94	0,72
rs11536897	119519830	3. kraj gena	G/A	0,06	0,07	0,95	0,73
rs1927906	119519935	3. kraj gena	A/G	0,09	0,05	0,98	0,82
rs1554973	119520632	između gena	T/C	0,24	0,20	0,98	0,50

* SNP-jednonukleotidni polimorfizam (od engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*)

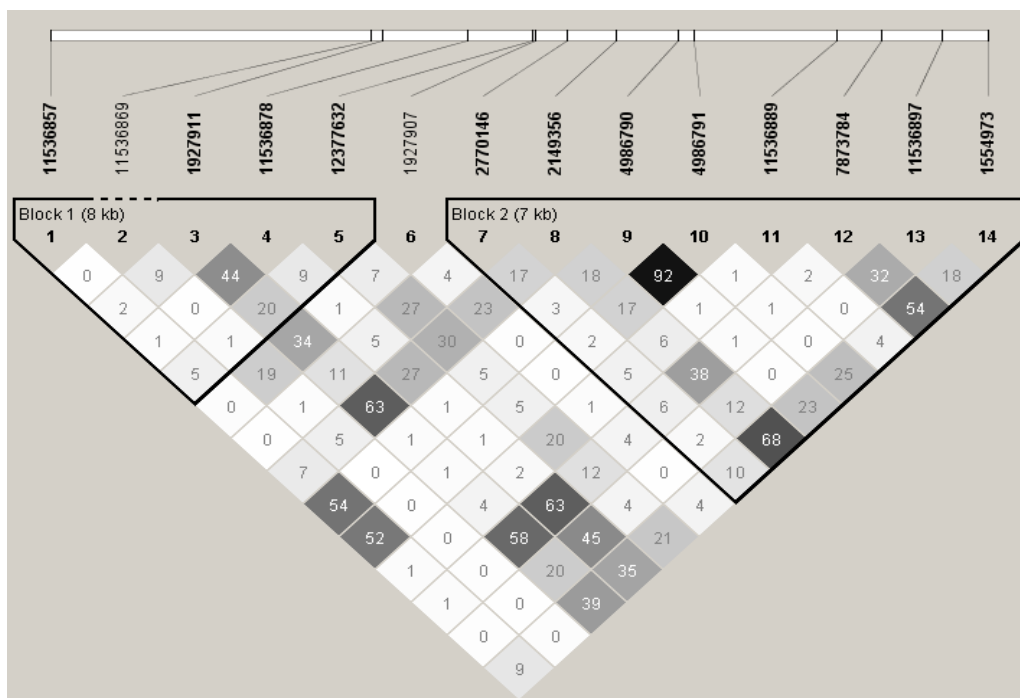
**MAF-učestalost minor alela (od engl. *Minor Allele Frequency, MAF*)

***Call Rate- uspjeh genotipizacije (od engl. *Call Rate*)

****HWE $p > 0,001$ (od engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE*)

‡3-UTR (eng. 3-untranslated region)

Analiziranjem LD vrijednosti, dva polimorfizma (rs10759931 i rs1927906) bila su isključena zbog LD>90%, dok su polimorfizmi s biološkim djelovanjem (rs4986790 i rs4986791) posebno uključeni u daljnju analizu (slika 13).



Slika 13. Grafički prikaz LD za genotipizirane polimorfizme u genu TLR4. Vrijednost LD je izražena kroz r^2

- *Povezanost varijabilnosti gena TLR4 s astmom*

Analizirano je 14 polimorfizama u genu *TLR4*, od kojih su dva bila statistički značajno povezana s astmom (tablica 27). Nositelji alela T za rs1927907 imali su viši rizik za astmu u odnosu na homozigote za alel C (aOR 1,51, 95%CI 1,04-2,2, p=0,03). Djeca s genotipom CC rs11536889, imala su veći rizik za astmu u odnosu na nositelje alela G (aOR 3,07, 95%CI 0,97-9,72, p=0,04). Opisane povezanosti varijabilnosti gena *TLR4* i astme, nisu bile statistički značajne nakon korekcije za višestruko testiranje (FDR p>0,05)

Tablica 27. Analiza povezanosti varijabilnosti gena TLR4 i astme

	genotip	Broj nositelja genotipa	aOR (95%CI)	p	FDR** p
rs1927907	TT+TC	138	1,51 (1,04-2,20)	0,03	0,09
	CC	660			
rs11536889	CC	16	3,07 (0,97-9,72)	0,04	0,11
	CG+GG	789			

p<0.05

aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

95%CI-95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

FDR, p<0,05-korekcija za višestruko testiranje (*od engl. False Discovery Rate*)

- *Povezanost međudjelovanja između polimorfizma gena TLR4 i endotoksina iz dječjih madraca s astmom*

Za polimorfizam rs11536889 u genu *TLR4* uočeno je statistički značajno međudjelovanje s endotoksinom ($p_{\text{međudjelovanja}}=0,04$). Homozigoti za C alel rs11536889 izloženi višim koncentracijama endotoksina, bili su zaštićeni od astme (aOR 0,28, 95%CI 0,0005-1,56, $p=0,08$).

U djece nositelja G alela koncentracije endotoksina nije imala utjecaj na rizik za astmu (aOR 0,92, 95%CI 0,63-1,33, $p=0,68$) (tablica 28, slika 14).

Tablica 28. Rizik za astmu među nositeljima genotipa CC i genotipa CG+GG polimorfizma rs11536889 gena TLR4 u međudjelovanju s okolišnim endotoksinom iz madraca 760 ispitanika u odnosu na astmu

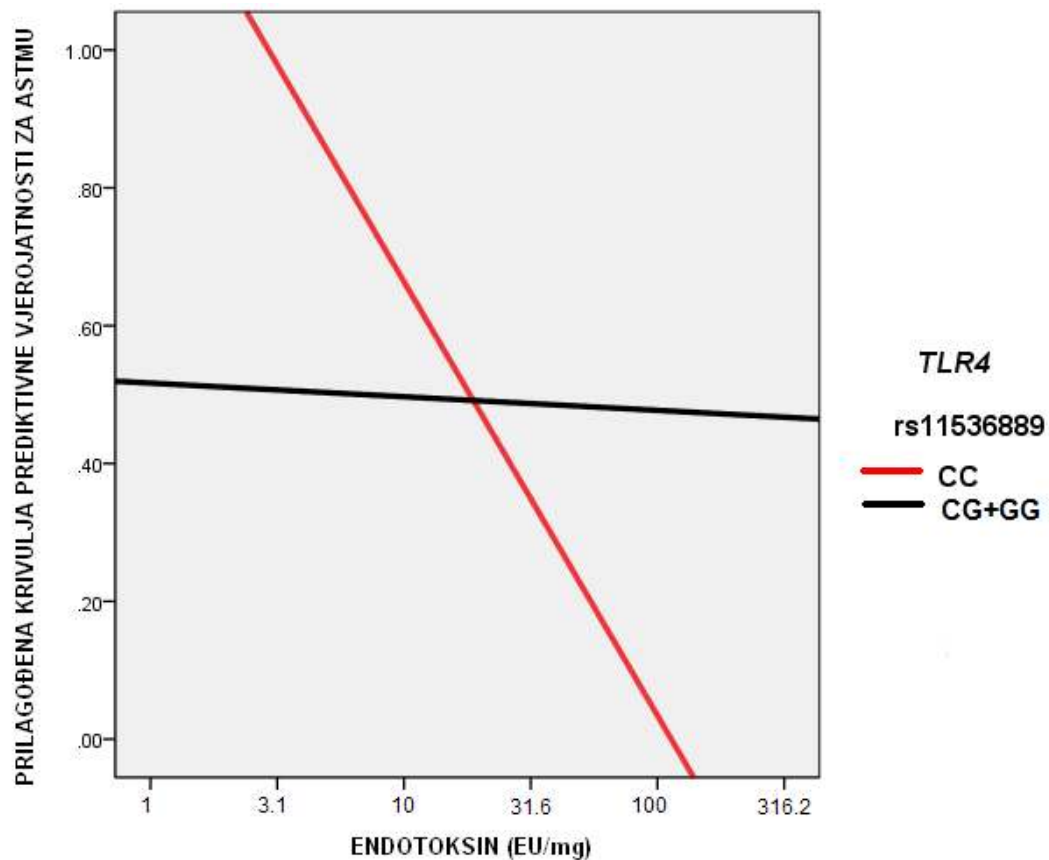
	genotip	Broj nositelja genotipa	aOR (95%CI)	p	MEĐUDJELOVANJE		
					aOR, 95%CI	p	FDR p
rs11536889	CC	15	0,28 (0,0005-1,56)	0,08	0,03 (0,001-1,54)	0,04	0,16
	CG+GG	714	0,92 (0,63-1,33)	0,68			

$p<0.05$

aOR-omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

95%CI-95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

FDR, $p<0,05$ -korekcija za višestruko testiranje (*od engl. False Discovery Rate*)



Slika 14. Prilagođena krivulja prediktivne vjerojatnosti za astmu u djece s genotipovima CC i CG+GG rs11536889 gena TLR4 u odnosu na izloženost endotoksinu iz madraca dobivena regresijskom analizom

Gen MD2

- Genotipiziranje

U genu MD2 genotipizirano je devet tag polimorfizama. Polimorfizmi rs2891354 i rs10504554 nisu uspješno genotipizirani, te su isključeni iz daljnje analize. Preostalih sedam polimorfizama zadovoljilo je mjere kontrole kvalitete s obzirom na uspjeh genotipiziranja iznad 90% i Hardy-Weinberg-ovu ravnotežu $p > 0,001$. Nasljeđivanje genotipiziranih polimorfizama je bilo neovisno ($r^2 < 90\%$), (tablica 27, slika 15).

Tablica 29. Prikaz genotipiziranih polimorfizama u genu MD2

	Položaj	Tip/ funkcija SNP*	Aleli	Učestalost minor alela (MAF)**	Objavljena MAF	Call Rate***	HWE p**** kontrole
rs7822054	75070343	intron	A/G	0,44	0,44	0,96	0,10
rs7822407	75070366	intron	G/A	0,17	0,11	0,96	0,04
rs11786591	75078897	intron	C/T	0,27	0,36	0,94	0,19
rs1991262	75081882	intron	G/C	0,25	0,24	0,98	0,01
rs10504554	75082266	intron	T/C	0,20	0,14	0,78 [‡]	0,01
rs17226566	75082465	intron	T/C	0,23	0,27	0,96	0,41
rs17324476	75088835	intron	C/T	0,00	0,05	0,97	0,92
rs7838017	75098252	intron	C/T	0,18	0,13	0,94	0,11
rs2891354	75103559	intron			0,10	0,00 [‡]	

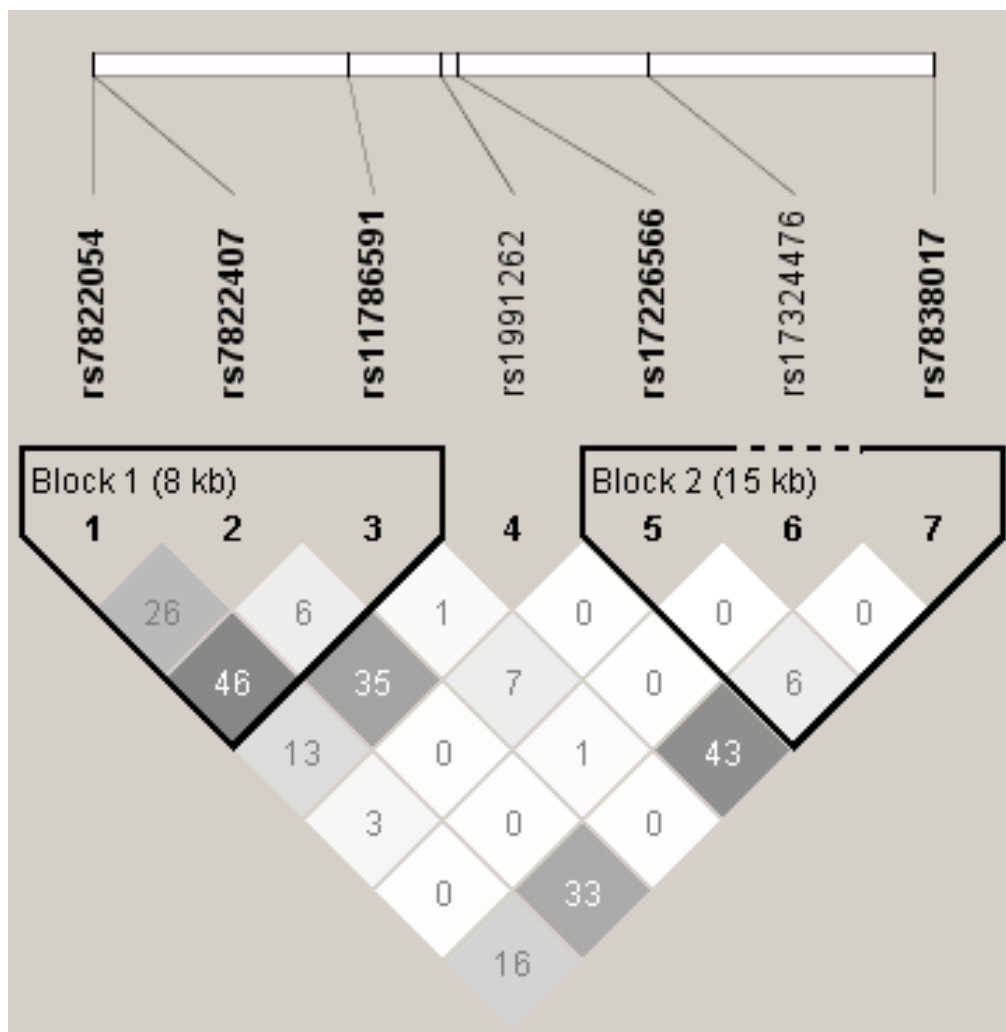
* SNP-jednonukleotidni polimorfizam (od engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*)

**MAF-učestalost minor alela (od engl. *Minor Allele Frequency, MAF*)

***Call Rate-uspjeh genotipizacije (od engl. *Call Rate*)

****HWE $p > 0,001$ (od engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE*)

[‡] polimorfizmi isključeni iz analize zbog uspjeha genotipizacije ispod 90%



Slika 15. Grafički prikaz LD za genotipizirane polimorfizme gena MD2. Vrijednost LD je izražena kroz r^2

- *Povezanost varijabilnosti gena MD2 s astmom*

Za četiri polimorfizma u genu *MD2* uočena je povezanost s astmom ($p < 0,05$), (tablica 30).

Nositelji genotipa TT rs11786591 imali su viši rizik za astmu (aOR 1,33, 95%CI 1,01-1,79, $p = 0,04$). U djece s genotipom rs1991262 CC, rs7822407 AA i rs7838017 TT, uočen je niži rizik za astmu (rs1991262, aOR 0,57, 95%CI 0,34-0,98, $p = 0,03$; rs7822407, aOR 0,44, 95%CI 0,19-1,01, $p = 0,04$; rs7838017, aOR 0,45, 95%CI 0,20-1,02, $p = 0,04$). Nakon korekcije za višestruko testiranje opisane povezanosti varijabilnosti gena *MD2* i astme, nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

Tablica 30. Analiza povezanosti varijabilnosti gena MD2 i astme

	gen	genotip	broj nositelja genotipa	aOR (95%CI)	p	FDR p
rs11786591	<i>MD2</i>	TT+TC	362	1,33 (1,01-1,79)	0,04	0,13
		CC	422			
rs1991262	<i>MD2</i>	CC	63	0,57 (0,34-0,98)	0,03	0,10
		CG+GG	756			
rs7822407	<i>MD2</i>	AA	28	0,44 (0,19-1,01)	0,04	0,12
		AG+GG	776			
rs7838017	<i>MD2</i>	TT	28	0,45 (0,20-1,02)	0,04	0,12
		TC+CC	759			

$p < 0,05$

aOR- omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

95%CI- 95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

FDR, $p < 0,05$ - korekcija za višestruko testiranje, (*od engl. False Discovery Rate*)

- *Povezanost međudjelovanja između gena MD2 i endotoksina iz madraca s astmom*

Statistički značajno međudjelovanje s endotoksinom, uočeno je za četiri polimorfizma gena MD2: rs7822054 ($p_{\text{međudjelovanja}}=0,01$), rs7822407 ($p_{\text{međudjelovanja}}=0,02$), rs11786591 ($p_{\text{međudjelovanja}}=0,02$), i rs7838017 ($p_{\text{međudjelovanja}}=0,04$) (tablica 31). Nakon korekcije za višestruko testiranje statističku značajnost zadržava međudjelovanje između endotoksina i rs7822054 ($p=0,03$).

