

# Povezanost dječje astme s polimorfizmima gena na kromosomu 17q12-21

---

**Blekić, Mario**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2017**

*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:105:555519>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mario Blekić**

**Povezanost dječje astme s  
polimorfizmima gena na kromosomu  
17q12-21**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2017.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mario Blekić**

**Povezanost dječje astme s  
polimorfizmima gena na kromosomu  
17q12-21**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2017.**

Ova je disertacija izrađena u:

- OB “Dr. Josip Benčević”, Slavonski Brod
- School of Translational Medicine, University of Manchester

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

Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenog projekta provođenog uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske.

Naziv projekta:

**Utjecaj genetičkih i okolišnih činitelja na razvoj astme u djece**

Šifra projekta: 219-0620228-2058

Vrsta projekta: Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa

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

Dio istraživanja financiran je sredstvima “The JP Moulton Charitable Foundation” i putem kratkoročne stipendije Europske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju, EAACI-a (short-term European Academy of Allergology and Clinical Immunology fellowship).

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici **prof. dr. sc. Nedi Aberle** te **prof. dr. sc. Adnanu Čustoviću** i **prof. dr. sc. Angeli Simpson** za ideju, stručnu pomoć i savjete pri izradi disertacije kao i na brizi, razumijevanju i strpljenju. Njihova pomoć i kontinuirana podrška tijekom svih faza izrade doktorske disertacije bili su neprocjenjivi.

Zahvaljujem im što sam imao priliku biti sudionik međunarodnih projekata putem kojih sam na najljepši način upoznao svijet znanosti i istraživanja, a posebno dio projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta pod nazivom „Utjecaj genetičkih i okolišnih činitelja na razvoj astme u djece“ i projekta “Croatian Asthma and Genetic Study“ iz kojeg je proizašla ova disertacija.

Zahvaljujem **dr. sc. Susani Marinho** za stručnu pomoć, savjete, nesebičnu podjelu znanja pri izradi disertacije te **dr. sc. Blaženki Kljaić-Bukvić** za stalnu prijateljsku, stručnu i tehničku podršku u prikupljanju, obradi i komentiranju rezultata istraživanja.

Zahvaljujem:

- Jenny Hankinson i Johnu A. Curtinu za stručnu pomoć i savjete pri izradi disertacije
- Danielle Belgrave za stručnu pomoć oko statističke analize podataka
- Osoblju Odjela za dječje bolesti Opće bolnice “Dr. Josip Benčević” za tehničku podršku i pomoć pri prikupljanju podataka i ispitanika
- Osoblju i suradnicima School of Translational Medicine, University of Manchester (Mike, Gina, Katy, Aida, Nic, Kamilla, Jiakai...) za tehničku podršku i pomoć pri obradi i analizi podataka i ispitanika

Zahvaljujem supruzi Gabrijeli te djeci Filipu i Iris koji su mi svojom nesebičnošću, strpljenjem i razumjevanjem pomogli pri izradi disertacije koju im s ljubavlju posvećujem.

## SADRŽAJ

i	<a href="#">ZAHVALA</a>	
ii	<a href="#">SADRŽAJ</a>	
iii	<a href="#">POPIS OZNAKA I KRATICA</a>	
1.	<a href="#">UVOD</a>	1
1.1.	<a href="#">Definicija astme</a>	1
1.2.	<a href="#">Prevalencija astme</a>	2
1.2.1.	<a href="#">Prevalencija astme u svijetu</a>	2
1.2.2.	<a href="#">Prevalencija astme u Hrvatskoj</a>	3
1.3.	<a href="#">Astma u djece</a>	5
1.4.	<a href="#">Fenotipovi i endotipovi astme</a>	7
1.5.	<a href="#">Rizični činitelji za astmu</a>	9
1.5.1.	<a href="#">Okolišni činitelji rizika za astmu</a>	9
1.5.1.1.	<a href="#">Učinak izlaganja djece dimu cigarete na razvoj astme</a>	9
1.5.1.2.	<a href="#">Aktivno pušenje</a>	10
1.5.1.3.	<a href="#">Pasivno pušenje</a>	10
1.5.1.4.	<a href="#">Kontaminacija česticama dima nakon što se cigareta ugasila</a>	12
1.5.1.5.	<a href="#">Zagađenje zraka u kući</a>	12
1.5.1.6.	<a href="#">Mačka i pas</a>	12
1.5.1.7.	<a href="#">Okolišno zagađenje zraka</a>	14
1.5.1.8.	<a href="#">Virusne infekcije</a>	14
1.5.2.	<a href="#">Činitelji načina života</a>	15
1.5.2.1.	<a href="#">Prehranjenost/debljina</a>	15
1.5.2.2.	<a href="#">Urbana/ruralna područja</a>	16
1.5.2.3.	<a href="#">Dijeta</a>	16

1.5.2.4.	<a href="#">Prehrana majčinim mlijekom</a>	17
1.5.2.5.	<a href="#">Probiotici</a>	17
<b>1.6.</b>	<b><a href="#">Međudjelovanje gena i okoliša u astmi</a></b>	<b>18</b>
<b>1.7.</b>	<b><a href="#">Genetika astme</a></b>	<b>19</b>
1.7.1.	<a href="#">Ljudski genom</a>	19
1.7.2.	<a href="#">Neravnoteža povezanosti, haplotipovi i SNP-ovi koji označavaju haplotipove</a>	23
1.7.3.	<a href="#">Genetska istraživanja složenih bolesti</a>	25
1.7.4.	<a href="#">Genetika astme</a>	25
1.7.4.1.	<a href="#">Genetska istraživanja povezanosti</a>	28
1.7.4.1.1.	<a href="#">Pristup probirom cijelog genoma (Genome-wide screen (GWS) approach)</a>	28
1.7.4.1.1.1.	<a href="#">Genome-wide Linkage studije</a>	28
1.7.4.1.1.2.	<a href="#">Istraživanje povezanosti cijelog genoma (microarray)</a>	28
1.7.4.1.2.	<a href="#">Pristup putem kandidatskih gena</a>	29
1.7.4.1.	<a href="#">Asthma i regija 17q</a>	31
1.7.4.2.	<a href="#">ORMDL3</a>	40
1.7.4.3.	<a href="#">GASDERMINI</a>	40
1.7.4.3.1.	<a href="#">GSDMA- Gasdermin A</a>	41
1.7.4.3.2.	<a href="#">GSDMB- gasdermin B</a>	41
1.7.4.4.	<a href="#">ZPBP2- zona pellucida vezni protein 2</a>	42
1.7.4.5.	<a href="#">IKZF3- IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)</a>	42
1.7.4.6.	<a href="#">TOP2- topoisomerase II</a>	43

<b>2. <u>HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA</u></b> .....	44
<b>2.1. <u>Hipoteza</u></b> .....	44
<b>2.2. <u>Ciljevi istraživanja</u></b> .....	44
2.2.1. <u>Opći cilj</u> .....	44
2.2.2. <u>Specifični ciljevi</u> .....	44
<b>3. <u>METODE</u></b> .....	45
<b>3.1. <u>Dizajn i mjesto izvođenja studije</u></b> .....	45
<b>3.2. <u>Ispitanici</u></b> .....	45
<b>3.3. <u>Izvori podataka/mjerenja</u></b> .....	46
3.3.1. <u>Izloženost pasivnom pušenju</u> .....	47
3.3.2. <u>Posjedovanje krznenih ljubimaca u kući</u> .....	47
3.3.3. <u>Mjerenja plućne funkcije</u> .....	47
3.3.4. <u>Kožni ubodni test</u> .....	48
<b>3.4. <u>Odabir gena – kandidatski geni za astmu</u></b> .....	48
<b>3.5. <u>Odabir SNP-ova</u></b> .....	49
<b>3.6. <u>Genotipiziranje</u></b> .....	53
<b>3.7. <u>Statistička analiza</u></b> .....	55
<b>4. <u>REZULTATI</u></b> .....	56
<b>4.1. <u>Sudionici</u></b> .....	56
<b>4.2. <u>Opisni podatci</u></b> .....	56
<b>4.3. <u>Genotipizirani i analizirani SNP-ovi</u></b> .....	59
<b>4.4. <u>Analiza povezanosti s astmom</u></b> .....	63
4.4.1. <u>Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, izloženosti duhanskom dimu tijekom rane dobi i astme</u> .....	64



4.4.2.	<a href="#">Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, posjedovanja krznenih kućnih ljubimaca i astme</a>	66
4.5.	<a href="#">Analiza povezanosti za težinu astme</a>	69
4.5.1.	<a href="#">Analiza povezanosti s prijemom u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme</a>	69
4.5.1.1.	<a href="#">Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, prijema u bolnicu s akutnom egzacerbacijom astme i izlaganja duhanskom dimu u ranoj dobi</a>	70
4.5.1.2.	<a href="#">Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, posjedovanja krznenih ljubimaca u kući za vrijeme istraživanja i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme</a>	71
4.5.2.	<a href="#">Analiza povezanosti za plućnu funkciju</a>	73
4.5.2.1.	<a href="#">Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, izlaganja pušenju u ranoj dobi i plućne funkcije</a>	75
4.5.2.2.	<a href="#">Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, posjedovanja krznenih ljubimaca u kući tijekom prve godine života i za vrijeme istraživanja te plućne funkcije</a>	76
5.	<a href="#">RASPRAVA</a>	78
5.1.	<a href="#">Glavni pronalasci</a>	84
5.2.	<a href="#">Objašnjenje rezultata</a>	85
5.3.	<a href="#">Prednosti i ograničenja istraživanja</a>	91
6.	<a href="#">ZAKLJUČAK</a>	93
7.	<a href="#">SAŽETAK</a>	94
8.	<a href="#">SUMMARY</a>	96
9.	<a href="#">POPIS LITERATURE</a>	97
10.	<a href="#">POPIS TABLICA I SLIKA</a>	124
11.	<a href="#">ŽIVOTOPIS</a>	129

12. <a href="#">DODATCI</a> .....	130
12.1. <a href="#">Upitnik o respiracijskom sustavu i okolišu</a> .....	131

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ADAM33	gen disintegrin i metaloproteinase 33 (engl. <i>A disintegrin and metalloproteinase 33 gene</i> )
ADRB2	beta-2-adrenergički receptor (engl. <i>Adrenoceptor Beta 2</i> )
ANOVA	analiza varijacije (engl. <i>Analysis of variance</i> )
ATRN	gen atraktin (engl. <i>Attractin gene</i> )
ATS	Američko torakalno društvo (engl. <i>The American Thoracic Society</i> )
aOR	prilagođeni omjer izgleda (engl. <i>Adjusted odds ratio</i> )
API	indeks predikcije astme (engl. <i>Asthma Predictive Index</i> )
BHR	bronhalna hiperreaktibilnost (engl. <i>Bronchial hyperresponsiveness</i> )
CAMP	Program zbrinjavanja astme u djece (engl. <i>The Childhood Asthma Management Program</i> )
CD	razlikovno obilježje (engl. <i>Cluster of differentiation</i> )
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>Confidence interval</i> )
COPSAC	kopenhaško prospektivno istraživanje o astmi u dječjoj dobi (engl. <i>The Copenhagen Prospective Study on Asthma in Childhood</i> )
CTCF	CCCTC-vezni činitelj (protein-cinkovog prstena) (engl. <i>CCCTC-Binding Factor (Zinc Finger Protein)</i> )
DNK	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EAACI	Europska akademija za alergologiju i kliničku imunologiju (engl. <i>European Academy of Allergology and Clinical Immunology</i> )
EBV	Epstein - Barr virus (engl. <i>Epstein–Barr virus</i> )
ECRHS	Istraživanje europskog društva za zdravlje dišnih putova

	(engl. <i>European Community Respiratory Health Survey</i> )
EGEA	epidemiološko istraživanje o genetici i okolišu u astmi (engl. <i>Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma</i> )
ELSPAC	Europska longitudinalna studija o trudnoći i djetinjstvu (engl. <i>European Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood</i> )
EPHX1	gen za ljudsku mikrosomalnu epoksidnu hidrolazu (engl. <i>The Human Microsomal Epoxide Hydrolase Gene</i> )
ER	endoplazmatski retikulum (engl. <i>Endoplasmic reticulum</i> )
ERS	Europsko respiracijsko društvo (engl. <i>European Respiratory Society</i> )
ESPAD	Europski školski istraživački projekt o alkoholu i drogama (engl. <i>European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs</i> )
FDR	postotak lažnih otkrića (engl. <i>False Discovery Rate</i> )
FEF25	forsirani ekspiracijski protok pri 25% vitalnog kapaciteta (engl. <i>Forced expiratory flow at 25% of vital capacity</i> )
FEF50	forsirani ekspiracijski protok pri 50% vitalnog kapaciteta (engl. <i>Forced expiratory flow at 50% of vital capacity</i> )
FEF75	forsirani ekspiracijski protok pri 75% vitalnog kapaciteta (engl. <i>Forced expiratory flow at 75% of vital capacity</i> )
FeNO	frakcija izdahnutog dušičnog oksida (engl. <i>Fraction of exhaled nitric oxide</i> )
FEV1	forsirani ekspiracijski volumen zraka u prvoj sekundi (engl. <i>Forced expiratory volume in 1 second</i> )
FVC	forsirani vitalni kapacitet (engl. <i>Forced expiratory vital capacity</i> )
GABRIEL	Multidisciplinarno istraživanje za prepoznavanje genetskih i okolišnih uzroka astme u Europskom društvu (engl. <i>A Multidisciplinary Study to Identify the Genetic and Environmental Causes of Asthma in the European Community</i> )
GALA	genetika astme u Latinoamerikanaca (engl. <i>The Genetics of Asthma in Latino Americans</i> )
GEACR	Genetska epidemiologija astme u Kostariki (engl. <i>Genetic Epidemiology of Asthma in Costa Rica cohort</i> )

GEI, G × E	međudjelovanje gena i okoliša (engl. <i>Gene-environment interaction</i> )
GEWIS	studija cijelog genoma s međudjelovanjem (engl. <i>Genomewide study of interaction</i> )
GINA	Međunarodni sporazum o dijagnosticiranju i liječenju astme (engl. <i>Global Initiative for Asthma</i> )
GSDMA	gen Gasdermin A (engl. <i>Gasdermin A gene</i> )
GSDMB	gen Gasdermin B (engl. <i>Gasdermin B gene</i> )
GSTP1	gen Glutation S-transferaza pi (engl. <i>Glutathione S-transferase pi gene</i> )
GVS	poslužitelj za varijacije genoma (engl. <i>Genome Variation Server</i> )
GWS	probir cijelog genoma (engl. <i>genome-wide screen</i> )
GWAS	istraživanje povezanosti cijelog genoma (engl. <i>Genome-wide association study</i> )
HSPA12B	gen heat-shock 70 kDa protein (engl. <i>Heat-shock 70 kDa protein 12B gene</i> )
HLADRB1	Glavni kompleks tkivne podudarnosti klase II, DR beta 1 (engl. <i>Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1</i> )
HWE	Hardy-Weinberg ravnoteža (zakon) (engl. <i>Hardy-Weinberg equilibrium, Hardy-Weinberg law</i> )
IgE	protutijelo E klase (engl. <i>immunoglobulin E</i> )
IKZF3	gen IKAROS obitelj zinkovog prstena 3 (Aiolos) (engl. <i>IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos) gene</i> )
IL	interleukin (engl. <i>interleukin</i> )
IL4R	receptor interleukina 4 (engl. <i>interleukin 4 receptor</i> )
ISAAC	Međunarodno istraživanje o astmi i alergijama u djetinjstvu (engl. <i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> )
kB	kilobaza (engl. <i>kilobase</i> )

LY69	limfocitni antigen (engl. <i>lymphocyte antigen 96</i> )
LD	neravnoteža povezanosti (engl. <i>Linkage disequilibrium</i> )
MAF	frekvencija manje učestalog alela (engl. <i>Minor allele frequency</i> )
NCBI	Nacionalni centar za biotehnološke podatke (engl. <i>The National Center for Biotechnology Information</i> )
NO2	dušični dioksid (engl. <i>nitrogen dioxide</i> )
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i> )
ORMDL3	gen sličan ORM1 proteinu 3 (engl. <i>ORM1-like protein 3 gene</i> )
PARSIFAL	Sprječavanje alergijskih rizičnih činitelja za senzibilizaciju djece koji su povezani sa životom na farmama te antropozofičnim načinom života (engl. <i>Prevention of allergy risk factors for sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>The polymerase chain reaction</i> )
PM	čestice prašine, lebdeće čestice (engl. <i>Particulate matter</i> )
PRACTALL	primjenjivanje alergologije u praksi (engl. <i>Practicing Allergology</i> )
PUFA	polinezasićena masna kiselina (engl. <i>Polyunsaturated fatty acid</i> )
rs	jedinstven, u DbSNP-u zabilježen, identifikacijski broj ("rs#"; npr. rs206437) (engl. <i>reference SNP ID number</i> )
RSV	respiracijski sincicijski virus (engl. <i>Respiratory syncytial virus</i> )
RV	rinovirusi (engl. <i>rhinoviruses</i> )
SAD (USA)	Sjedinjene Američke Države (engl. <i>United States of America</i> )
SAGE	Istraživanje astme, gena i okoliša (engl. <i>The Study of Asthma, Genes and the Environment</i> )

SERCA	Ca <sup>2+</sup> ATP-aza na sarko-endoplazmatskom retikulumu, (engl. <i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i> )
SLSJ	Saguenay-Lac-Saint-Jean kolekcija obitelji s astmom (engl. <i>Saguenay-Lac-Saint-Jean asthmatic familial collection</i> )
SNP	jednonukleotidni polimorfizam, polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. <i>Single nucleotide polymorphism</i> )
SPSS	statistički programski paket za društvene znanosti (engl. <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> )
sur. (et al.)	suradnici (lat. <i>et alii</i> )
SVS	kompjutorski program pod imenom SNP i Variation Suite (engl. <i>SNP &amp; Variation Suite</i> )
Th	pomoćnički limfocit T (engl. <i>T-helper</i> )
TLR	Toll-u sličan receptor (engl. <i>Toll like receptor</i> )
TNF-alfa	činitelj tumorske nekroze alfa (engl. <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> )
TOP2	gen topoisomerase II (engl. <i>Topoisomerase II gene</i> )
UPR	odgovor stanica na nakupljanje nesmotanih proteina (engl. <i>Unfolded protein response</i> )
ZPBP2	gen zona pellucida vezni protein 2 (engl. <i>Zona pellucida binding protein 2 gene</i> )

## 1. UVOD

### 1.1. Definicija astme

Astma je složena bolest uzrokovana interakcijom genetskih i okolišnih činitelja. Sastoji se od višestrukih različitih patogenetskih podskupina s različitim staničnim i molekularnim osobinama.

Međunarodni sporazum o dijagnosticiranju i liječenju astme (GINA, engl. *Global Initiative for Asthma*) definira astmu kao upalnu bolest dišnih putova u kojoj sudjeluju brojne upalne stanice i različiti upalni posrednici. Kronična upala je povezana s hipereaktibilnošću dišnih putova što se klinički manifestira ponavljajućim napadajima zviždanja, zaduhe, pritiska u prsima i kašlja, posebno tijekom noći i/ili u rano jutro. Napadaji su obično udruženi sa smanjenom prohodnošću dišnih putova, koja je promjenjiva, najčešće reverzibilna, bilo spontano ili uz pomoć odgovarajućeg liječenja. (*"Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways in which many cells and cellular elements play a role. The chronic inflammation is associated with airway hyperresponsiveness that leads to recurrent episodes of wheezing, breathlessness, chest tightness, and coughing, particularly at night or in the early morning. These episodes are usually associated with widespread, but variable, airflow obstruction within the lung that is often reversible either spontaneously or with treatment."*<sup>1</sup>)



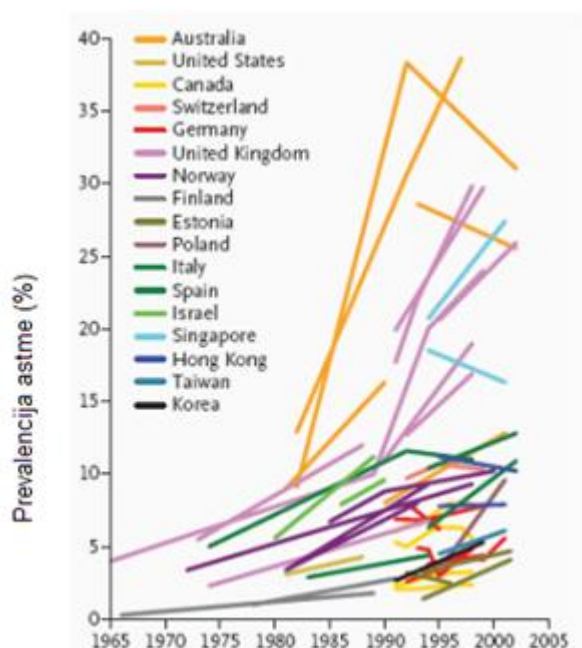
## 1.2. Prevalencija astme

### 1.2.1. Prevalencija astme u svijetu

Astma je zadnjih nekoliko desetljeća postala važan zdravstveni problem i bilježi značajan porast prevalencije<sup>2, 3</sup>. Do unazad dva desetljeća smatralo se da pogađa visoko razvijene zemlje (Novi Zeland, Australija, Velika Britanija, Kanada, Sjedinjene Američke Države (SAD)) gdje je registriran veći broj hospitalizacija i smrtnih ishoda što nije bilo uočeno u zemljama u razvoju<sup>4</sup>.

Poznato je da u svijetu postoje velike varijacije u prevalenciji astme (i do 15 puta među zemljama, Slika 1). Međunarodno istraživanje o astmi i alergijama u djetinjstvu (ISAAC, engl. *The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), bavilo se ispitivanjem prevalencije astme tijekom tri faze u velikom dijelu svijeta putem jednostavne standardizirane metodologije. Prva faza istraživanja uključivala je više od 100 zemalja i 2 milijuna djece i pokazala je visoku prevalenciju bolesti u zapadnim zemljama Europe i Latinskoj Americi, manju u istočnoj Europi, te nisku u Aziji i Africi<sup>2, 5-9</sup>. Treća faza ISAAC-a obuhvaćala je 233 centra i 98 zemalja i registrirala je smanjenje prevalencije astme u zemljama Zapadne Europe te porast prevalencije astme u regijama gdje je ona ranije bila niska, posebno u zemljama s niskim i srednjim prihodima te velikim brojem stanovništva<sup>6, 8, 10</sup>. Nadalje, zabilježen je značajan porast broja djece i adolescenata koji su na upitnicima u istraživanju odgovorili da imaju astmu što se objašnjava boljom dijagnostikom te edukacijom stanovništva<sup>6</sup>. U siromašnijim zemljama astma u djece bila je teža.<sup>10</sup> Dakle, dvadesetogodišnji program ISAAC pokazao je da je astma u djece česta bolest ne samo u razvijenim, nego i u nerazvijenim zemljama<sup>10</sup>.

Slika 1: Promjene u prevalenciji astme tijekom zadnjih desetljeća u svijetu u djece i mladih odraslih osoba (modificirano prema<sup>11</sup>)



### 1.2.2. Prevalencija astme u Hrvatskoj

Prevalencija astme kod djece u Hrvatskoj posljednjih 40-ak godina bilježi svoj porast, što potvrđuju brojna istraživanja<sup>12-15</sup>. Iako metodologija, nestandardiziranost upitnika te različiti dizajni otežavaju uspoređivanje dobivenih podataka, rezultati nedvojbeno pokazuju porast prevalencije astme djece školske dobi (Tablica 1)<sup>12</sup>. Istraživanja su provedena u zemljopisno različitim dijelovima Hrvatske s različitom klimom i vegetacijom zbog čega su njihovi rezultati reprezentativni za cijelu Hrvatsku.

Primjenom standardiziranih upitnika (preporučenih prema protokolu korištenom u ISAAC istraživanju) u istraživanjima provedenim u zadnjih 15 godina, dobiveni su kvalitetniji podatci za usporedbu<sup>12-15</sup>. U nekoliko županija registrirana je prevalencija astme od 5,1 do 14 % što Hrvatsku svrstava u zemlje s umjerenom prevalencijom astme djece školske dobi<sup>12-15</sup>. Zanimljivo je da prevalencija ipak i dalje raste što dokazuju istraživanja provedena u Primorsko-goranskoj županiji 2001./2002. - 2009./2010<sup>15</sup>.

Tablica 1: Kronološki pregled istraživanja prevalencije astme u djece u Hrvatskoj (modificirano prema Banac i suradnici (sur.))<sup>12</sup>

<b>Autori</b>	<b>Godina istraživanja</b>	<b>Regija/grad</b>	<b>Broj djece</b>	<b>Dob (u godinama)</b>	<b>Prevalencija astme (%)</b>
Kolbas, V. i sur.	1978./1979.	Zagreb	88 673	7-18	1,3
Restović-Sirotković, M. i sur.	1982./1983.	Split	510	6-14	2,8
Banac, S. i sur.	1988./1989.	Cres-Lošinj	1201	7-14	5,9
Aberle, N. i sur.	1990.	Slavonski Brod	*	2-15	3,6
Radonić, M. ** i sur.	1998.	Dubrovnik	1778	9-15	6,9
Stipić-Marković, A. i sur.		Zagreb	1047	10-11	6,0
Banac, S. i sur.	2001./2002.	Primorsko-goranska županija	2194	13-14	8,4
Banac, S. i sur.	2001./2002.	Primorsko-goranska županija	1634	6-7	9,7
Munivrana, H. i sur.	2005.	Međimurje	3111	12-14	5,1
Aberle, N.** i sur.	2007./2008.	Brodsko-posavska županija	1684	10-11	7,9
Drkulec, V.** i sur.	2007.	Požeško-slavonska županija	551	7-10	6,2
Drkulec, V.** i sur.	2007.	Požeško-slavonska županija	559	11-14	14,3
Banac, S. i sur.	2009./2010.	Primorsko-goranska županija	1181	13-14	14
Banac, S. i sur.	2009./2010.	Primorsko-goranska županija	1052	6-7	9,4

\*nije navedeno.

\*\*neobjavljeni podatci ili podatci objavljeni u sažetcima stručnih sastanaka

### 1.3. Astma u djece

Astma u djece definira se kao i astma u odraslih, ali u dječjoj astmi postoji puno osobitosti što ju čini posebnim izazovom: problematika je složenija u djece nego u odraslih, teže je prepoznavanje različitih fenotipova, dijagnostika je otežana radi čega su potrebne posebne smjernice za dječju astmu kao i planovi za liječenje<sup>16</sup>.

Astma počinje rano, najčešće u predškolskoj i školskoj dobi i može trajati cijeli život<sup>17</sup>. Poznato da se klinička slika astme mijenja s dobi djeteta<sup>18</sup>. Klinička prezentacija je dinamična, razvija se paralelno s razvojem dišnog i imunološkog sustava<sup>19</sup>, simptomi su tipični (zviždanje, kašalj, kratak dah, stezanje u prsima), egzacerbacije učestale<sup>20</sup> (atkada su jedina prezentacija bolesti, a u više od 80 % potaknute virusnim infekcijama)<sup>20, 21</sup>. Konsenzus PRACTALL (engl. *Practicing Allergology*) kod djece razlikuje nekoliko fenotipova: virusom potaknutu astmu, tjelesnim naporom potaknutu astmu i alergijsku astmu, što ima praktičnu primjenu u liječenju<sup>22</sup>. U patofiziologiji astme u djece dominantnu ulogu ima upala i remodelacija<sup>23</sup>. Remodelacija nije prisutna u dojenčadi, ali se uočava već od predškolske dobi<sup>23</sup>. U dojenčadi i predškolske djece teško je postaviti dijagnozu. Korisna je detaljna anamneza te indeks predikcije astme (API, engl. *Asthma Predictive Index*). On se temelji na predikciji rizika od astme u djece koja su mlađa od 3 godine, a imaju recidivirajuće epizode zviždanja<sup>24</sup>. Ako je pridružen jedan od glavnih činitelja rizika (atopijska bolest roditelja, atopijski dermatitis u djeteta) ili barem dva sporedna činitelja (eozinofilija, alergijski rinitis, zviždanje nevezano uz prehladu) može se sa značajnom vjerojatnošću postaviti dijagnoza astme<sup>24</sup>. Osim impulsne oscilometrije u toj dobi nisu mogući dodatni testovi plućne funkcije i određivanje bronhalne hiperreaktibilnosti. Izvan egzacerbacija plućna funkcija je vrlo često unutar normalnih vrijednosti<sup>25</sup>. Potrebno je isključiti druge uzroke zviždanja (rekurirajuće virusne respiracijske infekcije, gastroezofagusni refluks, cističnu fibrozu, bronhopulmonalnu displaziju, prirođene malformacije povezane sa suženjem dišnih putova, aspiraciju stranog tijela, primarnu cilijarnu diskineziju, imunodeficijencije, prirođene bolesti srca i tuberkulozu). Za potvrdu dijagnoze velika je pomoć povoljan odgovor na terapiju. U dojenčadi su

bronhoopstrukcije najčešće inducirane virusima, a alergenski okidači imaju sve veću ulogu što je dijete starije<sup>20</sup>. Vrlo rano atopijska senzibilizacija, odnosno kožni ubodni test, može olakšati identifikaciju potencijalnih okidača bolesti<sup>26</sup>. Djeca koja imaju astmu u ranoj dobi najčešće su senzibilizirana na alergene koje nalazimo u kući (grinje iz kućne prašine, alergeni kućnih ljubimaca), a kasnije na peludne alergene<sup>27</sup>. Liječenje astme i edukacija ovise o kronološkoj dobi djeteta. Terapija se primjenjuje stupnjevito prema uspostavljenoj kontroli bolesti, dobi djeteta, plućnoj funkciji, postavljenim ciljevima i suradljivošću bolesnika<sup>28</sup>, a učinkovitost primjenjenih lijekova razlikuje se u različitim dobnim skupinama djece. Također je važan izbor odgovarajućeg "inhalera" i pomagala, koji ovisi o suradljivosti djeteta te težini simptoma.

**Teška astma** je poseban, ali varijabilan fenotip astme. Sadrži mali, ali klinički i ekonomski važan postotak (10 %) među pacijentima s astmom<sup>29</sup>. Definicija se temelji na prisutnosti perzistirajućih simptoma, ograničenju protoka zraka u dišnim putovima te rezistenciji na liječenje. U djece se susreće značajno rjeđe nego u odraslih (4,5 %), a ti pacijenti češće imaju perzistentnu astmu u odrasloj dobi<sup>30</sup>. Za razliku od odraslih, djeca s teškom astmom u pravilu imaju visok stupanj senzibilizacije na okolišne alergene, visoke upalne markere (npr. frakcija izdahnutog dušičnog oksida (FeNO, engl. *Fraction of exhaled nitric oxide*)) te visok stupanj reverzibilnosti plućne funkcije nakon primjene bronhodilatacijske terapije<sup>31</sup>. Kod ovih pacijenata potreban je strog nadzor te liječenje koje je primjereno specifičnom fenotipu.

#### 1.4. Fenotipovi i endotipovi astme

Već se dugi niz godina zna da je klinička slika astme heterogena<sup>32</sup> te je uočeno više njezinih izražaja i/ili podskupina (fenotipova) koje označavaju vidljive pacijentove osobine nastale međudjelovanjem genetskih i okolišnih utjecaja<sup>33</sup>. Fenotipovi astme početno su se definirali na temelju kliničkih, fizioloških i staničnih osobina dok se posljednjih godina za definiciju fenotipa više koriste kliničke, biološke i genetske osobine te njihov odnos s okolišnim činiteljima<sup>34</sup>.

Mnogobrojna istraživanja uočila su nedovoljnu specifičnost fenotipova, kao i njihovo preklapanje. Međutim, nedavna istraživanja pokazala su da određene molekularne promjene prisutne u patofiziološkim zbivanjima, karakteriziraju molekularne fenotipove<sup>35</sup>, a njihov se značaj potvrđivao kroz primjenu ciljanih molekularnih bioloških terapija<sup>36, 37</sup>.

Istraživanja temeljena na povezivanju kliničkih i molekularnih osobina u pacijenata s astmom rezultirala su otkrivanjem takozvanog Th2 (eozinofilnog) citokinskog molekularnog fenotipa (pomoćnički limfocit T 2, engl. *T-helper 2*).<sup>35</sup> Za njegovu definiciju koriste se biomarkeri kao što su eozinofili, periostin i izdahnuti dušični oksid (NO)<sup>38</sup>. Određivanjem Th2 biomarkera poboljšava se terapijska efikasnost što je vidljivo u kliničkoj primjeni, a očituje se na dobrom odgovoru nakon primjene protuupalnih lijekova te ciljanih bioloških lijekova. Unatoč tomu, bolesnici imaju različit raspon pozitivnog odgovora na terapiju što upućuje na heterogenost i ovog molekularnog fenotipa<sup>39</sup>. Nadalje, prema nekim istraživanjima pretpostavlja se da će određeni Th2 molekularni fenotipovi (koji će na kraju najvjerojatnije biti prepoznati kao endotipovi) bolje odgovarati na usmjerenu terapiju interleukinom -4/-13 (IL -4/-13, engl. *interleukin -4/-13*)<sup>36</sup> dok će druga podskupina bolje odgovarati na IL-5 usmjerenu terapiju.<sup>37</sup> Termin „endotip“ bit će moguće uvesti boljim poznavanjem poveznice između kliničkih osobina i molekularnih putova tj. kada bude poznata etiologija i dosljedan patofiziološki mehanizam bolesti.

Fenotipovi astme koji ne izražavaju Th2 upalu nedovoljno su definirani, a karakterizirani su nedostatkom biomarkera povezanih s Th2 upalnim odgovorom. Smatra se da važnu ulogu u

patofiziologiji ovih fenotipova ima neurogeni put, oksidacijski stres i alternativni prirođeni ili stečeni imunosni put. U ove fenotipove ubrajaju se astma povezana s debljinom, neutrofilna astma, paucigranulocitna astma i astma povezana s pušenjem, a zajednička osobina im je slab odgovor na kortikosteroidnu terapiju<sup>40, 41</sup>. Ovi bolesnici imaju blažu kliničku sliku bolesti i manji broj egzacerbacija u usporedbi s bolesnicima s Th2 upalnim odgovorom<sup>34</sup>.

Očekuje se da će buduća ciljana istraživanja na velikom broju bolesnika usavršiti sposobnost definiranja fenotipova i endotipova astme, čime će naziv „astma“ postati opsolentan i biti zamijenjen nazivima koji mogu specifično prepoznati patofiziološki proces.

*Poseban interes ovog istraživanja usmjerio se na utjecaj duhanskog dima tijekom prenatalnog razdoblja djeteta u međudjelovanju s genetskim činiteljima na kasniji razvoj astme i njezinu težinu.*

## **1.5. Rizični činitelji za astmu**

Genetski, okolišni činitelji te način života značajno utječu na razvoj i izražavanje kliničke slike astme.

Rizični činitelji za astmu mogu sudjelovati u nastanku astme, mogu biti okidači astmatskih napadaja ili oboje.

### **1.5.1. Okolišni činitelji rizika za astmu**

#### **1.5.1.1. Učinak izlaganja djece dimu cigarete na razvoj astme**

Djeca su ne samo prenatalno, već i postnatalno, veoma osjetljiva na utjecaj okoliša, osobito na duhanski dim koji ima važno mjesto u patofiziologiji astme. On potiče upalu dišnih putova, povećava njegovu propusnost te oštećuje mukocilijarni klirens<sup>42-44</sup>. Takva djeca češće pate od posljedica poput recidivirajućih bronhopneumonija i eventualnog kasnijeg razvoja astme, akutnih respiracijskih infekcija<sup>45</sup>, upala srednjeg uha i iznenadne smrti<sup>46</sup>. Dim cigarete složena je mješavina preko 5000 različitih kancerogenih i toksičnih kemijskih supstanci<sup>47</sup>. Za ljudsko zdravlje opasni su direktni kancerogeni (metilolantreni, benzo- $\alpha$ -pireni i akrolei), toksini (ugljični monoksid, amonijak, aceton, nikotin i hidrokinon) te reaktivne krute čestice s kemijski katalitičkim površinama kao i oksidansi (superoksid i dušični oksidi)<sup>42, 47</sup>.

Izlaganje djece duhanskom dimu događa se na tri različita načina i svaki način može uzrokovati zasebne posljedice:

- aktivno pušenje



- pasivno pušenje
- kontaminacija česticama dima nakon što se cigareta ugasila

#### 1.5.1.2. Aktivno pušenje

U razvijenim europskim zemljama oko četvrtina odraslih osoba aktivno puši cigarete<sup>48</sup>, a postotak varira: 38 % u Njemačkoj, 30 % u Francuskoj, 29 % u Italiji i 18 % u Švedskoj<sup>49</sup>. Pušenje tijekom adolescentne dobi predstavlja značajan rizični činitelj za astmu i niz drugih stanja. Hrvatska je u vrhu po učestalosti pušenja cigareta tijekom adolescencije. U izvješću europskog školskog istraživačkog projekta o alkoholu i drugim drogama (ESPAD, engl. *The European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs*) oko 40 % mladih osoba je u Hrvatskoj pušilo, u usporedbi s 28 % mladih u drugim europskim zemljama. Prospektivna, epidemiološka istraživanja pokazala su da aktivno pušenje u adolescenata povećava incidenciju astme od 2,6 do 3,9 puta<sup>50, 51</sup>. Alergijska predispozicija ima značajnu ulogu za nastanak astme kod mladih osoba koje puše. To je potvrdila studija u kojoj su se uspoređivala djeca četvrtih i sedmih razreda koja nisu imala alergiju i nisu pušila, ali su u slijedećih 8 godina postala redoviti pušači. Njihov rizik za kasniji razvoj astme bio je 5,2 puta veći u usporedbi s vršnjacima koji su imali alergiju. U toj skupini ispitanika pušenje se nije pokazalo kao rizik za razvoj astme<sup>50</sup>. Nadalje, prospektivna studija Rasmussena i suradnika<sup>52</sup> pratila je tijekom 6 godina 271 adolescenta koji nisu imali simptome i u tom su razdoblju počeli pušiti te nastavili tijekom 6 godina ispitivanja. Rezultati su pokazali da je 25 % adolescenata razvilo simptome nalik astmi, 50 % ih je samo kašljalo, 29 % ih je imalo samo zviždanje, a 21 % i zviždanje i kašalj. Aktivno pušenje povećalo je rizik za astmatske simptome 2,1 puta<sup>52</sup>.

#### 1.5.1.3. Pasivno pušenje

Poznato je da izlaganje djece pasivnom pušenju povećava incidenciju zviždanja, bronhalne hiperreaktibilnosti i astme<sup>45, 53</sup>. Prenatalno i postnatalno izlaganje duhanskom dimu uzročno je povezano s razvojem dječje astme što je potvrdilo mnoštvo radova i meta-analiza<sup>54</sup>. U tim

istraživanjima rizik za razvoj astme je rastao u rasponu od 21 do 85 %, <sup>55</sup> a ako su majke pušile tijekom trudnoće rizik za razvoj astme rastao je ovisno o dozi inhaliranog dima što se utvrdilo mjerenjem kotinina kao biomarkera za izlaganje pasivnom pušenju <sup>45, 56</sup>. Majčino pušenje duhana predstavljalo je veći rizik za razvoj astme i zviždanja nego od strane oca <sup>57</sup>.

Izlaganje djeteta pušenju tijekom trudnoće povezano je s deficitom plućne funkcije već kod rođenja, koja može perzistirati do mlađe odrasle dobi <sup>58-61</sup> i može biti predispozicija za zviždanje tijekom respiracijskih infekcija s posljedičnonastalom bronhalnom hiperreaktabilnošću (BHR, engl. *Bronchial hyperresponsiveness*) <sup>62, 63</sup>. Pušenje utječe na razvoj i sazrijevanje plućnog imunološkog sustava <sup>64</sup> te narušava imunološki odgovor na virusne infekcije <sup>65</sup>. Nadalje, može potaknuti i spriječiti ekspresiju tkivno specifičnih gena koji su povezani s astmom, a takvo djelovanje je opisano na kandidatskim genima za astmu kao i drugim genskim lokusima <sup>66-70</sup>.

Prenatalna pošteta djeteta izlaganju duhanskom dimu prevenira kasniji razvoj astme za 5 - 15 % <sup>71</sup>.

Iako je prenatalno razdoblje rizičnije za izlaganje duhanskom dimu, i postnatalno razdoblje ima važnu ulogu za kasniji razvoj astme i zviždanja <sup>72</sup>. Ako je majka bila pušač, ili su to bila oba roditelja, rizik za razvoj astme iznosio je 1,21 <sup>73, 74</sup>, a rizik za ponavljajuće zviždanje iznosio je 1,4 <sup>74, 75</sup>. Ako dijete već ima dijagnosticiranu astmu, izlaganje duhanskom dimu povećava rizik za akutne egzacerbacije (potvrda putem anketa iznosila je 1,8 puta, a mjerenja razina kotinina u urinu 1,4 – 1,7 puta) <sup>76, 77</sup>, povećava BHR <sup>77</sup>, smanjuje plućnu funkciju- forsirani ekspiracijski volumen zraka u prvoj sekundi (FEV<sub>1</sub>, engl. *Forced expiratory volume in 1 second*) koji iznosi -4.14 % i omjer FEV<sub>1</sub>/FVC-a -0.03 (FEV<sub>1</sub>/FVC, forsirani vitalni kapacitet, engl. *Forced expiratory vital capacity*) <sup>78</sup> te povećava potrebu za zdravstvenom skrbi <sup>78</sup>.

#### 1.5.1.4. Kontaminacija česticama dima nakon što se cigareta ugasila

Kontaminacija česticama dima nakon što se cigareta ugasila može se zadržati nekoliko mjeseci na raznim površinama čak i kada je pušenje u tom prostoru prekinuto<sup>79</sup>. Čestice dima koje su kontaminirale okoliš mogu reagirati s ozonom te stvoriti ultra fine čestice koji mogu dovesti do egzacerbacije astme, ali i oštećivati deoksiribonukleinsku kiselinu, DNK (engl. DNA, *Deoxyribonucleic acid*) u ljudskim stanicama<sup>80,81</sup>.

#### 1.5.1.5. Zagađenje zraka u kući

Glavni zagađivači u kući su dušični dioksid (NO<sub>2</sub>, engl. *nitrogen dioxide*), čestice prašine, lebdeće čestice (PM, engl. *particulate matter*) te alergeni u kući (npr. alergeni grinja, miševa, žohara i plijesni).

NO<sub>2</sub> je polutant<sup>82</sup> koji nastaje izgaranjem kod visokih temperatura, najčešće prilikom kuhanja na plin. U ranijim istraživanjima nije se mjerila koncentracija NO<sub>2</sub>, već su se analizirali podatci o primjeni plina za kuhanje. Ustvrdili su da je primjena plina povezana s razvojem astme u djece (rizik 2 – 2,17)<sup>83, 84</sup>. Novija istraživanja koristila su mjerenje razine NO<sub>2</sub> u kući, a rezultati su bili dvojaki: neki su pokazali pozitivnu povezanost (dojenčad je imala 2,2 puta više dana sa simptomom zviždanja)<sup>85</sup>, a drugi nisu pronašli povezanost<sup>86</sup>.

**Lebdeće čestice (PM)** se sastoje od grubih PM<sub>10</sub> i finih PM<sub>2.5</sub> čestica i osnovni su sastojak zagađenja u kući. Nastaju prilikom kuhanja, izgaranja u pećima na drva, prilikom čišćenja, a izvor takvih čestica može biti i vanjski okoliš. Iako se dosadašnjim istraživanjima i meta-analizom uvidjelo da se visoke doze PM-a u kući mogu povezati sa simptomima astme [omjer izgleda (OR, engl. *odds ratio*) = 1.028; 95 % CI 1.006–1.051 (interval pouzdanosti, CI, engl. Confidence interval)]<sup>87, 88</sup>, ipak nije provedeno dovoljno istraživanja koje povezuju PM u kući i pojavu astme u djece te se stoga može zaključiti da nije dokazana međusobna uzročna povezanost.

**Alergeni grinja, žohara, životinjskih dlaka i plijesni** uobičajeni su kućni alergeni. Epidemiološke studije upućuju na to da u senzibiliziranih osoba s astmom izlaganje kućnim alergenima ima jasan utjecaj na plućnu funkciju i težinu astme<sup>89, 90</sup>, a s izloženošću visokim koncentracijama alergena osobe koje imaju atopiju imaju i veći rizik za razvoj astmatskih simptoma (OR, 1,81; 95 % CI, 1,04 – 3,15)<sup>90</sup>. Smanjenjem koncentracije alergena u kući manje su izražene tegobe povezane s astmom<sup>91</sup>. Međutim, prospektivno istraživanje koje su proveli Lau i sur.<sup>92</sup> u Njemačkoj, prateći djecu od rođenja do 7. godine života, nisu ustvrdili povezanost između ranog izlaganja alergenima u kući i razvoja astme ili bronhalne hiperreaktibilnosti. Nasuprot tome, istraživanje koje se provodilo u istoj skupini djece kada su oni bili u dobi od 13 godina pokazalo je da su senzibilizirana djeca, ako su bila izložena visokim koncentracijama alergena, imala povećan rizik za trajnu astmu i bronhalnu hiperreaktibilnost<sup>93</sup>. Stoga, može se reći da postoje dokazi koji izravno povezuju izlaganje alergenima u kući s razvojem astme u djece, ali da ipak ti dokazi još nisu dovoljni za jasan zaključak.

#### 1.5.1.6. Mačka i pas

Utjecaj kućnih ljubimaca tijekom rane dječje dobi ne može se jasno povezati s razvojem astme. Dosadašnja istraživanja pokazala su neujednačene rezultate. Dio istraživanja ustvrđuju veću prevalenciju alergijske senzibilizacije i bolesti dišnih putova u djece koja imaju mačku i psa u kući<sup>94-96</sup>, što potvrđuje pregledni rad Apelberga i sur. gdje je vidljivo da držanje ljubimca u kući tijekom dojenačke dobi povećava rizik za astmu i zviždanje (rizik je bio 1,1)<sup>97</sup>. Nasuprot tome, druga istraživanja nisu uspjela potvrditi povezanost između nazočnosti ljubimaca u kući s respiracijskim simptomima, senzibilizacijom i astmom. Štoviše, uočen je njihov zaštitni učinak<sup>98-100</sup>.

#### 1.5.1.7. Okolišno zagađenje zraka

Glavni izvor vanjskog zagađenja zraka u urbaniziranim sredinama je zagađenje iz prometa. Brojna su istraživanja provedena među djecom koja imaju astmu i izložena su vanjskim onečišćivačima. Veći broj istraživanja potvrđuje da okolišno zagađenje zraka može izazvati egzacerbaciju astme u djece<sup>101, 102</sup>. Neke studije koje analiziraju povezanost prometnog aerozagađenja sa simptomima astme<sup>103, 104</sup> i s dijagnosticiranom astmom, pokazale su da postoji povećan rizik (npr. Brauer i sur. ustvrdili su rizik 1,3)<sup>105, 106</sup>. Nasuprot tome, pojedina istraživanja to nisu uspjela potvrditi<sup>107, 108</sup>. Stoga, ostaje nejasan utjecaj aerozagađenja na razvoj astme.

#### 1.5.1.8. Virusne infekcije

Najčešći uzroci zviždanja u dojenčadi i male djece te okidači egzacerbacija astme u djece koja od ranije imaju astmu su infekcije dišnih putova virusne etiologije (posebno respiracijski sincicijski virus (RSV, engl. *Respiratory syncytial virus*) i rinovirusi (RV, engl. *Rhinoviruses*)<sup>20, 109-112</sup>. Virusni patogen detektiran je u 84 % djece mlađe od 3 godine koja su hospitalizirana zbog zviždanja. RSV je bio dominantan patogen tijekom zimskih mjeseci, a RV je bio učestaliji u ostalim mjesecima (Heymann i sur.)<sup>109</sup>. Prema istraživanju Johnstona i suradnika, 80 - 85 % egzacerbacija astme u djece školske dobi uzrokovano je virusima, a pikornavirusi u koje se ubrajaju RV-i i enterovirusi bili su pozitivni u 2/3 uzoraka<sup>110</sup>.

RSV je važan patogen za nastanak zviždanja u dojenačkoj dobi, a manje je povezan sa zviždanjem kod starije djece<sup>20</sup>. Teža RSV infekcija donjih dišnih putova (koja zahtjeva bolničko liječenje) povezana je s kasnijim ponavljajućim epizodama zviždanja<sup>113, 114</sup> što je bio poticaj za razmatranje njegove uloge u razvoju astme. Sigurs i suradnici uočili su da je teški bronhiolitis izazvan RSV-om u djece do 3 godine povezan s povećanim rizikom za astmu u 13-ogodišnje djece (43 %, nasuprot 8 % iz kontrolne skupine djece)<sup>115</sup>. Međutim, povezanost astme i RSV

infekcije nije potvrđena u svim istraživanjima. Tako su, npr., Stein i sur., u svom longitudinalnom istraživanju pokazali da djeca do 3. godine života s RSV infekcijom donjih dišnih putova imaju ponavljajuće zviždanje do 6. godine života (rizik za povremeno zviždanje bio je 3,2, a za učestalo zviždanje 4,3), ali ne u dobi od 13 godina<sup>116</sup>. U retrospektivnom istraživanju Thomsen i suradnika vrlo teška RSV infekcija nije bila uzrokom astme, ali je bila pokazatelj genetske predispozicije za astmu.<sup>117</sup>

U posljednje vrijeme istraživanja su pokazala da je zviždanje uzrokovano RV-om rizičniji činitelj za razvoj astme u odnosu na RSV (u trogodišnje djece rizik se kretao od 4,14 - 25,6)<sup>20, 118-120</sup>. Tako su Kotaniemi-Syrjänen i sur. ustvrdili da se u dojenčadi koja su hospitalizirana zbog zviždanja uzrokovanog RV-om rizik za astmu povećavao i trajao je najmanje 6 godina<sup>119</sup>. Lemanske i sur. su pokazali da je RV infekcija u dojenačkoj dobi bila značajan rizični činitelj za zviždanje u trećoj godini života (OR=6,6)<sup>120</sup>, a Jackson i sur. da je snažan rizik za astmu u dobi od 6 godina (OR 9,8)<sup>118</sup>.

Iz dosadašnjih istraživanja vidljivo je da su rane virusne infekcije dišnih putova (RV i RSV) važni rizični činitelji za ponavljajuće zviždanje u kraćim vremenskim periodima, ali ostaje upitno jesu li RV i RSV odgovorni za razvoj astme.

## 1.5.2. Činitelji načina života

### 1.5.2.1. Preuhranjenost/debljina

Porast prevalencije debljine i astme u djece potaknuo je širi znanstveni interes. Uočeno je da debljina povećava rizik za astmu<sup>121</sup>. U meta-analizi Flahermana i Rutherforda velika porođajna težina pokazala se kao blago uvećan rizik (OR 1,2) za posljedični razvoj astme<sup>122</sup>.

Rizik za novonastalu astmu bio je dokazan među preuhranjenim dječacima, ali ne i djevojčicama<sup>123</sup>. Nasuprot tome, u istraživanju Castro-Rodrigueza i sur. Uočeno je da preuhranjene djevojčice imaju 7 puta veći rizik za razvoj astme<sup>124</sup>.

#### 1.5.2.2. Urbana/ruralna područja

Prema mnogim epidemiološkim istraživanjima zadnjih 10-ak godina djeca koja žive u ruralnim područjima imaju manji rizik za astmu nego djeca u urbanim sredinama, a neka istraživanja su pokazala da život u ruralnoj sredini čak smanjuje rizik za astmu<sup>125, 126</sup> što podupire higijensku hipotezu. Međutim, rezultati istraživanja<sup>127, 128</sup> pokazali su da je slična prevalencija astme ako su iste okolišne i socioekonomske prilike bez obzira na život u urbanoj ili ruralnoj sredini. Iako život u ruralnoj sredini može biti protektivan za razvoj astme, multicentrična studija Sprječavanje alergijskih rizičnih činitelja za senzibilizaciju djece koji su povezani sa životom na farmama te antropozofičnim načinom života (PARSIFAL<sup>129</sup>, engl. Prevention of allergy risk factors for sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle) pokazala je da uzgajanje ovaca na poljoprivrednom gospodarstvu povećava rizik za atopijsku astmu i zviždanje (OR 1,72) te se može reći da nisu sve ruralne sredine povezane sa zaštitom od nastanka alergije.

#### 1.5.2.3. Dijeta

Porast prevalencije astme povezuje se i sa antioksidacijskom hipotezom<sup>130</sup>. Prijelaz s tradicionalne na modernu prehranu u zapadnim zemljama imao je za posljedicu manji unos antioksidansa<sup>130</sup> kao što su vitamin C i E, karotenoidi, flavonoidi i minerali (selen i cink) što se prema nekim istraživanjima povezuje s većom incidencijom astme u djece<sup>131, 132</sup>. Ovi rezultati ipak nisu potvrđeni pa tako Cochraneov sažetak pokazuje da nema dovoljno dokaza za preporučavanje nadomjesne terapije vitaminom C te nalaže potrebu za longitudinalnim praćenjem. Nadalje, u nekim radovima, porast prevalencije astme, atopijske senzibilizacije i upale povezuje se s povećanom konzumacijom polinezasićenih masnih kiselina (PUFAs, engl. *Polyunsaturated fatty acid*) i smanjenom konzumacijom zasićenih masnoća<sup>133</sup>. Proveden je mali broj istraživanja, a dobiveni rezultati su neujednačeni. ω-6 PUFAs, kao što je linoleinska kiselina, ima važnu ulogu u regulaciji imunog odgovora i upale. Linoleinska kiselina

je prekursor prostaglandinu E<sub>2</sub> koji inhibira interferon- $\gamma$  i potiče stvaranje upalnog okoliša što je bitno za razvoj astme<sup>134</sup>.

Nasuport tomu,  $\omega$ -3 PUFAs (nalazi se u ribljem ulju) ima protuupalni učinak<sup>134</sup>.

Također, analizirala se povezanost brze prehrane te mediteranske prehrane sa simptomima astme. Pretpostavljalo se da mediteranska prehrana ima protektivan učinak<sup>135</sup>, a brza prehrana čini rizik<sup>136</sup>, ali rezultati nisu pouzdani zbog nedostatka longitudinalnih istraživanja.

#### 1.5.2.4. Prehrana majčinim mlijekom

Utjecaj majčinog mlijeka na pojavu astme pokazao je u provedenim istraživanjima neujednačene rezultate.

Kramer i sur. uočili su da dojenje smanjuje rizik za razvoj astme, a formule pravljenе od kravljeg mlijeka ili soje povećavaju rizik<sup>137</sup>. Nadalje, isključivo dojenje kroz duže vremensko razdoblje bolje je štitalo dijete od pojave astme<sup>138, 139</sup>. Međutim, neka istraživanja nisu potvrdila ovu hipotezu; dojenje nije imalo protektivan učinak posebno kada bi se uzela u obzir dugoročna prognoza pojave astme. Štoviše, prehrana majčinim mlijekom ponekad je imala rizičan učinak<sup>140, 141</sup>.

#### 1.5.2.5. Probiotici

Ljudski probavni sustav kod rođenja je sterilan, a potom se ubrzano kolonizira uz istovremeni razvoj imunološkog sustava. Kolonizacija probavnog sustava različitim mikrobima povezana je s načinom života i zemljopisnim činiteljima, a može bitno utjecati na prevalenciju alergija u svijetu. Postoje očite razlike tijekom prvog tjedna života u sastavu crijevne flore između zdrave novorođenčadi i novorođenčadi koja kasnije ima kliničke simptome alergije što upućuje na važnost crijevne flore za razvoj bolesti<sup>142</sup>. Nekoliko istraživanja upućuje na to da probiotici, ako se koriste kao dodatak prehrani, mogu biti učinkoviti u prevenciji rane atopije kod djece mijenjajući crijevnu floru i regulirajući upalni odgovor<sup>143, 144</sup>. Unatoč dokazima koji upućuju na



pozitivan učinak nekih probiotika još uvijek je upitna vrsta bakterija, doziranje, najbolji put i vrijeme primjene probiotika.

### **1.6. Međudjelovanje gena i okoliša u astmi**

Složen odnos u razvoju astme temelji se na genetskoj predispoziciji te na izloženosti okolišu na čega je posljednjih desetak godina bila usmjerena velika pozornost u brojnim istraživanjima. Uz okoliš, genetska predispozicija djeteta ima ključnu ulogu u razvoju astme. Uočeno je da različiti okolišni činitelji u međudjelovanju s genetskom predispozicijom djeteta, daju specifične ishode. Posebno je važno prenatalno razdoblje, gdje se rizični činitelji manifestiraju već u maternici<sup>55</sup> ili pak utječu putem epigenetskih modifikacija<sup>145</sup>. Sve je više dokaza da je epigenetska regulacija, koja dolazi nakon izlaganja okolišnim činiteljima, vrlo važna u razvoju astme. Djeca prolaze stalan proces razvoja i sazrijevanja zbog čega je veoma važno njihovo vrijeme izlaganja okolišnim činiteljima. Opisuju se tzv. "prozori mogućnosti" u pojedinim razvojnim fazama djeteta kada oni mogu biti posebno osjetljivi na vanjske utjecaje. Ove spoznaje upućuju na zaključak da za prevenciju astme, određene intervencije u nekih osoba mogu biti korisne, a u nekih štetne<sup>146</sup>.

## 1.7. Genetika astme

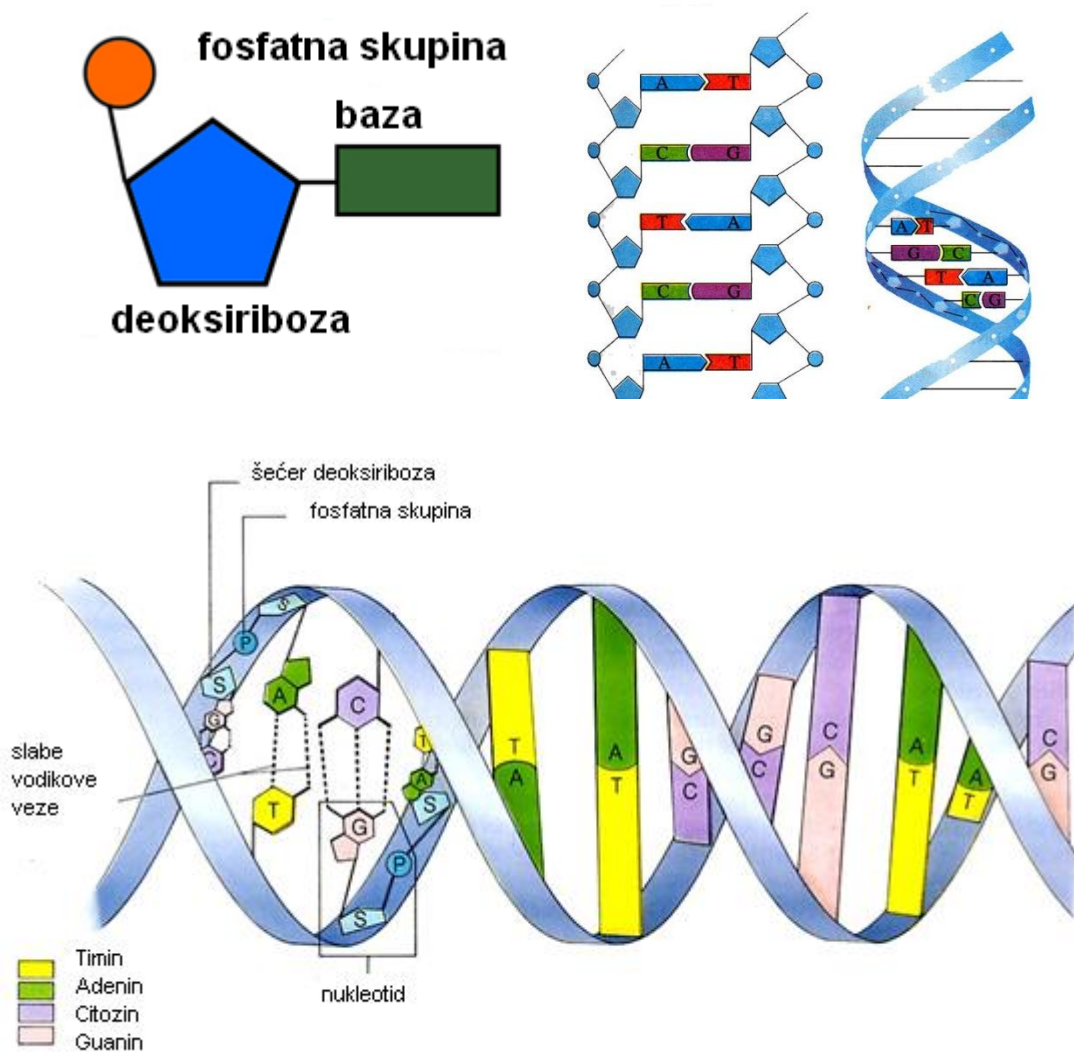
### 1.7.1. Ljudski genom

Ljudski genetski materijal (DNK) sastoji se od dva dugačka polimera koja se međusobno pružaju u suprotnim smjerovima, a sastavljeni su od nukleotidnih monomera s kosturom izrađenim od šećera (2 -deoksiriboze) i fosfatnih skupina spojenih esterskim vezama (Slika 2). Jedna od četiri vrste molekula, tzv. baza - adenin (A) gvanin (G), timin (T) ili citozin (C), spojena je na svaki šećer. DNK sadrži nekoliko milijardi parova baza, a haploidni ljudski genom ima ~30 000 gena za kodiranje proteina<sup>147, 148</sup>. Manje od 5 % genoma obuhvaća sekvence koje kodiraju proteine. Postoje dvije kopije svakog gena zbog nasljeđa seta kromosoma od svakog roditelja.