Tablica 31. Međudjelovanje između polimorfizama gena MD2 i endotoksina iz madraca 760 ispitanika u odnosu na astmu

	gen	genotip	broj nositelja genotipa	aOR (95%CI)	p	MEĐUDJELOVANJE		
						aOR (95%CI)	p	FDR p
rs7822054	MD2	GG	146	2,45 (1,01-5,90)	0,03	3,46		
		GA+AA	585	0,72 (0,48-1,01)	0,12	(1,33-9,03)	0,01	0,03
rs7822407	MD2	AA+AG	233	1,16 (0,72-1,85)	0,54	1,82		
		GG	495	0,63 (0,46-0,88)	0,01	(1,03-3,21)	0,02	0,15
rs11786591	MD2	TT+TC	326	1,49 (0,85-2,61)	0,12	2,66		
		CC	384	0,56 (0,33-0,94)	0,02	(1,23-5,7)	0,02	0,11
rs7838017	MD2	TT+TC	234	1,08 (0,7-1,69)	0,73	1,8		
		CC	479	0,65 (0,47-0,91)	0,01	(1,03-3,13)	0,04	0,14

$p < 0.05$

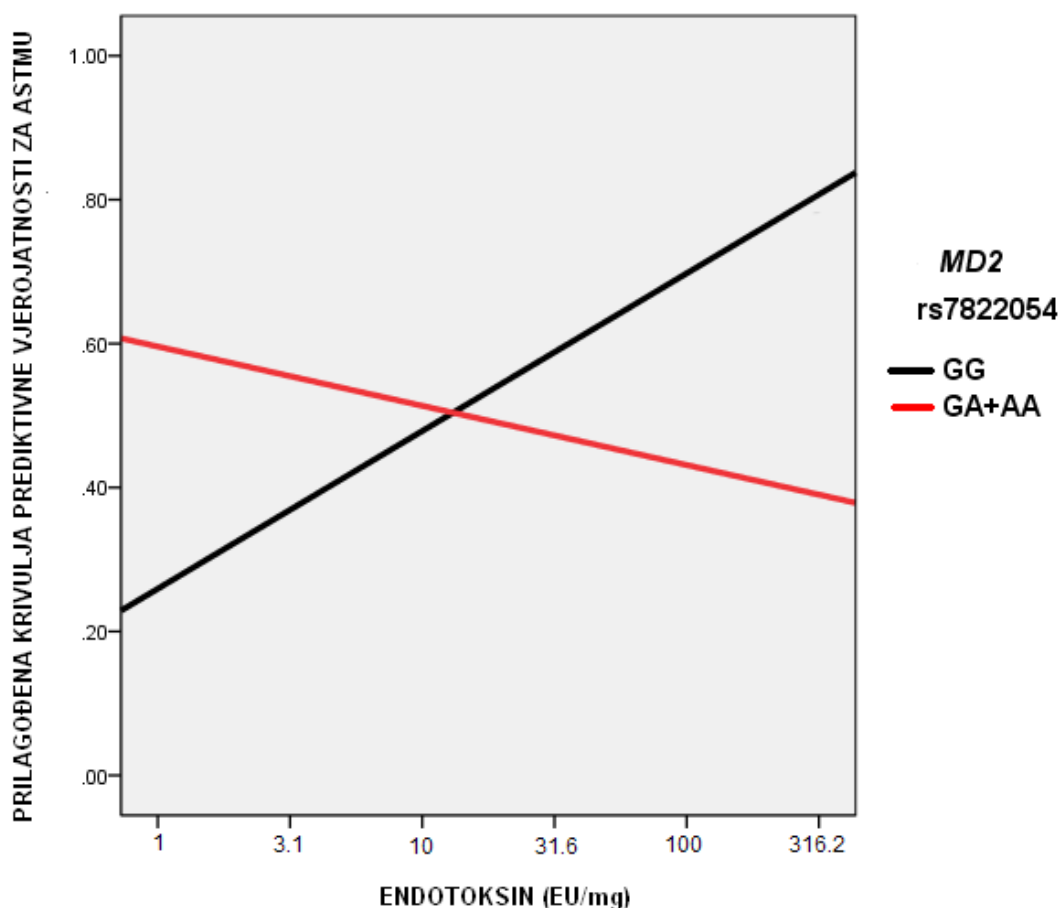
aOR- omjer vjerojatnosti korigiran za spol (*engl. adjusted Odds Ratio*)

95%CI- 95% interval pouzdanosti (*od engl. Confidence Interval*)

FDR, $p < 0,05$ - korekcija za višestruko testiranje (*od engl. False Discovery Rate*)

Kod djece nositelja genotipa rs7822054 GG, s povećavanjem koncentracije endotoksina povećavao se rizik za astmu (aOR 2,45, 95% CI 1,01-5,90, $p=0,03$). Nasuprot homozigotima za alel G, nositelji alela A pri višim koncentracijama endotoksina imali su niži rizik za astmu (aOR 0,72, 95% CI

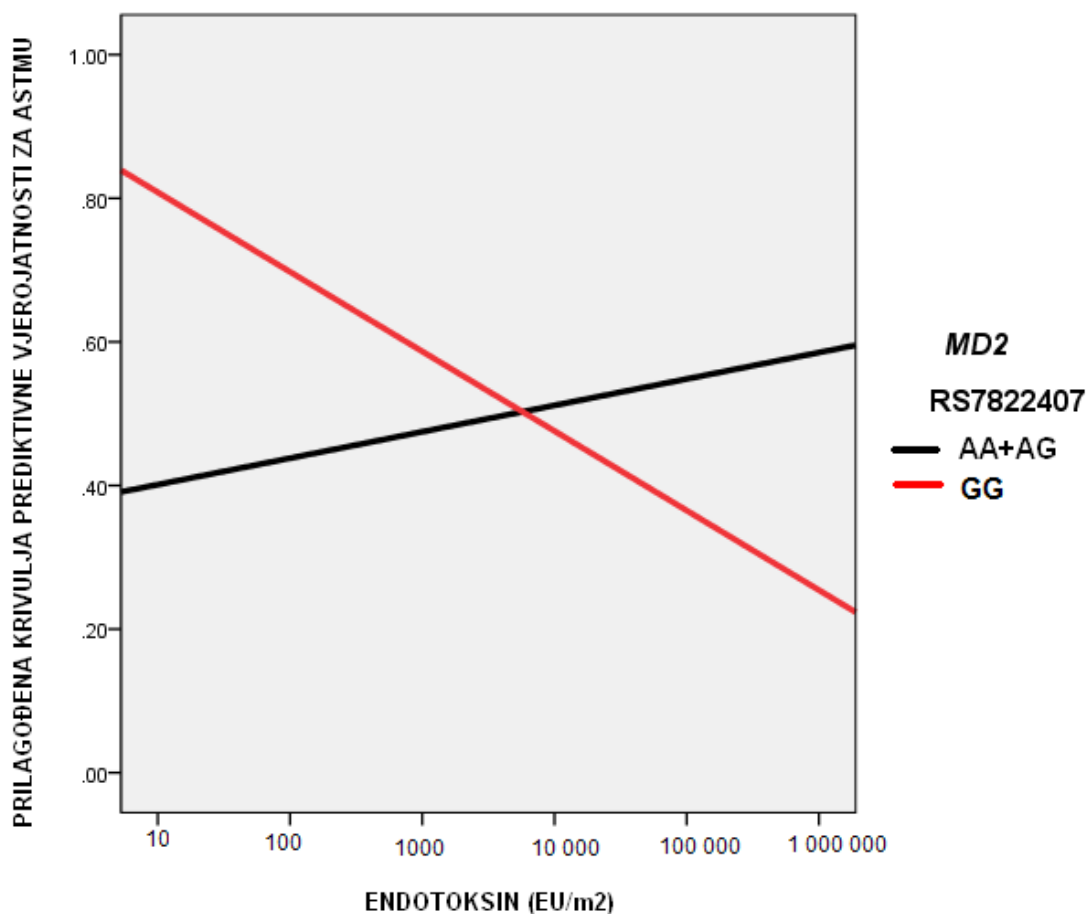
0,48-1,01, $p=0,12$). Pri izloženosti nižim koncentracijama endotoksina, odnosi kod navedenih genotipova bili su suprotni (slika 16).



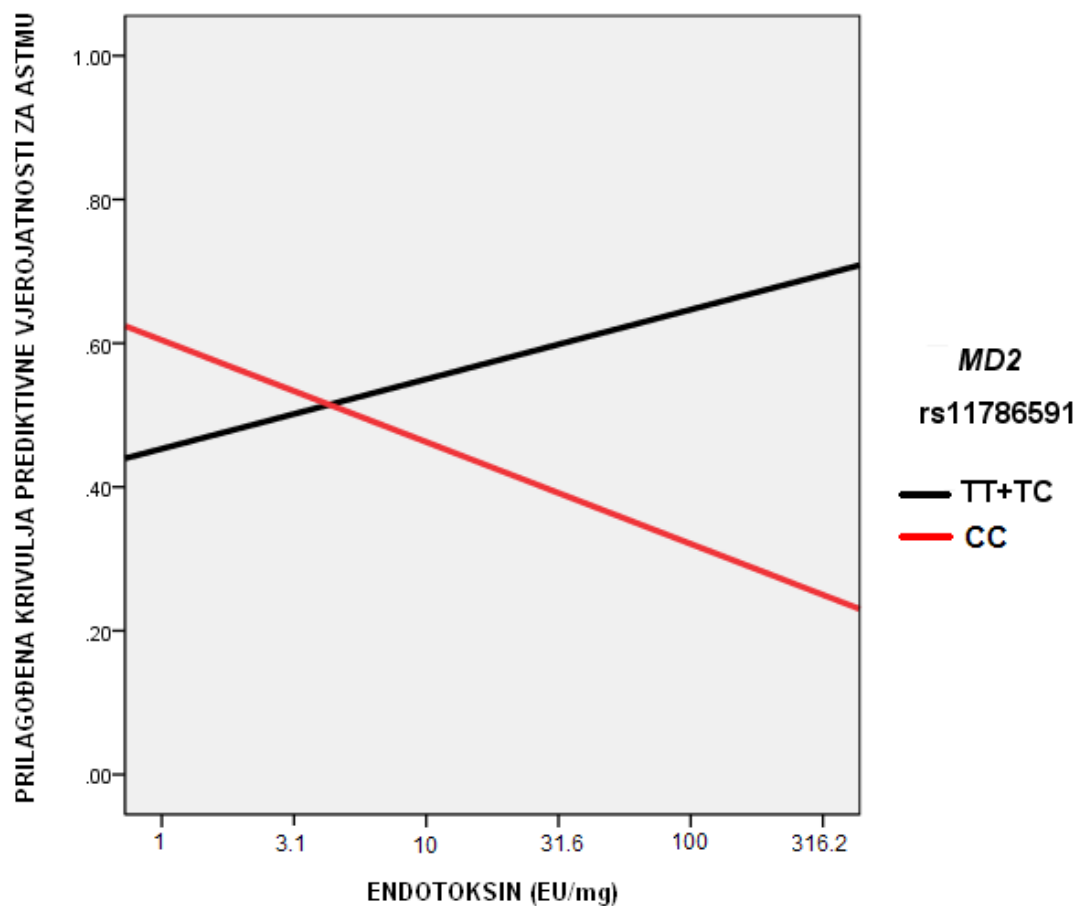
Slika 16. Prilagođena krivulja prediktivne vjerojatnosti za astmu u djece s genotipovima GG i GA+AA polimorfizma rs7822054 u genu MD2 u odnosu na izloženost endotoksinu iz madraca dobivena regresijskom analizom

Nositelji minor alela, odnosno genotipa rs7822407 AA+AG, rs11786591 TT+TC i rs7838017 TT+TC izloženi višim koncentracijama okolišnog endotoksina imali su veći rizik za astmu (rs7822407 aOR 1,16, 95%CI 0,72-1,85, $p=0,54$; rs11786591 aOR 1.49, 95% CI 0,85-2,61, $p=0,12$; rs7838017 aOR 1,08, 95% CI 0,7-1,69, $p=0,73$).

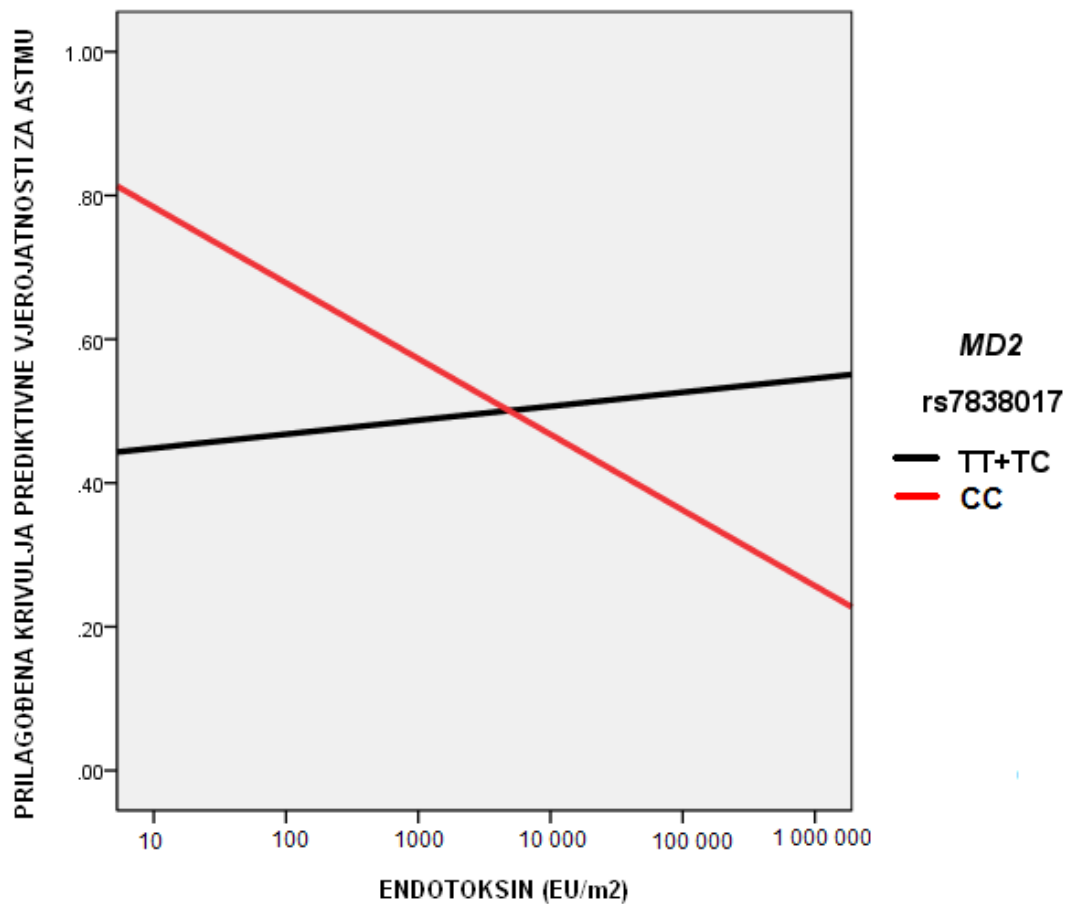
Suprotno nositeljima minor alela, homozigoti za major alel, genotip rs7822407 GG, rs11786591 CC i rs7838017 CC pri većoj izloženosti endotoksinu, imali su niži rizik za astmu (rs7822407 aOR 0,63, 95%CI 0,46-0,88, p=0,01; rs11786591 aOR 0,56, 95% CI 0,33-0,94, p=0,02; rs7838017 aOR 0,65, 95% CI 0,47-0,91, p=0,01). Pri izloženosti nižim koncentracijama endotoksina, odnosi kod navedenih genotipova su suprotni. Snižena koncentracija endotoksina povećava rizik za astmu kod homozigota za major alel, genotip rs7822407 GG, rs11786591 CC i rs7838017 CC, (slika 17, 18 i 19).



Slika 17. Prilagođena krivulja prediktivne vjerojatnosti za astmu u djece s genotipovima AA+AG i GG rs7822407 u genu MD2 u odnosu na izloženost endotoksinu iz madraca dobivena regresijskom analizom



Slika 18. Prilagođena krivulja prediktivne vjerojatnosti za astmu u djece s genotipovima TT+TC i CC rs11786591 u genu MD2 u odnosu na izloženost endotoksinu iz madraca dobivena regresijskom analizom



Slika 19. Prilagođena krivulja prediktivne vjerojatnosti za astmu u djece s genotipovima TT+TC i CC rs7838017 u genu MD2 u odnosu na izloženost endotoksinu iz madraca dobivena regresijskom analizom

5. RASPRAVA

U radu je istraženo međudjelovanje genetskih i okolišnih činitelja na pojavu astme u 837 djece, dobi 5 do 18 godina na području Brodsko-posavske županije. Ispitana je povezanost varijabilnosti gena prirođene imunosti *CD14*, *TLR4* i *MD2* s astmom dječje dobi u Hrvatskoj. Posebno je analiziran učinak međudjelovanja između varijabilnosti navedenih gena i izloženosti endotoksinu. U svih ispitanika analizirana je razlika u koncentraciji endotoksina i alergena *Der p1* u madracima njihovih kreveta.

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja i nedostataka. S obzirom na raspodjelu ispitanika u skupine, istraživanje je oblikovano kao ispitanik-kontrola, a prema vremenskom slijedu retrospektivno istražuje izloženost rizičnom čimbeniku i opisuje povezanost rizičnog čimbenika i astme. Retrospektivno prikupljeni podaci i iz njih dobiveni rezultati nemaju čvrst dokaz uzročnosti u odnosu na prospektivno prikupljene podatke skupine (npr. podatak o vlažnosti domova tijekom dojenačkog razdoblja i sl.). Nedostatak ovog opservacijskog istraživanja je i kontrolna skupina koja se po spolu ne podudara s ispitanicima. Astma je definirana prema smjernicama Globalne inicijative za astmu; nije procijenjivana nespecifična hiperreaktivnost bronha. Podatke o izloženosti duhanskom dimu dobili smo primjenom standardiziranog upitnika bez mjerenja razine kotinina u urinu.

837 djece podijeljeno je u dvije skupine koje su međusobno uspoređene. U prvoj skupini bilo je 423 (50,5%) ispitanika s astmom, a u drugoj skupini bilo je 414 (49,5%) djece iste dobi koja tijekom djetinjstva nisu imala ponavljajuće bronhopstrukcije. Između navedenih skupina istražena je razlika u učestalosti atopije, pozitivne obiteljske anamneze za alergijske bolesti, mjesta stanovanja, uvjeta stanovanja i izloženosti unutarnjim onečišćivačima.

Okolišni činitelji imaju važan učinak na pojavu astme, što čini osnovu higijenske hipoteze kojoj se od 1989. godine pridaje važnost putem mnogih znanstvenih istraživanja. U ovom radu analizirano je i mjesto stanovanja, za koje smo podjelu na selo/ grad primijenili administrativne kriterije.

Brodsko–posavska županija ima 166 731 stanovnika: u gradovima živi 80 495 ili 45,53% (Slavonski Brod 62 770, Nova Gradiška 14 956), dok na selu

živi 96270 ili 54,47%. U analiziranoj skupini djece s astmom kao i u kontrolnoj skupini ispitanika bile su podjednake podskupine gradske i seoske djece. Među ispitanicima s astmom (N=423) u gradu je živjelo 195 (46,1%), a u selu 228 (53,9%). Unutar kontrolne skupine djece (N=414) u gradu je živjelo 186 (45,3%), a u selu 225 (54,7%). Ova podjela temeljila se na pretpostavci da postoje razlike između ruralnog i urbanog stanovništva u stilu života, a što bi moglo utjecati na pojavu astme.