Premda je sekvenca DNK svake osobe specifična (osim kod monozigotnih blizanaca), ipak je približno 99,6 % sekvence među ljudima jednako<sup>149, 150</sup>. U ~0,4 % ljudskog genoma još uvijek postoje milijuni razlika (razlika između bilo koje dvije osobe je ~ 24 milijuna parova baza) među milijardama parova baza koje su odgovorne za nasljedne varijacije u fenotipovima, a sudjeluju u odgovoru na okoliš kao i na osjetljivost za pojedine bolesti<sup>149-151</sup>.

Navedene varijacije sekvenci mogu imati različite oblike kao što su velike kromosomske insercije/delecije, translokacije, inverzije ili amplifikacije, ali i manje promjene kao što su mutacije koje uključuju jednostavne točkaste mutacije i umetanja ili brisanja jednog ili više nukleotida u DNK-u.

Slika 2: Struktura DNK i nukleotida



\*preuzeto i modificirano prema:

Structure of DNA nucleotides. <http://scienceaid.co.uk/biology/genetics/images/nucleotide.jpg>.

(Preuzeto 25.9.2016.)

Structure of DNA. <http://pixshark.com/structure-of-dna-labeled.htm> (Preuzeto 25.9.2016.)

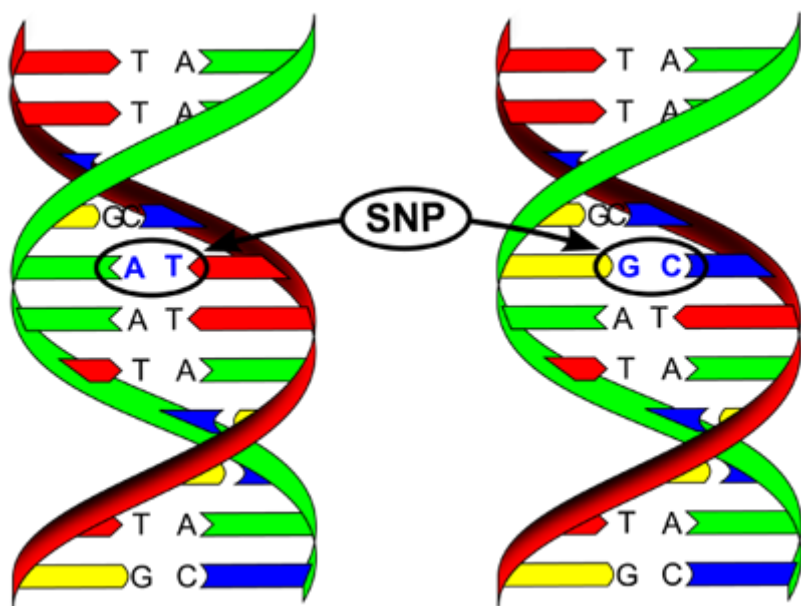
Biology Notes Help. STRUCTURE OF DNA. <http://ehrig-privat.de/ueg/images/dna-structure.jpg>

(Preuzeto 25.9.2016.)

Najčešći tip varijacija sekvence u ljudskom genomu (~90 %) je genetska varijanta koju nazivamo jednonukleotidni polimorfizam ili polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*). Ima ih oko  $1,42 \times 10^6$  i javljaju se u prosjeku svakih 1000 - 2000 baza<sup>151</sup>.

SNP je dio sekvence za koji postoji dva ili više alternativna alela (različitih baza) sa značajnom frekvencijom (> 1 %) u ljudskoj populaciji (Slika 3)<sup>147, 151</sup>. Procijenjeno je da se 60 000 SNP-ova nalazi u egzonima (kodirajućim i netranslatiranim regijama), ali većina se nalazi u nekodirajućim regijama DNK<sup>151</sup>.

Slika 3: Jednonukleotidni polimorfizam (SNP, engl. *Single nucleotide polymorphism*)



ViaGene. Available Technologies for Preimplantation Genetic Testing.

<http://www.viagenefertility.com/photos/snp.png> (preuzeto 25. rujna 2016.)

SNP-ovi koji se nalaze u egzonima, tj. regijama kodiranja proteina mogu rezultirati značajnim promjenama u slijedu DNK što može mijenjati aminokiselinsku strukturu proteina. Ovi SNP-ovi mogu biti nijemi (ili sinonimni) kada kodiraju istu aminokiselinu, bez da se mijenjaju proteini, ili

pak nesinonimni kada kodiraju različite aminokiseline i pri tome im mijenjaju strukturu/funkciju proteina. Nadalje, postoje SNP-ovi koji preuranjeno kodiraju „stop kodon“ (tako mogu skratiti proteine koji obično postanu nefunkcionalni). Umetanje ili brisanje jednog nukleotida u DNK može prouzročiti pomak okvira za čitanje, što može rezultirati značajnom promjenom genskog produkta. SNP u promotorskoj regiji može utjecati na izražavanje gena ili na proizvedenu količinu proteina što se zbiva u različitim okolnostima. SNP-ovi u nekodirajućim regijama koji su znatno učestaliji (uključujući introne) također mogu dovesti do određenih posljedica iako im učinak nije dovoljno jasan (npr. mogu utjecati na alternativno spajanje mRNA ili učinkovitost mRNA pretvorbe)<sup>152</sup>.

Učestalost alela unutar populacije u nesrodnih osoba (izmjerena prilikom genotipizacije) treba se podudarati s frekvencijom genotipova uočenom prema Hardy-Weinberg ravnoteži, pravilu, zakonu, teoremu, modelu (HWE, engl. Hardy-Weinberg equilibrium, Hardy-Weinberg law)<sup>153</sup>. U HWE-u frekvencije alela i genotipova će u populaciji, iz generacije u generaciju, ostati jednake ako nema drugih evolucijskih utjecaja kao što su izbor partnera, mutacija, selekcija, genetičko razilaženje (*genetic drift*), prenošenje gena (*gene drive*), itd. S obzirom na to da je u određenim populacijama prisutno više sličnih utjecaja, HWE opisuje idealno stanje s kojim se mogu uspoređivati i analizirati učinci evolucijskih utjecaja. Odstupanje od učestalosti alela prema HWE-u je pokazatelj da se koncepcija ne događa po slučajnom izboru (postojanje potomstva srodnih partnera) ili ukazuje na pogrešku tijekom genotipizacije zbog čega je HWE važan za kontrolu kvalitete.

### 1.7.2. Neravnoteža povezanosti, haplotipovi i SNP-ovi koji označavaju haplotipove

*Neravnoteža povezanosti (LD, engl. linkage disequilibrium)* ili neslučajna udruženost alela<sup>154-156</sup> predstavlja pojavnost dva alela u kromosomskom segmentu, češće nego što bi se očekivalo u slučaju neovisnog nasljeđivanja u populaciji. Pojedinci koji nose određeni alel/SNP na jednom mjestu često predvidljivo nose točno određene druge alele blizu promatranog alela. LD u genetičkim istraživanjima ima ulogu kod objašnjavanja dobivenih povezanosti, a može se izraziti kao  $D$  ili kao  $r^2$  koji označavaju kvadrat korelacijskog koeficijenta između alela smještenih na dva lokusa<sup>157</sup>. Kada nastane nova varijanta alela zbog mutacije, ona je u početku vezana za jedinstveni kromosom na kojem se mutacija dogodila. Obilježena je jasnom kombinacijom genetičkih varijanti koje su prisutne u kromosomu s kojim će biti naslijeđena. Učestalost nove mutacije u stanovništvu može se povećati kroz selekciju ili genetičko razilaženje Mejotske rekombinacije između roditeljskih kromosoma i mutacije postupno narušavaju ovu povezanost, ali se to događa jako polako u odnosu na broj generacija od kada se dogodila prva mutacija. To dovodi do progresivnog razdvajanja između ove i drugih mutacija, a tek nakon mnogih generacija zajedno će ostati samo fizički bliske mutacije i neće biti nasumično raspoređene.

Linearna kombinacija alela na multiplim lokusima koji se prenose zajedno na jednom kromosomu zove se haplotip. Da bi se promjenila funkcija gena i tako odredio fenotip, vjerojatnije je da je potreban haplotip umjesto pojedinog SNP-a. Unutar bilo koje kromosomske regije mogu se prepoznati tag-SNP-ovi. Tag-SNP je reprezentativni jednonukleotidni polimorfizam (SNP) u genomske regiji s visokim LD-om koji predstavlja skupinu SNP-ova koji se zovu *haplotip*. Uz njihovu pomoć moguće je identificirati genetske varijacije i povezanosti s fenotipom bez genotipiziranja svakog SNP-a u kromosomskoj regiji. Definicija tag-SNP-ova ovisi o poznavanju LD-a unutar genetske regije i unutar populacije koja se proučava. Označavanje („tagiranje“) SNP-ova učinkovito je samo kod hvatanja uobičajenih genetskih varijanti jer potrebno je sekvenciranje velikog broja ispitanika da se utvrde rijetki

polimorfizami. Štoviše, čak i za one koji imaju  $MAF < 5\%$  i koji su do sada identificirani (npr. u HapMap) nije vjerojatno da je njihov LD točan.

LD dovoljno snažan da bude koristan u mapiranju gena proteže se općenito na ograničenim udaljenostima, uglavnom 50 - 100 kB. Stoga, nalaz snažne povezanosti SNP-ova i bolesti je pokazatelj da se mutacija koja uzrokuje bolest nalazi najviše ~ 100 kB u oba smjera.

LD je važan u genetskim istraživanjima kao povezanost između genetskog markera i fenotipa bolesti, ali ne znači nužno da genetska varijacija unutar markera uzrokuje bolest već samo da je naslijeđena s varijantom koja uzrokuje bolest jer se oba lokusa nasljeđuju kao jedna jedinica.

### 1.7.3. Genetska istraživanja složenih bolesti

Složene bolesti uzrokovane su međudjelovanjem načina života s većinom još nepoznatih genetskih i okolišnih činitelja. Ovoj kategoriji pripada astma (ali i multipla skleroza, osteoporoza, Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, bolesti vezivnog tkiva, bolesti bubrega, autoimune bolesti i mnoge druge bolesti)<sup>158</sup>. "Složena osobina" odnosi se na bilo koji fenotip koji ne pokazuje klasični mendelovski recesivni ili dominantni oblik nasljeđivanja, a koji bi se mogao pripisati samo jednom genskom lokusu. To se obično događa kada različiti genotipovi mogu rezultirati istim fenotipom ili isti genotip može dovesti do različitih fenotipova (zbog utjecaja okoliša ili interakcije s drugim genima)<sup>159</sup>. Poznato je da složene bolesti ne prate Mendelove obrasce nasljeđivanja. Premda nasljeđujemo gene koje povezujemo s bolestima, genetski činitelji predstavljaju samo dio rizika koji se povezuje sa složenim fenotipovima bolesti, zbog čega osoba s genetskom sklonošću ne mora nužno razviti bolest (tj. ima genetsku prijemčivost za razvoj određene bolesti). Genetske i okolišne činitelje treba istraživati u međudjelovanju<sup>160</sup>. S obzirom na to da ne možemo mijenjati naše gene, možemo mijenjati okoliš i stil života s ciljem sprečavanja ili odgode poremećaja<sup>161</sup>.

### 1.7.4. Genetika astme

Nasljeđe ima važnu ulogu u patofiziologiji astme, a obrazac nasljeđivanja nije klasičan, mendelski<sup>162, 163</sup>. Nasljednost proizilazi iz puno gena s umjerenim do malim učinkom, a niti jedan gen nema presudan učinak u određivanju fenotipa astme<sup>164</sup>. Istraživanja na blizancima (provedena u Australiji, Engleskoj i skandinavskim zemljama u periodu od 1990. - 2001. godine), pokazala su da je utjecaj nasljedne komponente 48 - 79 %<sup>162</sup>. Veliki broj genetskih studija identificirale su određene kromosome povezane s astmom i alergijskim fenotipovima. Najčešće replicirane regije ljudskog genoma bile su: 5q31-32, 6p21, 11q12-13, 16p11-12, i



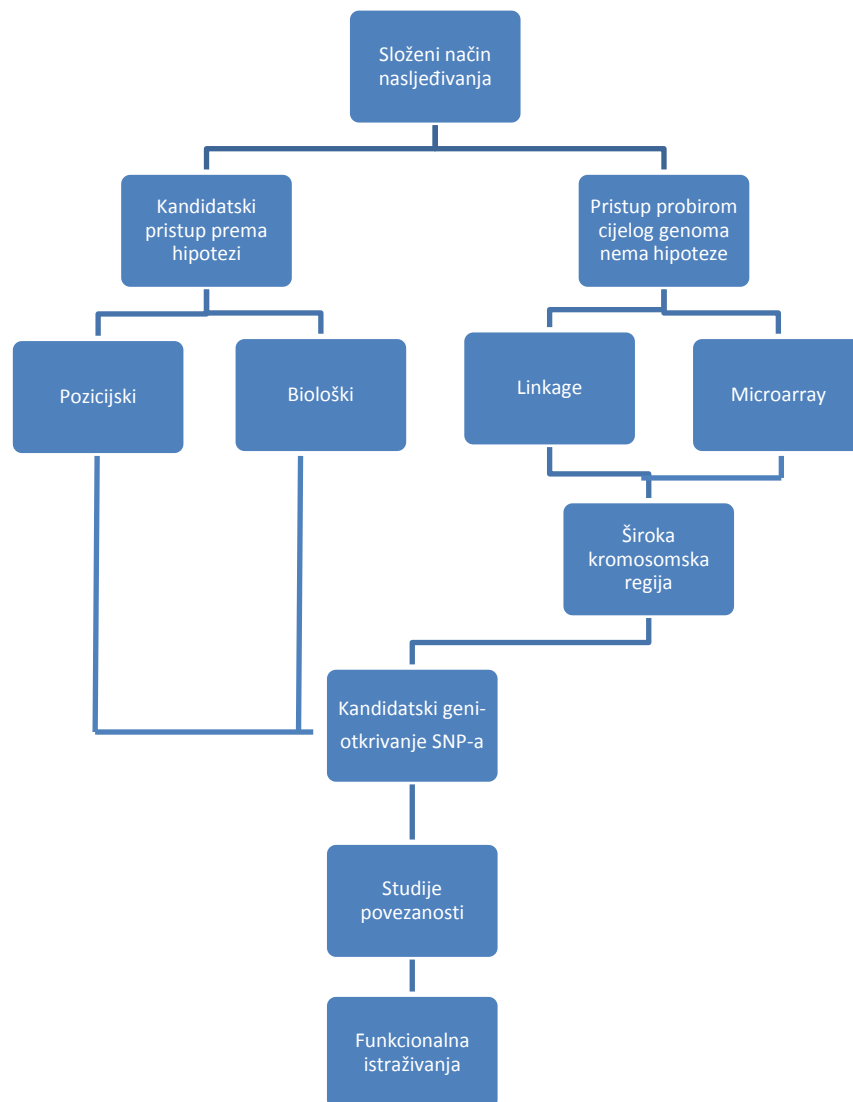
20p13. Prepoznato je više od 100 gena koji se danas povezuju s astmom<sup>163, 165-169</sup>, a manje od 50 ih je uspješno replicirano u više populacija.

#### 1.7.4.1. Genetska istraživanja povezanosti

U genetskim istraživanjima povezanosti za astmu općenito se koriste dva različita pristupa u otkrivanju genetske osnove astme (Slika 4)<sup>170</sup>:

- Pristup probirom cijelog genoma (engl. *Genome-wide screen (GWS) approach*)
- Pristup putem kandidatskih gena (engl. *Candidate-gene approach*)

Slika 4: Metode otkrivanja gena za koje se sumnja da sudjeluju u nastanku astme (modificirano prema <sup>170</sup>)



#### 1.7.4.1.1. *Pristup probirom cijelog genoma (GWS, engl. Genome-wide screen approach)*

Probir cijelog genoma koristi se za otkrivanje novih gena povezanih s nekom bolesti ili fenotipom kada nije poznata lokacija odgovornog gena, tj. kada nemamo unaprijed postavljenu hipotezu<sup>170</sup>.

##### 1.7.4.1.1.1. *Genome-wide Linkage studije*

*Linkage studies*, imale su veliki uspjeh u identificiranju gena koji uzrokuju monogenetske bolesti i puno su obećavale u proučavanju kompleksnih bolesti kao što je astma. *Genome-wide linkage studies* izvode se pretraživanjem genoma obitelji ili parova blizanaca u kojima se pojavljuje određena bolest (ili fenotip) putem DNK markera s ciljem prepoznavanja genetske regije vezane za taj fenotip<sup>171</sup>. Neuspjeh repliciranja u *Linkage studijama* povezan je niskom statističkom snagom zbog malog uzorka i potencijalne statističke greške (tip I i tip II)<sup>172, 173</sup>. Prednost *Linkage studija* je mogućnost identificiranja novih gena i patofizioloških putova te gena s većim fenotipskim efektima.

##### 1.7.4.1.1.2. *Istraživanja povezanosti cijelog genoma (microarray)*

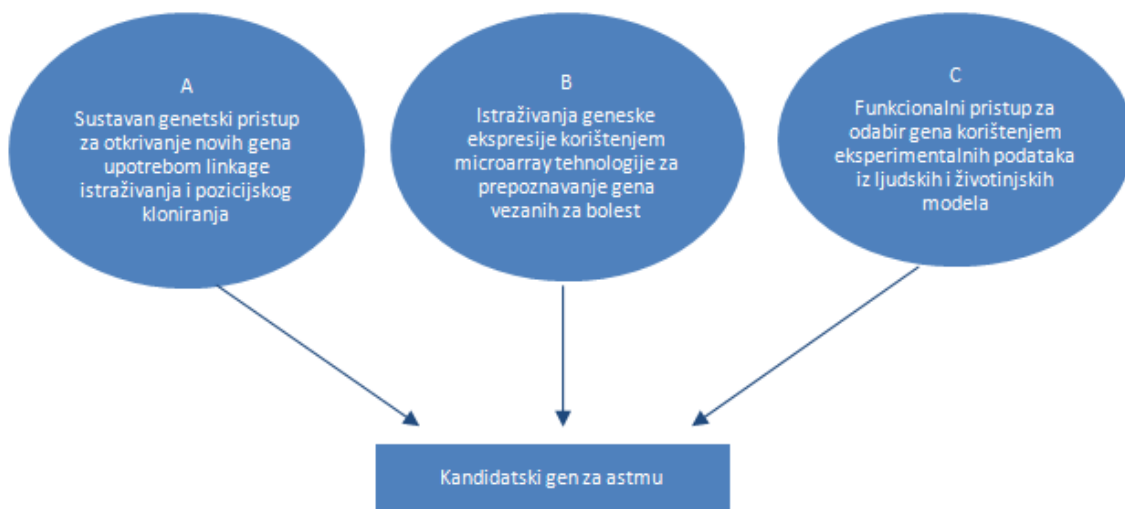
Istraživanje povezanosti cijelog genoma (GWAS, engl. Genome-wide association studies) je relativno nov način prepoznavanja gena vezanih za ljudske bolesti. Ovom metodom pretražuje se cijeli genom u potrazi za malim varijacijama SNP-ova koji se pojavljuju češće u bolesnih (ispitanici) nego u onih bez bolesti (kontrolna skupina). Studija analizira stotine ili tisuće SNP-ova u isto vrijeme. Dobiveni rezultati otkrivaju pojedinačne gene koji pridonose riziku za razvoj određene bolesti. S obzirom na to da istraživanja povezanosti genoma traže polimorfizme u cijelom genomu, predstavljaju metodu u kojoj pojedinačne genetske varijante pridonose riziku od bolesti<sup>170</sup>. Buduće GWAS studije trebaju identificirati još SNP-ova povezanih s kroničnim bolestima te odgovorom na terapiju. Prigovori ovom pristupu su: nedovoljna veličina uzorka, neuspjeh prikupljanja i fenotipiziranja na isti način kod ispitanika i njihove kontrolne skupine te neuspjeh ponavljanja ranijih rezultata<sup>173</sup>. Prva GWAS studija za astmu u djece objavljena je 2007. godine<sup>174</sup> gdje je uočena povezanost SNP-ova i gena ORMDL3 (gen sličan ORM1

proteinu 3, engl. *ORM1-like protein 3 gene*). Ove studije imaju prednost u odnosu na istraživanja povezanosti kandidatskih gena jer mogu prepoznati nove gene i patofiziološke putove. Imaju prednost i prema *linkage* studijama jer mogu prepoznati gene s malim učinkom. S obzirom na to da GWAS studija zahtijeva upotrebu više stotina SNP-ova, ovim se pristupom može locirati regija manja od 500 kB što nije moguće u *linkage* studijama.

#### 1.7.4.1.2. Pristup putem kandidatskih gena

Kandidatski gen definira se kao onaj koji je lociran u određenoj kromosomskoj regiji i za njega se pretpostavlja da ima utjecaj u izražavanju određene bolesti. Na identifikaciju gena može upućivati i njegov proteinski produkt.

Slika 5: Kako gen postaje kandidatski (modificirano prema<sup>165</sup>)



Istraživanja kandidatskog gena zasnivaju se na odabiru onih kandidatskih gena prema hipotezi koja se temelji na dosadašnjem znanju o bolesti (C-biološki pristup) ili odabiru kandidatske genske regije koja je ranije povezana s određenom bolesti (A, B-pozicijski pristup)(Slika 4 i 5)<sup>165</sup>. To je najjednostavniji pristup jer se veliki broj osoba može genotipizirati

u različito dizajniranim istraživanjima (npr. presječne studije, ispitanik-kontrola istraživanja), a učinkovitiji je s obzirom na utrošeno vrijeme i novac. Zasniva se na usporedbi incidencija pojedine genetske varijante kandidatskog gena u populaciji s određenom bolesti i populacije koja nema navedenu bolest<sup>175</sup>. Nedostatci su ograničen broj kandidatskih gena i malo repliciranih rezultata<sup>166</sup>. Poseban interes istraživača usmjeren je na astmu i alergijske bolesti. Tako su Ober i Hoffjan<sup>167</sup> saželi 500 članaka o utjecaju gena u astmi (objavljeni do kraja 2005. godine) gdje je analizirano više od 100 gena. S obzirom na to da su replicirani u šest ili više nezavisnih istraživanja, autori su izdvojili 25 gena koji su vjerojatno vezani za astmu. Nadalje, u 2006. godini otkriveno je još 53 kandidatska gena za astmu i pridružene osobine<sup>169</sup>. Interes istraživača i dalje je velik, pa je tako Vercelli D.<sup>168</sup> ponovno sažela objavljenu literaturu do prosinca 2007. godine. Na vrhu ljestvice kandidatskih gena, s najvećim brojem pozitivnih replikacija, bili su geni beta-2-adrenergički receptor (ADRB2 engl. *Adrenoceptor Beta 2*) s više od 40 izvještaja), receptor interleukina 4 (IL4R, engl. *interleukin 4 receptor*) i Glavni kompleks tkivne podudarnosti klase II, DR beta 1 (HLADRB1 engl. *Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1*); s otprilike 30 izvještaja za svaki). Studije se i dalje provode te je do danas izvedeno više od 1000 istraživanja genetskih povezanosti s astmom i alergijskim bolestima.

#### 1.7.4.2. Astma i regija 17q

U dječjoj populaciji uočena je velika povezanost između astme i gena na kromosomu 17q<sup>174</sup> i kromosomu 5q (ADRB, IL13 i IL14)<sup>163</sup>. *Linkage* studije cijelog genoma (provedene 2000. godine) povezale su 17q21 regiju s astmom<sup>176, 177</sup> (tablica 2) što je potvrdilo istraživanje povezanosti cijelog genoma (GWAS) s astmom (Moffatt i sur. 2007. godine)<sup>174</sup>. Isti rezultati replicirani su u nastavku istraživanja na dvije nezavisne populacije (engleskoj i njemačkoj)<sup>174</sup>. Studije povezanosti kandidatskih gena koje su pratile prvu GWAS studiju u većem broju etnički različitih populacija potvrdile su povezanost astme i genetskih varijanti u ovoj regiji<sup>70, 177-184</sup>.

Nadalje, povezanost istog lokusa s pojavom astme u dječjoj dobi potvrđeno je u drugoj, većoj GWAS studiji pod nazivom Multidisciplinarno istraživanje za prepoznavanje genetskih i okolišnih uzroka astme u Europskom društvu (GABRIEL consortium, engl. *A Multidisciplinary Study to Identify the Genetic and Environmental Causes of Asthma in the European Community*) ( SNP rs2305480,  $P = 6 \times 10^{-23}$ )<sup>185</sup>. Daljnja analiza u istraživanju Moffatt i sur. nakon GWAS studije pokazala je da varijante u ovoj regiji određuju ekspresiju gena ORMDL3 u Epstein–Barr virusu - transformiranih limfoblastoidnih staničnih linija djece s astmom što upućuje na to da je ORMDL3 potencijalni kandidatski gen za astmu te da je SNP (rs7216389) potencijalna uzročna genetska varijacija. Iznenađujuća je bila spoznaja da je polimorfizam rs7216389 na lokusu 17q21 bio lociran izvan gena ORMDL3<sup>174</sup>.

Rs7216389 otkriven je u LD bloku koji osim gena ORMDL3 uključuje i gen Gasdermin B (GSDMB, engl. gasdermin B gene), gen zona pellucida vežući protein 2 (ZPBP2, engl. zona pellucida binding protein 2), gen IKAROS obitelj zinkovog prstena 3 (Aiolos), IKZF3 (engl. IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos) gene), gen Gasdermin A, GSDMA (engl. gasdermin A gene) i gen topoisomerase II (TOP2, topoisomerase II gene). Rezultati istraživanja drugih autora koji su analizirali povezanost za astmu u ovoj regiji nisu uvijek bili ujednačeni u različitim populacijama i ostaje nejasno koji gen/i u ovoj regiji je/su uzročno povezan/i s

astmom i koji SNP-ovi su funkcionalni. Unatoč nejednakostima otkrivenim u genetskim studijama koje povezuju gen ORMDL3 s astmom uočena je konstantna povezanost između SNP-ova u regiji 17q21 i astme što predstavlja snažan dokaz da je on stvarni rizik za astmu (tablica 3).

Prospektivno istraživanje astme u djece (Bisgaard i sur.)<sup>178</sup> pokazalo je da su rana pojava astme kao i povećan rizik za teške egzacerbacije povezani sa SNP-ovima na lokusu 17q21 što je potvrdio Bouzigon i sur.<sup>70</sup>. Kao rizik za razvoj astme u daljnjim istraživanjima analizirano je međudjelovanje nekih genetskih varijacija u ovoj regiji s pušenjem. Iako je dobivena pozitivna korelacija<sup>70, 186</sup>, replikacija rezultata nije bila ujednačena<sup>187, 188</sup>.

Tablica 2: Objavljene *linkage* studije za povezanost regije 17q12-21 s astmom i plućnom funkcijom

Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Dizajn istraživanja	Astma	Plućna funkcija
Dizier 2000.g. <sup>176</sup>	107 francuskih obitelji s najmanje 2 djece (braće ili sestara) s astmom 493 ispitanika (EGEA Study)	GWS i <i>linkage</i> analiza	17q12-21	Nije opisano
Ferreira 2005.g. <sup>177</sup>	202 australijske obitelji 591 ispitanik	GWS i <i>linkage</i> analiza	17q21	17q25 FEV1
Dizier 2007.g. <sup>186</sup>	295 francuskih obitelji -najmanje jedno dijete s astmom 726 braće i sestara (EGEA Study)	GWS i <i>linkage</i> analiza GEI (pasivno pušenje)	17q21	Nije opisano

Tablica 3: Objavljena istraživanja povezanosti regije 17q12-21 s astmom i plućnom funkcijom

Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Dizajn istraživanja	Istraživani SNP-ovi	SNP-ovi povezani s astmom	SNP-ovi povezani s plućnom funkcijom
Moffatt, 2007.g. <sup>174</sup>	<p>994 djece s astmom Velika Britanija i Njemačka</p> <p>1243 kontrolnih ispitanika bez astme Velika Britanija i Njemačka</p> <p>207 obitelji s ispitanikom s teškom astmom iz Velike Britanije</p> <p>200 djece s astmom 2120 kontrola bez astme Njemačka</p> <p>301 Euroazijska populacija Velika Britanija kohortno istraživanje</p>	<p>GWAS</p> <p>FBAT - family-based association test</p> <p>ispitanik-kontrola</p> <p>ispitanik-kontrola</p>	<p>Illumina Sentrix HumanHap 300 BeadChip</p> <p>307328 SNP-ova</p> <p>Illumina Sentrix Human-1 BeadChip 91293 SNP-a 116 SNPs iz 17q21</p> <p>rs9303277 rs11557467 rs2290400 rs7216389 rs4795405 rs8079416 rs4795408 rs3894194 rs3859192 rs3894194</p>	<p>7 SNP-ova prošlo granicu p&lt;0.01 FDR rs9303277 rs11557467 rs8067378 rs2305480 rs2290400 rs7216389 rs4795405</p> <p>nekoliko SNP-ova u 17q21</p> <p>rs9303277 (T) rs11557467 (T) rs2290400 (G) rs7216389 (C) rs4795405 (T) rs8079416 (T) rs4795408 (G) rs3894194</p>	<p>Nije istraživano</p>



Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Dizajn istraživanja	Istraživani SNP-ovi	SNP-ovi povezani s astmom	SNP-ovi povezani s plućnom funkcijom
Madore, 2008.g. <sup>182</sup>	253 francusko-kanadskih obitelji s djetetom s astmom 1275 ispitanika	istraživanje obitelji	rs11557467 rs2305479 rs2209400 rs7216389 rs9303281 rs7219923 rs4378650 rs8076131 rs6503525	rs2305479(A) rs2209400(G) rs7216389(C) rs9303281(A) rs7219923(C) rs4378650(C) rs8076131(A)	nije istraženo
Galanter, 2008.g. <sup>179</sup>	701 portorikanski i meksički roditelj i djeca s astmom (GALA Study)  264 African-American subjects with asthma and 176 healthy controls (SAGE Study)	istraživanje obitelji  ispitanik-kontrola	rs7216389 rs4378650 rs8076131 rs12603332 rs3744246 rs11650680 rs3859192  rs7216389 rs4378650 rs8076131 rs12603332 rs3744246 rs11650680 rs3859192 rs9894164	rs7216389(T) rs4378650(C) rs8076131(A) rs12603332(C) rs3744246(C)  rs4378650(C) rs12603332(C) rs11650680 (T)	nema povezanosti  rs4378650(C) rs12603332(C) s bronhodilatacijskim testom

Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Dizajn istraživanja	Istraživani SNP-ovi	SNP-ovi povezani s astmom	SNP-ovi povezani s plućnom funkcijom
Hirota, 2008.g. <sup>180</sup>	545 djece s atopijskom astmom 738 odraslih kontrola Japan	ispitanik-kontrola	rs7216389	rs7216389(T)	nije istraženo
Tavendale, 2008.g. <sup>184</sup>	1054 djece i mladih odraslih s astmom 1465 kontrola populacija sjeverne Europe	ispitanik-kontrola	rs7216389 astma, egzacerbacije astme težina astme	rs7216389(T) FEV1 FVC PEFR	nema povezanosti
Sleiman, 2008.g. <sup>183</sup>	807 djece s astmom 2583 kontrole SAD - bijelci  1456 djece s astmom 1973 kontrola Afroamerikanci	ispitanik-kontrola  ispitanik-kontrola	rs9303277 rs11557467 rs8067378 rs2290400 rs7216389 rs4795405  rs8079416 rs3894194 rs3859192	rs9303277 (T) rs11557467 (T) rs8067378 (G) rs2290400 (G) rs7216389 (C) rs4795405 (T) rs8079416 (C)  nema povezanosti	nije istraženo  nije istraženo

Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Dizajn istraživanja	Istraživani SNP-ovi	SNP-ovi povezani s astmom	SNP-ovi povezani s plućnom funkcijom
Bouzigon, 2008.g. <sup>70</sup>	372 francuske obitelji član ima astmu 1511 ispitanika rana izloženost pušenju	istraživanje obitelji  procjena rane izloženosti pušenju	36 SNP-ova	rs9303277 (C) rs11557467(G) rs8069176(G) rs2305480(G) rs2305479(C) rs4795400(C) rs9303281(A) rs7219923(T) rs8076131(A) rs4795405(C) rs4794820(G) astma i rana pojava astme  snažnija povezanost kod rane izloženosti pušenju	nema povezanosti s FEV1
Flory, 2009.g. <sup>187</sup>	920 djece s astmom 3804 kontrola SAD- bijelci  1844 djece s astmom 3488 kontrola Afroamerikanci	ispitanik-kontrola procjena učinka izloženosti pušenju u ranom životu  ispitanik-kontrola procjena učinka izloženosti pušenju u ranom životu	rs9303277 rs11557467 rs8067378 rs2305480 rs2290400 rs7216389 rs4795405 rs8079416 rs3894194 rs3859192	rs9303277 rs11557467 rs8067378 rs2305480 rs2290400 rs7216389 rs4795405 rs8079416 rs3894194 rs3859192 rs8079416	nije istraženo        nije istraženo

Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Dizajn istraživanja	Istraživani SNP-ovi	SNP-ovi povezani s astmom	SNP-ovi povezani s plućnom funkcijom
Bisgaard, 2009.g. <sup>178</sup>	376 kohorta nizozemske djece Iz kohorte COPSAC od rođenja 549 roditelja  305 danskih COPSAC majki i 244 oca 1500 kontrola iz Velike Britanije iz kohorte od rođenja	istraživanje obitelji  ispitanik-kontrola	20 SNP-ova  rs7216389  rs7216389	rs7216389 (T)  Astma (rani početak) egzacerbacije astme ponavljajuće piskanje (rani početak)  rs7216389(T) astma u djetinjstvu	nema povezanosti s FEV0.5 sRaw  nije istraženo
Leung, 2009.g. <sup>181</sup>	315 djece s astmom i 192 kontrole Kina	ispitanik-kontrola	rs3816470 rs7216389 rs17608925 rs3744246 rs6503525 rs1007654 rs3859192 rs11650680	rs11650680(C) rs6503525(C)	nije istraženo
Wu, 2009.g. <sup>188</sup>	615 meksičkih obitelji dijete ima astmu	istraživanje obitelji procjena rane izloženosti pušenju i ozonu	rs4378650 rs7216389	rs4378650(C) rs7216389(T)	nije istraženo

Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Dizajn istraživanja	Istraživani SNP-ovi	SNP-ovi povezani s astmom	SNP-ovi povezani s plućnom funkcijom
Rogers, 2009.g. <sup>189</sup>	SAD - bijelci 403 obitelji s najmanje jednim pogođenim djetetom 1169 ispitanika (CAMP)	istraživanje obitelji	rs2872507(G) rs4795405(C)	rs11557467 rs8067378 rs2290400 rs7216389 rs4795405 rs3744246 rs2872507	nije istraženo
Verlaan, 2009.g. <sup>190</sup>	470 obitelji s djetetom s astmom (CAMP)  412 djece s astmom  Kostarika (GEACR)  253 ispitanika s astmom i njihovi rođaci 1275 ispitanika iz višegeneracijskih obitelji s najmanje jednim članom s astmom francusko-kanadska populacija (SLSJ)	istraživanje obitelji	rs7216389 rs12936231 rs8067378 rs9303277 rs3816470	rs7216389 (T) rs12936231 (C) rs8067378 (A) rs9303277(C) rs3816470 (A)  rs7216389 (T) rs12936231 (C) rs8067378 (A) rs9303277(C) rs3816470 (A)  rs7216389 (T) rs12936231 (C) rs8067378 (A) rs9303277(C) rs3816470 (A)	nije istraženo  nije istraženo  nije istraženo

Istraživanje	Populacija i veličina uzorka	Dizajn istraživanja	Istraživani SNP-ovi	SNP-ovi povezani s astmom	SNP-ovi povezani s plućnom funkcijom
Moffat, 2010.g. <sup>185</sup>	10365 ispitanika s astmom  16110 kontrola  (6783 djece s ranim početkom astme)  (7720 kontrola)	GWAS	582892 SNP-ova	33 SNP-a  najjača povezanost rs2305480 na genu GSDMB  u djece s ranim početkom astme	nije istraženo
Ferreira, 2011.g. <sup>191</sup>	986 ispitanika s astmom  1846 kontrola  Australija	GWAS	561 815 SNP-ova  Illumina 317K, 370K  ili 610K arrays	rs6503525 (C),  najjača povezanost	nije istraženo
Binia, 2011.g. <sup>192</sup>	397 odraslih s teškom astmom  1429 kontrola iz kohorte od rođenja  Velika Britanija, 1958 British Birth Cohort	ispitanik-kontrola	rs7216389	rs7216389  teškom astmom  ranim početkom astme	nije istraženo
Marinho, 2012.g. <sup>193</sup>	831 roditelj djece upisanih u kohortu  od rođenja  i 187 ispitanika s astmom	ispitanik-kontrola	47 SNPs  17q12-21	16 SNP  FDR P<0.01	nema povezanosti

#### 1.7.4.3. ORMDL3

ORMDL pripada novoj obitelji gena, a sastavljen je od tri gena (ORMDL1, ORMDL2 i ORMDL3) koji su izraženi u tkivima odraslih i fetusa, umjereno u gušterači, placenti i mozgu, a malo u mišićima i plućima<sup>194</sup>. Kodiraju transmembranske proteine u endoplazmatskom retikulumu (ER, engl. endoplasmic reticulum), a funkcija im je nejasna<sup>194</sup>. Oskudne su informacije o funkciji proteina kojeg kodira gen ORMDL3, a posljedično tome, ograničene su teorije kako ORMDL3 doprinosi riziku za razvoj astme. Otkriveno je da inhibira Ca<sup>2+</sup> pumpu na sarko-endoplazmatskom retikulumu (SERCA, engl. SERCA, or sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase) i povećava „odgovor stanica na nakupljanje nesmotanih proteina“, UPR (engl. unfolded-protein response)<sup>195</sup> za koji se smatra da je endogeni poticatelj kronične upale kao što je astma<sup>196</sup>. S obzirom na to da je ORMDL3 dio genske obitelji koja kodira transmembranske proteine u endoplazmatskom retikulumu, moguće je da ima ulogu transportera<sup>174</sup>. Također, gen je veoma izražen u limfocitima, pa je moguće da ORMDL3 ima ulogu u imunološkom aspektu astme<sup>184</sup>. Novija istraživanja upućuju da ORMDL3 ima utjecaj na rizik za pojavu astme zbog složenih promjena u metabolizmu sfingolipida<sup>197</sup>.

Provedene studije nisu objasnile mogući utjecaj gena ORMDL3 na razvoj astme, stoga su neophodna daljnja istraživanja funkcije tog gena.

#### 1.7.4.4. GASDERMINI

Genska obitelj gasdermina sastoji se od 4 ljudska gena: GSDMA, GSDMB, GSDMC i GSDMD. Geni GSDMA i GSDMB smješteni su na lokusu 17q21.2, a GSDMC i GSDMD na lokusu 8q24<sup>198</sup>. Gasdermini su vjerojatno uključeni u regulaciju staničnog rasta i diferencijaciju kože i/ili epitela folikula dlaka, kao i u epitelu gastrointestinalnog trakta. Kombinacija GSDM gena može djelovati na finu segmentaciju tako da utječe na konačnu diferencijaciju epitelnih stanica<sup>198, 199</sup>. U ovom radu posebna pozornost usmjerena je na gene GSDMA i GSDMB s obzirom na to da su smješteni na lokusu 17q21.

#### 1.7.4.4.1. GSDMA - Gasdermin A

Ovaj gen izražava se isključivo u diferenciranim stanicama kože, jednjaka, želuca i mliječnih žlijezda<sup>199, 200</sup>. Imaju visoku apoptotičku aktivnost (mehanizam je još uvijek nepoznat) te stoga mogu biti dio regulacijskog puta za usmjeravanje stanica prema apoptozi<sup>199, 200</sup>. Može djelovati kao tumor-supresorski gen (potisnut je u staničnim linijama raka želuca)<sup>201</sup>.

#### 1.7.4.4.2. GSDMB - Gasdermin B

GSDMA ima ograničenu ekspresiju premda su njegovi transkripti identificirani u različitim tkivima, a izražen je i u proliferirajućim i matičnim stanicama<sup>201</sup>. GSDMB otkriven je u želucu, debelom crijevu, gušterači, jetri, slezeni, krvi, kosti, limfnim čvorovima, bubrezima, plućima, mliječnim žlijezdama, mišićima, mozgu, perifernom živčanom sustavu, placenti, prostati, testisima, maternici, timusu, štitnjači i vezivnom tkivu što ukazuje na to da taj gen ne može biti dio izuzetno diferenciranog tkiva. Obitelj Gasdermini nema za organ specifičnu regulaciju, veoma je izražena u T-stanicama (CD8 + i CD4 + (razlikovno obilježje(CD, engl. *Cluster of differentiation*))), umjereno u plućima fetusa, ali ima slabu izražajnost u bronhalnim epitelnim stanicama<sup>202</sup>. Carl-McGrath i sur.<sup>203</sup> su temeljem analize proteinskoga proizvoda gena GSDMB-a, njegove stanične lokalizacije kao i izražavanja na različitim tkivima, pretpostavili da taj protein može biti sekrecijski ili metabolički proizvod uključen u sekrecijski put izlučivanja. Nadalje, izražen je u stanicama tumora jetre, želuca i debelog crijeva<sup>203</sup>. Promijenjena regulacija njegovih srodnih varijanti može biti ili izravno uključena u biologiju tumora ili simptom s rakom povezanih poremećaja u transkripciji ili translacijskim regulacijskim putovima<sup>203</sup>. Novije studije objavljuju da GSDMB može biti onkogen<sup>201</sup>.



#### 1.7.4.5. ZPBP2- Zona pellucida vezni protein 2

ZPBP2 - Zona pellucida vezni protein 2 također se nalazi u lokusu 17q21. Gen ima 7 eksona izraženih u testisu, tumoru zametnih stanica i meduli u mozgu. Kodira sekretorni glikoprotein sastavljen od 316 aminokiselina<sup>204</sup>. Istraživanja na miševima pokazala su da igra ulogu u spermiogenezi (manjak ZPBP2 rezultira slabijom plodnošću)<sup>205</sup>.

#### 1.7.4.6. IKZF3 - IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)

IKZF3 kodira člana obitelji Ikaros protein-cinkovog prsta. Članovi ove obitelji proteina (Ikaros, Aiolos, Helios, Eos i Pegasus) su hematopoetski transkripcijski faktori koji djeluju zajednički u regulaciji razvoja i funkcije limfocita i neophodni su za normalan razvoj prema zrelom i imunokompetentnom stanju<sup>206-209</sup>. Aiolos je različito izražen u ljudskim hematopoetskim staničnim subpopulacijama (najviše u B, T i NK stanicama, a veoma malo u monocitima)<sup>210</sup>. Poremećaj Aiolosa dovodi do povećanja pre-B i nezrelih B stanica i jakog smanjenja recirkulirajućih B stanica<sup>207</sup>, potreban je za stvaranje dugoživućih plazma stanica u koštanoj srži, koji su odgovorne za dugotrajan imunitet<sup>211</sup>. Ikaros i Aiolos imaju funkciju u pregradnji kromatina i deacetiliranju histona u limfoidnim stanicama<sup>209, 212</sup>, a Aiolos je uključen u regulaciju apoptoze putem interakcije s genima Ras i Bcl-XL u citoplazmi i putem transkripcijske kontrole nad ekspresijom gena Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)<sup>213, 214</sup>. Nedostatak Aiolosa povezan je s povišenom razinom serumskih imunoglobulina (uključujući protutijelo klase E, IgE (engl. immunoglobulin E)) što upućuje na to da bi ovaj gen mogao igrati ulogu u autoimunim bolestima<sup>207, 215</sup> i vjerojatno u atopiji.

#### 1.7.4.7. TOP2A - Topoisomerase (DNK) II alpha

TOP2A - Topoizomeraza (DNK) II alfa - kodira DNK topoizomerazu sveprisutni je enzim u jezgri, kontrolira i mijenja topološku strukturu DNK te kromosoma (putem prolaznog razdvajanja dvostruke uzvojnice DNK i njezinog naknadnog ponovnog spajanja)<sup>216, 217</sup>. Sudjeluje u procesima metabolizma DNK (npr. oslobađanje torzijskog stresa)<sup>216, 218, 219</sup>. Postoje dva oblika ovog enzima - alfa (na kromosomu 17q21-22) i beta (na kromosomu 3p24). TOP2A je neophodan za proliferaciju stanica i embrionalni razvoj<sup>220</sup> i vrlo je izražen u brzorastućim stanicama<sup>221</sup> (važan je u primjeni kemoterapije<sup>222-224</sup>, a mutacije ovog gena su povezane s razvojem rezistencije na kemoterapeutike)<sup>225-227</sup>.

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Hipoteza**

Pretpostavlja se da postoji pozitivna povezanost polimorfizma jednog nukleotida (SNP-a) na kromosomu 17q21 i astme u djece u Hrvatskoj. Također, pretpostavlja se da postoji pozitivna povezanost SNP-ova iste kromosomske regije s hospitalizacijom djece uslijed teže kliničke slike astme kao i međudjelovanje SNP-ova regije 17q12-21, pušenja majke u trudnoći ili izloženosti krznanim kućnim ljubimcima i astme u djece u Hrvatskoj.

#### **2.1.1. Ciljevi istraživanja**

##### 2.1.2. Opći cilj

1. utvrditi učinak međudjelovanja okolišnih činitelja i polimorfizma kandidatskih gena, za koje se pretpostavlja da su povezani s astmom u djece, na pojavnost i težinu kliničkog tijeka astme

##### 2.1.3. Specifični ciljevi

2. ispitati povezanost tag-SNP-ova na lokusu 17q12-21 s pojavom astme u dječjoj dobi u Hrvatskoj
3. ispitati povezanost tag-SNP-ova na lokusu 17q12-21 s hospitalizacijom djece uslijed teže kliničke slike astme
4. ispitati međudjelovanje tag-SNP-ova na lokusu 17q12-21 pojave astme (ili njezine težine) i izloženosti duhanskom dimu tijekom prenatalnog razdoblja u djece s astmom
5. ispitati međudjelovanje tag-SNP-ova na lokusu 17q12-21 pojave astme (ili njezine težine) i izloženosti krznanim kućnim ljubimcima (mački i psu) tijekom prenatalnog razdoblja i za vrijeme istraživanja u djece s astmom

### **3. METODE**

#### **3.1. Dizajn i mjesto izvođenja studije**

Ovo istraživanje temelji se na usporedbi ispitanika s astmom i kontrolnom skupinom bez astme (engl. case-control study). Izvedeno je na Odjelu za dječje bolesti Opće bolnice "Dr. Josip Benčević", Slavonski Brod, Hrvatska. Etičke komisije Opće bolnice "Dr. Josip Benčević" i Medicinskog fakulteta u Zagrebu odobrile su istraživanje, a roditelji svih ispitanika dali su pisani informirani pristanak (u nekim situacijama i sami ispitanici).

#### **3.2. Ispitanici**

Istraživanje je obuhvatilo djecu u dobi od 6 do 18 godina s područja Brodsko-posavske županije. Ispitivanu skupinu djece činili su bolesnici s dijagnosticiranom astmom i/ili astmom s drugim atopijskim fenotipovima Alergološke ambulante Odjela za dječje bolesti Opće bolnice «Dr. Josip Benčević» u Slavonskome Brodu. Kontrolnu skupinu činila su djeca koja nemaju astmu.

Kriteriji uključivanja ispitanika s astmom:

- Dijagnoza astme postavljala se prema smjernicama Međunarodnog sporazuma o dijagnosticiranju i liječenju astme [*GINA 2006* smjernice uključuju osobnu i obiteljsku anamnezu, fizikalni pregled bolesnika, objektivno mjerenje plućne funkcije (spirometriju), provokacijski test na koži (kožni ubodni test (*prick test*) na inhalacijske alergene), laboratorijske pretrage (koncentracija ukupnih i specifičnih IgE protutijela u serumu te broj eozinofilnih granulocita u krvi)].

Svakom ispitaniku je subspecijalistica pedijatrijske alergologije i kliničke imunologije (prof. dr. sc. Neda Aberle) postavila dijagnozu astme, a djeca su za vrijeme istraživanja uzimala lijekove za astmu i imali su dva ili više simptoma astme (zviždanje, kašalj, ili oboje) u posljednjih 12 mjeseci.

- Nepostojanje druge akutne i/ili kronične bolesti (dijabetes melitus, neoplastične bolesti, autoimune bolesti itd.)

Kontrolna skupina ispitanika (koji nisu imali astmu) regrutirana je prilikom sistematskih pregleda, preoperacijskih pregleda za manje izabrane kirurške zahvate (strabizam, herniju, fimozu, otapostazu i sl.) te prilikom hospitalizacije zbog neuroloških bolesti i akutnih infekcija mokraćnog sustava.

Kriteriji uključivanja za kontrolnu skupinu ispitanika su :

- Negativan odgovor o pojavljivanju bronhoopstrukcija (zviždanja, otežanog disanja) i drugih alergijskih bolesti u standardiziranom ISAAC-ovom upitniku
- Nepostojanje druge teške i/ili kronične bolesti (dijabetes melitusa, neoplastične bolesti, autoimunosne bolesti itd.)

Ispitanici s astmom i ispitanici u kontrolnoj skupini nisu bili usklađeni po spolu.

### **3.3. Izvori podataka/mjerenja**

Roditelji djece iz obje skupine spunjavali su standardni ISAAC-ov upitnik EAACI-a sa 127 pitanja (dodatak 1) u kojima se registriraju ove pojedinosti:

(a) obiteljsko stanje;

(b) roditeljska sklonost astmi, polenozi i ekcemu,

(c) uvjeti stanovanja, obilježja dječjih spavaonica, korištenje različitih izvora energije u domaćinstvu, kućni ljubimci, domaće životinje, izloženost pasivnom pušenju;

- (d) postojanje upala dišnih putova,
- (e) postojanje epizoda bronhoopstrukcije, postavljena dijagnoza astme od strane liječnika,
- (f) postojanje simptoma rinitisa, postavljena dijagnoza alergijskog rinitisa od strane liječnika,
- (g) postojanje ekcema,
- (h) alergije na hranu te liječenje tih stanja;
- (i) eventualne hospitalizacije;
- (j) upitnik o kvaliteti života.

#### 3.3.1. Izloženost pasivnom pušenju

Podatci o izloženosti djece pušenju u ranoj dobi (tijekom prve godine života i za vrijeme istraživanja) uključeni su u upitnik. Rano izlaganje duhanskom dimu definirano je kao pozitivan odgovor na pitanje „Je li majka pušila tijekom trudnoće?“ Podatci o prijemu djece s akutnom egzacerbacijom astme prikupljeni su iz bolničkih povijesti bolesti.

#### 3.3.2. Posjedovanje krznenih ljubimaca u kući

U upitnik su uključeni podatci o nazočnosti ljubimaca u kući (tijekom prve godine života i za vrijeme istraživanja). Tijekom statističke analize varijabla *krzneni ljubimac u kući tijekom prve godine života i trenutno* definirana je držanjem mačke ili psa u kući tijekom prve godine života ili trenutno (za vrijeme trajanja istraživanja).

#### 3.3.3. Mjerenja plućne funkcije

Djeci s astmom napravljena je spirometrija (Jaeger, Germany) prema specifikacijama Američkog torakalnog društva (ATS, engl. *The American Thoracic Society*) / Europskog respiracijskog društva (ERS, European Respiratory Society). Mjereni su FVC, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub> 1 % prediktivnog, forsirani ekspiracijski protok pri 25 % vitalnog kapaciteta, FEF 25 % (engl.

Forced expiratory flow at 25 % of vital capacity), forsirani ekspiracijski protok pri 50 % brzoga vitalnog kapaciteta, FEF 50 % (engl. Forced expiratory flow at 25 % of vital capacity) i forsirani ekspiracijski protok pri 75 % vitalnog kapaciteta, FEF75 (engl. Forced expiratory flow at 75 % of vital capacity)<sup>228-230</sup>. Test je ponavljan sve dok nisu dobivena tri tehnički ispravna FVC-a (dvije najviše vrijednosti FVC-a i/ili FEV-a1 su bile unutar 0,150 L - varijabilnost od 5 %). Najviše 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<sup>228, 229</sup>, a zabilježene su i vrijednosti udjela dobivenih mjerenjem u odnosu na one predviđenih vrijednosti (%).

#### 3.3.4. Kožni ubodni test

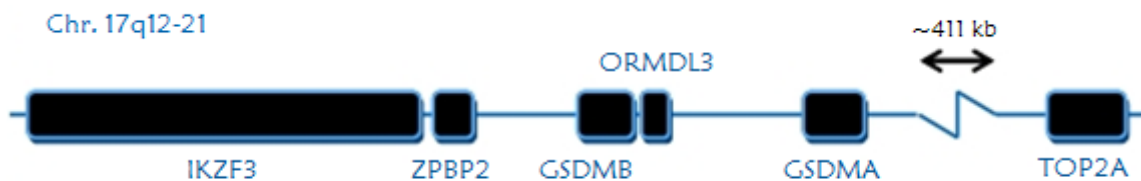
Skupini ispitanika s postavljenom dijagnozom astme kao i djeci iz kontrolne skupine izveden je kožni ubodni test sa setom alergena (histamin, kontrola, kikiriki, jaje, grinja, mačka, pas, breza, ambrozija, trave; Stallergens S.A., Antony, Francuska). Kožni ubodni test izveden je radi potvrde atopijskog statusa i detaljnije usporedbe skupina. Alergijskom senzibilizacijom smatra se kožni test u kojem je promjer urtike na određeni alergen veći 3 mm od negativne kontrole.

### 3.4. Odabir gena - kandidatski geni za astmu

Odabrana je regija **17q12-21** i gen **ORMDL3** te okolni geni u toj regiji (Slika 6):

IKZF3, ZPBP2, TOP2, GSDMA, GSDMB

Slika 6: Regija 17q12-21 i gen ORMDL3

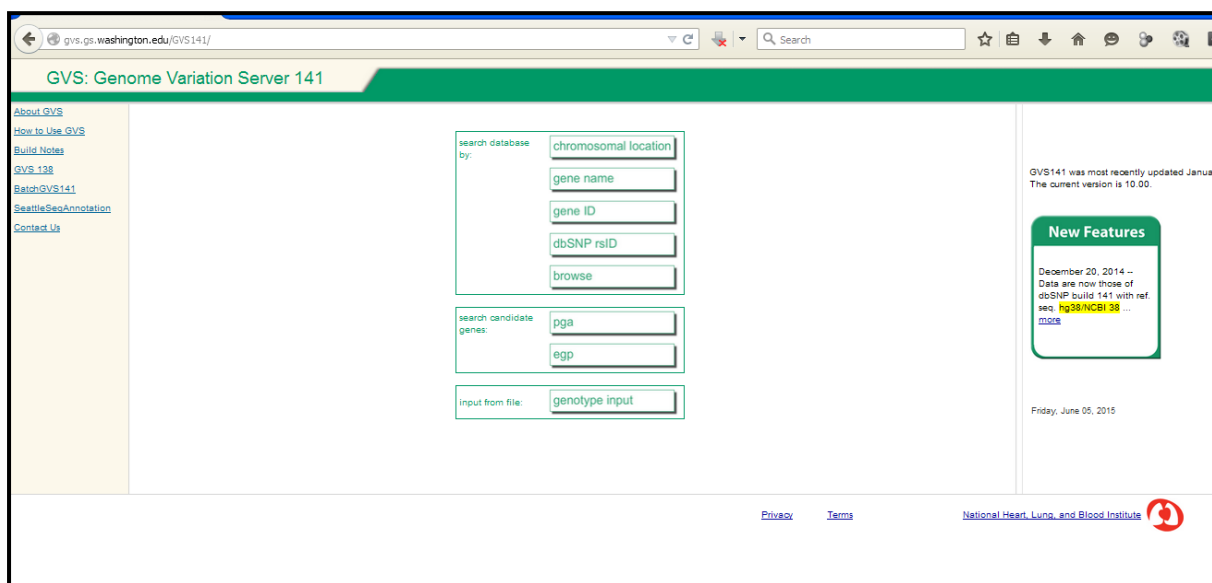


### 3.5. Odabir SNP-ova

Tag-SNP-ovi za genotipiziranje odabrani su za svaki gen na temelju LD-a iz populacija europskog podrijetla (kako bi se podudarali s istraživanom populacijom) uz pomoć programa „LD Select“ Carlsona i suradnika<sup>231</sup> preko poslužitelja za varijacije genoma (GVS, engl. *Genome Variation Server*) (Slika 7 i 8) <http://gvs.gs.washington.edu/GVS/> i dopunjeni podacima iz NCBI's dbSNP: [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/).

Korišten je i Haploview<sup>232</sup> (Tagger)<sup>233</sup>: [www.broadinstitute.org/haploview/haploview](http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview), da se upotpuni odabir tag-SNP-ova<sup>232</sup>.

Slika 7: Genome Variation Server





Slika 8: Primjer podataka dostupnih za gen ORMDL3

**GVS: Genome Variation Server 137**

Gene Name: **ORMDL3**  [expand search](#)  
 Gene ID: 94103  
 Chromosome 17: 38077296 - 38083884 (-)  
 Total chromosome span: 38075796 - 38086384

**Select Data Set(s)**

Check at least one data set below. If more than one data set is selected, the outcome of data merging will depend on how the parameter "Merge Samples and Variations" below is set. [\(see the detailed description of data merging\)](#)  
 To remove HapMap 3 data for CEU, YRI, HCB, JPT, check the "No HapMap 3" box below (use "Show More Parameters").