Poznato je da je pozitivna obiteljska anamneza za atopiju ima krucijalnu važnost za pojavu astme što je posebno uočeno u brojnim genetskim istraživanjima atopije i astme u blizanaca, prospektivnim praćenjem djece od rođenja do adolescentne dobi te u presječnim istraživanjima.³⁰⁴ Stoga smo u ovom radu analizirali učestalost astme u roditelja naših ispitanika (tablica 13). Od ukupno 837 djece, pozitivnu obiteljsku anamnezu za astmu (majka/otac) imalo je 75 (9%) ispitanika. U skupini ispitanika s astmom pozitivnu obiteljsku anamnezu je imalo 62 (14,7%), a u kontrolnoj skupini ispitanika 13 (3,2%) djece. Iz podataka se uočava da je pozitivna anamneza za astmu u roditelja rizik za astmu u njihove djece (aOR 5,06, 95%CI 2,73-9,4, $p<0,01$). Podjednaku zastupljenost astme u roditelja iznose i drugi istraživači (Dold i sur. 1992, Litonjua i sur 1998, Berg i sur. 2007)³⁰⁵⁻³⁰⁷

Majčina astma ima posebno jak rizik.³⁰⁷ Tijekom trudnoće majka za svoj fetus predstavlja specifičnu prenatalnu okolinu koja povećava rizik za astmu u djeteta putem programiranja imunoloških stanica³⁰⁸ ili putem lijekova koje uzima za liječenje astme. U ovom istraživanju zastupljenost majčine astme u 837 djece iznosila je 41 (4,89%): u skupini djece s astmom (N=423) majčina astma registrirana je u 37 (8,7%), a u kontrolnoj skupini (N=414) u 4 (1%) ispitanika. Dakle, isključivo majčina astma nosi devet puta veći rizik za astmu njezine djece (aOR 9,05, 95%CI 3,18-25,74, $p<0,01$). Očeva astma bila je zastupljena u 36 (4,3%) od 837 ispitanika: od 423 djece s astmom, astma u oca zabilježena je u 27 (6,4%), a u kontrolnoj skupini u 9 (2,2%) djece. Iz rezultata je vidljivo da astma u oca čini rizik za dijete (aOR 3,09, 95%CI 1,43-6,71, $p<0,01$). Slične podatke iznose i drugi autori (Dold i sur. 1992, Litonjua i sur. 1998, Berg i sur. 2007)³⁰⁵⁻³⁰⁷

Među rizičnim unutarnjim okolišnim činiteljima analizirali smo izloženost duhanskom dimu, unutarnjim onečišćivačima zraka, vlažnosti domova. Izlaganje duhanskom dimu pogoršava simptome, pridonosi pogoršanju plućne funkcije i umanjuje kliničke učinke inhalacijskih kortikosteroida kod djece s već postojećom astmom. Duhanski dim, već prenatalno, a i postnatalno oštećuje plućnu funkciju, povećava bronhalnu hiperreaktibilnost te nosi rizik za ponavljajuće bronhopstrukcije i kasnije astmu.^{9, 309} Transplacentarni prijenos štetnih sastojaka duhanskog dima modificira imunološke procese novorođenčeta: povećava se Th2-odgovor na alergen, smanjuje se proizvodnja IFN- γ na mitogene te oslabljuju učinci reakcija posredovanih Toll-u sličnim receptorima.¹² U ovom istraživanju izloženost duhanskom dimu od strane jednog ili više članova obitelji iznosila je: 64,1% u prenatalnom periodu, 67,9% u prvoj godini života, a 73,7% tijekom cijelog djetinjstva. Rezultati ovog istraživanja su u okvirima rezultata drugih autora. Naime, objavljena istraživanja iznose da u 35 do 80% dječjih domova puši jedan od članova obitelji.³¹⁰ Snažan utjecaj duhanskog dima na razvoj astme, uočen je tijekom izloženosti u prenatalnom i dojenačkom razdoblju, dok izloženost tijekom djetinjstva pogoršava simptome postojeće astme ili povećava učestalost drugih bolesti dišnog sustava.^{8, 9} Međutim, u ovom istraživanju izloženost duhanskom dimu nije pokazala utjecaj na pojavu astme (tablica 14).

Vlažni, tamni i slabo ventilirani domovi povoljna su sredina za razvoj plijesni koji su rizični činitelji za pojavu i pogoršanje astme.³¹¹ Za vrijeme istraživanja analizirana je prisutnosti vlage i plijesni na zidovima, a retrogradno je dobiven podatak i o stanju tijekom prve godine života. Prema dobivenim rezultatima, skupina djece s astmom češće je imala vlažne zidove i vidljive plijesni u svojim domovima tijekom prve godine života, 152 (35,9%), u odnosu na djecu iz kontrolne skupine 101 (24,6%). Tijekom samog istraživanja razlika nije uočena (tablica 15).

Važan izvor onečišćenja zraka unutar domova djece su energenti za kuhanje i grijanje (drvo, loživo ulje, nafta, plin), koji mogu pridonijeti upali dišnih putova u predškolske djece te pogoršanju astme u adolescenata.³¹² Međutim rezultati dosadašnjih istraživanja su ograničeni, a za uočavanje

stvarnog utjecaja onečišćivača unutarnjeg zraka na alergijske bolesti u dječjoj dobi potrebna su veća prospektivna praćenja. Analizirajući izvor energije za kuhanje, uočili smo da je primjena drva tijekom istraživanja statistički značajnije bila zastupljena u kontrolnoj skupini ispitanika. Primjena plina ili kombinacije plina, drva i struje u ovom istraživanju, nije mijenjala rizik za astmu (tablica 16).

Posebno smo analizirali izvore energije za grijanje. Anamnestičkim podacima saznali smo koje izvori energije su korišteni tijekom prve godine života naših ispitanika kao i za vrijeme istraživanja. Ustvrdili smo da nije bilo razlike u primjeni različitih goriva/energenata između ispitivane skupine djece s astmom kao i kontrole skupine (tablica 16). Iz toga se zaključuje da primjena raznih vrsta goriva za zagrijavanje domova nije doprinijela razvoju astme. Jedno od mogućih objašnjenje za to je dob djece tijekom istraživanja, budući da djeca školske dobi samo dio dana provode u svom domu.

Život u obiteljima s više starije braće i sestara indirektna je mjera izloženosti infekcijama tijekom ranog djetinjstva, što ima utjecaj na razvoj astme. Dosadašnja istraživanja pokazala su neujednačene rezultate. Primjerice, Strachan i sur. ustvrdili su da odrastanje u obiteljima s više djece ima zaštitni učinak na pojavu astme,³¹³ dok drugi autori nisu ustvrdili zaštitni učinak,^{80, 81, 314-318} a također nije niti ovo istraživanje (tablica 17).

Nazočnost alergijske senzibilizacije jedan je od rizičnih činitelja za astmu, što uočavaju i brojne epidemiološke studije.^{47, 50, 319} Izloženost visokim razinama alergena unutar domova povećava senzibilizaciju u djece,³²⁰ utječe na težinu astme te na pogoršanje simptoma u već postojeće astme.³²¹ Međutim, iako atopija ima važnu ulogu za pojavu astme, prema rezultatima epidemioloških istraživanja postavljena je sumnja na prenaplašenu ulogu atopije u astmi, s obzirom da je proporcija astme u dječjoj dobi koja se može pripisati atopiji od 25% do 63%.³¹⁹ Složeni odnosi atopije i astme, posljedica su heterogenosti sindroma astme kao i heterogenosti pojma atopije, te se smatra da atopija snažno pridonosi određenim fenotipovima astme, dok u ostalim fenotipovima astme ima manji ili nikakav utjecaj.³²² Ovo istraživanje, sukladno drugim presječnim istraživanjima, upućuje na visoku zastupljenost atopije (90,5%) u djece školske dobi koja imaju astmu, uz pridruženi atributivni rizik od 73%

(*engl. population attributable risk*). Atopija je definirana pozitivnim kožnim ubodnim testom na jedan ili više alergena. Od ispitivanih alergena, najzastupljenija je senzibilizacija na alergene grinje iz kućne prašine (*Dermatophagoides pteronyssinus* 44,7%, tablica 18). Podjednaka, odnosno viša zastupljenost specifične senzibilizacije, prisutna je u zemljama sličnih klimatskih uvjeta³²³⁻³²⁵, a značajno niža u mediteranskim i zemljama Dalekog istoka.^{188, 326} Druga po učestalosti je senzibilizacija na pelud ambrozije (23,4%), što je uzrokovano širokom rasprostranjenosti korova na neobrađenim ravnicama Slavonije. Podjednaku senzibilizaciju na pelud ambrozije nalazimo u Australiji (34%), a značajno nižu u zemljama sjevera Europe (medijan 0,8%).^{327, 328} U ovom istraživanju senzibilizacija na alergene peludi trava i stabala (mješavina peludi trava 17,9% i *Betula alba* 7,4%) manje je zastupljena u odnosu na SAD³²⁵, Meksiko³²³ i zemlje sjeverne Europe³²⁷. Senzibilizacija na epitel psa i mačke je niža (epitel psa 6.7%, epitel mačke 6.9%), u odnosu na zapadno europske zemlje i SAD (epitel psa 23%,^{43, 329} epitel mačke 40-50%).^{43, 54} Niska zastupljenost senzibilizacije na epitel psa i mačke u skladu je s niskom učestalošću držanja ovih kućnih ljubimaca (pas 6,6%, mačka 12,1%) u ispitivane djece.

Nutritivni alergeni u ovom istraživanju imali su manju pozitivnu zastupljenost u odnosu na inhalacijske alergene. Senzibilizacija na kikiriki u ispitivanoj skupini djece iznosila je 3,8%, što je niže u odnosu na neke razvijene zemlje (kao npr. SAD 10,7%)³³⁰, što objašnjavamo njegovom manjom konzumacijom među stanovništvom Slavonije. Učestalost senzibilizacije na jaje iznosila je 3,7%. Istraživanjem među djecom školske dobi ustvrdili smo da i inhalacijski i nutritivni alergeni, osim jajeta, povećavaju rizik za astmu.

Djelovanje okolišnih činitelja u genetski predisponiranih osoba, osnova je za kliničku ekspresiju kao i za pogoršanja astme. Porast prevalencije astme u industrijski razvijenim zemljama u drugoj polovini dvadesetog stoljeća objašnjava se promjenom okoliša i načina života. U okolišu suvremenog čovjeka, opaža se smanjenje izloženosti mikroorganizmima uzrokovana promjenom životnih uvjeta, poboljšanom javnom higijenom, primjenom antibiotika i provođenjem cijepljenjem. Jedan od pokazatelja mikrobnog okruženja je endotoksin koji je dio staničnog zida Gram negativnih bakterija.

Prema podacima u literaturi visoke koncentracije endotoksina izmjerene su u seoskim sredinama (aritmetička sredina 23 340 EU/m², 95%CI 11 159-48 819 EU/m²), pogotovo domovima uz farme (aritmetička sredina 49 479 EU/m², 95%CI 34 951-70 047 EU/m²)¹⁷¹, dok se niže vrijednosti bilježe u gradskim sredinama (median 856 EU/m², 10.-90.ct, 190-3 616 EU/m²).¹⁹¹ Slična mjerenja dobivena su i u ovom istraživanju (tablica 20). Nadalje, izmjerene koncentracije endotoksina u ovom istraživanju u okvirima su izloženosti koja su zabilježena u gradskim sredinama Velike Britanije,¹⁰¹ SAD^{114,241} više su u odnosu na koncentracije izmjerene u domovima djece u Cipru¹⁸⁸ i Nizozemskoj,¹⁹¹ a niže u odnosu na vrijednosti izmjerene u madracima dječjih spavaonica u Njemačkoj,³³¹ (tablica 19). Iako se u brojnim istraživanjima mjerila koncentracija endotoksina u kućnom okruženju, ponekad je uspoređivanje koncentracije endotoksina teško zbog izražavanja okolišnog endotoksina u različitim mjernim jedinicama.

Uočeno je da djeca koja odrastaju na farmama imaju manje alergijske senzibilizacije i simptoma alergijskog rinitisa, s različitom zastupljenošću astme.¹⁸³ Međutim rezultati istraživanja su neujednačeni, pa tako nekoliko studija iznose suprotne rezultate.^{145, 332, 333} Ukoliko se analiziraju koncentracije endotoksina u gradskim domovima, njihove niže vrijednosti, u odnosu na domove uz farme, također mogu djelovati zaštitno na pojavu atopije.^{331, 185, 334, 335} Do istih rezultata došli smo i u našem istraživanju: porast koncentracije endotoksina u dječjim madracima smanjuje rizik za astmu (aOR 0,75, 95% CI 0,58-0,98, p=0,03, slika 9) i za alergijsku senzibilizaciju (aOR 0,61, 95%CI 0,46-0,82, p<0,01, slika 10). Suprotno našem istraživanju, neki autori iznose opažanja da izlaganje višim koncentracijama endotoksina u okolini ili nema utjecaja ili pak, povećava rizik za pojavu atopijskog fenotipa.^{175, 187, 188, 190-192, 336} Neujednačenost rezultata navedenih istraživanja može biti posljedica metodoloških, tehničkih razlika te različitih mjerenja, ali i složenosti odnosa između izlaganja endotoksinu, atopije i astme. Brojni činitelji imaju na to svoj utjecaj: doza endotoksina, put unosa u organizam, faza razvoja imunološkog sustava, klinički oblik astme, drugi činitelji iz okoline (HSP 60, bakterijska DNK, beta-1,3-glukan) i genetska varijabilnost pojedinca.

Najzastupljeniji alergeni kućnog okruženja su alergeni grinje *Dermatophagoides pteronissinus*, a koncentracija glavnog alergena *Der p1* je iznosila 4,57ng/mg, 95%CI 4,07-5,25. Ukoliko se mjeri koncentracija po jedinici usisavane površine, ona je iznosila 2 454,71 ng/m², 95%CI 2 137,96-2 884,04. Navedena mjerenja odgovoraju umjerenom kontinentalnoj klimi u Slavoniji obilježene umjerenom prosječnom vlažnosti zraka. Koncentracije alergena *Der p1* zabilježene u ovom istraživanju u korelaciji su s koncentracijama izmjerenim u zemljama sličnih klimatskih uvjeta, poput Velike Britanije i nekim dijelovima SAD.^{47, 54, 337} Više koncentracije alergena grinje zabilježene su u Australiji,³³⁸ a značajno niže u područjima suhe i tople klime Cipra,¹⁸⁸ Kuvajta,³²⁶ kao i u planinama Meksika.³³⁹

Prema većini objavljenih istraživanja, izlaganje alergenima grinje i povećanje njihove koncentracije u okolini povećavaju rizik za razvoj specifične alergijske senzibilizacije,^{44, 45, 337} za koju je potrebna izloženost od minimalno 2 µg alergena *Der p1* po gramu prašine. U djece s pozitivnom obiteljskom anamnezom, specifična senzibilizacija se javlja i pri nižim koncentracijama alergena.³⁴⁰ Međutim, opisani linearni odnos nije potvrđen u svim istraživanjima,³⁴¹ a također niti u našem istraživanju (aOR 1,11, 95%CI 0,92-1,34, p=0,28, tablica 22). Nekoliko je mogućih objašnjenja: provođenje redovnih mjera prevencije poput učestalog usisavanja madraca smanjuje razinu alergena grinje u neposrednoj okolini oboljelih od astme; potom jednokratno mjerenje koncentracije alergena grinje u okolini tijekom školske dobi nije primjeren odraz izloženosti, jer djeca većinu vremena provode izvan kuće, također i niska zastupljenost pozitivne obiteljske anamneze za astmu (13,7%) u cijeloj skupini ispitanika ukazuje da je za senzibilizaciju u njih potrebna viša koncentracija alergena i naglašava ulogu nasljeđa.

Iako je važan odnos izloženosti alergenima i senzibilizacije, isto tako je bitno analizirati odnos između izloženosti i astme. U ovom istraživanju nije uočena povezanost između izloženosti alergenima *Der p1* u madracu i astme (aOR 1,01, 95%CI 0,91-1,32, p=0,33), što potvrđuju i drugi autori.^{48, 49} Posljednja istraživanja upućuju na heterogenost fenotipa atopije, kao i na heterogenost sindroma astme te da je atopija rizični činitelj u nekim fenotipovima astme, dok u drugima nema utjecaja. Za istraživanje odnosa izloženost-atopija-

astma su neophodna preciznija definiranja fenotipova astme i atopije te promatranje drugih činitelja iz okoline koji imaju sinergistički učinak poput virusa, iritansa, onečišćivača zraka i dijelova bakterija.³²²

U složenoj patogenezi atopije i alergijskih bolesti sudjeluju i PRR koji prepoznaju PAMP iz okoline. Endotoksin kao dio bakterijskog zida, prepoznaje tromolekularni kompleks PRR koji čine CD14-TLR4-MD2. CD14 vezan za membranu ili prisutan u topljivom obliku prepoznaje i veže endotoksin predočen od strane lipoprotein vežućeg proteina. Na površini stanične membrane MD2 osigurava vezanje endotoksina za TLR4 koji svojim unutarstaničnim dijelom prenosi signal u stanicu, pokreće izražajnost proupalnih gena i sintezu proupalnih citokina uključenih u Th1-imunoreakciju. Varijabilnost gena odgovornih za sintezu receptora prirođene imunosti mijenja imunološki odgovor osobe na izlaganje okolišnom endotoksinu.

Baldini i suradnici²²² 1999. godine su objavili prvo istraživanje o povezanosti atopije i varijabilnosti gena za CD14. Funkcijski polimorfizam rs2569190 C/T gena *CD14*, povezan je s višom serumskom razinom topljivog CD14 što homozigote za alel T čini osjetljivijima na niske koncentracije okolišnog endotoksina i posljedično time su zaštićeniji od atopije. Suprotno, niže razine topljivog CD14 karakteristične su kod homozigota za alel C. Mnogobrojna istraživanja pokazuju različite rezultate. Tako studije u Nizozemskoj,²²⁴ Tunisu,²²⁵ Kini,²²⁷ Australiji²²⁶ i Indiji²²⁸ pokazuju da prisutnost alela C povećava rizik za atopiju i/ili druga obilježja astme. Naprotiv, suprotne rezultate objavili su Ober i suradnici koji su u populaciji Hutterita pokazali da alel T povećava rizik od atopije.²³⁵ Hutteriti su izolirana zajednica stanovnika SAD čija je osnovna djelatnost zemljoradnja zbog čega su izloženi visokim koncentracijama endotoksina.

Istraživanje koje smo tijekom ovog rada proveli u populaciji hrvatske školske djece, nije pokazalo povezanost između polimorfizma rs2569190 gena *CD14* i astme, što je u skladu s istraživanjima provedenim u Australiji,²³² Njemačkoj,^{230, 231, 234} Velikoj Britaniji²²⁹ i Češkoj.²³³

Pretpostavlja se da proturječni rezultati navedenih istraživanja o povezanosti polimorfizma gena za CD14 i atopije/astme mogu biti posljedica utjecaja različitog životnog okruženja. U patogenezi složenih bolesti kao što je astma

ne možemo odvojeno istraživati samo naslijeđe, odnosno samo okolinu, nego treba istražiti njihove isprepletene utjecaje na pojavu astme. Hipoteza da modificirajući učinak varijabilnost gena za CD14 na atopiju/astmu ovisi o izloženosti endotoksinu u neposrednoj okolini, potvrđena je kroz četiri nezavisna istraživanja prema kojima visoke razine okolišnog endotoksina kod nositelja alela C zaštićuju, a kod alela T povećavaju rizik od astme. Promjenom koncentracije endotoksina u okolini, za nositelje alela C, odnosno T, mijenjao bi se i rizik za astmu.^{101, 114-116}

U našem istraživanju nije uočen utjecaj međudjelovanja funkcijskog polimorfizma rs2569190 i okolišnog endotoksina na astmu dječje dobi, (tablica 24). Prema javno dostupnim medicinskim bazama podataka do sada nije objavljeno istraživanje koje ima isti rezultat. Nepovezanost rezultata može se eventualno objasniti ograničenjem istraživanja koje proučava samo jedan od brojnih mogućih utjecaja iz okoline i varijabilnosti samo jednog gena. Naime, endotoksin može biti samo obilježje stupnja higijene, dok drugi utjecaji iz okoline poput muraminske kiseline, glukana ili kontakt sa životinjama mogu imati biološki učinak. Nadalje, ne možemo isključiti mogućnost postojanja polimorfizma s biološkim djelovanjem u neposrednoj okolini rs2569190 koji bi s njim bio u visokom LD jer se nasljeđuje zajedno. Također nepovezanost može biti posljedica pojavljivanja haplotipova i/ili međudjelovanja između više gena uključenih u signalni put za endotoksin.