Select	Number Variations	Number Genotypes	Number PHASE Genotypes	Population	Submitter	Check to Select Only Unrelated Individuals
<input type="checkbox"/>	21	21	0	<a href="#">ENSEMBL_Watson</a>	<a href="#">ENSEMBL</a>	
<input type="checkbox"/>	20	20	0	<a href="#">ENSEMBL_Venter</a>	<a href="#">ENSEMBL</a>	
<input type="checkbox"/>	15	2989	1620	<a href="#">HapMap-CEU</a>	<a href="#">CSHL-HAPMAP</a>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	15	15	0	<a href="#">YRI</a>	<a href="#">ILLUMINA-JUK</a>	
<input type="checkbox"/>	15	3000	1800	<a href="#">HapMap-YRI</a>	<a href="#">CSHL-HAPMAP</a>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	15	1515	720	<a href="#">HapMap-JPT</a>	<a href="#">CSHL-HAPMAP</a>	
<input type="checkbox"/>	15	855	720	<a href="#">HapMap-HCB</a>	<a href="#">CSHL-HAPMAP</a>	
<input type="checkbox"/>	14	14	0	<a href="#">CEU</a>	<a href="#">COMPLETE_GENOMICS</a>	
<input type="checkbox"/>	13	13	0	<a href="#">J_Craig_Venter</a>	<a href="#">HUMANGENOME_JCVI</a>	
<input type="checkbox"/>	10	1710	0	<a href="#">HAPMAP_MKK</a>	<a href="#">CSHL-HAPMAP</a>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	10	770	0	<a href="#">HAPMAP_MEX</a>	<a href="#">CSHL-HAPMAP</a>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	10	10	0	<a href="#">RGP</a>	<a href="#">COMPLETE_GENOMICS</a>	

Gene Name: **ORMDL3**  
 Gene ID: 94103  
 Chromosome 17: 38077296 - 38083884 (-)  
 Total chromosome span: 38075796 - 38086384  
 Allele Frequency Cutoff (%): 5, monomorphic sites excluded  
 Data Merging: common samples with combined variations  
 Population: HapMap-CEU(unrelated only), Submitter: CSHL-HAPMAP

[open map](#)

**Add or Remove Columns:**

Conservation Score GERP

Chimp Allele

ChIP Availability

RepeatMasker

Tandem Repeats Finder

Copy Number Variation

GVS Function

Flanks

[reset](#) ↻

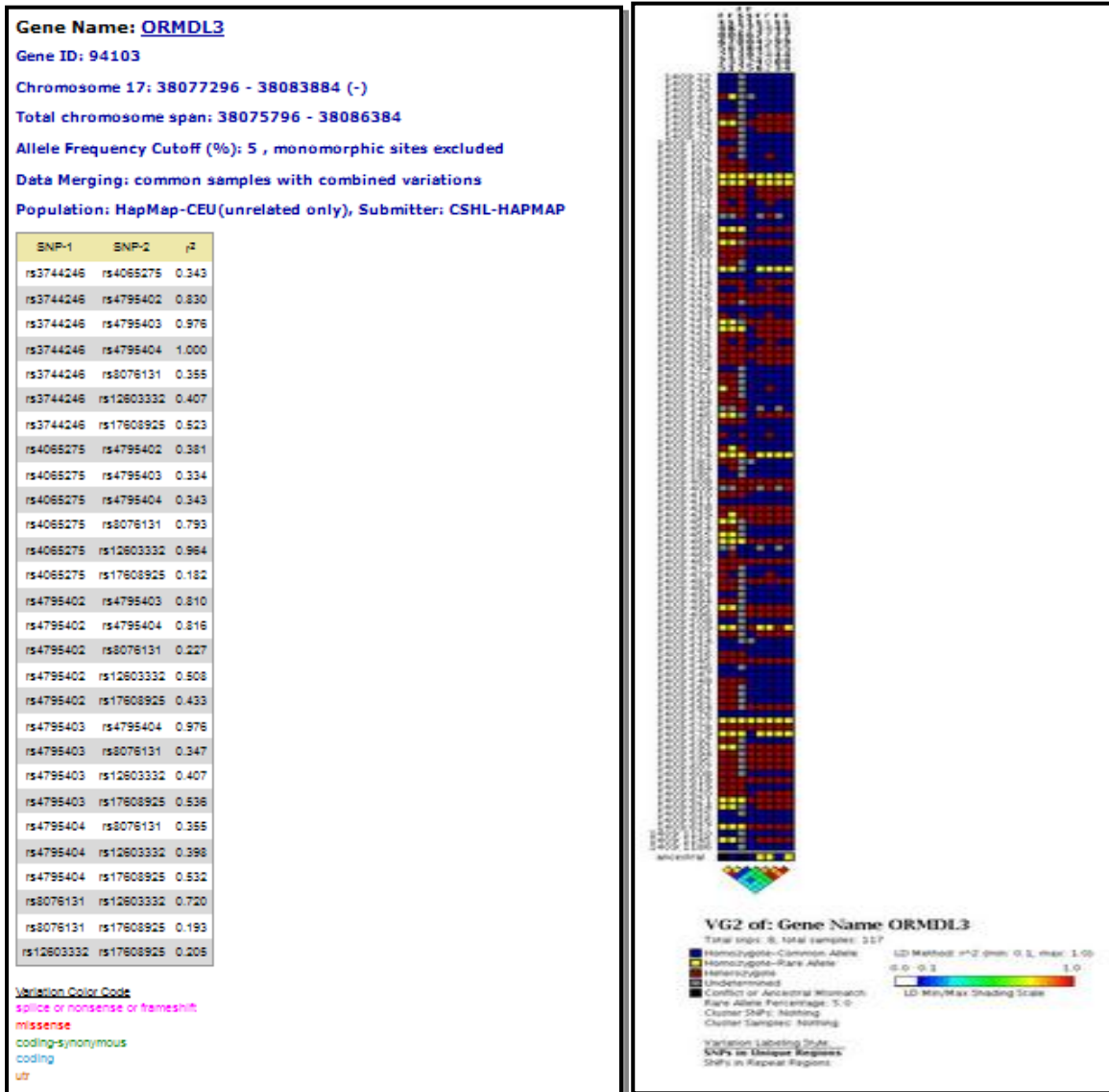
SNP base (NCBI Build 37)	SNP rs ID	Alleles	Minor Allele	Minor Allele Frequency (%)	Heterozygosity	Hardy-Weinberg Chi-Square	Genes	Function	Conservation Score phastCons
38080865	rs4065275	T/ C	T	48	0.50	1.12	ORMDL3	<a href="#">intron-variant(obsNP)</a>	0.0000
38080912	rs3076131	G/ A	G	47	0.50	0.00	ORMDL3	<a href="#">intron-variant(obsNP)</a>	0.0000
38082807	rs12603332	T/ C	T	48	0.50	3.86	ORMDL3	<a href="#">intron-variant(obsNP)</a>	1.0000
38082831	rs17608925	C/ T	C	14	0.25	0.09	ORMDL3	<a href="#">intron-variant(obsNP)</a>	0.0080
38084350	rs3744246	T/ C	T	24	0.36	0.08		<a href="#">near-gene-5(GVS)</a>	0.0000
38085385	rs4795402	A/ C	A	27	0.40	0.66		<a href="#">near-gene-5(GVS)</a>	0.0010
38085722	rs4795403	T/ C	T	23	0.36	0.01		<a href="#">near-gene-5(GVS)</a>	0.2420
38085791	rs4795404	A/ C	A	24	0.36	0.08		<a href="#">near-gene-5(GVS)</a>	0.0070

**Variation Color Code:**  
 splice or nonsense or frameshift  
 missense  
 coding-synonymous  
 coding  
 utr

[Description of Columns](#)

Pretražena je kromosomska regija koja uključuje gene ORMDL3, IKZF3, ZPBP2, TOP2, GSDMA, GSDMB te 2500 parova baza uzvodno i 1500 parova baza nizvodno od svakog gena. U algoritam su odabrani polimorfizmi s frekvencijom rizičnog alela (MAF, engl. *Minor allele frequency*) > 5 % (Slika 9). Algoritam generira LD binove s korespondirajućim tag-SNP-om. LD granica  $r^2=0,8$  odabrana je za ovu studiju jer je ta granica općeprihvaćeni kompromis između optimalne pokrivenosti varijacijama kako bi se dobio maksimalno informativan set SNP-ova uz smanjeni trud genotipiziranja. Važni SNP-ovi iz ove regije do sada povezani s astmom dodatno su uključeni kao tag-SNP-ovi u algoritam. Nakon vrednovanja rezultata genotipizacije svih SNP-ova oni su bili podvrgnuti mjerama kontrole kvalitete. Isključeni su svi SNP-ovi s uspjehom genotipiziranja < 85 % i/ili HWE  $p < 0,001$ .

Slika 9: GVS- primjer sumiranih podataka za gen ORMDL3



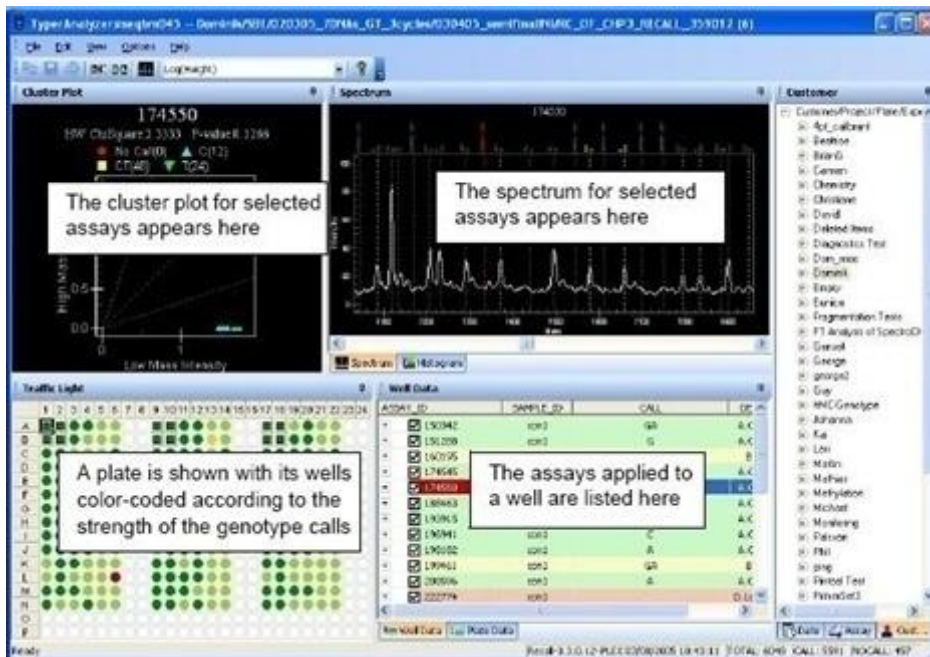
### 3.6. Genotipiziranje

Svim ispitanicima uzeto je 5 ml krvi za genetsko istraživanje (analiza SNP-ova vezanih za regiju 17q12-21). Iz smrznute krvi ekstrahirana je leukocitna DNK i kvantificirana pomoću spektrofotometra. Uzorci genomske DNK obrađivani su standardnim postupkom lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. The polymerase chain reaction). Umnoženi PCR-produkti minisekvencirani su koristeći nanolitarski automatski uređaj (SpectroPLOTTER, Sequenom, San Diego, Kanada) i stavljeni na mikročip (SpectroCHIPS, Sequenom, San Diego, Kanada) koji može nositi 384 uzorka (Slika 10). Čipovi su analizirani masenim spektrometrom Bruker Biflex MALDI-TOF koji može razlikovati alele sa zamjenom jednog nukleotida (SNP-a). Rezultirajući spektar pretvara se u genotipske podatke pomoću softverskog programa SpectroTYPER-RT (Sequenom, San Diego, Kanada) (Slika 11 i 12).

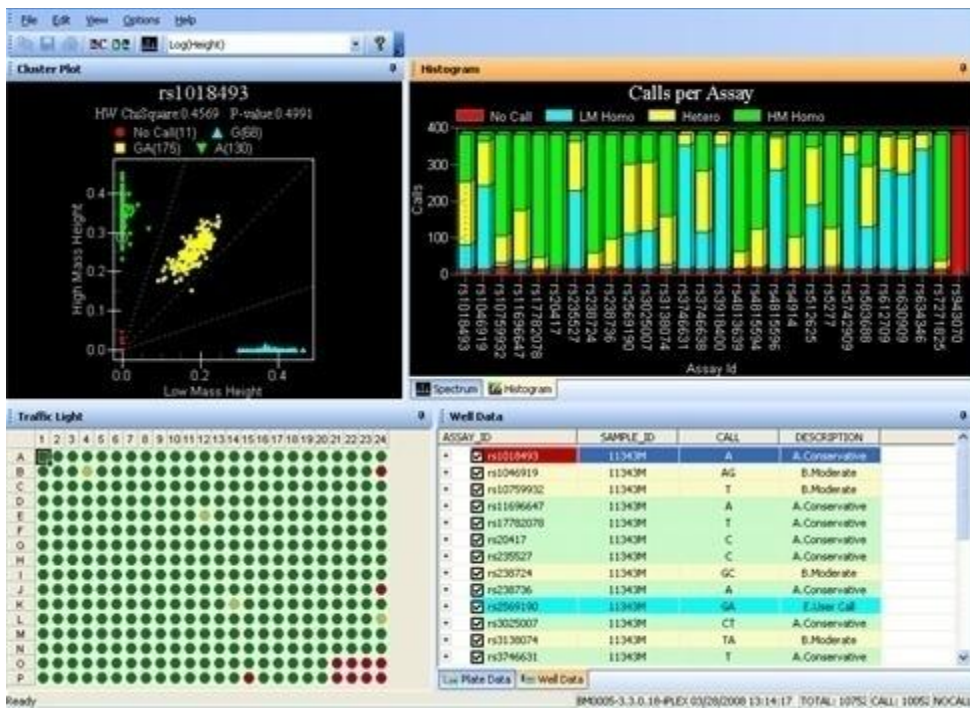
Slika 10: Sequenom® Spectropoint Nanodispenser® i maseni spektrometar



Slika 11: Primjer za prozor u programu Typer Analyser



Slika 12: Prozor u programu Typer Analyser za jednu pločicu (plate/plex)



### 3.7. Statistička analiza

Rezultati su analizirani uz razinu signifikantnosti  $p \leq 0,05$  i CI 95 %.

Za istraživanje genetskih utjecaja u dječjoj astmi analizirajući 400 bolesnih i 400 zdravih ispitanika, snaga studije je 80 % pri razini značajnosti od 5 %. Za statističku analizu dobivenih podataka koristio se statistički programski paket za društvene znanosti (SPSS 19.0.0.1, engl. Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IN, USA), i Statistički program SVS (engl. *SNP & Variation Suite*) 7.2.3 (Golden Helix, Inc., MT, USA).

Za istraživanje povezanosti između genetskih varijanti u regiji 17q12-21 i astme korišteni su  $\chi^2$  testovi i logistička regresija. Testirali smo alternativne modele (dominantne i recesivne genotipske modele). Ocijenjena je snaga povezanosti pod genetskim modelom koji najbolje odgovara.

S obzirom na to da je uočena statistički značajna razlika u spolu ispitanika i njihovih kontrola, sva statistička analiza podataka korigirana je za spol primjenom multivarijantne logističke regresije.

Postotak lažnih otkrića (FDR, engl. *False Discovery Rate*) kontrolna je statistička metoda kojom su se ispravljale pogreške višestruke usporedbe. Rezultati su prikazani kao p vrijednosti (ispravljene i neispravljene FDR-om), OR i 95 % CI. Analiza interakcije gena i okoliša učinjena je koristeći odgovarajući multivarijantni regresijski model. Kvantitativni ishodi (plućna funkcija) analizirani su uz pomoć *correlation/trendtest*, univarijantne linearne regresije i generalnog linearnog modela univarijantne jednosmjerne neovisne analize varijacije (ANOVA, engl. *Univariate one-way independent analysis of variance*). Analize FEF25 su korigirane za dob, spol i visinu.

## 4. REZULTATI

### 4.1. *Sudionici*

923-oje djece nasumično je odabrano i pristupljeno im je radi uključivanja u istraživanje (438 djece s astmom i 485 kontrola). Ukupni odaziv bio je 91 % (837 sudionika; 423-oje djece s astmom i 414-ero djece iz kontrolne skupine). 824 sudionika dalo je uzorak krvi za DNK analizu (417 djece s astmom i 407 djece iz kontrolne skupine) (Slika 13).

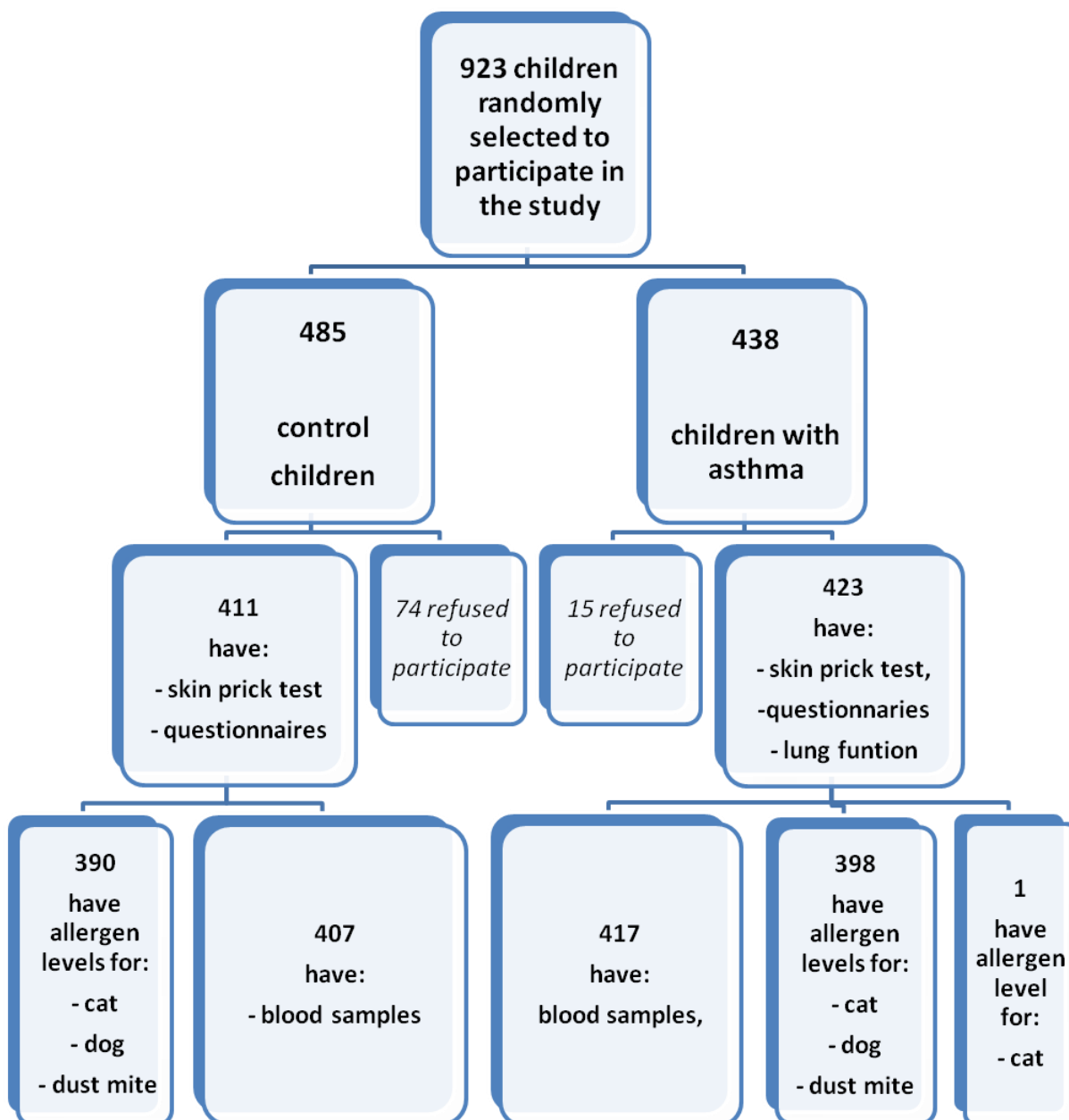
### 4.2. **Opisni podatci**

Demografske karakteristike istraživane populacije opisane su u Tablici 4. Muških je bilo više među djecom s astmom (muški, 58.6 vs. 43.1,  $p < 0.01$ ), stoga je sva analiza usklađena sa spolom. S obzirom na statistički značajnu razliku između skupina (12,3 vs. 11,8 godina, Tablica 4), smatramo da je razlika u dobi malo vjerojatno važna za analizu. Nismo opazili razlike između skupina u izloženosti dimu cigareta za vrijeme istraživanja niti tijekom ranog života.

Krznjeni kućni ljubimci (mačka i pas) u kući prisutni su češće kod djece iz kontrolne skupine nego u skupini djece s astmom i za vrijeme istraživanja (11,1 % skupina s astmom, 22,1 % kontrolna skupina,  $p < 0,01$ ) i tijekom prve godine života (8 % skupina s astmom, 16,1 % kontrolna skupina,  $p < 0,01$ ). Samo četvero djece bilo je senzibilizirano na mačku i trenutno imalo mačku u svojem domu, troje djece bilo je senzibilizirano na psa i trenutno je imalo psa u svojem domu. Drugi okolišni i socioekonomski čimbenici (npr. mjesto života, broj starije ili mlađe braće i sestara) nisu se značajno razlikovali (podatci nisu prikazani).

150-ero (35,5 %) djece je najmanje jednom hospitalizirano zbog akutne egzacerbacije astme. Među njima 53-oje djece (12,7 %) hospitalizirano je dva ili više puta. Nije opažena značajna povezanost između rane izloženosti duhanskom dimu i primitka u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme. Također, nije bilo povezanosti između trenutnog posjedovanja mačke ili psa u kući i prijema zbog astme.

Slika 13: Dijagram tijeka međunarodnog istraživanja dio kojeg je i istraživanje regije 17q12-21





Tablica 4: Demografska obilježja ispitivane populacije

Obilježja	ISPITANICI S ASTMOM (N=423)	KONTROLNA SKUPINA (N=414)	p- vrijednost
Prosječna dob (u godinama)	11,8	12,3	< 0,001
Muškarci	248 (58,6 %)	178 (43,0 %)	< 0,001
Izloženost duhanskom dimu tijekom trudnoće od strane člana kućanstva	268 (63,7 %)	265 (64,5 %)	0,43
Izloženost duhanskom dimu tijekom trudnoće od strane majke	86 (20,3 %)	85 (20,7 %)	0,48
Izloženost duhanskom dimu tijekom prve godine života od strane člana kućanstva	282 (66,7 %)	284 (69,1 %)	0,25
Izloženost duhanskom dimu tijekom prve godine života od strane majke	122 (28,8 %)	133 (32,4 %)	0,15
Izloženost duhanskom dimu od strane člana kućanstva za vrijeme istraživanja	304 (71,9 %)	311 (75,7 %)	0,12
Pas ili mačka u kući u prvoj godini života	34 (8,0%)	66 (16,1 %)	<0,001
Pas ili mačka u kući za vrijeme istraživanja	47 (11,1 %)	91 (22,1 %)	<0,001
Prijem u bolnicu zbog astme ikada u životu	150 (35,5 %)	/	
Samo jedan prijem u bolnicu	97 (22,9 %)	/	
Prijem u bolnicu ≥2 puta	53 (12,5 %)	/	

### 4.3. Genotipizirani i analizirani SNP-ovi

Od početnog 51 SNP-a koji su odabrani za genotipiziranje u daljnju analizu nisu bili uključeni slijedeći SNP-ovi (Tablica 5):

- za 3 nije bila uspješna genotipizacija, stopa uspješnosti < 90 %: rs558068 na TOP2A, rs10852937 na genu GSDMA, rs11870965 na genu ZPBP2
- jedan je bio monomorfan u našoj populaciji: rs11545311 na genu ORMDL3
- jedan nije bio u Hardy-Weinberg equilibriumu na  $p < 0,001$  razini značajnosti: rs12943633 na genu IKZF3
- Za ostalih 46 SNP-ova, primijenili smo algoritam LD algoritam za filtriranje za identifikaciju tagg-SNP-ova i odbačeni su dodatni SNP-ovi: IKZF3 (rs2313430, rs2313429, rs9911688, rs2060941, rs1453559), ZPBP2 (rs1453560, rs1054609), GSDMB (rs1008723, rs869402), ORMDL3 (rs7942), GSDMA (rs3859192)

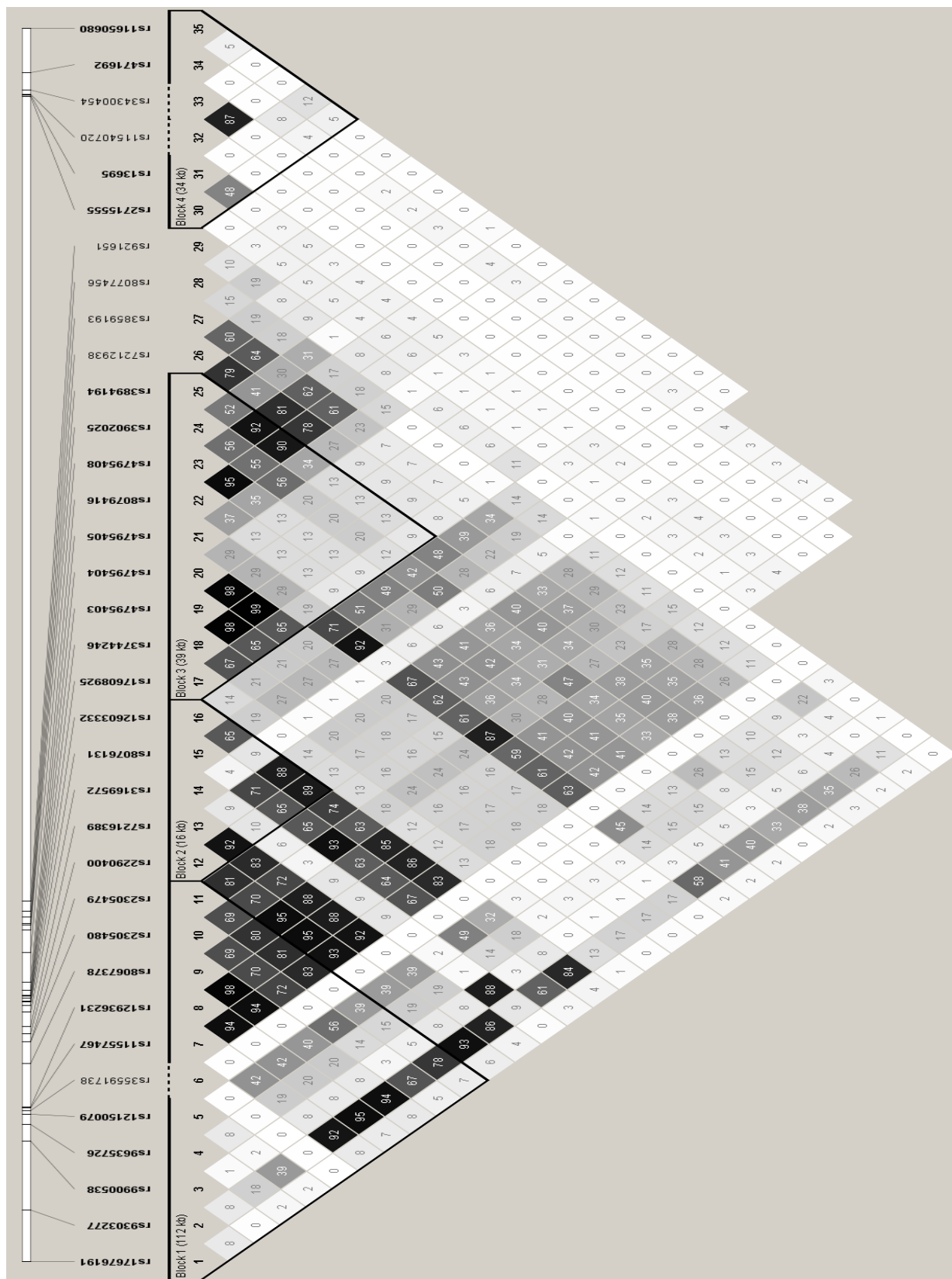
U istraživanju su ipak zadržani SNP-ovi koje su opisale druge objavljene studije: 1 SNP na genu IKZF3 (rs9303277), 1 SNP na genu ZPBP2 (rs11557467), 4 SNP-a na genu GSDMB (rs8067378, rs2305480, rs2305479, rs2290400), 2 SNP-a na genu ORMDL3 (rs4795403, rs4795404) i 3 SNP-a na genu GSDMA (rs8079416, rs4795408, rs3894194).

To je na kraju rezultiralo sa 35 SNP-ova koji su korišteni u statističkoj analizi, a uzorci LD-a prikazani su na Slikama 14 i 15.

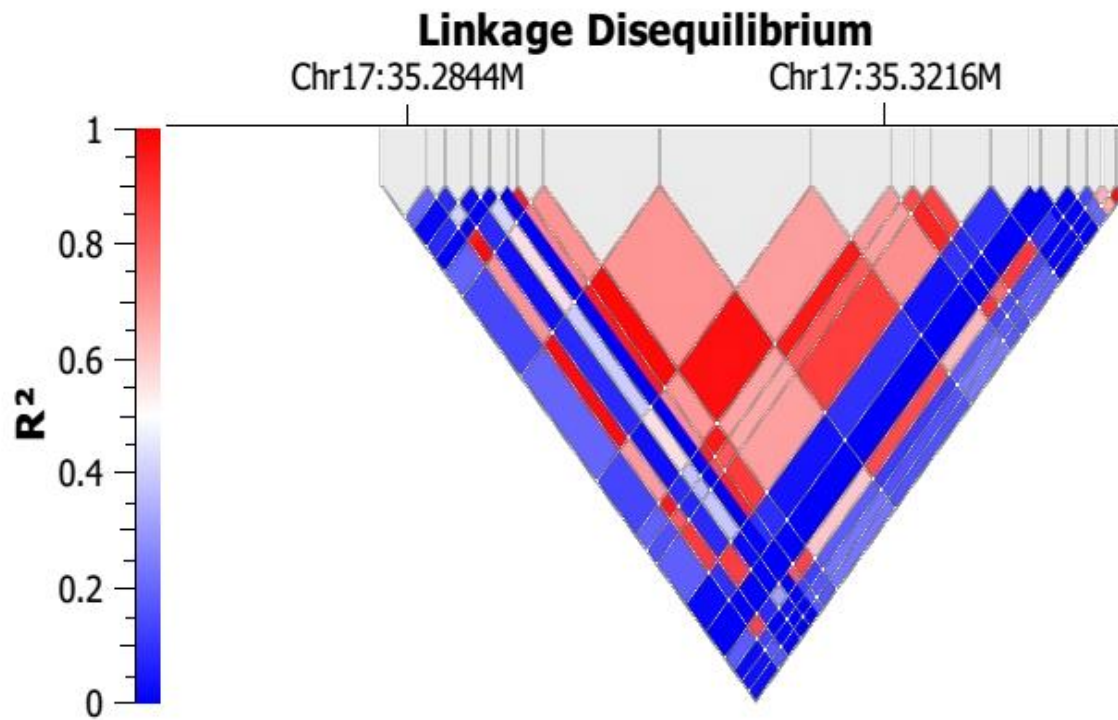
Tablica 5: Sumirane genotipske informacije za 51 tipiziran SNP u regiji 17q12-21

SNP	Pozicija	Gen	Aleli	SNP tip/funkcija	uspjeh genotipizacije	MAF	HWE P
rs2313430	35183341	IKZF3	C/T	intron	0,,52	0,450	0,686
rs2313429	35184184	IKZF3	A/G	intron	0,98	0,060	0,487
rs9911688	35197326	IKZF3	C/T	intron	0,96	0,059	0,457
rs17676191	35203449	IKZF3	A/G	intron	0,94	0,098	0,306
rs12943633	35223890	IKZF3	C/T	intron	0,95	0,172	0,000
rs9303277	35229994	IKZF3	C/T	intron	0,94	0,433	0,800
rs2060941	35236408	IKZF3	G/T	intron	0,52	0,111	0,866
rs9900538	35265234	IKZF3	T/C	intron	0,96	0,059	0,455
rs9635726	35273666	IKZF3	C/T	intron	0,96	0,210	0,668
rs1453559	35273944	IKZF3	T/C	netranslatirani-5`	0,97	0,431	0,958
rs1453560	35276966	ZBPB2	T/G	u blizini gena-5`	0,95	0,060	0,463
rs12150079	35278942	ZBPB2	G/A	intron	0,96	0,244	0,419
rs35591738	35280555	ZBPB2	C/G	nesinonimni	0,97	0,004	0,915
rs11557467	35282159	ZBPB2	G/T	nesinonimni	0,96	0,428	0,927
rs12936231	35282645	ZBPB2	C/G	intron	0,96	0,434	0,888
rs11870965	35283730	ZBPB2	T/A	intron	0,07	0,371	0,268
rs1054609	35286802	ZBPB2	A/C	netranslatirani-3`	0,94	0,355	0,243
rs8067378	35304873	GSDMB	A/G	nepoznat/a	0,95	0,434	0,484
rs2305480	35315721	GSDMB	G/A	nesinonimni	0,97	0,348	0,843
rs2305479	35315742	GSDMB	C/T	nesinonimni	0,96	0,414	0,776
rs2290400	35319765	GSDMB	T/C	intron	0,94	0,430	0,803
rs1008723	35319792	GSDMB	G/T	intron	0,52	0,434	0,316
rs869402	35321568	GSDMB	C/T	intron	0,96	0,426	0,548
rs7216389	35323474	GSDMB	T/C	intron	0,96	0,424	0,705
rs3169572	35330937	ORMDL3	G/A	netranslatirani-3`	0,97	0,067	0,856
rs7942	35330989	ORMDL3	T/C	netranslatirani-3`	0,52	0,010	0,827
rs11545311	35332911	ORMDL3	A	nesinonimni	0,96	0,000	1,000
rs8076131	35334437	ORMDL3	A/G	intron	0,94	0,357	0,293
rs12603332	35336332	ORMDL3	C/T	intron	0,97	0,420	0,673
rs17608925	35336356	ORMDL3	T/C	intron	0,96	0,095	0,050
rs3744246	35337875	ORMDL3	C/T	u blizini gena-5`	0,96	0,134	0,842
rs4795403	35339247	ORMDL3	C/T	u blizini gena-5`	0,97	0,134	0,873
rs4795404	35339316	ORMDL3	C/A	u blizini gena-5`	0,98	0,138	0,661
rs4795405	35341942	ORMDL3	C/T	nepoznat/a	0,97	0,350	0,680
rs8079416	35346238	ORMDL3	T/C	nepoznat/a	0,97	0,469	0,340
rs4795408	35361152	GSDMA	G/A	nepoznat/a	0,94	0,471	0,440
rs3902025	35372779	GSDMA	T/G	netranslatirani-5`	0,97	0,389	0,702
rs3894194	35375518	GSDMA	G/A	nesinonimni	0,96	0,470	0,674
rs7212938	35376205	GSDMA	T/G	nesinonimni	0,94	0,491	0,149
rs3859193	35379381	GSDMA	T/A	intron	0,96	0,476	0,126
rs3859192	35382173	GSDMA	C/T	intron	0,52	0,453	0,565
rs8077456	35382290	GSDMA	G/C	intron	0,97	0,339	0,599
rs10852937	35382622	GSDMA	G/C	intron	0,82	0,201	0,285
rs921651	35387447	GSDMA	A/G	netranslatirani-3`	0,96	0,198	0,768
rs2715555	35798149	TOP2A	G/A	u blizini gena-3`	0,98	0,181	0,413
rs13695	35798718	TOP2A	C/T	netranslatirani-3`	0,97	0,308	0,593
rs11540720	35799349	TOP2A	C/A	nesinonimni	0,96	0,015	0,666
rs34300454	35801393	TOP2A	C/T	nesinonimni	0,96	0,013	0,707
rs471692	35810295	TOP2A	G/A	intron	0,97	0,160	0,270
rs558068	35817235	TOP2A	C	intron	0,00		
rs11650680	35832761	TOP2A	C/T	nepoznat/a	0,94	0,225	0,945

Slika 14: Grafički prikaz LD-a (r2) 35 genotipiziranih polimorfizama gena regije 17q12-21 za ispitanu skupinu djece (N=837) koji su korišteni u statističkoj analizi



Slika 15: Grafički prikaz LD-a ( $r^2$ ) genotipiziranih polimorfizama gena regije 17q12-21 za ispitanu skupinu djece (N=837) koji su korišteni u statističkoj analizi



#### 4.4. Analiza povezanosti s astmom

Od 35 analiziranih SNP-ova samo su dva povezana s astmom (Tablica 6). Homozigoti za alel T na SNP-u rs9635726 (na genu *IKZF3*) i nositelji alela G na SNP-u rs12150079 (na genu *ZPBP2*) imali su povećan rizik za astmu kada se uspoređuju s drugim genotipskim skupinama (OR [95 %CI], 1.53 [1,14- 2,05],  $p < 0,01$  i 1,46 [1,10 - 1,94],  $p = 0,01$ ). Nijedan nije ostao značajno povezan s astmom nakon FDR korekcije za mnogostruke usporedbe. Nije uočena povezanost između rs7216389 i rs2305480 i astme ( $p > 0,2$ ) (Tablica 6).

Tablica 6: Povezanost genetskih varijanti u regiji 17q12-21 s astmom

Sve analize su usuglašene za spol

\*uobičajeni alel je napisan kao prvi/rijetki alel drugi

Rizični alel je ispisan zadebljan

SNP	Gen	Aleli*	p- vrijednost	FDR	Genetski model	aOR	95%CI
rs9635726	IKZF3	<b>T</b> /C	<0,01	0,12	TT vs. CC+CT	1,53	1,14-2,05
rs12150079	ZPBP2	A/ <b>G</b>	0,01	0,18	GG+GA vs. AA	1,46	1,10-1,94
rs7216389	GSDMB	<b>T</b> /C	0,21	0,82	CC vs. CT+TT	1,26	0,87-1,81
rs2305480	GSDMB	<b>G</b> /A	0,20	0,44	AA+AG vs. GG	1,20	0,91-1,60

4.4.1. Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, izloženosti duhanskom dimu tijekom rane dobi i astme

Devet varijanti bilo je u značajnoj interakciji s izloženosti duhanskom dimu tijekom rane dobi i astmom, ali sedam od njih bilo je u visokom LD-u ( $r^2 > 0,9$ ) pa je malo vjerojatno da predstavljaju nezavisne učinke (Tablica 7, Slika 14). Npr. izlaganje duhanskom dimu u rano doba povećava rizik za astmu kod homozigota za alel T na rs4795405, a učinak duhanskog dima na rizik za astmu nije vidljiv kod nositelja alela C (Slika 16).

Tablica 7. Značajna međudjelovanja između genetskih varijanti u regiji 17q12-21,

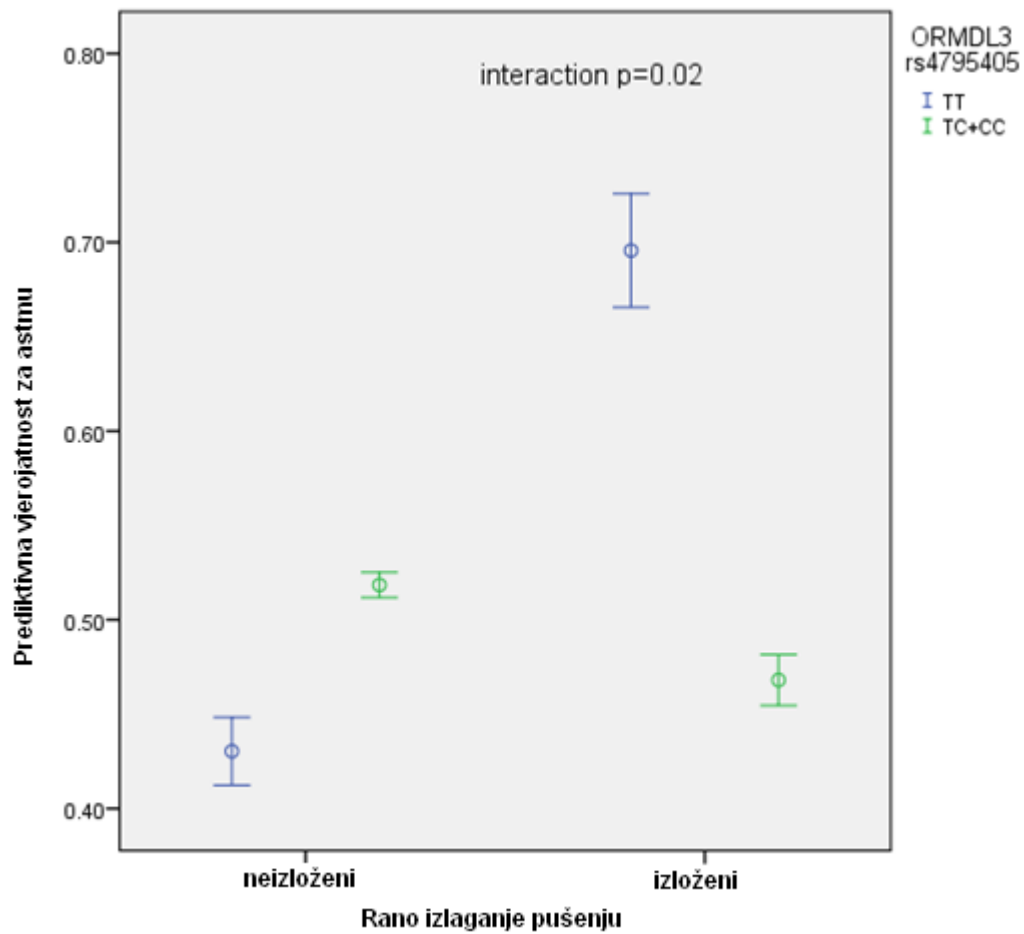
ranog izlaganja pušenju i astme

\* uobičajeni alel je napisan kao prvi

Osjenčani SNP-ovi su u visokom LD-u ( $r^2 > 90$ ).

SNP	Gen	Alel*	Genetski model	p-vrijednost
rs9303277	IKZF3	C/T	TT+TC vs. CC	0,01
rs11557467	ZPBP2	G/T	TT+TG vs. GG	0,01
rs12936231	ZPBP2	C/G	GG+GC vs. CC	0,02
rs8067378	GSDMB	A/G	GG+GA vs. AA	0,02
rs2290400	GSDMB	T/C	CC+CT vs. TT	0,01
rs7216389	GSDMB	T/C	CC+CT vs. TT	0,02
rs12603332	ORMDL3	C/T	TT+TC vs. CC	0,01
rs4795405	ORMDL3	C/T	TT vs. TC+CC	0,02
rs3894194	GSDMA	G/A	AA vs. AG+GG	0,04

Slika 16. Međudjelovanje genetske varijante na genu ORMDL3, ranog izlaganja pušenju i astme: Rano izlaganje pušenju značajno povećava rizik za astmu među homozigotima za alel T na SNP-u rs4795405, a izlaganje pušenju nema učinak na rizik za astmu među nositeljima alela C.





#### 4.4.2. Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, posjedovanja krznenih kućnih ljubimaca i astme

U početku smo zasebno analizirali interakciju između polimorfizama 17q12-21 i posjedovanja mačke ili psa. Otkrili smo značajne interakcije koje su išle u istom smjeru i za posjedovanje mačke i psa (Slika 17, a-c). Stoga, sva daljnja analiza izvodila se na zajedničkoj varijabli nazvanoj *posjedovanje krznenih ljubimaca*.

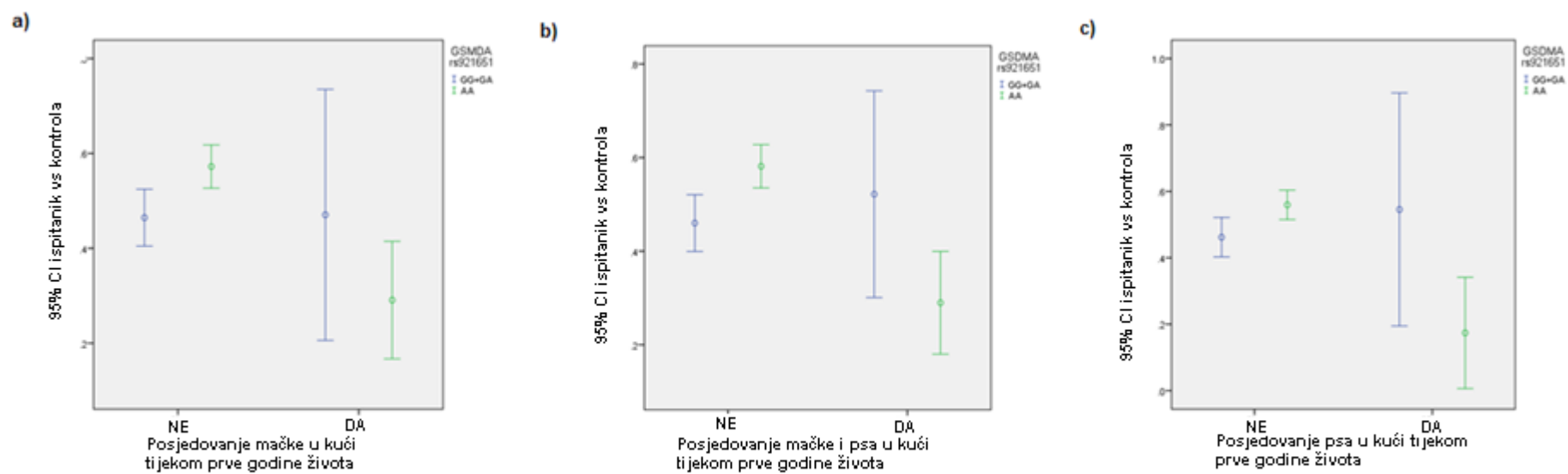
Postoje značajna međudjelovanja 2 SNP-a na genu GSDMA (rs921651 i rs8077456), trenutnog posjedovanja krznenih ljubimaca i astme.

Za jedan od tih SNP-ova (rs921651) postoji međudjelovanje s posjedovanjem krznenih ljubimaca tijekom prve godine života (Tablica 8). Npr., homozigoti za alel A na SNP-u rs921651 imaju značajno manji rizik za astmu ako su posjedovali u kući krznene ljubimce tijekom prve godine života, a učinak nije uočljiv kod nositelja alela G (Slika 17 c).

Slika 17, a-c. Međudjelovanje genetske varijante na genu GSDMA, posjedovanja mačke ili psa tijekom prve godine života i astme:

Posjedovanje mačke, psa ili mačke/psa tijekom prve godine života značajno smanjuje rizik za astmu među

homozgotima za alel A na SNP-u rs921651 dok posjedovanje krznenog ljubimca nije imalo učinak među nositeljima alela G.



Tablica 8. Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21,  
posjedovanja krznjenih ljubimaca u kući tijekom prve godine života i  
za vrijeme istraživanja u odnosu na astmu

SNP	Gen	Alel*	Genetski model	Posjedovanje krznjenih ljubimaca u prvoj godini života p-vrijednost	Posjedovanje krznjenih ljubimaca za vrijeme istraživanja p-vrijednost
rs921651	GSDMA	A/G	GG+GA vs. AA	0,008	0,021
rs8077456	GSDMA	G/C	CC+CG vs. GG		0,017

\* uobičajen alel je prvi naveden

## 4.5. Analiza povezanosti za težinu astme

### 4.5.1. Analiza povezanosti s prijedom u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme

Kod djece s astmom četiri SNP-a povezana su s prijedom u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme (Tablica 9). Npr., nositelji alela G na SNP-u rs7212938 imaju veći rizik za prijem u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme nego homozigoti za alel T (OR [95 % CI], 1,71 [1,01 – 2,88],  $p=0,04$ ). Nijedna od ovih povezanosti nije prošla FDR korekciju za mnogostruka testiranja. Dva SNP-a (rs8067378, rs2290400) su u visokom LD-u i vjerojatno predstavljaju isti učinak.

Tablica 9: Povezanosti između genetskih varijanti u regiji 17q12-21 i prijema u bolnicu

zbog akutne egzacerbacije astme

Osjenčani SNP-ovi su u visokom LD-u ( $r^2>90$ ).

SNP rs broj	Gen	Alel*	p- vrijednost	FDR	Genetski model	aOR	95 %CI
rs12150079	ZPBP2	G/A	0,02	0,75	AA+AG vs.GG	0,61	0,40 – 0,93
rs8067378	GSDMB	A/G	0,04	0,43	GG vs.GA+AA	0,56	0,32 – 0,99
rs2290400	GSDMB	T/C	0,03	0,91	CC vs.TC+TT	0,52	0,28 – 0,95
rs7212938	GSDMA	T/G	0,04	0,69	GG+GT vs.TT	1,71	1,01 - 2,88

\*uobičajeni alel je prvi naveden, a rizični alel je zadebljan

4.5.1.1. Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, prijema u bolnicu s akutnom egzacerbacijom astme i izlaganja duhanskom dimu u ranoj dobi

Opazili smo značajne interakcije između 3 SNP-a (na genima ORMDL3 i GSDMA), izlaganja duhanskom dimu u ranoj dobi i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme (Tablica 10). Dva od tri SNP-a (rs4795408 i rs8079416) su u visokom LD-u i vjerojatno predstavljaju isti učinak.

Tablica 10: Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, ranog izlaganja pušenju i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme

Osjenčani SNP-ovi su u visokom LD-u ( $r^2 > 90$ ).

SNP	Gen	Alel*	Genetski model	p-vrijednost
rs8079416	ORMDL3	T/C	CC+CT vs. TT	0,04
rs4795408	GSDMA	G/A	AA+AG vs. GG	0,03
rs7212938	GSDMA	T/G	GG+GT vs. TT	0,03

\* uobičajeni alel je prvi naveden

4.5.1.2. Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, trenutnog posjedovanja krznenih ljubimaca u kući i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme

Tri SNP-a u visokom LD-u na genu *ORMDL3* (rs3744246, rs4795403 i rs4795404) bila su u međudjelovanju s trenutnim posjedovanjem krznenih ljubimaca u kući i prijemom u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme (Tablica 11) i vjerojatno predstavljaju isti učinak. Npr., kod djece s astmom nositelji alela T za SNP rs4795403 (na genu *ORMDL3*) bili su u značajno većem riziku za prijem u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme ako su za vrijeme istraživanja posjedovali krznenog ljubimca, dok se ne očituje učinak posjedovanja krznenih ljubimaca za vrijeme istraživanja na rizik među homozigotima za alel C (Slika 18).

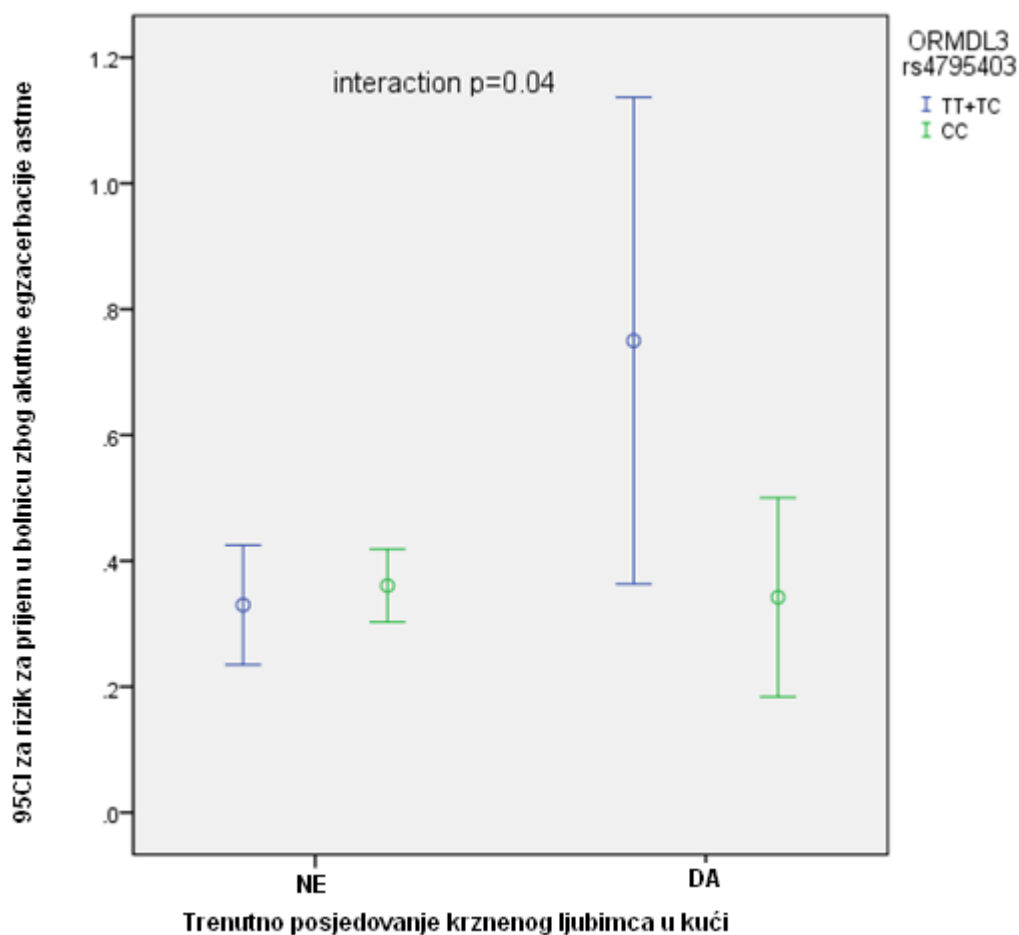
Tablica 11: Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, posjedovanja krznenog ljubimca za vrijeme istraživanja i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme

Osjenčani SNP-ovi su u visokom LD-u ( $r^2 > 90$ ).

SNP	Gen	Alel*	Genetski model	Posjedovanje krznenog ljubimca u kući za vrijeme istraživanja p-value
rs3744246	ORMDL3	C/T	TT+TC vs. CC	0,04
rs4795403	ORMDL3	C/T	TT+TC vs. CC	0,04
rs4795404	ORMDL3	C/A	AA+AC vs. CC	0,04

\* uobičajen alel je prvi naveden

Slika 18: Međudjelovanje genetske varijante za SNP rs4795403 na genu ORMDL3 i posjedovanja krznenog ljubimca u kući za vrijeme istraživanja i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme: Posjedovanje krznenog ljubimca u kući među djecom s astmom značajno povećava rizik za prijem u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme kod nositelja alela T, dok posjedovanje kućnog ljubimca u kući nije imalo učinka kod homozigota za alel C.



#### 4.5.2. Analiza povezanosti za plućnu funkciju

Osam SNP-ova bilo je značajno povezano s plućnom funkcijom (FEV<sub>1</sub> % prediktivni, FEF<sub>25</sub>, Tablica 12). Šest SNP-ova bilo je povezano s FEV<sub>1</sub> % prediktivnim (po dva na genima *IKZF3* i *ORMDL3*, i po jedan na genima *GSDMA* i *TOP2A*). Pet SNP-ova bilo je povezano sa FEF<sub>25</sub> (po jedan na genima *IKZF3*, *ORMDL3* i *GSDMA*, i dva na genu *TOP2A*). Jedan SNP (rs9635726 na genu *IKZF3*) ostao je značajno povezan s FEV<sub>1</sub>% prediktivnim nakon korekcije za mnogostruke usporedbe. Npr., homozigoti za alel T na SNP-u rs9635726 (na genu *IKZF3*) imali su značajno niži FEV<sub>1</sub>% prediktivni u usporedbi s nositeljima uobičajenog alela C (Tablica 12).



Tablica 12: Genetske varijante u regiji 17q12-21 i mjere plućne funkcije

Gen	Alel*	p-vrijednost	FDR	FEV1 % prediktivni			p-vrijednost	FDR	FEF25			
				genetski model	srednja vrijednost	95 % CI			Genetski model	srednja vrijednost	95 % CI	
rs9900538	IKZF3	T/C	0,,04	0,,35	CC+CT	102,30	98,04-106,57	0,01	0,18	CC+CT	4,48	4,24-4,71
					TT	97,43	95,77-99,09			TT	4,11	4,02-4,20
rs9635726	IKZF3	C/T	<0,,01	0,,01	TT	86,01	79,23-92,79					
					CT+CC	98,63	97,06-100,20					
rs3169572	ORMDL3	G/A	0,,02	0,,20	AA+AG	102,80	98,74-106,85	0,01	0,10	AA+AG	4,46	4,24-4,69
					GG	97,41	95,75-99,06			GG	4,12	4,03-4,21
rs4795403	ORMDL3	C/T	0,,04	0,,33	TT+TC	100,93	97,84-104,01					
					CC	97,27	95,50-99,04					
rs4795408	GSDMA	G/A						0,03	0,18	AA+AG	4,10	3,99-4,20
										GG	4,33	4,15-4,50
rs921651	GSDMA	A/G	0,,04	0,,29	GG+GA	95,83	93,11-98,54					
					AA	99,20	97,32-101,09					
rs471692	TOP2A	G/A	0,,04	0,,31	AA	107,94	98,66-117,22	0,02	0,18	AA+AG	4,32	4,17-4,48
					AG+GG	97,84	96,28-99,41			GG	4,10	3,99-4,20
rs11650680	TOP2A	C/T						0,02	0,20	TT+TC	4,02	3,88-4,16
										CC	4,23	4,12-4,35

\*uobičajeni alel prvi je naveden, rizični alel je zдебљан

#### 4.5.2.1. Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21, izlaganja pušenju u ranoj dobi i plućne funkcije

Postoji međudjelovanje izloženosti pušenju u ranoj dobi, tri genetske varijante i FEV<sub>1</sub> % prediktivnog (Tablica 13). Npr., uobičajeni homozigoti za alele rs9303277 (*IKZF3*), rs8067378 (*GSDMB*) i rs12603332 (*ORMDL3*) imaju obrnuti učinak ako su izloženi pušenju u usporedbi s nositeljima rizičnog alela.

Tablica 13: Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, ranog izlaganja pušenju i plućne funkcije kod djece s astmom

Osjenčani SNP-ovi su u visokom LDU ( $r^2 > 90$ ).