U ovom istraživanju uočen je utjecaj međudjelovanja između polimorfizma rs2563298, smještenog na 3-kraju gena *CD14*, i endotoksina iz madraca, na pojavu astme (tablica 25, slika 12). S obzirom na položaj unutar gena, pretpostavlja se da bi opisani polimorfizam mogao utjecati na alternativno prekrajanje i razinu različitih izoformi proteina CD14 čime se mijenja i njegova funkcija. Nadalje, u istraživanju smo ustvrdili da su nositelji genotipa rs2563298 CC gena *CD14* uz izlaganje višim koncentracijama endotoksina u okolini, bili zaštićeni od astme, dok u nositelja genotipa rs2563298 AA+AC, endotoksin nije imao utjecaja na astmu (slika 12).

Kompleks endotoksina i proteina CD14 i MD2 veže se za TLR4 receptor, nakon čega slijedi stvaranje multimera koji je sastavljen od dvije kopije TLR4-MD2-endotoksina. Na taj način započinje TLR4-posredovan prijenos signala

u stanicu koji potiče izražajnost proupalnih gena i proupalnog odgovora (IFN- α/β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 i IL-18), sazrijevanja antigen-prezentirajućih stanica (dendritičkih stanica) i usmjeravanja imunološke reakcije značajnije u Th1- nego u Th2-smjeru.²¹¹ U patogenezi alergijskih bolesti, uloga TLR4 pretpostavila je hipotezu da varijabilnost gena *TLR4* modificira imunološki odgovor nakon ulaska endotoksina u organizam. U studijama koje istražuju biološki učinak polimorfizama^{244-246, 342} uočeno je da su nositelji kosegregacijske mutacije (rs4986790, zamjena A-G/Asp299Gly i rs4986791, zamjena C-T/Thr399Ile), koje mijenjaju izvanstanični dio receptora smanjeno osjetljivi na udahnuti endotoksin. Brojne studije istraživale su povezanost opisanih funkcijskih polimorfizama s atopijom i/ili astmatskim obilježjima, a njihovi objavljeni rezultati upućuju da oni nisu povezani s astmom^{113, 225, 251, 252, 255, 256, 260, 262, 264, 266, 267, 269-272, 343} što je potvrđeno i u našem istraživanju.

Negativni rezultati prethodno navedenih polimorfizama u genu *TLR4*, naveli su na istraživanje i drugih polimorfizama gena *TLR4* s nepoznatim biološkim djelovanjem. U našem istraživanju uočili smo povezanost dva polimorfizma u genu *TLR4* (rs1927907 i rs11536889) s astmom, (tablica 27). Iako funkcija polimorfizama povezanih s astmom (rs1927907 i rs11536889) nije poznata, smatra se da smješteni na nekodirajućim regijama gena utječu na izražajnost gena uključenih u translaciju RNK odnosno alternativno prekrajanje kojim mijenjaju stabilnost mRNK. Ovim promjenama mijenjaju predispoziciju za razvoj astme. Prethodna istraživanja^{260, 262, 267} genotipizirala su opisane polimorfizme (rs1927907 i rs11536889), no međutim nije bila uočena poveznost s astmom. Spomenuta istraživanja su s obzirom na dizajn, jednako oblikovana kao i naše istraživanje. Razlike su bile u veličini ispitivanog uzorka, različitoj okolini i definiciji astme koja je u prethodnim istraživanja bila samoprijavljena od strane ispitanika, a u ovom istraživanju dijagnozu astme je postavio liječnik.

Analizirajući u ovom istraživanju interakciju polimorfizma rs11536889 gena *TLR4* s endotoksinom, uočena je modifikacija rizika za astmu, (tablica 28, slika14). S povećanjem izloženosti endotoksinu među djecom nositeljima genotipa CC snižavao se rizik za astmu, dok u nositelja genotipa CG+GG promjena koncentracije endotoksina nije imala utjecaja na astmu. U javnim

medicinskim bazama samo su tri objavljene studije o međudjelovanju polimorfizama *TLR4* gena s mikrobnim okruženjem. Werner i suradnici²⁷³ izvijestili su da nositelji minora alela funkcijskog polimorfizma gena *TLR4* (A-G/Asp299Gly) izloženi visokim koncentracijama endotoksina, imaju niži rizik za astmu i bronhalnu hiperreaktivnost u odnosu na homozigote za major alel. Smit i suradnici²⁶² su uočili međudjelovanje između seoskog okruženja i dva polimorfizma gena *TLR4*. Naime, život u selu u nositelja minor alela rs11536889 i homozigota za minor alel rs7045953 smanjuje rizik od atopijske astme.

Značajno je naglasiti da smo u našem istraživanju potvrdili utjecaj rs11536889 na pojavu rizika za astmu u međudjelovanju s endotoksinom, kao što je uočio Smit i suradnici.²⁶² Međutim, uspoređivanje nije prihvatljivo zbog metodoloških razlika jer život u selu predstavlja mjeru izloženosti mikroorganizmima i brojnim drugim čimbenicima koji obilježavaju seoski život i modificiraju pojavu alergijskih bolesti, a nije ekvivalent izloženosti endotoksinu. Nedugo, nakon prvog istraživanja, Smit i suradnici, 2011. godine, uočili su da nema međudjelovanja genotipa *TLR4* i endotoksina iz okoline.²⁷² Dosadašnji publicirani radovi, uključujući i naše istraživanje, pokazuju kontroverzne rezultate, što upućuje na neophodnost daljnjih istraživanja.

TLR4 ima ključnu ulogu i u pokretanju prirođene imunoreakcije na infekciju RSV. Slično endotoksinu, predmet brojih istraživanja bio je utjecaj kosegregacijskih mutacija ovog gena na kliničku težinu bolesti te citokinski profil nakon RSV infekcije. Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja nisu ujednačeni, pa tako neka povezuju minor alel, neka major alel funkcijskog polimorfizma s težom kliničkom slikom RSV infekcije. Također, objavljene su studije koje ne uočavaju promjenu citokinskog profila ovisnu o genotipu.³⁴⁴

S obzirom na značajnu ulogu *TLR4* u RSV infekciji, ali i u odgovoru na izlaganje endotoksinu, drugim komponentama mikroorganizama te alergena poput Der p2, neophodna su daljnja istraživanja povezanosti istodobne izloženosti i virusu i alergenu s pojavom astme i egzacerbacija koje su ovisne o genotipu *TLR4*.

MD2 je sekretorni glikoprotein koji prepoznaje kompleks endotoksina s CD14, udružuje se s izvanstaničnim dijelom TLR4 i omogućava prijenos signala u stanicu. U ovom istraživanju uočena je statistički značajna povezanost četiri polimorfizma u genu *MD2* s astmom. Djeca nositelji genotipova rs11786591 TT+TC, rs1991262 CG+GG, rs7822407 AG+GG i rs7838017 TC+CC su imala povećan rizik za astmu (tablica 30). Ukoliko se uzme u obzir i izloženost endotoksinu, mijenjao se i rizik za astmu (tablica 31). Naime, u nositelja genotipa rs11786591 TT+TC povećavao se rizik za astmu samo kod izloženosti višim koncentracijama okolišnog endotoksina, dok pri nižoj izloženosti, isti genotip nije djelovao zaštitno na astmu. Nositelji genotipa rs7822407 GG pri niskoj koncentraciji endotoksina su imali povećan rizik za astmu. Suprotan učinak je uočen za isti genotip kod izloženosti višim koncentracijama. Povećan rizik za astmu uočen je i kod međudjelovanja genotipa rs7838017 CC i endotoksina kod izloženosti nižim koncentracijama endotoksina, dok povećanjem koncentracije okolišnog endotoksina ovaj genotip je djelovao zaštitno na pojavu astme.

Polimorfizam rs7822054 nije bio povezan s astmom, dok je pod utjecajem okoline ovaj genotip mijenjao rizik za astmu. U našoj ispitivanoj skupini, povećanje koncentracije endotoksina je imalo zaštitni učinak, što je uočeno i za djecu nositelje genotipa rs7822054 AA+AG. Međutim, homozigoti za alel G izloženi višim koncentracijama endotoksina imali su povećan rizik za astmu. Međudjelovanje uočeno za rs7822054 je zadržalo statističku značajnost i nakon korekcije za višestruko testiranje ($p=0.03$).

Malobrojne su studije o biološkom učinku polimorfizama *MD2* gena. Funkcija opisanih polimorfizama gena *MD2* povezanih s astmom odnosno uključenih u međudjelovanje s okolišnim endotoksinom nije poznata. Međutim, povezni polimorfizmi smješteni u intronu 1 i intronu 2, mogu dovesti do prekrajanja mRNK. Nakon stimulacije endotoksinom, umjesto sinteze proteina MD2, proizvodi se njegova kraća varijanta MD2s (od engl. MD2 short). MD2s se veže za TLR4, pa izostaje aktivacija NF κ B i sinteza IL-8, čime blokira daljnji prijenos signala u stanicu. Varijabilnost u intronu 1 i intronu 2 gena *MD2* rezultira proizvodnjom proteina MD2s koji negativnom povratnom spregom inhibira učinkoviti imunološki odgovor na endotoksin.²⁸⁶

Do sada su objavljene tri studije udruženosti polimorfizama gena *MD2* i atopije, astme i astmatskih obilježja prema kojima istraživani polimorfizmi gena *MD2* nisu povezani s atopijom i astmom. Međutim uzimanjem u obzir okolišnih činitelja poput koncentracije endotoksina ili izloženosti ekvivalentima respiracijskih infekcija te utjecaja drugih gena prirođene imunosti, polimorfizmi gena *MD2* statistički značajno utječu na atopiju, astmu i astmi pridružena obilježja.^{267, 272, 287} Istraživanja je teško uspoređivati zbog metodoloških razlika, različitih istraživanih polimorfizama te različitih okolišnih utjecaja.

Astma je složena bolest koja je posljedica djelovanja brojnih, pojedinačno slabih genetskih promjena. Međutim, one mogu proizvesti snažni fenotipski učinak u međudjelovanju s okolinom i biološkim sustavima. Okolinom se definiraju svi unutrašnji i vanjski negentski činitelji koji povećavaju rizik za razvoj astme, dok biološki sustavi uključuju epistazu, epigenetiku, haplotipove i mikrookolinu stanice. Navedeni činitelji imaju snažni učinak na pojavu astme ukoliko djeluju u prenatalnom i dojenačkom razdoblju. Smatra se da su epigenetske promjene mehanizmi putem kojih se ostvaruju međudjelovanja gena i okoline. Stabilne epigenetske promjene povećavaju se tijekom razvoja i proliferacije stanica, omogućavajući višestaničnim organizmima genetičku identičnost, ali i različitost u strukturi i funkciji. Razvojem molekularne biologije i genetike, tijekom posljednjih godina znatno su se poboljšala saznanja o patofiziologiji astme, ali za bolje razumijevanje ovih složenih procesa potrebna su daljnja prospektivna istraživanja, gdje bi se pozornost usmjerila na utjecaj međudjelovanja više gena i više okolišnih čimbenika.³⁴⁵

Predstavljeno istraživanje je studija udruženosti gena prirođene imunosti s astmom u školske djece i jedna od malobrojnih studija izvedenih u hrvatskoj populaciji. Prema medicinskim bazama podataka do sada je objavljeno preko tisuću ovakvih istraživanja koja su analizirala povezanost polimorfizama na oko stotinjak kandidatskih gena za astmu. Istraživanja imaju za cilj uočiti povezanost atopije i/ili astme i drugih astmatskih obilježja s polimorfizmima kandidatskih gena za astmu. Zlatni standard u dokazivanju povezanosti gena i polimorfizma s ispitivanim obilježjem je ponavljanje rezultata istraživanja.

Uočeno je da genetičke studije udruženosti gena kandidata često ne mogu ponoviti ranije objavljenje rezultate. Mogući razlozi su nepravilan oblik istraživanja, slojevitost populacije, različiti obrasci LD između pojedinaca različitih populacija te različiti utjecaji iz okoline za različite populacije. Također neponavljanje rezultata može biti posljedica nejasnih definicija ishoda istraživanja kao i neprimjerena statistička snaga studije.³⁴⁶

Rezultati našeg istraživanja upućuju da u složenim bolestima kao što je astma, kod procjene izloženosti različitim okolišnim činiteljima treba uzeti u obzir i nasljednu sklonost, i obrnuto, okolišne činitelje treba uključiti i u genetička istraživanja. Nadalje, obično koristimo epidemiološke podatke za procjenu rizičnih činitelja za astmu, i prema njima nastojimo osmisliti preventivne mjere. Ukoliko prenesemo dobivene podatke u okvire primarne prevencije bolesti, možemo reći da samo osobe s određenim genotipom mogu imati koristi od specifičnih mjera, dok primjena istih mjera može naštetiti osobama sa suprotnim genotipom. Ovakve spoznaje naglašavaju individualni pristup svakom bolesniku u dijagnostici i liječenju, ali i individualne preventivne mjere. U budućnosti, poznavanje genotipa zajedno s razvojnim kliničkim fenotipom i pokazateljima podležećih patofizioloških zbivanja, omogućilo bi učinkovitije razvrstavanje tipa astme te posljedično i primjenu specifičnijeg liječenje. Međutim za praktičnu primjenu potrebna su veća daljnja istraživanja funkcionalnih polimorfizama, međudjelovanja gen-gen, te višestruka međudjelovanja između gena i različitih okolišnih čimbenika, kao i uniformirana mjerenja okolišnih čimbenika.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata iz ovog istraživanja proizlaze slijedeći zaključci:

- Rizični činitelji za astmu u ispitivanoj skupini su: astma majke i/ili oca; vlažnost doma tijekom dojenačkog razdoblja; atopija; specifična senzibilizacija na *Dermatophagoides pteronyssinus*, epitel mačke, epitel psa, pelud *Betulle albe*, *Ambrosie elatior* i mješavine peludi trava, te kikiriki
- Izloženost duhanskom dimu, način zagrijavanja doma ili način kuhanja, centralno grijanje te veličina obitelji u kojoj dijete odrasta nisu pokazali utjecaj na astmu
- Povećanje koncentracije okolišnog endotoksina zaštićuje od astme
- Koncentracija alergena *Der p1* u madracu nije imala utjecaja na specifičnu senzibilizaciju na *Dermatophagoides pteronyssinus* i na astmu
- Polimorfizmi gena *CD14* uključivši i funkcijski polimorfizam rs2569190 nisu bili povezani s astmom
- Polimorfizmi gena *CD14* uključivši i funkcijski polimorfizam rs2569190 u međudjelovanju s endotoksinom nisu imali utjecaja na astmu
- Polimorfizmi rs1927907 i rs11536889 gena *TLR4* su bili povezani s astmom; funkcijski polimorfizmi (rs4986790 i rs4986791) gena *TLR4* nisu bili povezani s astmom
- Polimorfizam rs11536889 gena *TLR4* u međudjelovanju s endotoksinom je mijenjao rizik za astmu; funkcijski polimorfizmi (rs4986790 i rs4986791) u međudjelovanju s endotoksinom nisu imali utjecaja na astmu
- Polimorfizmi rs1178659, rs1991262, rs7822407 i rs7838017 gena *MD2* pokazali su povezanost s astmom
- Polimorfizmi rs7822054, rs7822407, rs7838017 i rs11786591 gena *MD2* u međudjelovanju s endotoksinom su mijenjali rizik za astmu

7. SAŽETAK

Uvod: Prema higijenskoj hipotezi prenatalno i rano postneonatalno izlaganje endotoksinu može usmjeriti imunološke reakcije u Th1-smjeru i prevenirati razvoj i astme. Međutim, rezultati istraživanja su proturječni. Endotoksin svoj učinak atopije ostvaruje vezanjem za receptore prirođene imunosti (CD14, MD2 i TLR4), a varijabilnost njihovih gena u međudjelovanju s okolišnim endotoksinom, mijenja klinički fenotip.

Cilj: Istražili smo rizične činitelje i utjecaj endotoksina i alergena *Der p1* na astmu. Proučena je povezanost varijabilnosti gena za CD14, MD2 i TLR4 kao i međudjelovanje s endotoksinom na astmu.

Metode: Istraživanje je obuhvatilo 837 djece dobi od 5-18 godina (423 djece s astmom, 414 zdravih kontrola). Svim ispitanicima prikupljeni su podaci prema standardiziranom upitniku i učinjen im je kožni ubodni test. Iz madraca dječjih spavaonica uzeti su uzorci prašine u kojima je izmjerena koncentracija endotoksina (primjenom Limulus amebocyte lysate testa) i koncentracija *Der p1* (primjenom ELISA). Genotipizirali smo pet polimorfizama gena *CD14*, devet gena *MD2* i šestnaest gena *TLR4* primjenom spektrometrije masa.

Rezultati: Rizik za astmu su povećavale alergijske bolesti u obitelji, vlažnost doma, atopija i specifična senzibilizacija. Izloženost endotoksinu djelovala je zaštitno na astmu, dok koncentracija alergena grinje u okolini nije pokazala utjecaj. Za polimorfizme gena *CD14*, kao i za međudjelovanje s endotoksinom nije uočena povezanost s astmom. Polimorfizmi gena *MD2* (rs1178659, rs1991262, rs7822407 i rs7838017) i gena *TLR4* (rs1927907 i rs11536889) su bili povezani s astmom. Statistički značajno međudjelovanje s endotoksinom uočeno je za polimorfizme *MD2* (rs7822054, rs7822407, rs7838017 i rs11786591) i *TLR4* (rs11536889).

Zaključak: Okolišni endotoksin ima značajnu ulogu u patogenezi astme dječje dobi. Međutim, varijabilnost gena *MD2* i *TLR4* modificira učinak izloženosti endotoksinu.

8. SUMMARY

THESIS TITLE: The association of endotoxin and polymorphisms in CD14 and TLR4 among children with asthma (2013)

AUTHOR: Blazenka Kljaic Bukvic

Background: According to the hygiene hypothesis prenatal and early postnatal exposure to environmental endotoxin may be protective against atopy and asthma development (by inducing Th1 type immune response). However, various studies have reported contradictory results. The pathway of endotoxin response involves a complex of innate immunity receptors (CD14, MD2 i TLR4). Genetic variants in *CD14*, *TLR4* and *MD2* genes may modify the relationship between endotoxin exposure and asthma

Aim: We investigated risk factors for asthma and impact of environmental exposures (endotoxin and house dust mite) on asthma. We evaluated associations between genetic variants in *CD14*, *MD2* and *TLR4*. In addition, we assessed the effect of endotoxin exposure in the context of genetic variants.

Methods: The study included 837 children 5-18 years old (423 children with asthma and 414 non-asthmatic controls). Data were collected using standardised questionnaire. Sensitization was determined by skin prick testing. Dust samples were collected from the child's mattress, where we measured the endotoxin load (using the Limulus amoebocyte lysate test) and *Der p1* concentration (using ELISA). We genotyped five variants in *CD14* gene, nine in *MD2* gene and sixteen in *TLR4* by use of mass spectrometry.

Results: An increased asthma risk was associated with family history of allergic disease, home dampness, atopy and specific sensitization. Endotoxin exposure was found to have a protective effect against asthma, whereas no such effect was recorded for house dust mite. We found no associations between genetic variants in *CD14* and asthma. There were no significant interactions with endotoxin either. Association with asthma was found for variants in *MD2* (rs1178659, rs1991262, rs7822407 i rs7838017) and *TLR4* (rs1927907 i rs11536889). We observed significant interactions

between 4 SNPs in *MD2* (rs7822054, rs7822407, rs7838017 i rs11786591), 1 SNP in *TLR4* (rs11536889) and endotoxin exposure in relation to asthma.

Conclusion: Environmental endotoxin exposure has an important role in pathogenesis of childhood asthma. Genetic variants in the *MD2* and *TLR4* modify the relationship between endotoxin exposure and asthma.

9. LITERATURA

1. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, i sur. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006; 368:733-743.
2. Banac S, Tomulic KL, Ahel V, i sur. Prevalence of asthma and allergic diseases in Croatian children is increasing: survey study. *Croat Med J* 2004; 45:721-726.
3. Munivrana H, Vorko-Jovic A, Munivrana S, Kursar M, Medlobi-Gluhak M, Vlahek P. The prevalence of allergic diseases among Croatian school children according to the ISAAC Phase One questionnaire. *Med Sci Monit* 2007; 13:CR505-509.
4. Stipic-Markovic A, Pevec B, Pevec MR, Custovic A. [Prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinitis, conjunctivitis and atopic eczema: ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) in a population of schoolchildren in Zagreb]. *Acta Med Croatica* 2003; 57:281-285.
5. Banac S, Rozmanic V, Manestar K, i sur. Rising trends in the prevalence of asthma and allergic diseases among school children in the north-west coastal part of Croatia. *J Asthma* 2013.
6. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006; 7:95-100.
7. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:169-182.
8. Pattenden S, Antova T, Neuberger M, i sur. Parental smoking and children's respiratory health: independent effects of prenatal and postnatal exposure. *Tob Control* 2006; 15:294-301.
9. Gilliland FD, Berhane K, Li YF, Rappaport EB, Peters JM. Effects of early onset asthma and in utero exposure to maternal smoking on childhood lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:917-924.

10. Child F, Lenney W, Clayton S, i sur. The association of maternal but not paternal genetic variation in GSTP1 with asthma phenotypes in children. *Respir Med* 2003; 97:1247-1256.
11. Noakes PS, Holt PG, Prescott SL. Maternal smoking in pregnancy alters neonatal cytokine responses. *Allergy* 2003; 58:1053-1058.
12. Noakes PS, Hale J, Thomas R, Lane C, Devadason SG, Prescott SL. Maternal smoking is associated with impaired neonatal toll-like-receptor-mediated immune responses. *Eur Respir J* 2006; 28:721-729.
13. Maritz GS, Morley CJ, Harding R. Early developmental origins of impaired lung structure and function. *Early Hum Dev* 2005; 81:763-771.
14. Kumar R. Prenatal factors and the development of asthma. *Curr Opin Pediatr* 2008; 20:682-687.
15. Ege MJ, Bieli C, Frei R, i sur. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:817-823.
16. Douwes J, Cheng S, Travier N, i sur. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J* 2008; 32:603-611.
17. Litonjua AA, Rifas-Shiman SL, Ly NP, i sur. Maternal antioxidant intake in pregnancy and wheezing illnesses in children at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:903-911.
18. Camargo CA, Jr., Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, i sur. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:788-795.
19. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, i sur. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:853-859.
20. Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, i sur. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62:68-77.

21. Prescott SL, Dunstan JA. Prenatal fatty acid status and immune development: the pathways and the evidence. *Lipids* 2007; 42:801-810.
22. Willers SM, Devereux G, Craig LC, i sur. Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax* 2007; 62:773-779.
23. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, i sur. Maternal fish oil supplementation in pregnancy reduces interleukin-13 levels in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:442-448.
24. Salam MT, Li YF, Langholz B, Gilliland FD. Maternal fish consumption during pregnancy and risk of early childhood asthma. *J Asthma* 2005; 42:513-518.
25. Romieu I, Torrent M, Garcia-Esteban R, i sur. Maternal fish intake during pregnancy and atopy and asthma in infancy. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:518-525.
26. Johannsen H, Prescott SL. Practical prebiotics, probiotics and synbiotics for allergists: how useful are they? *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1801-1814.
27. Curley AE, Sweet DG, MacMahon KJ, O'Connor CM, Halliday HL. Chorioamnionitis increases matrix metalloproteinase-8 concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from preterm babies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89:F61-64.
28. Kumar R, Yu Y, Story RE, i sur. Prematurity, chorioamnionitis, and the development of recurrent wheezing: a prospective birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:878-884.
29. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995; 332:133-138.
30. Taussig LM. Maximal expiratory flows at functional residual capacity: a test of lung function for young children. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116:1031-1038.

31. Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Martinez FD. Increased incidence of asthmalike symptoms in girls who become overweight or obese during the school years. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1344-1349.
32. McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Hubbard R. The importance of prenatal exposures on the development of allergic disease: a birth cohort study using the West Midlands General Practice Database. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:827-832.
33. Shaheen SO, Newson RB, Henderson AJ, i sur. Prenatal paracetamol exposure and risk of asthma and elevated immunoglobulin E in childhood. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:18-25.
34. Garcia-Marcos L, Sanchez-Solis M, Perez-Fernandez V, Pastor-Vivero MD, Mondejar-Lopez P, Valverde-Molina J. Is the effect of prenatal paracetamol exposure on wheezing in preschool children modified by asthma in the mother? *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149:33-37.
35. Perzanowski MS, Miller RL, Tang D, i sur. Prenatal acetaminophen exposure and risk of wheeze at age 5 years in an urban low-income cohort. *Thorax* 2008; 65:118-123.
36. Frye C, Mueller JE, Niedermeier K, Wjst M, Heinrich J. Maternal oral contraceptive use and atopic diseases in the offspring. *Allergy* 2003; 58:229-232.
37. Wright RJ. Prenatal maternal stress and early caregiving experiences: implications for childhood asthma risk. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2007; 21 Suppl 3:8-14.
38. Hawrylowicz C, Ryanna K. Asthma and allergy: the early beginnings. *Nat Med* 2010; 16:274-275.
39. Conrad ML, Ferstl R, Teich R, i sur. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *J Exp Med* 2009; 206:2869-2877.
40. Hollingsworth JW, Maruoka S, Boon K, i sur. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 2008; 118:3462-3469.

41. Li YF, Langholz B, Salam MT, Gilliland FD. Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma. *Chest* 2005; 127:1232-1241.
42. Miller RL, Garfinkel R, Horton M, i sur. Polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke, and respiratory symptoms in an inner-city birth cohort. *Chest* 2004; 126:1071-1078.
43. Huss K, Adkinson NF, Jr., Eggleston PA, Dawson C, Van Natta ML, Hamilton RG. House dust mite and cockroach exposure are strong risk factors for positive allergy skin test responses in the Childhood Asthma Management Program. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:48-54.
44. Lau S, Illi S, Sommerfeld C, i sur. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet* 2000; 356:1392-1397.
45. Lau S, Falkenhorst G, Weber A, i sur. High mite-allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:718-725.
46. Kuehr J, Frischer T, Meinert R, i sur. Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94:44-52.
47. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med* 1990; 323:502-507.
48. Burr ML, Limb ES, Maguire MJ, i sur. Infant feeding, wheezing, and allergy: a prospective study. *Arch Dis Child* 1993; 68:724-728.
49. Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Exposure to cockroach allergen in the home is associated with incident doctor-diagnosed asthma and recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:41-47.
50. Simpson BM, Custovic A, Simpson A, i sur. NAC Manchester Asthma and Allergy Study (NACMAAS): risk factors for asthma and allergic disorders in adults. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:391-399.

51. Warner JA. Controlling indoor allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11:208-219.
52. Roost HP, Kunzli N, Schindler C, i sur. Role of current and childhood exposure to cat and atopic sensitization. European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:941-947.
53. Hesselmar B, Aberg N, Aberg B, Eriksson B, Bjorksten B. Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development? *Clin Exp Allergy* 1999; 29:611-617.
54. Sporik R, Squillace SP, Ingram JM, Rakes G, Honsinger RW, Platts-Mills TA. Mite, cat, and cockroach exposure, allergen sensitisation, and asthma in children: a case-control study of three schools. *Thorax* 1999; 54:675-680.
55. Simpson A. Effect of household pet ownership on infant immune response and subsequent sensitization. *J Asthma Allergy* 2010; 3:131-137.
56. Tavernier G, Fletcher G, Gee I, i sur. IPEADAM study: indoor endotoxin exposure, family status, and some housing characteristics in English children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:656-662.
57. Heinrich J, Gehring U, Douwes J, i sur. Pets and vermin are associated with high endotoxin levels in house dust. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1839-1845.
58. Platts-Mills JA, Custis NJ, Woodfolk JA, Platts-Mills TA. Airborne endotoxin in homes with domestic animals: implications for cat-specific tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:384-389.
59. Litonjua AA, Milton DK, Celedon JC, Ryan L, Weiss ST, Gold DR. A longitudinal analysis of wheezing in young children: the independent effects of early life exposure to house dust endotoxin, allergens, and pets. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:736-742.
60. Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001; 357:752-756.

61. Dharajiya N, Boldogh I, Cardenas V, Sur S. Role of pollen NAD(P)H oxidase in allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8:57-62.
62. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, i sur. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:137-141.
63. Henderson J, Hilliard TN, Sherriff A, Stalker D, Al Shammari N, Thomas HM. Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16:386-392.
64. Kotaniemi-Syrjanen A, Vainionpaa R, Reijonen TM, Waris M, Korhonen K, Korppi M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:66-71.
65. Lemanske RF, Jr., Jackson DJ, Gangnon RE, i sur. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:571-577.
66. Goetghebuer T, Isles K, Moore C, Thomson A, Kwiatkowski D, Hull J. Genetic predisposition to wheeze following respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:801-803.
67. Hoebee B, Rietveld E, Bont L, i sur. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis* 2003; 187:2-11.
68. Hoebee B, Bont L, Rietveld E, i sur. Influence of promoter variants of interleukin-10, interleukin-9, and tumor necrosis factor-alpha genes on respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2004; 189:239-247.
69. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Moore C, Sharland M, Kwiatkowski D. Variants of the chemokine receptor CCR5 are associated with severe bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 2003; 188:904-907.
70. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, i sur. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004; 189:2057-2063.

71. Wilson J, Rowlands K, Rockett K, i sur. Genetic variation at the IL10 gene locus is associated with severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005; 191:1705-1709.
72. Heymann PW, Carper HT, Murphy DD, i sur. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:239-247.
73. Grayson MH, Cheung D, Rohlfing MM, i sur. Induction of high-affinity IgE receptor on lung dendritic cells during viral infection leads to mucous cell metaplasia. *J Exp Med* 2007; 204:2759-2769.
74. Papadopoulos NG, Stanciu LA, Papi A, Holgate ST, Johnston SL. A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma. *Thorax* 2002; 57:328-332.
75. Friedlander SL, Jackson DJ, Gangnon RE, i sur. Viral infections, cytokine dysregulation and the origins of childhood asthma and allergic diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24:S170-176
76. Gern JE, Brooks GD, Meyer P, i sur. Bidirectional interactions between viral respiratory illnesses and cytokine responses in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:72-78.
77. Kristjansson S, Bjarnarson SP, Wennergren G, i sur. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses during the first 3 months of life promote a local TH2-like response. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:805-811.
78. Friedlander SL, Busse WW. The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:267-273.
79. Psarras S, Volonaki E, Skevaki CL, i sur. Vascular endothelial growth factor-mediated induction of angiogenesis by human rhinoviruses. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:291-297.
80. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343:538-543.
81. Illi S, von Mutius E, Lau S, i sur. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *Bmj* 2001; 322:390-395.

82. Liu B, Kimura Y. Respiratory syncytial virus protects against the subsequent development of Japanese cedar pollen-induced allergic responses. *J Med Virol* 2007; 79:1600-1605.
83. Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, i sur. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med* 2004; 351:1057-1067.
84. Marks GB, Colquhoun JR, Girgis ST, i sur. Thunderstorm outflows preceding epidemics of asthma during spring and summer. *Thorax* 2001; 56:468-471.
85. American Thoracic Society. What constitutes an adverse health effect of air pollution? Official statement of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:665-673.
86. Jha P, Ranson MK, Nguyen SN, Yach D. Estimates of global and regional smoking prevalence in 1995, by age and sex. *Am J Public Health* 2002; 92:1002-1006.
87. Soperi M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:372-377.
88. Colilla S, Nicolae D, Pluzhnikov A, i sur. Evidence for gene-environment interactions in a linkage study of asthma and smoking exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:840-846.
89. Meyers DA, Postma DS, Stine OC, i sur. Genome screen for asthma and bronchial hyperresponsiveness: interactions with passive smoke exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1169-1175.
90. Bouzigon E, Corda E, Aschard H, i sur. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *N Engl J Med* 2008; 359:1985-1994.
91. Dizier MH, Bouzigon E, Guilleud-Bataille M, i sur. Evidence for gene x smoking exposure interactions in a genome-wide linkage screen of asthma and bronchial hyper-responsiveness in EGEA families. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:810-815.
92. Stampfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:377-384.

93. Prescott SL, Smith P, Tang M, i sur. The importance of early complementary feeding in the development of oral tolerance: concerns and controversies. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19:375-380.
94. Agostoni C, Braegger C, Decsi T, i sur. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49:112-125.
95. Kneepkens CM, Brand PL. Clinical practice: Breastfeeding and the prevention of allergy. *Eur J Pediatr* 2010; 169:911-917.
96. Rubin RN, Navon L, Cassano PA. Relationship of serum antioxidants to asthma prevalence in youth. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:393-398.
97. Devereux G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:869-874.
98. Levy J. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:S8-10.
99. Alm B, Erdes L, Mollborg P, i sur. Neonatal antibiotic treatment is a risk factor for early wheezing. *Pediatrics* 2008; 121:697-702.
100. Farquhar H, Stewart A, Mitchell E, i sur. The role of paracetamol in the pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:32-41.
101. Simpson A, John SL, Jury F, i sur. Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:386-392.
102. Vercelli D. Gene-environment interactions: the road less traveled by in asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:26-27.
103. Kabesch M, Hoefler C, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E. Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma. *Thorax* 2004; 59:569-573.
104. Choudhry S, Avila PC, Nazario S, i sur. CD14 tobacco gene-environment interaction modifies asthma severity and immunoglobulin E levels in Latinos with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:173-182.

105. Wang Z, Chen C, Niu T, i sur. Association of asthma with beta(2)-adrenergic receptor gene polymorphism and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1404-1409.
106. Reijmerink NE, Kerkhof M, Koppelman GH, i sur. Smoke exposure interacts with ADAM33 polymorphisms in the development of lung function and hyperresponsiveness. *Allergy* 2009; 64:898-904.
107. Rogers AJ, Brasch-Andersen C, Ionita-Laza I, i sur. The interaction of glutathione S-transferase M1-null variants with tobacco smoke exposure and the development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1721-1729.
108. Sadeghnejad A, Karmaus W, Arshad SH, Kurukulaaratchy R, Huebner M, Ewart S. IL13 gene polymorphisms modify the effect of exposure to tobacco smoke on persistent wheeze and asthma in childhood, a longitudinal study. *Respir Res* 2008; 9:2.
109. Ramadas RA, Sadeghnejad A, Karmaus W, i sur. Interleukin-1R antagonist gene and pre-natal smoke exposure are associated with childhood asthma. *Eur Respir J* 2007; 29:502-508.
110. Panasevich S, Lindgren C, Kere J, i sur. Interaction between early maternal smoking and variants in TNF and GSTP1 in childhood wheezing. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:458-467.
111. Lee YL, Lin YC, Lee YC, Wang JY, Hsiue TR, Guo YL. Glutathione S-transferase P1 gene polymorphism and air pollution as interactive risk factors for childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1707-1713.
112. Gilliland FD, Li YF, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet* 2004; 363:119-125.
113. Smit LA, Bongers SI, Ruven HJ, i sur. Atopy and new-onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: a nested case-control study. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1602-1608.

114. Williams LK, McPhee RA, Ownby DR, i sur. Gene-environment interactions with CD14 C-260T and their relationship to total serum IgE levels in adults. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:851-857.
115. Eder W, Klimecki W, Yu L, i sur. Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:601-607.
116. Zambelli-Weiner A, Ehrlich E, Stockton ML, i sur. Evaluation of the CD14/-260 polymorphism and house dust endotoxin exposure in the Barbados Asthma Genetics Study. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1203-1209.
117. Gern JE, Reardon CL, Hoffjan S, i sur. Effects of dog ownership and genotype on immune development and atopy in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:307-314.
118. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C(4) synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:290-296.
119. Barr RG, Cooper DM, Speizer FE, Drazen JM, Camargo CA, Jr. Beta(2)-adrenoceptor polymorphism and body mass index are associated with adult-onset asthma in sedentary but not active women. *Chest* 2001; 120:1474-1479.
120. Hoffjan S, Nicolae D, Ostrovnya I, i sur. Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the 1st year of life. *Am J Hum Genet* 2005; 76:696-704.
121. Upham JW, Holt PG. Environment and development of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:167-172.
122. Liu X, Beaty TH, Deindl P, i sur. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:489-495.
123. Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, i sur. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet* 2005; 76:349-357.

124. Hunninghake GM, Lasky-Su J, Soto-Quiros ME, i sur. Sex-stratified linkage analysis identifies a female-specific locus for IgE to cockroach in Costa Ricans. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:830-836.
125. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012; 18:673-683.
126. Minnicozzi M, Sawyer RT, Fenton MJ. Innate immunity in allergic disease. *Immunol Rev* 2011; 242:106-127.
127. Carlson M, Hakansson L, Kampe M, Stalenheim G, Peterson C, Venge P. Degranulation of eosinophils from pollen-atopic patients with asthma is increased during pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:131-139.
128. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:789-815.
129. Hoshino M, Nakamura Y, Sim JJ. Expression of growth factors and remodelling of the airway wall in bronchial asthma. *Thorax* 1998; 53:21-27.
130. Homer RJ, Elias JA. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med* 2000; 21:331-343.
131. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; 1:520-524.
132. Suzuki R, Kato T, Miyazaki Y, i sur. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in sputum from patients with bronchial asthma. *J Asthma* 2001; 38:477-484.
133. Simpson A, Custovic A, Tepper R, i sur. Genetic variation in vascular endothelial growth factor-a and lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185:1197-1204.
134. Bush A. How early do airway inflammation and remodeling occur? *Allergol Int* 2008; 57:11-19.
135. Martinez FD. The origins of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in early life. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6:272-277.
136. Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics* 2002; 109:362-367.

137. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, i sur. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008; 63:5-34.
138. Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, i sur. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1253-1258.
139. Lowe LA, Simpson A, Woodcock A, Morris J, Murray CS, Custovic A. Wheeze phenotypes and lung function in preschool children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:231-237.
140. Sears MR, Greene JM, Willan AR, i sur. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003; 349:1414-1422.
141. Bostock J. Of the Catarrhus AEstivus, or Summer Catarrh. *Med Chir Trans* 1828; 14:437-446.
142. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000; 55 Suppl 1:2-10.
143. Ball TM, Holberg CJ, Aldous MB, Martinez FD, Wright AL. Influence of attendance at day care on the common cold from birth through 13 years of age. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002; 156:121-126.
144. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, i sur. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:28-34.
145. Perkin MR, Strachan DP. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1374-1381.
146. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, i sur. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *Bmj* 1997; 314:999-1003.