SNP	Gen	Alel*	Genetsk i model	p <sub>int</sub> - vrijednost	Izloženi pušenju			Neizloženi pušenju		
					FEV <sub>1</sub> %pred Srednja vrijednost	n	95 % CI	FEV <sub>1</sub> %pred Srednja vrijednost	n	95 % CI
rs9303277	<i>IKZF3</i>	C/T	TT+TC	0,03	101,67	61	97,59-105,76	97,42	185	95,15-99,7
			CC		92,7	20	85,57-99,83	98,16	108	95,19-101,13
rs8067378	<i>GSDMB</i>	A/G	GG+G A	0,03	101,86	63	97,8-105,92	97,51	199	95,34-99,68
			AA		92,96	21	85,92-100	97,95	112	95,06-100,85
rs12603332	<i>ORMDL3</i>	C/T	TT+TC	0,04	101,76	64	97,75-105,77	97,82	198	95,66-99,99
			CC		92,96	21	85,9699,97	97,73	118	94,93-100,54

\*uobičajeni alel je prvi naveden

4.5.2.2. Međudjelovanje polimorfizama 17q12-21 , posjedovanja krznenih ljubimaca u kući tijekom prve godine života i za vrijeme istraživanja i plućne funkcije

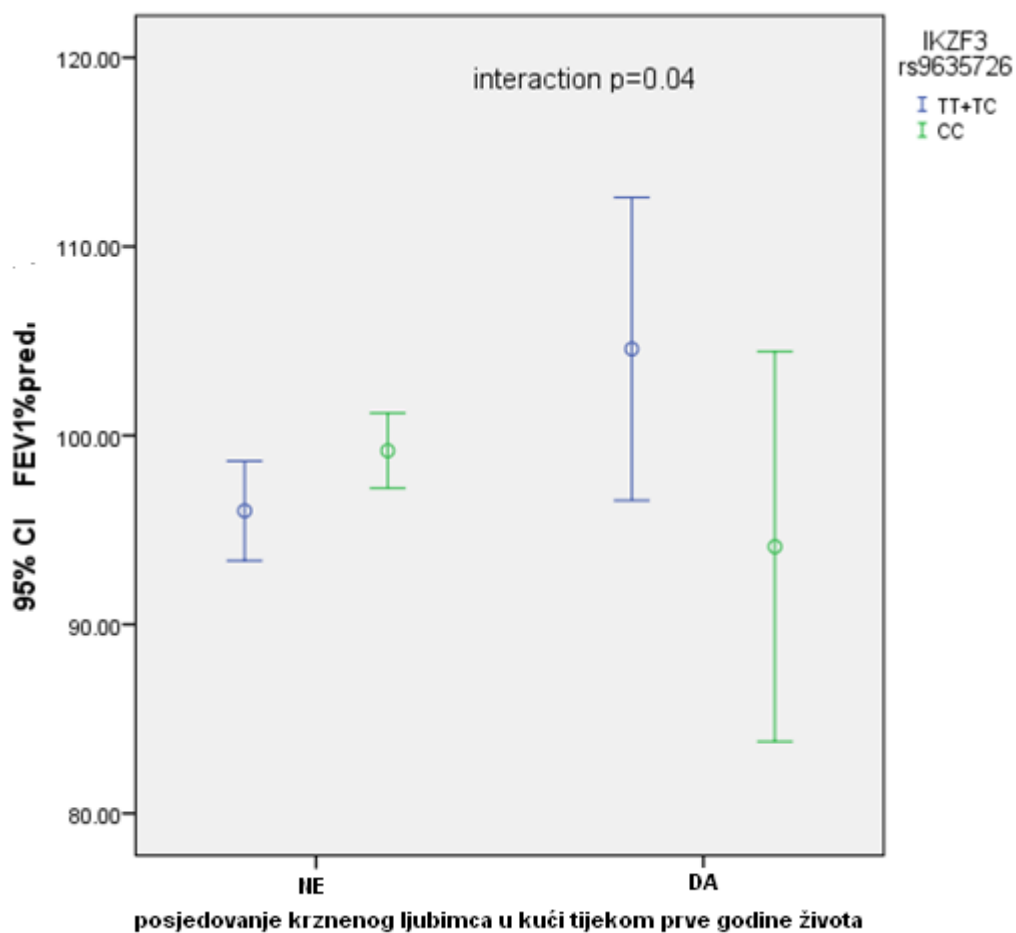
Otkrili smo povezanost jednog SNP-a (rs9635726 na genu *IKZF3*), FEV<sub>1</sub> % prediktivnog i posjedovanja krznenih ljubimaca u kući tijekom prve godine života (Tablica 14), npr.nositelji alela T imali su značajno veći FEV<sub>1</sub> % prediktivni bez vidljivog učinka posjedovanja krznenih ljubimaca u kući među homozigotima za alel C (Slika 19).

Tablica 14: Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, posjedovanja krznenih ljubimaca u kući tijekom prve godine života i plućne funkcije kod djece s astmom

SNP	Gen	Alel*	Genetski model	FEV <sub>1</sub> % prediktivni posjedovanja krznenih ljubimaca u kući tijekom prve godine života p value
rs9635726	<i>IKZF3</i>	C/T	TT+TC vs. CC	0,035

\* uobičajeni alel prvi je naveden

Slika 19: Međudjelovanje genetske varijante rs9635726 na genu IKZF3, posjedovanja krznenog ljubimca u kući tijekom prve godine života i plućne funkcije: posjedovanje krznenog ljubimca u kući tijekom prve godine života kod djece s astmom značajno povećava FEV<sub>1</sub> % prediktivni za nositelej alela T, dok posjedovanje krznenog ljubimca nije imalo učinka na FEV<sub>1</sub> % prediktivni kod homozigota za alel C.



## 5. RASPRAVA

Astma je je složena, heterogena bolest, karakterizirana međudjelovanjem genetskih i okolišnih činitelja. Sindrom je različitih fenotipova s definiranim kliničkim i fiziološkim karakteristikama koji se međusobno preklapaju, s upalnim procesima čiji se biomarkeri još otkrivaju, različitim odgovorom na terapiju te različitim tijekom bolesti i komorbiditetima<sup>34, 234</sup>. Prepoznata je još u starom Egiptu, a ime joj je nadjenio Hipokrat oko 450. godine prije Krista (grč. astma označava zaduhu)<sup>235</sup>. Astma se učestalo razvija u ranom djetinjstvu, a ubraja se među najčešće kronične bolesti u dječjoj i adolescentnoj, ali i u odrasloj dobi. Definiciju i dijagnozu astme preporučio je Međunarodni sporazum o dijagnosticiranju i liječenju astme, GINA, iz 2006. godine čijih smjernica smo se pridržavali u ovom istraživanju. Ispitano je 423-oje djece s astmom i 414-ero djece bez astme (kontrolna skupina ispitanika) koji su se odazvali na poziv uže specijalistice pedijatrijske alergologije. Analizirani su podatci iz njihove osobne i obiteljske anamneze, učinjen fizikalni pregled, objektivno mjerenje plućne funkcije (spirometrija), provokacijski test na koži te laboratorijske pretrage.

Prevalencija astme u svijetu varira, a od nje boluje više od 300 milijuna ljudi<sup>236</sup>. Ona više nije bolest razvijenih zemalja kako se ranije pretpostavljalo jer većina osoba s astmom dolaze iz zemalja s niskim i srednjim prihodima te prema nekim procjenama prevalencija u tim zemljama najbrže raste. U Republici Hrvatskoj učinjena je ISAAC studija u nekoliko županija te je utvrđeno da se prevalencija astme kreće od 5,1 do 14 % što Hrvatsku svrstava u zemlje s umjerenom prevalencijom astme djece školske dobi<sup>12-15</sup>. , ISAAC studija iz 2007./2008. godine je u Brodsko-posavskoj županiji (u kojoj su provedena istraživanja za ovu disertaciju) pokazala da je prevalencija astme bila 7,9 % (na 1684 ispitanika u dobi 10-11 godina). Istraživanja Aberle i suradnika iz 1990.g. te iz 2007./2008. godine bilježe dvostruki porast prevalencije astme (istraživanje iz 1990. godine nije provedeno uz pomoć standardiziranog upitnika te je velik raspon dobi). Međutim, potvrđeno je da prevalencija astme u Hrvatskoj i dalje raste što dokazuju istraživanja provedena u Primorsko-goranskoj

županiji 2001./2002. - 2009./2010<sup>15</sup>. U usporedbi s rezultatima pojedinih zemalja u svijetu koje su izvele sve faze ISAAC studije, vidljivo je da je prevalencija astme negdje rasla, negdje je dosegla vrhunac dok se u pojedinim zemljama broj djece s astmom smanjio. Tako Kostarika (37,6 %) ili Otok Man (31,2 %) imaju devet do trinaest puta veću prevalenciju zviždanja u posljednjih 12 mjeseci u djece (6-7 godina i 13-14 godina) u usporedbi s Indonezijom (2,8 %) ili Albanijom (3,4 %)<sup>236</sup>. Također, registrirane su značajne razlike i između centara u kojima se provodilo istraživanje (djeca 6-7 godina). Tako, npr. Jodhpur (India) ima 2,4 %, a Kostarika 37,6 %. Istraživanja među djecom dobi 13-14 godina pokazala su da ih je u Tibetu (Kina) bilo 0,8 %, a u Wellingtonu (Novi Zeland) 32,6 %.<sup>236</sup> Zanimljivo je da su razlike prevalencije bile značajnije između nekih zemalja nego između područja unutar tih zemalja.<sup>236</sup> Oblici teške astme među djecom također pokazuju značajne varijacije u prevalenciji između raznih zemalja, npr. u Indoneziji 1,1 % djece u dobi 6-7 godina ima tešku astmu, u Kostariki 20,3 %. U djece dobi 13-14 godina prevalenciju teške astme ima u Albaniji 1,1% , a u Kostariki 16 %.<sup>236</sup> Teška astma često zahtjeva hospitalizaciju što povećava troškove liječenja, a ona je indikator opterećenja zdravstvenog sustava. U ovom istraživanju hospitalizirano je (najmanje jednom) 150-ero djece (35,5 %) zbog akutne egzacerbacije astme. Među njima je 53-oje djece (12,7 %) hospitalizirano dva ili više puta. Činitelji koji utječu na varijacije prijema u bolnicu nisu dovoljno razjašnjeni. Velika se pozornost pridaje utjecaju unutarnjeg i vanjskog okoliša (izlaganju alergenima, virusnim infekcijama, duhanskom dimu itd.) za što su još potrebna dodatna istraživanja. U ovom radu nije opažena značajna povezanost između rane izloženosti duhanskom dimu i primitka u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme. Također, nije utvrđena povezanost između posjedovanja mačke ili psa u kući i hospitalizacije zbog astme.

Poznato je da se astma u dječjoj dobi prezentira različitim kliničkim slikama i tipovima upale te da odgovor na terapiju nije jednak. Prema određenim smjernicama tri ili više reverzibilne bronhoopstrukcije tijekom šest mjeseci mogu se proglasiti astmom, no, prema nekim

autorima, sigurnu dijagnozu astme moguće je postaviti tek poslije navršene 5. godine života kada su dostupne objektivne metode definiranja bolesti<sup>22, 237</sup>.

Ispitanici u provedenom istraživanju (6-18 godina) nisu odabrani prema fenotipovima, a za vrijeme istraživanja su uzimali lijekove za astmu i imali dva ili više simptoma astme (zviždanje, kašalj ili oboje) u posljednjih 12 mjeseci.

Od ukupno 837 ispitanika pozitivan kožni test na jedan od ispitivanih alergena imalo je 460 (55 %) djece: u skupini djece s astmom (N=423) bilo ih je 383 (90,5 %), a u kontrolnoj skupini ispitanika (N=414) 73-oje djece (17,7 %). U istraživanju je analizirana pojava alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa u djece s astmom. Pridružene simptome alergijskog rinitisa tijekom djetinjstva od ukupnog broja ispitanika s astmom imalo je dvije trećine ispitanika (N=290, 68,6 %), a u 282-oje ispitanika (66,7 %) simptomi alergijskog rinitisa registrirani su i tijekom posljednjih 12 mjeseci. Atopijski dermatitis tijekom djetinjstva imala je četvrtina ispitanika s astmom (N=108, 25,5 %), a recidive u posljednjih 12 mjeseci imalo je 37-ero (8,7 %) djece. Simptome astme, alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa tijekom djetinjstva imala je petina djece (N=88, 20,8 %) što ukazuje na zajednički patofiziološki proces u djece s atopijom, a klinička slika se manifestira u šoknom organu. Ponavljajuće zviždanje u predškolskoj dobi najčešće se klasificira prema okidačima. Razlikujemo virusima inducirano zviždanje (ako su virusne infekcije jedini okidač) ili zviždanje potaknuto mnogostrukim okidačima (ako se simptomi javljaju i izvan virusnih infekcija)<sup>237</sup>. U školskoj dobi zviždanje je najčešće potaknuto mnogostrukim okidačima, povezano je s alergijom, često je pozitivna obiteljska atopijska anamneza, a simptomi se javljaju i između razdoblja pogoršanja. Identifikacija fenotipova ključna je za postavljanje dijagnoze, primjenu liječenja kao i u razjašnjenju mehanizama bolesti<sup>238</sup>. Fenotipovi astme mogu se dijeliti i prema tipu upale. Atopijski mehanizmi mogu se povezati s najviše 40 % bolesnika s astmom u općoj populaciji. S eozinofilnom upalom može se povezati najviše 50 % oboljelih od astme<sup>239, 240</sup>. Alergijski mehanizmi ne moraju biti jedini i/ili odlučujući faktori za razvoj astme. Neeozinofilna astma povezana je s neutrofilnom upalom ne samo u bolesnika

s teškom astmom, već i kod umjerene i blage astme te se pretpostavlja da je astma uglavnom vezana uz neutrofilnu upalu<sup>241</sup>. Okidači ovakve upale u dišnim putovima mogu biti različiti, kao npr. virusne infekcije, bakterijski endotoksini, onečišćenje zraka i ozon te gljive.

Na temelju navedenih podataka zaključujemo da se većina naših ispitanika (s obzirom na dob i atopiju) ubraja u podskupinu astme koju nazivamo „zviždanje potaknuto mnogostrukim okidačima“ (engl. *Multiple trigger wheezing*), a prema upali u podskupinu alergijske astme.

Premda je poznat veliki broj činitelja koji utječu na astmu nije identificiran specifičan biološki ili okolišni uzročnik. Istraživanja upućuju na doprinos genetskih, ali i negenetskih činitelja. Negenetski činitelji mogu biti okidači napadaja astme i mogu biti uzroci astmatskog procesa ili sklonosti prema nastanku astme (koji su manje poznati). Obje grupe činitelja, i genetski i negenetski, mogu pridonijeti težini i trajanju astme.

U ovoj studiji pozornost smo usmjerili na utjecaj pušenja majke u trudnoći što je jedan od najvažnijih činitelja rizika na razvoj astme u međudjelovanju s genetskim činiteljima.

Svjesnost o štetnosti pušenja u Europi raste (podatci govore o trećini europske populacije). Zabrinjavajuća je činjenica da približno jedna četvrtina do jedna trećina žena reproduktivne dobi, pa tako i trudnica, puši<sup>242</sup>. Na osnovu rezultata Europske longitudinalne studije o trudnoći i djetinjstvu (ELSPAC, engl. *European Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood*) koja istražuje i pušačke navike žena tijekom trudnoće, smatra se da je približno polovica ukupnog broja trudnica neko vrijeme pušila (44,12 %). Kada se uzme u obzir količina od barem 10 cigareta na dan, na početku trudnoće bilo ih je 35,13 %, u vrijeme prvog micanja ploda 18,51 %, a u posljednja dva mjeseca trudnoće 14,02 %. Nakon poroda ponovno se povećao broj žena koje puše (18,97 %)<sup>243</sup>. Učestalost pušenja u trudnoći u Hrvatskoj iznosi oko 26 %<sup>244-246</sup>. U ovom istraživanju, otprilike 20 % djece bilo je izloženo pušenju majke tijekom trudnoće, a otprilike 30 % tijekom prve godine života. Tijekom prve godine života 2/3 djece bilo je izloženo duhanskom dimu od strane člana kućanstva. Drugi autori također su potvrdili štetan utjecaj duhanskog dima na dišne putove. Strachan i Cook



pratili su učinke pasivnog pušenja na astmu i zviždanje u djece. Registrirali su da se rizik za prevalenciju astme u djetinjstvu poveća za 40 % ako netko od roditelja puši. Ako majka puši postnatalno incidencija za astmu i zviždanje do 6 godina života se povisi za oko 30 %, a tijekom školske dobi za 13 %<sup>46, 75</sup>. Noviji, sustavni pregled literature iz 2007.godine, koji je pratio izloženost pušenju u kući pokazao je porast astme u djetinjstvu za 33 %<sup>54</sup>. Burke i suradnici su<sup>55</sup>, u meta-analizi, pokazali da je izloženost djeteta pušenju majke u trudnoći bila povezana s 40 %-tnim porastom rizika za **zviždanje** u djece mlađom od 2 godine (OR = 1,41, 95 % CI = 1,20 – 1,67), a slično i za djecu dobi 3-4 godine (OR = 1,28, 95 % CI = 1,14 – 1,44). Prenatalna izloženost pušenju povećala je rizik za zviždanje za 52 % (u djece dobi 5-12 godina, OR = 1,52, 95 % CI = 1,23 – 1,87), a postnatalno izlaganje djeteta majčinom pušenju bilo je povezano s najjačim učinkom na zviždanje djece mlađe od 2 godine (OR = 1,70, 95 % CI = 1,24 – 2,35), kao i sa zviždanjem u djece dobi između 3 i 4 godine (OR = 1,65, 95 % CI = 1,20 – 2,68) i incidencijom zviždanja u djece između 5 i 18 godina (OR = 1,18, 95 % CI = 0,99 – 1,40). Pušenje nije samo rizik za zviždanje, već i za razvoj astme. Prenatalno pušenje majke ima najjači učinak na incidenciju **astme** u djece mlađe od 2 godine (OR = 1,85, 95 % CI = 1,35 – 2,53). Taj se učinak progresivno smanjivao u odnosu na incidenciju astme s porastom dobi, ali je i dalje bio značajan i u djece dobi između 5 i 18 godina (OR = 1,23, 95 % CI = 1,12 – 1,36).

Osim okolišnih činitelja, tijekom posljednja tri desetljeća, veliki broj genetskih istraživanja imala su za cilj pronaći genetske varijante povezane s rizikom za razvoj astme. Korišteni su različiti genetski i genomski pristupi uključujući *linkage* analizu, istraživanja povezanosti polimorfizama kandidatskog gena, istraživanja povezanosti polimorfizama cijelog genoma. Nasuprot općim očekivanjima nijedan SNP otkriven putem GWAS studije nije u potpunosti objasnio nasljednost astme premda su se otkrili novi rizični lokusi i aleli. Kao i u drugim složenim, poligenetskim bolestima, aleli povezani s astmom imali su pojedinačno slab utjecaj na rizik za nastanak astme (OR~1,2 i za najjače povezane lokuse)<sup>185</sup>. Ovim analizama

uočeno je preko sto različitih gena koji su povezani s astmom, a lista se i dalje produžuje. Otkriveni geni temeljem načina svog djelovanja mogu se svrstati u podskupine: 1) gene povezane s funkcijom imunološkog sustava, 2) gene povezane s biologijom i funkcijom mukoze i 3) gene povezane s plućnom funkcijom, remodelacijom dišnih putova i težinom bolesti<sup>247, 248</sup>. Važno je naglasiti da povezanost gena s astmom u samo jednom istraživanju nužno ne potvrđuje vezu između gena i bolesti. Temeljni problem u velikom broju istraživanja koja su vezana za astmu je manjak „replikacijskih“ istraživanja, tj. ponavljanja istih istraživanja na drugim populacijama. Samo manja podskupina otkrivenih gena bila je povezana s astmom u više istraživanja (>1) i mnogi smatraju ponavljanje (replikaciju) rezultata kao najvažniju osobinu kandidatskog gena<sup>247, 248</sup>. Stoga je i u ovom istraživanju cilj bio ponoviti rezultate prijašnjih istraživanja na populaciji djece u Republici Hrvatskoj, ali i detaljnije istražiti cijelu regiju 17q12-21. Nadalje, pojedini geni mogu biti važni samo za neki fenotip astme (npr. astma u dječjoj dobi, atopijska astma, astma povezana s grinjama ili profesionalna astma) i stoga se ne može uvijek očekivati ponavljanje rezultata u različitim populacijama. Također, pojedini geni izraženi su samo u određenim okolišnim sredinama, npr. u djece koja odrastaju s mačkom<sup>249</sup> ili u onih koji su izloženi pasivnom pušenju tijekom prve godine života<sup>250, 251</sup>. Može se reći da su genetski činitelji uključeni u razvoj, aktivnost i težinu astme, da djeluju putem složenih mehanizama koji uključuju međudjelovanja s okolišnim činiteljima i drugim genima. Stoga, istraživanja međudjelovanja gena i okoliša, G × E ili GEI (engl. *Gene–environment interaction studies*) imaju za cilj objasniti kako snaga i smjer povezanosti između određenih genetskih varijanti i astme mogu ovisiti o tadašnjim okolišnim izloženostima i obratno. Do sada je većina G × E međudjelovanja prepoznata putem istraživanja koja su koristila već ranije postavljene hipoteze, a uključivale su samo nekoliko kandidatskih gena<sup>252</sup>.

## 5.1. Glavni pronalasci

U ovom istraživanju o astmi djece školske dobi, opsežno su genotipizirani tag-SNP-ovi na šest gena u regiji 17q12-21. Potvrđena je značajna povezanost između SNP-a rs12150079 na genu *ZPBP2* i astme, (što je opisano i u drugim populacijama)<sup>185</sup>. Po prvi puta je uočena povezanost između SNP-a rs9635726 na genu *IKZF3* i astme. Ovaj intronski SNP nije ranije genotipiziran u drugim objavljenim studijama i nije u LD-u s drugim SNP-ovima na genu *IKZF3* koji su bili povezani s astmom. Stoga može predstavljati novi i neovisni rezultat. Nasuprot tome, nismo uočili povezanost između astme i najčešće opisanih SNP-ova (rs7216389 i rs2305480) što je objavljeno u drugim studijama<sup>70, 174, 178, 182-185, 190-193</sup>.

Potvrđena su međudjelovanja izloženosti pušenju, SNP-ova na cijeloj regiji i astme, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima<sup>70, 187, 193</sup>.

Kod djece s astmom testovi plućne funkcije povezani su s 8 SNP-ova od kojih je jedan (rs3169572 u genu *ORMDL3*) ostao značajno povezan nakon korekcije za multiple usporedbe. Opazili smo značajne povezanosti između izlaganja duhanskom dimu u ranoj dobi, genetskih varijanti 17q12-21 i plućne funkcije.

Prvi put su pokazana značajna međudjelovanja polimorfizama 17q12-21, izloženosti krznanim ljubimcima u kući i astme te težih egzacerbacija astme koje zahtijevaju prijem u bolnicu. Posjedovanje kućnih ljubimaca u dojenačkom razdoblju imalo je zaštitni učinak na razvoj astme, ali samo kod djece koja su homozigoti za uobičajeni alel za SNP (rs921651) na genu *GSDMA*.

Kod djece s dijagnosticiranom astmom uočili smo suprotan učinak između posjedovanja kućnih ljubimaca za vrijeme istraživanja, genetskih varijanti na genu *ORMDL3* i egzacerbacija astme. Posjedovanje kućnih ljubimaca za vrijeme istraživanja povećalo je rizik za prijem u bolnicu, ali samo kod djece koja su nositelji rizičnog alela na SNP-ovima rs3744246, rs4795403 i rs4795404 gena *ORMDL3*.

## 5.2. Objašnjenje rezultata

U našem istraživanju na djeci školske dobi uočili smo povezanosti SNP-ova na genima GSDMA i ZPBP2 s prijemom u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme. U kontekstu ranih okolišnih izlaganja dodatno smo potvrdili povezanosti između regije 17q12-q21 i astme te otkrili nekoliko novih interakcija. Pojedine povezanosti genetskih varijanti i astme kao i težine astme uočile su se tek nakon što se u obzir uzmu izlaganja djece okolišu (pušenju majke u trudnoći ili posjedovanju kućnih ljubimaca). Ranije studije koje su istraživale<sup>70, 174, 185, 189</sup> povezanosti SNP-ova u ovoj regiji i astme objavile su nekonzistentne rezultate što može biti posljedica višestrukih interakcija između genetskih varijanti i okolišnih činitelja (Tablica 15).

Tablica 15: Skupna usporedba povezanosti polimorfizama u regiji 17q12-21 i astme u objavljenim istraživanjima u euroazijskim populacijama uključujući istraživanje u hrvatske djece školske dobi

	Geni	Moffatt	Madore	Tavendale	Sleiman	Flory	Bouzigon	Bisgaard	Rogers	Verlaan	Moffat2	Ferreira	Binia	Marinho	hrvatsko istraživanje
rs3859192	GSDMA	? (As)			x	? (As)	x				T			T As+At+GEIcde	
rs7212938	GSDMA	? (As)					x							G	G (hospit.)+GEI (hospit.)
rs4795408	GSDMA													A As+GEIe	A (LF)+GEI (Hospit.)
rs921651	GSDMA													A(eNO)	G (LF)
rs3859193	GSDMA														
rs3894194	GSDMA	? (As)			x	? (As)+GEIc	x				A			A	GEI (As+LF)
rs3902025	GSDMA	? (As)									T			T As+GEIcde	GEI (LF)
rs8077456	GSDMA														
rs2290400	GSDMB	C (As)	C (As)		C (As)	? (As)+GEIc	x		x		T			T As+GEIc	T (hospit.)+GEI (As)
RS1008723	GSDMB														
rs8067378	GSDMB	? (As)			G (As)	? (As)+GEIc	x		x	A (As)				A	A (hospit.)+GEI (As+LF)
rs2305479	GSDMB	? (As)	T (As)				C (As)+GEIc							C	
rs869402	GSDMB														
rs7216389	GSDMB	C (As)	C (As)	T (As)	(As)	? (As)+GEIc	x	T (As, AHR)	x	T (As)		T	T	T	GEI (As)
rs2305480	GSDMB	? (As)				? (As)+GEIc	G (As)+GEIc					G			GEI (LF)
rs9303281	GSDMB	? (As)	A (As)				A (As)+GEIc								
rs7219923	GSDMB	? (As)	C (As)				T (As)+GEIc								
rs4795400	GSDMB	? (As)					T (As)+GEIc								
rs2060941	IKZF3														
RS2313430	IKZF3														
rs9303277	IKZF3	T (As)			T (As)	? (As)+GEIc	C (As)+GEIc								GEI (As+LF)
rs17676191	IKZF3														
rs9635726	IKZF3														T (As+LF)
RS9911688	IKZF3									C (As)				GEIc	
rs9900538	IKZF3													GEIc	C (LF)
rs1453559	IKZF3													T	
RS2313429	IKZF3														
rs3816470	IKZF3									A (As)					
rs8069176	intergenic	? (As)					G								

					(As)a+GEIc							
rs2872507	intergenic					G						
rs7942	ORMDL3					(As+AHR)					x	
											A As+GEId	
rs8076131	ORMDL3	? (As)	A (As)			A					GEI (LF)	
rs17608925	ORMDL3					(As)b+GEIc					GEI (LF)	
rs11545311	ORMDL3											
rs12603332	ORMDL3									x	GEI (As+LF)	
rs4795403	ORMDL3	? (As)								x	C (LF)+GEI (LF)	
rs3169572	ORMDL3										G (LF)	
rs4795405	ORMDL3	T (As)				T (As)	? (As)+GEIc	C (As)+GEIc	C (As+AHR)	C	C	GEI (As)
rs8079416	ORMDL3	T (As)				C (As)	? (As)+GEIc	x		C	C As+GEIc	GEI (Hospit.)
rs4795404	ORMDL3	? (As)						x			GEIc <sub>ef</sub>	GEI (LF)
rs4378650	#	? (As)	C (As)					x				
rs4795402	ORMDL3i	? (As)						ř				
rs3744246	ORMDL3i	? (As)						x	x	C		GEI (LF)
						G						
rs4794820	ORMDL3i	? (As)				(As)a+GEIc						
rs7207600	ORMDL3i	? (As)						x				
rs8065126	ORMDL3i	? (As)						x				
rs6503525	ORMDL3i	? (As)	x					x		C		
rs4795408	ORMDL3i	G (As)	x					x				
rs11650680	TOP2A	? (As)						x				T (LF)
rs11540720	TOP2A										GEId	GEI (LF)
rs34300454	TOP2A											GEI (LF)
rs471692	TOP2A											T (LF)
rs13695	TOP2A										x	
rs2715555	TOP2A											
rs11870965	ZPBP2											
rs1054609	ZPBP2	? (As)									A As+GEId	
rs1453560	ZPBP2											
rs12936231	ZPBP2								C (As)		C As+GEIc	GEI (As)
rs12150079	ZPBP2									G	GEIc	G(As)+hospit.
										G	G	
rs11557467	ZPBP2	T (As)	G (As)			T (As)	? (As)+GEIc	G (As)+GEIc		ř		GEI (As)
rs35591738	ZPBP2										x	

Skraćenice: I-intergenetski; As - astma; At - atopija; GEI - međudjelovanje gena i okoliša; LF - plućna funkcija, hospit – prijem u bolnicu

Tablica prikazuje rizične alele za SNP-ove povezane s astmom, ako nije drugačije zabilježeno

? označava povezanost, ali rizični alel nije objavljen; x označava da nema povezanosti; #rs4378650 je pretvoren u rs4065275.

GEIa - astma i rana prezentacija astme; GEIb - astma, rani i kasni početak astme; GEIc - povezano s astmom; GEId - povezano s plućnom funkcijom; GEIe - povezano s bronhalnom hiperreaktabilnošću AHR; GEIf - povezan s atopijom

U posljednje vrijeme nekoliko studija istraživalo je povezanost polimorfizama u regiji 17q12-21 i astme u međudjelovanju s izloženošću pušenju u djetinjstvu.<sup>69, 187, 194</sup> U našem istraživanju devet varijanti bilo je u značajnom međudjelovanju s astmom i izloženosti duhanskom dimu tijekom rane dobi, ali sedam od njih bilo je u visokom LD-u ( $r^2 > 0,9$ ) pa je malo vjerojatno da predstavljaju neovisne učinke. Bouzigon<sup>69</sup> je uočio povezanost 11 SNP-ova u regiji 17q12-21 i rane pojave astme samo kod djece izložene dimu cigareta u ranoj dobi, ali ne i kod neizložene djece. Flory i suradnici<sup>187</sup> istraživali su utjecaje između izloženosti pušenju tijekom djetinjstva, genetskih varijanti u regiji 17q12-21 i astme u dvije različite populacije te otkrili modificirajući učinak za devet SNP-ova u navedenoj regiji. Povezanosti između ovih devet SNP-ova i astme bila je jača u skupini djece izložene dimu cigareta. Nadalje, podatci iz dvije neovisne prospektivne kohortne studije u Nizozemskoj koje su pratile djecu od fetalnog razdoblja povezale su SNP rs2305480 sa simptomima nalik astmi u predškolske djece, a ta povezanost bila je modificirana izloženošću pušenju već tijekom fetalnog i dojenačkog razdoblja<sup>253</sup>. Istraživanje na odraslima<sup>193</sup> pokazalo je značajno međudjelovanje aktivnog pušenja i polimorfizama 17q12-21 s astmom. Nije bilo značajnog međudjelovanja SNP-a rs7216389 i pušenja majke tijekom trudnoće ili dojenačkog razdoblja u odnosu na ponavljajuće zviždanje (u 1845-ero dojenčadi, istraživanje tipa ispitanik–kontrola)<sup>254</sup>.