147. Linneberg A, Ostergaard C, Tvede M, i sur. IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:847-853.
148. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, i sur. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet* 2001; 358:1493-1499.
149. Dagoye D, Bekele Z, Woldemichael K, i sur. Wheezing, allergy, and parasite infection in children in urban and rural Ethiopia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1369-1373.
150. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275:77-79.
151. Aaby P, Shaheen SO, Heyes CB, i sur. Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:644-650.
152. Lewis SA, Britton JR. Measles infection, measles vaccination and the effect of birth order in the aetiology of hay fever. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1493-1500.
153. Gern JE, Weiss ST. Protection against atopic diseases by measles--a rash conclusion? *Jama* 2000; 283:394-395.
154. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:342-346.
155. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357:1076-1079.
156. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361:1869-1871.
157. McKeever TM, Lewis SA, Smith C, i sur. Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort

study with the West Midlands General Practice Research Database. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:43-50.

158. Reddy A, Fried B. Atopic disorders and parasitic infections. *Adv Parasitol* 2008; 66:149-191.
159. Odelram H, Granstrom M, Hedenskog S, Duchon K, Bjorksten B. Immunoglobulin E and G responses to pertussis toxin after booster immunization in relation to atopy, local reactions and aluminium content of the vaccines. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5:118-123.
160. Ring J, Kramer U, Schafer T, Behrendt H. Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 2001; 13:701-708.
161. Suzuki N, Kudo K, Sano Y, Ito K. Can *Mycobacterium tuberculosis* infection prevent asthma and other allergic disorders? *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124:113-116.
162. Eggleston PA, Buckley TJ, Breysse PN, Wills-Karp M, Kleeberger SR, Jaakkola JJ. The environment and asthma in U.S. inner cities. *Environ Health Perspect* 1999; 107 Suppl 3:439-450.
163. Vercelli D. Mechanisms of the hygiene hypothesis--molecular and otherwise. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:733-737.
164. Prescott SL, Macaubes C, Yabuhara A, et al. Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:75-79.
165. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-793.
166. Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; 102:5-28.
167. Gore C, Custovic A. Protective parasites and medicinal microbes? The case for the hygiene hypothesis. *Prim Care Respir J* 2004; 13:68-75.
168. Yang X, Gao X. Role of dendritic cells: a step forward for the hygiene hypothesis. *Cell Mol Immunol* 2011; 8:12-18.
169. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010; 40:1232-1240.

170. Liu AH, Leung DY. Renaissance of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1063-1066.
171. von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, i sur. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1230-1234.
172. Gereda JE, Leung DY, Liu AH. Levels of environmental endotoxin and prevalence of atopic disease. *Jama* 2000; 284:1652-1653.
173. Rullo VE, Rizzo MC, Arruda LK, Sole D, Naspitz CK. Daycare centers and schools as sources of exposure to mites, cockroach, and endotoxin in the city of Sao Paulo, Brazil. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:582-588.
174. Hines CJ, Milton DK, Larsson L, Petersen MR, Fisk WJ, Mendell MJ. Characterization and variability of endotoxin and 3-hydroxy fatty acids in an office building during a particle intervention study. *Indoor Air* 2000; 10:2-12.
175. Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, i sur. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000; 355:1680-1683.
176. Park JH, Spiegelman DL, Burge HA, Gold DR, Chew GL, Milton DK. Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home. *Environ Health Perspect* 2000; 108:1023-1028.
177. Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, Burge HA, Milton DK. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:322-328.
178. Gereda JE, Klinnert MD, Price MR, Leung DY, Liu AH. Metropolitan home living conditions associated with indoor endotoxin levels. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:790-796.
179. Rabinovitch N, Liu AH, Zhang L, Foarde K, Rodes CE, Gelfand EW. Increased personal respirable endotoxin exposure with furry pets. *Allergy* 2006; 61:650-651.

180. Su HJ, Wu PC, Chen HL, Lee FC, Lin LL. Exposure assessment of indoor allergens, endotoxin, and airborne fungi for homes in southern Taiwan. *Environ Res* 2001; 85:135-144.
181. Rizzo MC, Naspitz CK, Fernandez-Caldas E, Lockey RF, Mimica I, Sole D. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 8:121-126.
182. Downs SH, Marks GB, Mitakakis TZ, Leuppi JD, Car NG, Peat JK. Having lived on a farm and protection against allergic diseases in Australia. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:570-575.
183. von Mutius E. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:212-216.
184. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, i sur. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001; 358:1129-1133.
185. Gehring U, Bolte G, Borte M, i sur. Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:847-854.
186. Phipatanakul W, Celedon JC, Raby BA, i sur. Endotoxin exposure and eczema in the first year of life. *Pediatrics* 2004; 114:13-18.
187. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, i sur. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347:869-877.
188. Nicolaou N, Yiallourous P, Pipis S, Ioannou P, Simpson A, Custovic A. Domestic allergen and endotoxin exposure and allergic sensitization in Cyprus. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17:17-21.
189. Wickens K, Douwes J, Siebers R, i sur. Determinants of endotoxin levels in carpets in New Zealand homes. *Indoor Air* 2003; 13:128-135.
190. Bolte G, Bischof W, Borte M, Lehmann I, Wichmann HE, Heinrich J. Early endotoxin exposure and atopy development in infants: results of a birth cohort study. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:770-776.
191. Douwes J, van Strien R, Doekes G, i sur. Does early indoor microbial exposure reduce the risk of asthma? The Prevention and Incidence of

Asthma and Mite Allergy birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1067-1073.

192. Lau S, Illi S, Platts-Mills TA, i sur. Longitudinal study on the relationship between cat allergen and endotoxin exposure, sensitization, cat-specific IgG and development of asthma in childhood--report of the German Multicentre Allergy Study (MAS 90). *Allergy* 2005; 60:766-773.
193. Michel O, Nagy AM, Schroeven M, i sur. Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1157-1164.
194. Douwes J, Zuidhof A, Doekes G, i sur. (1-->3)-beta-D-glucan and endotoxin in house dust and peak flow variability in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1348-1354.
195. Michel O, Ginanni R, Duchateau J, Vertongen F, Le Bon B, Sergysels R. Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:441-448.
196. Michel O, Kips J, Duchateau J, i sur. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1641-1646.
197. Chu HW, Honour JM, Rawlinson CA, Harbeck RJ, Martin RJ. Hygiene hypothesis of asthma: a murine asthma model with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Chest* 2003; 123:390S.
198. Roponen M, Hyvarinen A, Hirvonen MR, Keski-Nisula L, Pekkanen J. Change in IFN-gamma-producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:1048-1052.
199. Blumer N, Herz U, Wegmann M, Renz H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:397-402.
200. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-

- dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002; 196:1645-1651.
201. Gehring U, Douwes J, Doekes G, i sur. Beta(1-->3)-glucan in house dust of German homes: housing characteristics, occupant behavior, and relations with endotoxins, allergens, and molds. *Environ Health Perspect* 2001; 109:139-144.
 202. Gao JJ, Zuvanich EG, Xue Q, Horn DL, Silverstein R, Morrison DC. Cutting edge: bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 1999; 163:4095-4099.
 203. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, i sur. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992; 176:1665-1671.
 204. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431-1433.
 205. Poltorak A, He X, Smirnova I, i sur. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-2088.
 206. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, i sur. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; 3:667-672.
 207. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, i sur. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189:1777-1782.
 208. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011; 34:637-650.
 209. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:499-511.
 210. Horner AA, Redecke V, Raz E. Toll-like receptor ligands: hygiene, atopy and therapeutic implications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:555-561.

211. Bauer S, Hangel D, Yu P. Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease. *Immunobiology* 2007; 212:521-533.
212. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409:928-933.
213. Maquat LE. The power of point mutations. *Nat Genet* 2001; 27:5-6.
214. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006; 7:781-791.
215. Reich DE, Cargill M, Bolk S, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 2001; 411:199-204.
216. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 1995; 29:311-322.
217. Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet* 2001; 29:217-222.
218. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994; 264:1152-1156.
219. Martinez FD, Solomon S, Holberg CJ, Graves PE, Baldini M, Erickson RP. Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1739-1744.
220. Walley AJ, Wiltshire S, Ellis CM, Cookson WO. Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits. *Genomics* 2001; 72:15-20.
221. Kim JI, Lee CJ, Jin MS, et al. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem* 2005; 280:11347-11351.
222. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:976-983.
223. Martinez FD. CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:221-225.

224. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, i sur. Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:965-969.
225. Lachheb J, Dhifallah IB, Chelbi H, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue Antigens* 2008; 71:417-425.
226. O'Donnell AR, Toelle BG, Marks GB, i sur. Age-specific relationship between CD14 and atopy in a cohort assessed from age 8 to 25 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:615-622.
227. Leung TF, Tang NL, Sung YM, i sur. The C-159T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14:255-260.
228. Sharma M, Batra J, Mabalirajan U, i sur. Suggestive evidence of association of C-159T functional polymorphism of the CD14 gene with atopic asthma in northern and northwestern Indian populations. *Immunogenetics* 2004; 56:544-547.
229. Gao PS, Mao XQ, Baldini M, i sur. Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q31. *Clin Genet* 1999; 56:164-165.
230. Sengler C, Haider A, Sommerfeld C, i sur. Evaluation of the CD14 C-159 T polymorphism in the German Multicenter Allergy Study cohort. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:166-169.
231. Heinzmann A, Dietrich H, Jerkic SP, Kurz T, Deichmann KA. Promoter polymorphisms of the CD14 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children. *Eur J Immunogenet* 2003; 30:345-348.
232. Kedda MA, Lose F, Duffy D, Bell E, Thompson PJ, Upham J. The CD14 C-159T polymorphism is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population. *Thorax* 2005; 60:211-214.
233. Buckova D, Holla LI, Schuller M, Znojil V, Vacha J. Two CD14 promoter polymorphisms and atopic phenotypes in Czech patients with IgE-mediated allergy. *Allergy* 2003; 58:1023-1026.
234. Kabesch M, Hasemann K, Schickinger V, i sur. A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of

- soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases. *Allergy* 2004; 59:520-525.
235. Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1154-1162.
 236. Woo JG, Assa'ad A, Heizer AB, Bernstein JA, Hershey GK. The -159 C-->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:438-444.
 237. Wang JY, Wang LM, Lin CG, Chang AC, Wu LS. Association study using combination analysis of SNP and STRP markers: CD14 promoter polymorphism and IgE level in Taiwanese asthma children. *J Hum Genet* 2005; 50:36-41.
 238. Litonjua AA, Belanger K, Celedon JC, i sur. Polymorphisms in the 5' region of the CD14 gene are associated with eczema in young children. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1056-1062.
 239. Simpson A, Martinez FD. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clinical & Experimental Allergy* 2010; 40:209-223.
 240. Vercelli D. Learning from discrepancies: CD14 polymorphisms, atopy and the endotoxin switch. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:153-155.
 241. Williams LK, Oliver J, Peterson EL, i sur. Gene-environment interactions between CD14 C-260T and endotoxin exposure on Foxp3+ and Foxp3- CD4+ lymphocyte numbers and total serum IgE levels in early childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 100:128-136.
 242. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:446-458.
 243. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, i sur. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics* 2000; 25:187-191.

244. Michel O, LeVan TD, Stern D, i sur. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:923-929.
245. Fageras Bottcher M, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, i sur. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:561-567.
246. Lundberg A, Wikberg LA, Ilonen J, Vaarala O, Bottcher MF. Lipopolysaccharide-induced immune responses in relation to the TLR4(Asp299Gly) gene polymorphism. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1878-1883.
247. von Aulock S, Schroder NW, Gueinzus K, i sur. Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. *J Infect Dis* 2003; 188:938-943.
248. Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. *J Exp Med* 2003; 197:1787-1791.
249. Senthilselvan A, Dosman JA, Chenard L, i sur. Toll-like receptor 4 variants reduce airway response in human subjects at high endotoxin levels in a swine facility. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:1034-1040, 1040 e1031-1032.
250. Smit LAM, Bongers SIM, Ruven HJT, i sur. Atopy and new onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: a nested case control study. *Clinical & Experimental Allergy* 2007; 37:1602-1608.
251. Werner M, Topp R, Wimmer K, i sur. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112:323-330.
252. Yang IA, Barton SJ, Rorke S, i sur. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes and Immunity* 2004; 5:41-45.

253. Adjers K, Karjalainen J, Pessi T, Eklund C, Hurme M. Epistatic effect of TLR4 and IL4 genes on the risk of asthma in females. *International archives of allergy and immunology* 2005; 138:251-256.
254. Sackesen C, Karaaslan C, Keskin O, i sur. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 2005; 60:1485-1492.
255. LeVan TD, Von Essen S, Romberger DJ, i sur. Polymorphisms in the CD14 gene associated with pulmonary function in farmers. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; 171:773.
256. Senthilselvan A, Rennie D, Chenard L, i sur. Association of polymorphisms of toll-like receptor 4 with a reduced prevalence of hay fever and atopy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2008; 100:463-468.
257. Pacheco K, Maier L, Silveira L, i sur. Association of Toll-like receptor 4 alleles with symptoms and sensitization to laboratory animals. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008; 122:896-902.
258. Pahwa P, Karunanayake CP, Rennie DC, Chen Y, Schwartz DA, Dosman JA. Association of the TLR 4 Asp 299 Gly polymorphism with lung function in relation to body mass index. *BMC Pulmonary Medicine* 2009; 9:46.
259. Oh DY, Schumann RR, Hamann L, Neumann K, Worm M, Heine G. Association of the toll like receptor 2 A 16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis. *Allergy* 2009; 64:1608-1615.
260. Daley D, Lemire M, Akhabir L, i sur. Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. *Human genetics* 2009; 125:445-459.
261. Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, i sur. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1449-1456.

262. Smit LA, Siroux V, Bouzigon E, i sur. CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:363-368.
263. Hsieh YY, Wan L, Chang CC, Tsai CH, Tsai FJ. STAT2*C related genotypes and allele but not TLR4 and CD40 gene polymorphisms are associated with higher susceptibility for asthma. *Int J Biol Sci* 2009; 5:74-81.
264. Kang I, Oh YK, Lee SH, Jung HM, Chae SC, Lee JH. Identification of polymorphisms in the Toll-like receptor gene and the association with allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267:385-389.
265. Tewfik MA, Bosse Y, Lemire M, i sur. Polymorphisms in interleukin-1 receptor-associated kinase 4 are associated with total serum IgE. *Allergy* 2009; 64:746-753.
266. Genuneit J, Cantelmo JL, Weinmayr G, i sur. A multi-centre study of candidate genes for wheeze and allergy: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase 2. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1875-1888.
267. Reijmerink NE, Bottema RW, Kerkhof M, i sur. TLR-related pathway analysis: novel gene-gene interactions in the development of asthma and atopy. *Allergy* 2010; 65:199-207.
268. Adjers K, Karjalainen J, Pessi T, Eklund C, Hurme M. Epistatic effect of TLR4 and IL4 genes on the risk of asthma in females. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138:251-256.
269. Hsieh YY, Wan L, Chang CC, Tsai CH, Tsai FJ. STAT2* C related genotypes and allele but not TLR4 and CD40 gene polymorphisms are associated with higher susceptibility for asthma. *International Journal of Biological Sciences* 2009; 5:74.
270. Weidinger S, Novak N, Klopp N, i sur. Lack of association between Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 118:277-279.
271. Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, i sur. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related

- phenotypes. American journal of respiratory and critical care medicine 2002; 166:1449.
272. Smit LA, Heederik D, Doekes G, i sur. Endotoxin exposure, CD14 and wheeze among farmers: a gene-environment interaction. Occup Environ Med 2011.
 273. Werner M, Topp R, Wimmer K, i sur. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 112:323-330.
 274. Lachheb J, Dhifallah IB, Chelbi H, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Toll like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. Tissue Antigens 2008; 71:417-425.
 275. Tewfik MA, Bossé Y, Lemire M, i sur. Polymorphisms in interleukin 1 receptor associated kinase 4 are associated with total serum IgE. Allergy 2009; 64:746-753.
 276. Oh DY, Schumann RR, Hamann L, Neumann K, Worm M, Heine G. Association of the toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis. Allergy 2009; 64:1608-1615.
 277. da Silva Correia J, Ulevitch RJ. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. J Biol Chem 2002; 277:1845-1854.
 278. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JA, Segal DM. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001; 98:12156.
 279. Inohara N, Nunez G. ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. Trends Biochem Sci 2002; 27:219-221.
 280. Re F, Strominger JL. Monomeric recombinant MD-2 binds toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. J Biol Chem 2002; 277:23427-23432.
 281. Visintin A, Latz E, Monks BG, Espevik T, Golenbock DT. Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-

- like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* 2003; 278:48313-48320.
282. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Satow Y. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* 2007; 316:1632-1634.
 283. Tissieres P, Dunn-Siegrist I, Schappi M, i sur. Soluble MD-2 is an acute-phase protein and an opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* 2008; 111:2122-2131.
 284. Gu W, Shan YA, Zhou J, i sur. Functional significance of gene polymorphisms in the promoter of myeloid differentiation-2. *Ann Surg* 2007; 246:151-158.
 285. Hyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, i sur. Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediated signaling. *J Immunol* 2004; 173:6949-6954.
 286. Gray P, Michelsen KS, Sirois CM, i sur. Identification of a novel human MD-2 splice variant that negatively regulates Lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Immunol* 2010; 184:6359-6366.
 287. Reijmerink NE, Kerkhof M, Bottema RW, i sur. Toll-like receptors and microbial exposure: gene-gene and gene-environment interaction in the development of atopy. *Eur Respir J* 2011; 38:833-840.
 288. Verstraelen H, Verhelst R, Nuytinck L, i sur. Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*. *J Reprod Immunol* 2009; 79:163-173.
 289. Xue Y, Zhao ZQ, Hong D, i sur. Lack of association between MD-2 promoter gene variants and tuberculosis. *Genet Mol Res* 2010; 9:1584-1590.
 290. Ertan P, Berdeli A, Yilmaz O, Gonulal DA, Yuksel H. LY96, UPKIB Mutations and TLR4, CD14, MBL Polymorphisms in Children with Urinary Tract Infection. *Indian J Pediatr* 2011; 78:1229-1233.
 291. Dhiman N, Ovsyannikova IG, Vierkant RA, i sur. Associations between SNPs in toll-like receptors and related intracellular signaling molecules

- and immune responses to measles vaccine: preliminary results. *Vaccine* 2008; 26:1731-1736.
292. Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, i sur. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 100:S1-148.
 293. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, i sur. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26:319-338.
 294. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, i sur. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26:948-968.
 295. Stanojevic S, Wade A, Cole TJ, i sur. Spirometry centile charts for young Caucasian children: the Asthma UK Collaborative Initiative. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180:547-552.
 296. Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TA, Miller JD, Lopez M, Chapman MD. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p I and Der f I. *J Immunol Methods* 1989; 118:227-235.
 297. Cooper JF, Weary ME, Jordan FT. The impact of non-endotoxin LAL-reactive materials on *Limulus* amebocyte lysate analyses. *PDA J Pharm Sci Technol* 1997; 51:2-6.
 298. Levin J, Bang FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 1968; 19:186-197.
 299. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 2004; 74:106-120.
 300. Sun X, Ding H, Hung K, Guo B. A new MALDI-TOF based mini-sequencing assay for genotyping of SNPS. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:E68.
 301. Bray MS, Boerwinkle E, Doris PA. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. *Hum Mutat* 2001; 17:296-304.

302. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 2001; 125:279-284.
303. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1995; 57:289-300.
304. Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1351-1358.
305. Dold S, Wjst M, von Mutius E, Reitmeir P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 1992; 67:1018-1022.
306. Bjerg A, Hedman L, Perzanowski MS, Platts-Mills T, Lundback B, Ronmark E. Family history of asthma and atopy: in-depth analyses of the impact on asthma and wheeze in 7- to 8-year-old children. *Pediatrics* 2007; 120:741-748.
307. Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:176-181.
308. Pfefferle PI, Buchele G, Blumer N, i sur. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:108-115.
309. Martinez FD, Cline M, Burrows B. Increased incidence of asthma in children of smoking mothers. *Pediatrics* 1992; 89:21-26.
310. Miller T, Rauh VA, Glied SA, i sur. The economic impact of early life environmental tobacco smoke exposure: early intervention for developmental delay. *Environ Health Perspect* 2006; 114:1585-1588.
311. Mendell MJ, Mirer AG, Cheung K, Tong M, Douwes J. Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect* 2011; 119:748-756.

312. Perez-Padilla R, Schilman A, Riojas-Rodriguez H. Respiratory health effects of indoor air pollution. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:1079-1086.
313. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989; 299:1259-1260.
314. Celedon JC, Litonjua AA, Ryan L, Platts-Mills T, Weiss ST, Gold DR. Exposure to cat allergen, maternal history of asthma, and wheezing in first 5 years of life. *Lancet* 2002; 360:781-782.
315. de Meer G, Janssen NA, Brunekreef B. Early childhood environment related to microbial exposure and the occurrence of atopic disease at school age. *Allergy* 2005; 60:619-625.
316. Hagerhed-Engman L, Bornehag CG, Sundell J, Aberg N. Day-care attendance and increased risk for respiratory and allergic symptoms in preschool age. *Allergy* 2006; 61:447-453.
317. Infante-Rivard C, Amre D, Gauthier D, Malo JL. Family size, day-care attendance, and breastfeeding in relation to the incidence of childhood asthma. *Am J Epidemiol* 2001; 153:653-658.
318. Nafstad P, Brunekreef B, Skrandal A, Nystad W. Early respiratory infections, asthma, and allergy: 10-year follow-up of the Oslo Birth Cohort. *Pediatrics* 2005; 116: 255-262.
319. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 1999; 54:268-272.
320. Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, et al. The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N Engl J Med* 1997; 336:1356-1363.
321. Lowe LA, Woodcock A, Murray CS, Morris J, Simpson A, Custovic A. Lung function at age 3 years: effect of pet ownership and exposure to indoor allergens. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004; 158:996-1001.
322. Custovic A, Simpson A, Bardin PG, Le Souef P. Allergy is an important factor in asthma exacerbation: a pro/con debate. *Respirology* 2010; 15:1021-1027.

323. Larenas-Linnemann DE, Fogelbach GA, Alatorre AM, i sur. Patterns of skin prick test positivity in allergic patients: usefulness of a nationwide SPT chart review. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2011; 39:330-336.
324. Pastorino AC, Kuschnir FC, Arruda LK, i sur. Sensitisation to aeroallergens in Brazilian adolescents living at the periphery of large subtropical urban centres. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2008; 36:9-16.
325. Sheehan WJ, Rangsithienchai PA, Baxi SN, i sur. Age-specific prevalence of outdoor and indoor aeroallergen sensitization in Boston. *Clin Pediatr (Phila)* 2010; 49:579-585.
326. Al-Mousawi MS, Lovel H, Behbehani N, Arifhodzic N, Woodcock A, Custovic A. Asthma and sensitization in a community with low indoor allergen levels and low pet-keeping frequency. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1389-1394.
327. Bousquet PJ, Chinn S, Janson C, Kogevinas M, Burney P, Jarvis D. Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy* 2007; 62:301-309.
328. Rueff F, Przybilla B, Walker A, i sur. Sensitization to common ragweed in southern Bavaria: clinical and geographical risk factors in atopic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 159:65-74.
329. Gruchalla RS, Pongracic J, Plaut M, i sur. Inner City Asthma Study: relationships among sensitivity, allergen exposure, and asthma morbidity. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:478-485.
330. Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, i sur. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:798-806.
331. Gehring U, Bischof W, Fahlbusch B, Wichmann HE, Heinrich J. House dust endotoxin and allergic sensitization in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:939-944.

- 332. Schram-Bijkerk D, Doekes G, Boeve M, i sur. Nonlinear relations between house dust mite allergen levels and mite sensitization in farm and nonfarm children. *Allergy* 2006; 61:640-647.
- 333. Wickens K, Lane JM, Fitzharris P, i sur. Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* 2002; 57:1171-1179.
- 334. Gehring U, Heinrich J, Hoek G, i sur. Bacteria and mould components in house dust and children's allergic sensitisation. *Eur Respir J* 2007; 29:1144-1153.
- 335. Bottcher MF, Bjorksten B, Gustafson S, Voor T, Jenmalm MC. Endotoxin levels in Estonian and Swedish house dust and atopy in infancy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:295-300.
- 336. Gehring U, Bischof W, Borte M, Herbarth O, Wichmann HE, Heinrich J. Levels and predictors of endotoxin in mattress dust samples from East and West German homes. *Indoor Air* 2004; 14:284-292.
- 337. Huss K, Naumann PL, Mason PJ, i sur. Asthma severity, atopic status, allergen exposure and quality of life in elderly persons. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86:524-530.
- 338. Marks GB, Tovey ER, Toelle BG, Wachinger S, Peat JK, Woolcock AJ. Mite allergen (Der p 1) concentration in houses and its relation to the presence and severity of asthma in a population of Sydney schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:441-448.
- 339. Sporik R, Ingram JM, Price W, Sussman JH, Honsinger RW, Platts-Mills TA. Association of asthma with serum IgE and skin test reactivity to allergens among children living at high altitude. Tickling the dragon's breath. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1388-1392.
- 340. Wahn U, Lau S, Bergmann R, i sur. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:763-769.
- 341. Tovey ER, Almquist C, Li Q, Crisafulli D, Marks GB. Nonlinear relationship of mite allergen exposure to mite sensitization and asthma in a birth cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:114-118.

342. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, i sur. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25:187-191.
343. Sackesen C, Karaaslan C, Keskin O, i sur. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 2005; 60:1485-1492.
344. Douville RN, Lissitsyn Y, Hirschfeld AF, i sur. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: no impact on human immune responsiveness to LPS or respiratory syncytial virus. *PLoS One* 2010; 5:12087.
345. Ober C, Vercelli D. Gene-environment interactions in human disease: nuisance or opportunity? *Trends Genet*; 27:107-115.
346. Holloway JW, Yang IA, Holgate ST. Genetics of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125:81-94.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 26. siječnja, 1975. godine u Slavonskom Brodu. Osnovnu školu i Gimnaziju pohađala sam u Slavonskom Brodu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1993. godine i diplomirala 1999. godine. Liječnički staž obavila sam u Općoj bolnici »Dr. Josip Benčević« u Slavonskom Brodu», a 2000. godine položila državni ispit.

Specijalizaciju iz pedijatrije započela sam 2000. godine na KBC Zagreb, tijekom koje sam pohađala stručni poslijediplomski studij iz Kliničke pedijatrije, a specijalistički ispit položila u prosincu 2005. godine. Na Odjelu za dječje bolesti Opće bolnice »Dr. Josip Benčević«, pri odsjeku za pedijatrijsku pulmologiju i alergologiju nastavljam raditi kao specijalist pedijatrije od 2005. g. Godine 2004./05. upisala sam razlikovnu godinu Dokorskog studija »Biomedicina i zdravstvo« pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te položila sve izabrane i odslušane kolegije. 2009. godine započela stručno usavršavanje iz uže specijalnosti pedijatrijska alergologija i klinička imunologija, te 2012. godine položila završni ispit.

Od 2006. godine sudjelujem na znanstvenom projektu prof. dr. sc. Nede Aberle »Utjecaj genetičkih i okolišnih činitelja na razvoj astme u djece« br. 219-0620228-2058 koji sufinancira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH. S obzirom da se projekt odvija u suradnji s prof. dr. sc. A. Čustovićem sa Sveučilišta u Manchesteru, Velika Britanija, u četiri navrata sam boravila u Centru za istraživanje i obrazovanje, Sveučilišta u Manchesteru aktivno sudjelujući u laboratorijskim analizama prikupljenih uzoraka te statističkoj analizi dobivenih podataka. Za edukacijski boravak u Centru za istraživanje i razvoj, Sveučilišta u Manchesteru dobila sam stipendiju Europske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju 2008. godine (EAACI Clinical Fellowship 2008). Sudjelovala sam na regionalnom projektu s nazivom »Prevalencija astme na području Brodsko-posavske županije«, pod voditeljstvom prof. dr. sc. N. Aberle, te na međunarodnom znanstvenom projektu »The effect of montelukast on cytokine secretion in children with asthma« voditeljice doc. dr. sc. A. Gagro, Klinika za dječje bolesti, Zagreb.

Aktivno sam sudjelovala na više domaćih, međunarodnih kongresa, tečajeva trajnog usavršavanja i međunarodnih škola, a koautor sam na nekoliko znanstvenih članaka od kojih je šest indeksirano u *Current Contestu*.

Sudjelovala sam u organizaciji više tečajeva trajnog medicinskog usavršavanja Sekundarna prevencija u pedijatriji koji se održava u Slavanskom Brodu. Predavala sam više stručnih predmeta u Srednjoj medicinskoj školi od 2001.do 2002. godine, a od 2009. godine dobivam zvanje asistenta i sudjelujem u nastavi iz Pedijatrije, pri Medicinskom fakultetu, Sveučilišta „Josip Juraj Strossmayer“ u Osijeku.

Članica sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog pedijatrijskog društva, Hrvatskog pedijatrijskog pulmološkog društva, Hrvatskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju te Europske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju.

11. DODATAK

Upitnik o respiracijskom sustavu i okolišu

Upitnik o respiracijskom sustavu i okolišu

Vaša kuća

P1 Da li Vaše dijete dijeli, ili je dijelilo, spavaću sobu sa drugim ljudima (odraslim ili djecom)? Ako je, napišite točan broj:

<u>Trenutno</u>					<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>				
Da	Ne	Ne znam	Odraslih	Djece	Da	Ne	Ne znam	Odraslih	Djece
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

P2 Koje od slijedećih kućnih ljubimaca držite, ili ste držali, unutar djetetovog doma? Ako je odgovor potvrđan napišite koliko:

	<u>Trenutno</u>				<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>			
	Da	Ne	Ne znam	koliko	Da	Ne	Ne znam	koliko
Pas	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Mačka	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Druga životinja s dlakama (krznom)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Ptica	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Ostalo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Napišite točno koja životinja	_____				_____			

P3 Da li Vaše dijete ima, ili je imalo, barem jedanput kontakt sa bilo kojom od navedenih životinja izvan svog doma?

	<u>Trenutno</u>			<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>		
	Da	Ne	Ne znam	Da	Ne	Ne znam
Pas	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Mačka	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Domaća životinja	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Ptica	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Ostale	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Napišite točno koja životinja	_____			_____		

P4 Da li majka, otac ili neka druga bliska osoba puši cigarete?

	<u>Trenutno</u>			<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>			<u>Tijekom trudnoće</u>		
	Da	Ne	Ne znam	Da	Ne	Ne znam	Da	Ne	Ne znam
Majka	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Otac	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Druga bliska osoba	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Ako nitko ne puši “trenutno”, preskoči na 6. pitanje

P5 Koliko se ukupno cigareta popuši u djetetovoj kući? (npr. Majka popuši 4 cigarete+ otac popuši 5 cigareta+druga osoba popuši 3 cigarete= 12 cigareta)

Manje od 10 cigareta	10-20 cigareta	Više od 20 cigareta	Ništa	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐

P6 Koje gorivo koristite za kuhanje? (odaberite sve odgovore koji odgovaraju)

Struja	Plin	Ne znam	Ostalo	Napišite točno koje drugo gorivo
☐	☐	☐	☐	_____

P7 Da li imate, ili ste imali, centralno grijanje?

	<u>Trenutno</u>			<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>		
	Da	Ne	Ne znam	Da	Ne	Ne znam
	☐	☐	☐	☐	☐	☐

P8 Koje gorivo koristite ili ste koristili za grijanje? (odaberite sve odgovore koji odgovaraju)

Struja	Plin	Ne znam	Ostalo	Napišite točno koje drugo gorivo
☐	☐	☐	☐	_____

P9 Da li u djetetovom domu ima, ili je bilo, vlažnih mrlja na zidovima ili stropu?

<u>Trenutno</u>			<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>		
Da	Ne	Ne znam	Yes	No	Don't Know
☐	☐	☐	☐	☐	☐

P10 Da li u djetetovom domu ima, ili je bilo, vidljive plijesni ili gljivica na zidovima ili stropu?

<u>Trenutno</u>			<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>		
Da	Ne	Ne znam	Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐	☐

P11 Čime je prekriven, ili je bio prekriven, pod u djetetovoj spavaćoj sobi? (odaberite sve odgovore koji odgovaraju)

<u>Trenutno</u>				<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>			
Tepison	Tepih	Tvrđi pod	Ne znam	Tepison	Tepih	Tvrđi pod	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

P12 Koja vrsta prozora je bila, i koja je sada, u djetetovoj spavaćoj sobi? (odaberite sve odgovore koji odgovaraju)

<u>Trenutno</u>				<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>			
S jednim staklom	Dvostruki prozor	Izostaklo	Ne znam	S jednim staklom	Dvostruki prozor	Izostaklo	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

P13 Kakve jastuke Vaše dijete koristi, ili je koristilo? (odaberite sve odgovore koji odgovaraju)

<u>Trenutno</u>						<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>					
Ispunjeni pjenom	Ispunjeni perjem	Ispunjeni sintetičkim vlaknima	Drugo	Ne koristi jastuk	Ne znam	Ispunjeni pjenom	Ispunjeni perjem	Ispunjeni sintetičkim vlaknima	Drugo	Ne koristi jastuk	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Navedite što drugo koristi						Navedite što je drugo koristilo					

P14 Koju vrstu pokrivača Vaše dijete koristi, ili je koristilo? (odaberite sve odgovore koji odgovaraju)

<u>Trenutno</u>					<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>				
Sintetički pokrivač	Pernati pokrivač	Deka	Ostalo	Ne znam	Sintetički pokrivač	Pernati pokrivač	Deka	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Navedite što drugo koristi					Navedite što je drugo koristilo				

P15 Da li je madrac, jastuk ili pokrivač (jorgan) vašeg djeteta obložen, ili je bio obložen, kakvim materijalom?

<u>Trenutno</u>						<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>					
Koji ne propušta grinje	Nepro-močivim	Pamu-čnim	Nijednim	Ne znam	Pitanje ne vrijedi	Koji ne propušta grinje	Nepro-močivim	Pamu-čnim	Nijednim	Ne znam	Pitanje ne vrijedi
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

P16 Da li je madrac, jastuk ili prekrivač (jorgan) roditelja obložen, ili je bio obložen, kakvim materijalom?

	Trenutno					Tijekom djetetove prve godine života				
	Koji ne propušta grinje	Nepro-močivim	Pamu-čnim	Nijednim	Ne znam	Koji ne propušta grinje	Nepro-močivim	Pamu-čnim	Nijednim	Ne znam
Madrac	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Jastuk	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Prekrivač (jorgan)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

P17 Da li ste napravili kakve promjene u vašem domu jer vaše dijete ima astmu ili alergijske tegobe? (odaberite sve odgovore koji odgovaraju)

	Dob djeteta					
	Da	Ne	Pitanje ne vrijedi	Ne znam	Godina	Mjesec
Prestali držati kućne ljubimce	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Prestali ili smanjili pušenje	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Promijenili jastuke	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Promijenili prekrivače	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Promijenili pokrov na podu	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Druge promjene	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Napišite druge promjene						

P18 Kako bi opisali okolinu djetetovog doma?

	Trenutno	Tijekom djetetove prve godine života
Seoska, otvoreni prostori i polja u blizini	☐	☐
Suburbana, s puno parkova i vrtova	☐	☐
Suburbana, s nekoliko parkova i vrtova	☐	☐
Urbana, bez parkova i vrtova	☐	☐
Ne znam	☐	☐

RANI DANI

P19 Da li vaše dijete ima brata ili sestru?

	Da	Ne	Ne znam	Koliko
Starije braće	☐	☐	☐	☐
Starijih sestara	☐	☐	☐	☐

P20 Da li vaše dijete ima mlađe braće ili sestara?

	Da	Ne	Ne znam	Koliko
Mlađe braće	☐	☐	☐	☐
Mlađih sestara	☐	☐	☐	☐

P21 Koliko ljudi živi u kući? (odrasli = više od 18 godina)

	Koliko		Koliko
Muški, odrasli	☐	Žene, odrasle	☐
Stariji dječaci	☐	Starije djevojčice	☐
Mlađi dječaci	☐	Mlađe djevojčice	☐

P22 Da li vam se ikada činilo da vaše dijete kašlje više od ostale djece?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P23 Da li vaše dijete uobičajeno kašlje kada je prehladeno?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P24 Da li vaše dijete uobičajeno kašlje tijekom dana, neovisno o prehladama?

Yda	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P25 Da li vaše dijete uobičajeno kašlje po noći, neovisno o prehladama?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P26 Da li vaše dijete kašlje u naporu (tijekom fizičke aktivnosti), neovisno o prehladama?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P27 Da li vaše dijete kašlje kada je uzbuđeno, neovisno o prehladama?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P28 Da li vaše dijete kašlje kada je izloženo hladnom zraku, neovisno o prehladama?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P29 Ako kašlje, da li je kašalj:

Suh

☐

Produktivan

☐

Dijete ne kašlje

☐

Ne znam

☐

Neprohodnost dišnih putova i sekret

P30 Da li je vaše dijete u posljednjih 12 mjeseci imalo neprohodne dišne puteve u prsima ili iskašljavalo sekret u prehladi?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Q31 Da li je vaše dijete u posljednjih 12 mjeseci imalo neprohodne dišne puteve u prsima ili iskašljavalo sekret, a da nije bilo prehladeno?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Ako ste na 31. i 32. pitanje odgovorili sa “NE” preskočite na 34. pitanje

P32 Da li je vaše dijete imalo neprohodne dišne puteve u prsima ili iskašljavalo sekret 4 ili više dana tjedno tijekom 3 mjeseca u godini?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Ako ste na 32. pitanje odgovorili sa “NE” preskočite na 34. pitanje

P33 Prije koliko godina se to dogodilo?

Broj god.

☐

Astma

P34 Da li je vaše dijete **ikada** imalo tegoba zbog astme?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P35 Da li vaše dijete sada ima astmu?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P36 Da li vam je vaš liječnik ikada rekao da vaše dijete ima, ili je imalo, astmu?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P37 Da li je vaše dijete ikada imalo sipnju i zviždanje u prsima, bilo kada u prošlosti?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Ako ste odgovorili sa “ne” na 37. pitanje, preskočite na pitanje broj 48

P38 Ako je imalo sipnju i zviždanje u prsima, kada su tegobe počele?

Dob

U godinama

☐

mjesecima

☐

P39 Da li je vaše dijete imalo sipnju i zviždanje u prsima u proteklih 12 mjeseci?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 39. pitanje, preskočite na pitanje broj 48

P40 Koliko napadaja sipnje i zviždanja u prsima je imalo vaše dijete u proteklih 12 mjeseci?

1 do 3

☐

4 do 12

☐

Više od 12

☐

Ne znam

☐

P41 Koliko često, u prosjeku, je san vašeg djeteta bio ometan sipnjom i zviždanjem u prsima, u proteklih 12 mjeseci?

Nikada se nije budio sa sipnjom i
zviždanjem u prsima

☐

Manje od jedne
noći tjedno

☐

Jedna ili više noći u
tjednu

☐

Ne znam

☐

P42 Da li je sipnja i zviždanje u prsima, u proteklih 12 mjeseci, bila tako teška da ograniči djetetov govor na samo jednu do dvije riječi između 2 udaha?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P43 Da li je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, ikada imalo sipnju i da li mu je zviždalo u prsima tijekom ili nakon fizičkog napora?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Q44 Da li je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, ikada imalo sipnju i da li mu je zviždalo u prsima kada nije imalo tjelesni napor?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P45 Da li je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, imalo sipnju i zviždanje u prsima kada je bilo prehladeno?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P46 Da li je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, imalo sipnju i zviždanje u prsima kada nije bilo prehladeno?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P47 U proteklih 12 mjeseci što je pogoršavalo simptome sipnje i zviždanja u prsima? (možete odabrati više ponuđenih odgovora)

Vrijeme	Pelud	Emocije	Dim	Prašina	Kućni ljubimci	Vunena odjeća
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Prehlade ili gripa	Dim cigarete	Hrana i piće	Sapuni, sprejevi ili deterdženti	Druge stvari	Ništa	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Napišite što ga je drugo smetalo: _____						

Zbrinjavanje astme

P48 Da li se vaše dijete ikada u životu probudilo sa nedostatkom zraka, kratkim dahom?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P49 Da li se vaše dijete ikada u životu probudilo sa stezanjem u prsima?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P50 Da li je vaše dijete u proteklih 12 mjeseci koristilo lijekove, tablete, sprejeve ili druge lijekovite tvari za sipnju i zviždanje u prsima ili astmu?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Ako je odgovor “DA” molimo napišite koji lijek:

Ordinirani lijekovi			
Lijek	U napadaju sipnje i zviždanja u prsima	Redovito	Ne znam
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐

Dodatni lijekovi			
Lijekovi	U napadaju sipnje i zviždanja u prsima	Redovito	Ne znam
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 34.,35., 36.,37. i 50. pitanje, onda preskočite na 58. pitanje

Zbrinjavanje astme

P51 Da li je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, koristilo kakve lijekove, tablete, sprejeve ili druge lijekovite tvari za napadaje teškog disanja ili astmu, prije, tijekom ili nakon tjelesnog napora?

Da ☐ Ne ☐ Ne znam ☐

Ako je odgovor “DA” molimo napišite koji lijek:

Ordinirani lijekovi			
Lijek	U napadaju sipnje i zviždanja u prsima	Redovito	Ne znam
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐

Dodatni lijekovi			
Lijekovi	U napadaju sipnje i zviždanja u prsima	Redovito	Ne znam
_____	☐	☐	☐
_____	☐	☐	☐

P52 Da li imate napisani plan koji vam govori kako zbrinjavati astmu kod vašeg djeteta?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P53 Da li vaše dijete ima aparatić za mjerenje vršnog protoka zraka (peak flow meter) kod kuće?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P54 Koliko je pregleda tijekom proteklih 12 mjeseci vaše dijete imalo kod liječnika zbog sipnje i zviždanja u prsima, ili astme?

Za sipnju i zviždanje u prsima?

	Nijedan	1 do 3	4 do 12	Više od 12	Ne znam
Medicinska sestra	☐	☐	☐	☐	☐
Obiteljski liječnika	☐	☐	☐	☐	☐
Hitna služba					
(Hitna pedijatrijska ambulanta)	☐	☐	☐	☐	☐

Za redovitu kontrolu astme?

	Nijedan	1 do 3	4 do 12	Više od 12	Ne znam
Medicinska sestra	☐	☐	☐	☐	☐
Obiteljski liječnika	☐	☐	☐	☐	☐
Hitna služba (Hitna pedijatrijska ambulanta)	☐	☐	☐	☐	☐

P55 Koliko je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, puta hospitalizirano zbog sipnje i zviždanja u prsima, ili astme?

nijednom	1	2	Više od 2 puta	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐

P56 Da li je vaše dijete u proteklih 12 mjeseci bilo na akupunkturi, kod kiropraktičara, homeopate, psihoterapeuta, psihologa, psihijatra ili socijalnog radnika zbog sipnje i zviždanja u prsima, ili astme?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P57 Koliko je dana (ili dijelova dana), u proteklih 12 mjeseci, vaše dijete izostalo iz škole zbog sipnje i zviždanja u prsima, ili astme?

Nijedan	1 do 5	6 do 10	Više od 10	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐

Rinitis

P58 Da li je vaše dijete ikada imalo simptome polenoze, „peludnu hunjavicu“?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P59 Da li vaše dijete sada ima polenozu, „peludnu hunjavicu“?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P60 Dali vam je liječnik ikada rekao da vaše dijete ima polenozu, „peludnu hunjavicu“?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P61 Da li je vaše dijete ikada imalo tegoba sa šmrcajem, curenjem nosa ili neprohodnim nosom, kada NIJE bilo prehladeno?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

**Ako ste na pitanja broj 58, 59, 60 i 61 odgovorili s “NE”
preskočite na 66. pitanje**

P62 Da li je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, imalo tegoba sa šmrcajem, curenjem nosa ili neprohodnim nosom, kada NIJE bilo prehladeno?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 62. pitanje, preskočite na 66. pitanje

P63 Da li su tegobe s nosom bile praćene suzenjem i svrbežom očiju u proteklih 12 mjeseci?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Zbrinjavanje rinitisa

P64 U kojem od proteklih 12 mjeseci su bile tegobe s nosom? (odaberite sve mjesece za koje to vrijedi)

Siječanj	Veljača	Ožujak	Travanj	Svibanj	Lipanj
☐	☐	☐	☐	☐	☐
Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studenj	Prosinac
☐	☐	☐	☐	☐	☐
Ne znam					
☐					

P65 Koliko su, u proteklih 12 mjeseci, tegobe s nosom utjecale na djetetove svakodnevne aktivnosti?

Ništa	Malo	Umjereno	Puno	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐

Zbrinjavanje rinitisa

P66 Da li je vaše dijete, u posljednjih 12 mjeseci, koristilo neke lijekove, tablete, nazalne sprejeve ili neke druge lijekovite stvari za peludnu hunjavicu ili tegobe s nosom?

Ako je koristilo nešto, napišite što:

Ordinirani lijekovi			
Lijekovi	Kada je iritacija	Redovito	Ne znam
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐
Dodatni lijekovi			
Lijekovi	Kada je iritacija	Redovito	Ne znam
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐

**Ako ste na pitanja 58, 59, 60 i 66 odgovorili sa “NE”,
preskočite na 70. pitanje**

P67 Koliko je puta vaše dijete posjetilo zdravstvenog djelatnika, u proteklih 12 mjeseci, radi “peludne hunjavice” ili tegoba s nosom?

	Nijednom	1 do 3	4 do 12	Više od 12	Ne znam
Farmaceuta / kemičara	☐	☐	☐	☐	☐
Medicinsku sestru	☐	☐	☐	☐	☐
Obiteljskog liječnika	☐	☐	☐	☐	☐
Specijalistu	☐	☐	☐	☐	☐
Hitnu službu (ili Hitnu pedijatrijsku ambulantu)	☐	☐	☐	☐	☐

P68 Da li je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, bilo na akupunkturi, kod kiropraktičara, homeopata ili nekod drugog tko se bavi alternativnom medicinom zbog “peludne hunjavice” ili tegoba s nosom?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P69 Koliko je dana (ili dijelova dana), u proteklih 12 mjeseci, vaše dijete izostalo iz škole zbog “peludne hunjavice” ili tegoba s nosom?

Nijedan	1 do 3	4 do 12	Više od 12	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐

Ekcem

P70 Da li je vaše dijete ikada imalo ekcem?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P71 Imal li vaše dijete sada ekcem?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P72 Da li vam je ikada liječnik rekao da vaše dijete ima ekcem?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P73 Da li je vaše dijete ikada imalo osip koji svrbi, koji se pojavljivao i nestajao tijekom barem 6 mjeseci?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

**Ako ste na pitanja 70, 71, 72 i 73 odgovorili sa “NE”,
preskočite na 79. pitanje**

P74 Da li je vaše dijete ikada imalo osip koji svrbi, bilo kada u proteklih 12 mjeseci?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 74. pitanje, preskočite na 79. pitanje

P75 Da li je taj osip, bilo kada, zahvatio neka od slijedećih mjesta? (napišite sva mjesta koja je zahvatio)

Udubine
laktova

☐

Iza koljena

☐

Prednje dijelove
skočnih zglobova

☐

Ispod
stražnjice

☐

Drugo mjesto

☐

Oko vrata

☐

Oko ušiju

☐

Oko očiju

☐

Ne znam

☐

Napišite koje
drugo mjesto

P76 U kojoj se godini osip prvi puta pojavio?

Prije 2. godine

☐

2 do 4
godine

☐

U 5. godini ili
više

☐

Ne znam

☐

P77 Da li je osip u potpunosti nestao proteklih 12 mjeseci?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

P78 Koliko često je, u prosjeku, vaše dijete bilo budno tijekom noći zbog ovog osipa i svrbeža tijekom proteklih 12 mjeseci?

Nijednom u proteklih
12 mjeseci

☐

Manje od 1 noći
tjedno

☐

1 ili više noći tjedno

☐

Ne znam

☐

Zbrinjavanje ekcema

P79 Da li je vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, koristilo nekakve lijekove, masti, kreme, tablete ili druge lijekovite tvari za svrbež kože, osip ili ekcem?

Ako je koristilo nešto, napišite što:

	Ordinirani lijekovi		
Lijekovi	Kada je iritacija	Redovito	Ne znam
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐

	Dodatni lijekovi		
Lijekovi	Kada je iritacija	Redovito	Ne znam
	☐	☐	☐
	☐	☐	☐

Ako ste na pitanja 70, 71, 72 i 79 odgovorili sa “NE”, preskočite na 84. pitanje

P80 Koliko je puta vaše dijete posjetilo zdravstvenog djelatnika, u proteklih 12 mjeseci, radi osipa koji svrbi ili ekcema?

	Nijednom	1 do 3	4 do 12	Više od 12	Ne znam
Farmaceuta / kemičara	☐	☐	☐	☐	☐
Medicinsku sestru	☐	☐	☐	☐	☐
Obiteljskog liječnika	☐	☐	☐	☐	☐
Specijalistu	☐	☐	☐	☐	☐
Hitnu službu (ili Hitnu pedijatrijsku ambulantu)	☐	☐	☐	☐	☐

P81 Da li je vaše dijete u proteklih 12 mjeseci hospitalizirano radi osipa koji svrbi ili ekcema?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

P82 Koliko je dana (ili dijelova dana), u proteklih 12 mjeseci, vaše dijete izostalo iz škole zbog osipa koji svrbi ili ekcema?

Nijednom 1 do 5 6 do 10 Više od 10 Ne znam

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Ako ispunjavate upitnik kod kuće preskočite 84 pitanje

P83 Današni rezultat za ekcem?

0, nema ga	1, blagi: suha koža, samo masti ili masti i blagi steroidi
☐	☐
2, umjereni: šire raspoređene masti i steroidi	3, teški: inficirani / izgreban do krvi, široko raspoređene steroidne kreme +/- antibiotik
☐	☐

Alergija na hranu

P84 Da li vaše dijete izbjegava neku od slijedeće hrane?

	Da	Ne	Ne znam
Kiki riki	☐	☐	☐
Cijelo jaje	☐	☐	☐
Mlijeko	☐	☐	☐
ribu	☐	☐	☐
Sjeme sezama	☐	☐	☐

P85 Da li vaše dijete imalo kakvih tegoba (simptoma) kada jede kiki riki?

Da Ne Ne znam

☐ ☐ ☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 85. pitanje preskočite na 89. pitanje

P86 Kada je vaše dijete zadnji put reagiralo na kiki riki?

Dob

U godinama mjesecima

☐ ☐

P87 Koliko minuta nakon što ga je dijete pojelo, reakcija je započela?

Minuta

P88 Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

P89 Da li je vaše dijete imalo kakvih tegoba (simptoma) dok je jelo orašide, npr. lješnjak, orah, brazilski orašac?

Da

☐

Ne

☐

Ne znam

☐

Ako ste odgovorili sa "NE" na 89. pitanje, preskočite na 94. pitanje

P90 Koja vrsta orašida?

vrsta

P91 Kada je vaše dijete zadnji put reagiralo na taj orašid?

	Dob	
Godine		Mjeseci

P92 Koliko minuta nakon što ga je dijete pojelo, reakcija je započela?

Minuta

P93 Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

Ako postoji dodatna vrsta orašida koji uzrokuje tegobe, molimo vas da dodate pojedinosti u odjeljku koji počinje s pitanjem broj 115

P94 Da li je vaše dijete imalo kakvih tegoba(simptoma) dok je jelo jaja, npr. kuhana jaja, pečena jaja?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 94. pitanje, preskočite na 98. pitanje

P95 Kada je vaše dijete zadnji put reagiralo na jaje?

	Dob	
Godine		Mjeseci
☐		☐

P96 Koliko minuta nakon što ga je dijete pojelo, reakcija je započela?

Minuta

☐

P97 Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

P98 Da li je vaše dijete imalo kakvih tegoba sa mlijekom?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 98. pitanje preskočite na 102. pitanje

P99 Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na mlijeko?

	Dob	
Godine		Mjeseci
☐		☐

P100 Koliko minuta nakon što ga je dijete pojelo, reakcija je započela?

Minuta

☐

P101 Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljevi	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

P102 Da li je vaše dijete imalo kakvih tegoba dok je jelo ribu?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 102. pitanje, preskočite na 107. pitanje

P103 Napišite vrstu ribe:

Vrsta ribe

P104 Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na ribu?

	Dob	
Godine		Mjeseci
☐		☐

P105 Koliko minuta nakon što ju je dijete pojelo, reakcija je započela?

Minuta

☐

P106 Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

**Ako postoji dodatna vrsta ribe koji uzrokuje tegobe,
molimo vas da dodate pojedinosti u odjeljku koji počinje s
pitanjem broj 115**

P107 Da li je vaše dijete imalo kakvih tegoba dok je jelo sjeme sezama?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 107. pitanje preskočite na 111. pitanje

P108 Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na sjeme sezama?

	Dob	
Godine		Mjeseci
☐		☐

P109 Koliko minuta nakon što ga je dijete pojelo, reakcija je započela?

Minuta

☐

P110 Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

P111 Da li je vaše dijete imalo kakvih tegoba kada je dodirivaro svježe jaje ili jelo hranu koja sadrži svježa jaja? npr. majoneza ili čokoladno jelo sa tučenim vrhnjem

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Ako ste odgovorili sa “NE” na 111. pitanje preskočite na 115. pitanje

P112 Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na svježa jaja?

	Dob	
U godinama		mjesecima
☐		☐

P113 Koliko minuta nakon uzimanja hrane su se pojavile tegobe?

Minute

☐

P114 Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

Ovaj odjeljak je za nadopunu samo ako vaše dijete ima dodatnu alergiju na hranu (orašidi, riba ili druga vrsta hrane). Ako vaše dijete nema druge alergije na hranu preskočite na 119. pitanje

P115 Navedite vrstu hrane na koju je reagiralo vaše dijete?

Vrsta hrane

Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na tu hranu?

	Dob	
Godine		Mjeseci
☐		☐

Koliko minuta nakon uzimanja hrane su se pojavile tegobe?

Minute

☐

Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

P116 Navedite vrstu hrane na koju je reagiralo vaše dijete?

Vrsta hrane

Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na tu hranu?

Dob

Prije koliko godina	Prije koliko mjeseci

Koliko minuta nakon uzimanja hrane su se pojavile tegobe?

Minute

Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

P117 Navedite vrstu hrane na koju je reagiralo vaše dijete?

Vrsta hrane

Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na tu hranu?

Dob

Prije koliko godina	Prije koliko mjeseci

Koliko minuta nakon uzimanja hrane su se pojavile tegobe?

Minute

Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐
Navedite koje ostale tegobe			

P118 Navedite vrstu hrane na koju je reagiralo vaše dijete?

Vrsta hrane

Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na tu hranu?

	Dob	
Prije koliko godina	Prije koliko mjeseci	

Koliko minuta nakon uzimanja hrane su se pojavile tegobe?

Minute

Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐

Navedite koje
ostale tegobe

P119 Da li je vaše dijete imalo nekakvu alergijsku reakciju u slijedećim situacijama?

	Da	Ne	Ne znam
Igrajući se s balonima	☐	☐	☐
Koristeći gumene rukavice	☐	☐	☐
Noseći kapu za plivanje	☐	☐	☐
Igrajući se sa gumenim igračkama	☐	☐	☐
Kod zubara	☐	☐	☐

P120 Koliko minuta nakon kontakta je reakcija započela?

Minuta

P121 Koji tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Otjecanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, sipnja, stezanje u prsima
☐	☐	☐	☐
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
☐	☐	☐	☐

Navedite koje
ostale tegobe

Pojedinosti na kraju

P122 Osim u školi, koliko često vaše dijete vježba tako da mu ponestane zraka ili se uznoji?

Svaki dan	4 do 6 puta tjedno	2 do 3 puta tjedno	Jednom tjedno	Jednom mjesečno	Manje od jednom mjesečno	Ne znam
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

P123 Da li vam je liječnik ikada rekao da vaše dijete ima još neku bolest koja do sada nije spomenuta?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Ako je, napišite koja bolest?

P124 Da li je vaše dijete na nekoj dugotrajnoj terapiji koja do sada nije spomenuta?

Da	Ne	Ne znam
☐	☐	☐

Ako je, napišite kojoj:

P125 Da li je vaše dijete ikada hospitalizirano?

Bolnica	Datum
Razlog	

Bolnica	Datum
Razlog	

Bolnica	Datum
Razlog	

Bolnica	Datum
Razlog	

Bolnica	Datum
Razlog	

P126 Da li majka djeteta, sada, ima nešto od navedenog?

Astma Ekcem Polenožu Ništa Ne znam

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

P127 Da li otac djeteta, sada, ima nešto od navedenog?

Astma Ekcem Polenožu Ništa Ne znam

☐ ☐ ☐ ☐ ☐