Među djecom s astmom otkrili smo nekoliko povezanosti između SNP-ova u regiji 17q12-21 i prijema u bolnicu zbog egzacerbacije astme. Među njima su određeni SNP-ovi bili povezani s prijemom djece u bolnicu zbog egzacerbacije astme samo ako su djeca bila izložena pušenju u ranoj dobi. Prema našem saznanju ova studija je prva pokazala međudjelovanje polimorfizama u regiji 17q12-21, izloženost duhanskom dimu i prijem u bolnicu zbog teže egzacerbacije astme. Time se ukazuje na mogući utjecaj ranog izlaganja duhanskom dimu u razvoju teže astme.

Nadalje, neki istraživači su također tražili povezanosti između polimorfizama 17q12-q21 i drugih pokazatelja egzacerbacija s težinom bolesti. Dva istraživanja u djece<sup>178, 184</sup> u kojima su egzacerbacije definirane uzimanjem oralnih kortikosteroida, pokazale su povezanost alela T na SNP-u rs7216389 s egzacerbacijom astme. Dva istraživanja na odraslim osobama uočila su povezanost istog alela i teže astme, ali samo u ispitanika kod kojih se astma pojavila u ranoj dobi<sup>192, 255</sup>. Te četiri studije istraživale su samo jedan SNP rs7216389, a u našem istraživanju uočen je pozitivan trend za povezanost iste varijante SNP-a rs7216389 s egzacerbacijom astme ( $p=0,09$ ). Istraživali smo mnogo širi panel SNP-ova i uočili najjače povezanosti sa SNP-ovima rs8067378 i rs2290400. Oba su smještena unutar gena *ORMDL3* u istom bloku LD-a kao i SNP rs7216389.

Također smo otkrili nekoliko novih povezanosti između polimorfizama 17q12-21 i parametara plućne funkcije. Uočena je značajna promjena plućne funkcije ako je postojalo izlaganje duhanskom dimu u ranoj životnoj dobi. Većina studija nije dokazala povezanosti s plućnom funkcijom osim studije u populaciji Afroamerikanaca u kontekstu pozitivnog odgovora na bronhodilatatore<sup>179</sup> te u studiji na odrasloj populaciji koja je povezala plućnu funkciju i regiju 17q21 s pušenjem<sup>193</sup>. Samo je jedna studija<sup>254</sup> istraživala potencijalno međudjelovanje polimorfizama u ovoj regiji s posjedovanjem kućnih ljubimaca te izvjestila da postoji značajno međudjelovanje SNP-a rs7216389 na genu *GSDMB* s krznenim kućnim ljubimcima. Uočili su da posjedovanje kućnih ljubimaca povećava rizik za ponavljajuće dojenačko zviždanje kod djece sa genotipom CC, a smanjuje rizik kod homozigota za alel T. S obzirom na to da smo u našem istraživanju iz ISAAC upitnika imali podatke o posjedovanju kućnih ljubimaca, analizirali smo i njihovo međudjelovanje s polimorfizmima u regiji 17q12-21 i astmom. Naše istraživanje pokazuje da varijacije na genu *GSDMA* smanjuju rizik za astmu, ali samo kada su krznjeni ljubimci bili u kući tijekom prve godine života. Kod djece s astmom uočili smo značajno međudjelovanje posjedovanja kućnih ljubimaca, genetskih varijanti na genu *ORMDL3* i egzacerbacija astme. Posjedovanje kućnih



ljubimaca povećavalo je rizik za prijem u bolnicu, ali samo u djece koja su nositelji rizičnog alela na SNP-ovima rs3744246, rs4795403 i rs4795404 gena ORMDL3

Međutim, za daljnje tumačenje uočenih povezanosti genetskih varijanti na razvoj astme, potrebne su funkcionalne studije. Tako su Moffatt i sur.<sup>174</sup> pokazali snažnu vezu transkripcijskih razina gena ORMDL3 u transformiranim limfoblastoidnim staničnim linijama Epstein–Barr virusa (EBV) sa SNP-ovima u regiji 17q21 povezanim s astmom (rs7216389, potencijalno uzročna varijanta). Murphy i suradnici<sup>256</sup> isto su potvrdili na limfocitima CD4+, ali jači dokaz prikazan je za SNP rs4795405. Verlaan i suradnici<sup>190</sup> pokazali su da genetski markeri djeluju preko velike genomske regije i pogađaju ekspresiju nekoliko transkripata. Oni upućuju na to da je SNP rs12936231 dio regulacijske regije koja upravlja transkripcijskom aktivnosti (*allele-specific binding of insulator CTCF* na SNP-u rs12936231) najmanje 3 gena (*ZBP2*, *GSDMB* i *ORMDL3*) i da je jedan od vodećih funkcionalnih kandidata koji objašnjava fenotipsku povezanost s astmom. Navedeni autori ekspresijskih studija predviđeli su da su ova 3 SNP-a (rs7216389, rs4795405, rs12936231) najvjerojatnije funkcionalna. Važno je naglasiti da su u našem istraživanju sva tri ista SNP-a bila povezana s astmom, ali tek u interakciji s ranim izlaganjem duhanskom dimu. Također, otkrivene su neke povezanosti genetičkih markera i astme tek kada se uzme u obzir važan okolišni činitelj (rana izloženost duhanskom dimu, posjedovanje krznenih kućnih ljubimaca). Ovaj rad je doprinos podržavanju ideje dosadašnjih istraživanja<sup>146, 257</sup> u kojima je dokazano da međudjelovanja genetike i okoliša igraju važnu ulogu u određivanju složenih fenotipova astme.

### 5.3. Prednosti i ograničenja istraživanja

Ograničenja istraživanja odnose se na usklađenosti skupina djece prema spolu. Proporcija muške djece bila je veća među ispitanicima s astmom te je sva daljnja statistička analiza morala biti usklađena za spol. Ne može se isključiti mogućnost utjecaja na rezultate zbog neuočene stratifikacije populacije.

Podatci o izloženosti pušenju i kućnim krznenim ljubimcima prikupljeni su putem upitnika i moguće je da je eventualno dolazilo do pogreške jer se neki roditelji nisu sjećali pojedinosti. Broj krznenih kućnih ljubimaca bio je manji u skupini djece s astmom nego u kontrolnoj skupini što se objašnjava izbjegavanjem držanja ljubimaca u nekim domaćinstvima jer u obiteljskoj anamnezi postoji sklonost alergijama.

Snaga ove studije leži u činjenici da smo izveli opsežno genotipiziranje poznatih varijanti unutar široke regije 17q12-21 koja uključuje gene *GSDMA*, *GSDMB*, *ORMDL3*, *IKZF3*, *ZPBP2* i *TOP2* što je omogućilo otkriće novih povezanosti za SNP-ove koji nisu prethodno bili genotipizirani u istraživanjima astme. Ipak je moguće da su iz ovog istraživanja izostavljene dodatne, do sada nepoznate, varijante te da mogu postojati rijetke varijante povezane s bolešću, ali ovo istraživanje nije dizajnirano tako da ih pronalazi. U ovakvim istraživanjima potencijalni je problem identifikacija lažno pozitivnih povezanosti. Da bismo ojačali pronalazak povezanosti gena, okoliša i astme, te smanjili utjecaj greške koji nastaje zbog višestukih testiranja usklađivali smo analizu putem FDR metode. Povećali smo vjerojatnost da su naši rezultati predstavljali stvarnu povezanost (uzimajući u obzir ukupan broj testiranih varijabli), a s obzirom na višestruka testiranja prikazali smo i korigirane i nekorigirane p-vrijednosti.

Dijagnozu astme prema strogim kriterijima postavila je uža specijalistica pedijatrijske alergologije i kliničke imunologije. Hospitalizacija zbog egzacerbacije astme bila je prema

medicinskoj dokumentaciji indikator teže astme. Takvi podatci su pouzdaniji nego podatci koji se dobiju uz pomoć upitnika.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata iz ovog istraživanja zaključujemo:

- Podatci ukazuju na to da je nekoliko gena u regiji 17q12-21 povezano s astmom, težinom astme i plućnom funkcijom
- Pokazano je značajno međudjelovanje polimorfizama u regiji 17q12-21, astme i izlaganja djeteta pušenju tijekom trudnoće
- Postoje značajna međudjelovanja polimorfizama u regiji 17q12-21 regiji, astme i posjedovanja kućnih ljubimaca
- U djece s astmom uočena su međudjelovanja polimorfizama regije 17q12-21, izlaganja djeteta pušenju tijekom trudnoće u odnosu na teže egzacerbacije astme koje zahtijevaju liječenje u bolnici te u odnosu na razinu plućne funkcije
- U djece s astmom uočena su međudjelovanja polimorfizama regije 17q12-21 i posjedovanja kućnih ljubimaca u odnosu na teže egzacerbacije astme koje zahtijevaju liječenje u bolnici te u odnosu na razinu plućne funkcije
- Postoji slabija povezanost između značajnog panela SNP-ova u regiji 17q12-21 i astme, a povezanosti su izrazitije samo kod rane izloženosti okolišu u genetski predisponiranih osoba.
- Ovo istraživanje potvrđuje da varijable koje opisuju izlaganje okolišnim činiteljima treba uključiti u genetske studije povezanosti radi boljeg razumijevanja razvoja astme.

## 7. SAŽETAK

**Dosadašnje spoznaje:** Polimorfizmi u regiji 17q12-21 povezani su s astmom u različitim populacijama, ali su nedovoljno istraživana moguća međudjelovanja genetskih varijanti s okolišem. Vrlo je malo radova pratilo međudjelovanje genetskih varijanti u regiji 17q12-21 i izlaganja djeteta pušenju u ranom životu s pojavom astme, njezinom težinom i plućnom funkcijom. Međutim, nisu istražena međudjelovanja polimorfizama iste regije s okolišnim činiteljem, kao što je posjedovanje kućnog ljubimca (mačke i psa), na pojavu astme, težinu astme i plućnu funkciju.

**Cilj rada:** replicirati povezanost SNP-ova na lokusu 17q12-21 s pojavom astme u dječjoj dobi u Republici Hrvatskoj te detaljno istražiti povezanost genetskih varijanti u ovoj regiji s pojavom astme, težinom astme i plućnom funkcijom (zasebno i kada su u međudjelovanju s okolišnim činiteljima).

**Metode:** U istraživanje je uključeno 837-ero djece dobi od 6 do 18 godina. 423-oje djece imalo je dijagnosticiranu astmu, a 414-ero ispitanika bez astme sačinjavala su kontrolnu skupinu. Genotipiziran je 51 SNP u regiji 17q12-21 (GSDMA, GSDMB, ORMDL3, IKZF3, ZPBP2, TOP2). Podatci o izloženosti djece pušenju majke tijekom trudnoće i posjedovanju kućnih ljubimaca (psa i mačke) prikupljeni su pomoću standardiziranog upitnika. Podatci o akutnim, teškim egzacerbacijama astme, koji su rezultirali prijemom u bolnicu dobiveni su iz bolničkih povijesti bolesti. Svim ispitanicima s astmom učinjena je procjena plućne funkcije (spirometrija).

**Rezultati:** Otkrili smo dva SNP-a (jedan po prvi put otkriven, rs9635726 na genu IKZF3) povezana s astmom. Kod djece s astmom 4 SNP-a (na genima ZPBP2, GSDMB i GSDMA) povezana su s prijemom u bolnicu zbog teže akutne egzacerbacije astme i 8 SNP-ova povezano je s plućnom funkcijom. Jedan SNP (rs9635726) ostao je značajno povezan s FEV<sub>1</sub> i nakon korekcije za višestruka testiranja. Devet genetskih varijanti u cijeloj regiji značajno je povezano s ranim izlaganjem djece pušenju majke (tijekom trudnoće) i astmom,

a 2 genetske varijante s posjedovanjem krznenog kućnog ljubimca (mačke i psa) i astmom. Kod djece s astmom potvrđena su značajna međudjelovanja ranog izlaganja djece pušenju, 3 SNP-a i plućne funkcije te između ranog izlaganja djeteta pušenju, 3 SNP-a (na genima ORMDL3 i GSDMA) i prijema djece u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme. Tri SNP-a (na genu ORMDL3) u značajnom su međudjelovanju s posjedovanjem krznenog ljubimca za vrijeme istraživanja i prijemom djeteta u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme.

**Zaključak:** Analizirani rezultati pokazuju da je više gena u regiji 17q12-21 povezano s astmom. U značajnom su međudjelovanju polimorfizami u regiji 17q12-21, okolišni činitelji (izlaganje djece kućnim ljubimcima ili rano izlaganje djeteta pušenju) te astma, težina astme i plućna funkcija. Ovo istraživanje potvrđuje da bi u genetske studije povezanosti trebalo uključiti izlaganje okolišnim činiteljima.

## 8. SUMMARY

### **Polymorphisms in region 17q12-21 and their associations with asthma presence, asthma severity and lung function among Croatian schoolchildren**

**Mario Blekić**

**2016**

**Background:** Polymorphisms in 17q12-21 region are associated with asthma across different populations.

**Objective:** We sought to replicate those associations and extensively investigate the genes in this region amongst Croatian schoolchildren.

**Methods:** 423 children with asthma and 414 healthy controls aged 6-18 years were recruited. 51 haplotype tagging SNPs were genotyped in 17q12-21 region. Data on exposure to smoking and pet ownership were collected using ISAAC questionnaire. Information on acute asthma exacerbations resulting in hospital admission were retrieved from hospital notes. All asthma cases underwent spirometry.

**Results:** We found 2 SNPs to be associated with asthma. Among children with asthma, 4 SNPs were associated with hospital admissions and 8 SNPs with lung function. Nine markers showed interaction with early-life ETS exposure in relation to asthma and 2 with furry pet ownership. Among children with asthma, we observed significant interactions between early-life ETS exposure, 3 SNPs and lung function, also early-life ETS exposure, 3 SNPs and hospital admission. Three SNPs interacted with current pet ownership in relation to hospital admissions.

**Conclusions:** Several genes in the 17q12-21 region are associated with asthma. Polymorphisms in 17q12-21 region interact with pet and early-life ETS exposure in relation to asthma presence and asthma severity.

## 9. POPIS LITERATURE

1. Bateman E, Hurd S, Barnes P, Bousquet J, Drazen J, FitzGerald M i sur. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal*. 2008; 31(1): 143-78.
2. Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F i sur. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *European Respiratory Journal*. 1995; 8(3): 483.
3. Beasley R. The burden of asthma with specific reference to the United States. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002; 109(5): S482-S9.
4. Jackson RT, Beaglehole R, Rea HH, Sutherland DC. Mortality from asthma: a new epidemic in New Zealand. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982; 285(6344): 771-4.
5. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *European Respiratory Journal*. 1998; 12(2): 315-35.
6. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK 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. *The Lancet*. 2006; 368(9537): 733-43.
7. Patel SP, Järvelin MR, Little MP. Systematic review of worldwide variations of the prevalence of wheezing symptoms in children. *Environmental Health*. 2008; 7(1): 57.
8. Pearce N, Aït-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E i sur. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007; 62(9): 758-66.
9. Pearce N, Sunyer J, Cheng S, Chinn S, Björkstén B, Burr M i sur. Comparison of asthma prevalence in the ISAAC and the ECRHS. ISAAC Steering Committee and the European Community Respiratory Health Survey. *International Study of Asthma and*



Allergies in Childhood. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2000; 16(3): 420-6.

10. Mallol J, Crane J, von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewart A. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: A global synthesis. *Allergologia et Immunopathologia*. 2013; 43(04): 73-85.

11. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med*. 2006; 355(21): 2226-35.

12. Banac S, Tomulić KL, Ahel V, Rozmanić V, Simundić N, Zubović S i sur. Prevalence of asthma and allergic diseases in Croatian children is increasing: survey study. *Croatian Medical Journal*. 2004; 45(6): 721-6.

13. 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. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2007; 13(11): CR505-9-CR-9.

14. Stipić-Marković A, Pevec B, Pevec MR, Custović 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 Medica Croatica: Casopis Hrvatske Akademije Medicinskih Znanosti*. 2003; 57(4): 281-5.

15. Banac S, Rozmanic V, Manestar K, Korotaj-Rozmanic Z, Lah-Tomulic K, Vidovic I i sur. Rising trends in the prevalence of asthma and allergic diseases among school children in the north-west coastal part of Croatia. *J*. 2013; 50(8): 810-4. doi: 10.3109/02770903.2013.803115. Epub 2013 Jun 20.

16. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Lemanske R i sur. International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy*. 2012; 67(8): 976-97.

17. Yunginger JW, Reed CE, O'Connell EJ, Melton LJ, 3rd, O'Fallon WM, Silverstein MD. A community-based study of the epidemiology of asthma. Incidence rates, 1964-1983. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146(4): 888-94.

18. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM i sur. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med.* 2003; 349(15): 1414-22.
19. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med Wkly.* 2014; 144: w14036.
20. Carroll KN, Hartert TV. The impact of respiratory viral infection on wheezing illnesses and asthma exacerbations. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2008; 28(3): 539-61, viii. doi: 10.1016/j.iac.2008.03.001.
21. Forno E, Celedon JC. Predicting asthma exacerbations in children. *Curr Opin Pulm Med.* 2012; 18(1): 63-9.
22. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Gotz M i sur. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy.* 2008; 63(1): 5-34.
23. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M i sur. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171(7): 722-7. Epub 2005 Jan 18.
24. Castro-Rodriguez JA. The Asthma Predictive Index: a very useful tool for predicting asthma in young children. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 126(2): 212-6.
25. Moeller A, Carlsen KH, Sly PD, Baraldi E, Piacentini G, Pavord I i sur. Monitoring asthma in childhood: lung function, bronchial responsiveness and inflammation. *Eur Respir Rev.* 2015; 24(136): 204-15.
26. Eigenmann PA, Atanaskovic-Markovic M, J OBH, Lack G, Lau S, Matricardi PM i sur. Testing children for allergies: why, how, who and when: an updated statement of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Section on Pediatrics and the EAACI-Clemens von Pirquet Foundation. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013; 24(2): 195-209.

27. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Gruber C, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet*. 2006; 368(9537): 763-70.
28. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Expert Panel Report 3: Moving forward to improve asthma care. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120(5): 1012-4.
29. Ogawa Y, Calhoun WJ. Phenotypic characterization of severe asthma. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2010; 16(1): 48-54.
30. Aberle N. Teska astma u djece. *Medix*. 2014; 20(109/110).
31. Fitzpatrick AM, Gaston BM, Erzurum SC, Teague WG. Features of severe asthma in school-age children: Atopy and increased exhaled nitric oxide. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(6): 1218-25. Epub 2006 Oct 10.
32. Rackemann FM. A working classification of asthma. *Am J Med*. 1947; 3(5): 601-6.
33. Samter M, Beers RF, Jr. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy*. 1967; 40(5): 281-93.
34. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012; 18(5): 716-25.
35. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A i sur. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180(5): 388-95. doi: 10.1164/rccm.200903-0392OC. Epub 2009 May 29.
36. Gauvreau GM, Boulet L-P, Cockcroft DW, FitzGerald JM, Carlsten C, Davis BE i sur. Effects of interleukin-13 blockade on allergen-induced airway responses in mild atopic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 183(8): 1007-14.
37. Hamelmann E, Oshiba A, Loader J, Larsen GL, Gleich G, Lee J i sur. Antiinterleukin-5 antibody prevents airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997; 155(3): 819-25.

38. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD i sur. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 130(3): 647-54. e10.
39. ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. "Refractory" eosinophilic airway inflammation in severe asthma: effect of parenteral corticosteroids. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004; 170(6): 601-5.
40. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*. 1999; 353(9171): 2213-4.
41. Cowan DC, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, Taylor DR. Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma. *Thorax*. 2009; 65(5): 384-90.
42. Stampfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(5): 377-84. doi: 10.1038/nri2530.
43. Boulet L-P, Lemièrre C, Archambault F, Carrier G, Descary MC, Deschesnes F. Smoking and asthma\*: Clinical and radiologic features, lung function, and airway inflammation. *Chest*. 2006; 129(3): 661-8.
44. Nielsen GD, Olsen O, Larsen ST, Lovik M, Poulsen LK, Glue C i sur. IgE-mediated sensitisation, rhinitis and asthma from occupational exposures. Smoking as a model for airborne adjuvants? *Toxicology*. 2005; 216(2-3): 87-105. Epub 2005 Aug 31.
45. Jaakkola JJK, Gissler M. Maternal Smoking in Pregnancy, Fetal Development, and Childhood Asthma. *American Journal of Public Health*. 2004; 94(1): 136-40.
46. Health UDo, Services H. The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke: a report of the Surgeon General. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. 2006; 709.

47. Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011; 8(2): 613-28.
48. Centers for Disease Control and P. State-specific prevalence of current cigarette smoking among adults--United States, 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2004; 52(53): 1277.
49. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *European respiratory journal*. 2004; 24(5): 822-33.
50. Gilliland FD, Islam T, Berhane K, Gauderman WJ, McConnell R, Avol E i sur. Regular smoking and asthma incidence in adolescents. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 174(10): 1094-100.
51. Genuneit J, Weinmayr G, Radon K, Dressel H, Windstetter D, Rzehak P i sur. Smoking and the incidence of asthma during adolescence: results of a large cohort study in Germany. *Thorax*. 2006; 61(7): 572-8.
52. Rasmussen F, Siersted HC, Lambrechtsen J, Hansen HS, Hansen N-CG. Impact of airway lability, atopy, and tobacco smoking on the development of asthma-like symptoms in asymptomatic teenagers: the Odense Schoolchild Study. *CHEST Journal*. 2000; 117(5): 1330-5.
53. Goksör E, Åmark M, Alm B, Gustafsson PM, Wennergren G. The impact of pre-and post-natal smoke exposure on future asthma and bronchial hyper-responsiveness. *Acta Paediatrica*. 2007; 96(7): 1030-5.
54. Vork K, Broadwin R, Blaisdell R. Developing asthma in childhood from exposure to secondhand tobacco smoke: insights from a meta-regression. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2008; 13(4): 1313-25.
55. Burke H, Leonardi-Bee J, Hashim A, Pine-Abata H, Chen Y, Cook DG i sur. Prenatal and passive smoke exposure and incidence of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*. 2012; 129(4): 735-44.

56. Johnston R. Clearing the air: asthma and indoor air exposures. Washington, DC: National Academy Press; 2000.
57. Institute of Medicine . Committee on the Assessment of Asthma and Indoor A. Clearing the air: asthma and indoor air exposures: National Academy Press; 2000.
58. Cook DG, Strachan DP, Carey IM. Parental smoking and spirometric indices in children. *Thorax*. 1998; 53(10): 884-93.
59. Cunningham J, Dockery DW, Speizer FE. Maternal smoking during pregnancy as a predictor of lung function in children. *American Journal of Epidemiology*. 1994; 139(12): 1139-52.
60. Stick SM, Burton PR, Gurrin L, Sly PD, LeSouef PN. Effects of maternal smoking during pregnancy and a family history of asthma on respiratory function in newborn infants. *The Lancet*. 1996; 348(9034): 1060-4.
61. Gilliland FD, Berhane K, McConnell R, Gauderman WJ, Vora H, Rappaport EB i sur. Maternal smoking during pregnancy, environmental tobacco smoke exposure and childhood lung function. *Thorax*. 2000; 55(4): 271.
62. Cook DG, Strachan DP. Parental smoking, bronchial reactivity and peak flow variability in children. *Thorax*. 1998; 53(4): 295-301.
63. Young S, Le Souef PN, Geelhoed GC, Stick SM, Turner KJ, Landau LI. The influence of a family history of asthma and parental smoking on airway responsiveness in early infancy. *New England Journal of Medicine*. 1991; 324(17): 1168-73.
64. Tager IB. Smoking and childhood asthma-where do we stand? *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158(2): 349-51.
65. 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. *European Respiratory Journal*. 2006; 28(4): 721-9.

66. Palmer CNA, Doney ASF, Lee SP, Murrie I, Ismail T, Macgregor DF i sur. Glutathione S-transferase M1 and P1 genotype, passive smoking, and peak expiratory flow in asthma. *Pediatrics*. 2006; 118(2): 710-6.
67. Wu H, Romieu I, Sienra-Monge J-J, del Rio-Navarro BE, Anderson DM, Dunn EW i sur. Parental smoking modifies the relation between genetic variation in tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) and childhood asthma. *Environmental health perspectives*. 2007: 616-22.
68. Wang Z, Chen C, Niu T, Wu D, Yang J, Wang B i sur. Association of asthma with  $\beta$ 2-adrenergic receptor gene polymorphism and cigarette smoking. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001; 163(6): 1404-9.
69. Dizier MH, Bouzigon E, Guilloud-Bataille M, Siroux V, Lemainque A, Boland A i sur. Evidence for gene $\times$  smoking exposure interactions in a genome-wide linkage screen of asthma and bronchial hyper-responsiveness in EGEA families. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15(7): 810-5.
70. Bouzigon E, Corda E, Aschard H, Dizier MH, Boland A, Bousquet J i sur. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *New England Journal of Medicine*. 2008; 359(19): 1985.
71. Rothman KJ, Greenland S. *Modern epidemiology*. Boston: Little, Brown. 1986; 2: 23-31.
72. Gilliland FD, Li Y-F, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001; 163(2): 429-36.
73. Cook DG, Strachan DP. Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research. *Thorax*. 1999; 54(4): 357-66.
74. Cook DG, Strachan DP. Health effects of passive smoking. 3. Parental smoking and prevalence of respiratory symptoms and asthma in school age children. *Thorax*. 1997; 52(12): 1081-94.

75. Strachan DP, Cook DG. Parental smoking and childhood asthma: longitudinal and case-control studies. *Thorax*. 1998; 53(3): 204-12.
76. Chilmonczyk BA, Salmun LM, Megathlin KN, Neveux LM, Palomaki GE, Knight GJ i sur. Association between Exposure to Environmental Tobacco Smoke and Exacerbations of Asthma in Children. *New England Journal of Medicine*. 1993; 328(23): 1665-9.
77. McCarville M, Sohn MW, Oh E, Weiss K, Gupta R. Environmental tobacco smoke and asthma exacerbations and severity: the difference between measured and reported exposure. *Arch Dis Child*. 2013; 98(7): 510-4.
78. Comhair SA, Gaston BM, Ricci KS, Hammel J, Dweik RA, Teague WG i sur. Detrimental effects of environmental tobacco smoke in relation to asthma severity. *PLoS One*. 2011; 6(5): 0018574.
79. Matt GE, Quintana PJE, Zakarian JM, Fortmann AL, Chatfield DA, Hoh E i sur. When smokers move out and nonsmokers move in: Residential thirdhand smoke pollution and exposure. *Tob Control*. 2011; 20(1): 037382.
80. Sleiman M, Destailats H, Smith JD, Liu C-L, Ahmed M, Wilson KR i sur. Secondary organic aerosol formation from ozone-initiated reactions with nicotine and secondhand tobacco smoke. *Atmospheric Environment*. 2010; 44(34): 4191-8.
81. Hang B, Sarker AH, Havel C, Saha S, Hazra TK, Schick S i sur. Thirdhand smoke causes DNA damage in human cells. *Mutagenesis*. 2013; 28(4): 381-91.
82. Heinrich J. Influence of indoor factors in dwellings on the development of childhood asthma. *International journal of hygiene and environmental health*. 2011; 214(1): 1-25.
83. Dekker C, Dales R, Bartlett S, Brunekreef B, Zwanenburg H. Childhood asthma and the indoor environment. *Chest*. 1991; 100(4): 922-6.
84. Ponsonby A-L, Couper D, Dwyer T, Carmichael A, Kemp A, Cochrane J. The relation between infant indoor environment and subsequent asthma. *Epidemiology*. 2000; 11(2): 128-35.



85. van Strien RT, Gent JF, Belanger K, Triche E, Bracken MB, Leaderer BP. Exposure to NO<sub>2</sub> and nitrous acid and respiratory symptoms in the first year of life. *Epidemiology*. 2004; 15(4): 471-8.
86. Garrett MH, Hooper MA, Hooper BM, Abramson MJ. Respiratory symptoms in children and indoor exposure to nitrogen dioxide and gas stoves. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998; 158(3): 891-5.
87. McConnell R, Berhane K, Gilliland F, Molitor J, Thomas D, Lurmann F i sur. Prospective study of air pollution and bronchitic symptoms in children with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003; 168(7): 790-7.
88. Weinmayr G, Romeo E, De Sario M, Weiland SK, Forastiere F. Short-term effects of PM<sub>10</sub> and NO<sub>2</sub> on respiratory health among children with asthma or asthma-like symptoms: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2010; 118(4): 449-57.
89. Hasan Arshad S, Hamilton RG, Franklin Adkinson Jr N. Repeated aerosol exposure to small doses of allergen: a model for chronic allergic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998; 157(6): 1900-6.
90. Salo PiM, Arbes SJ, Crockett PW, Thorne PS, Cohn RD, Zeldin DC. Exposure to multiple indoor allergens in US homes and its relationship to asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008; 121(3): 678-84. e2.
91. Morgan WJ, Crain EF, Gruchalla RS, O'Connor GT, Kattan M, Evans lii R i sur. Results of a home-based environmental intervention among urban children with asthma. *New England Journal of Medicine*. 2004; 351(11): 1068-80.
92. Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von Mutius E i sur. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. *The Lancet*. 2000; 356(9239): 1392-7.
93. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, GrÄLber C, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *The Lancet*. 2006; 368(9537): 763-70.

94. Burr ML, Anderson HR, Austin JB, Harkins LS, Kaur B, Strachan DP i sur. Respiratory symptoms and home environment in children: a national survey. *Thorax*. 1999; 54(1): 27-32.
95. Bornehag C-G, Sundell J, Hagerhed L, Janson S. Pet-keeping in early childhood and airway, nose and skin symptoms later in life. *Allergy*. 2003; 58(9): 939-44.
96. Melen E, Wickman M, Nordvall S, Hageå Hamsten V, Lindfors A. Influence of early and current environmental exposure factors on sensitization and outcome of asthma in pre-school children. *Allergy*. 2001; 56(7): 646-52.
97. Apelberg BJ, Aoki Y, Jaakkola JJK. Systematic review: Exposure to pets and risk of asthma and asthma-like symptoms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001; 107(3): 455-60.
98. 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. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2002; 110(5): 736-42.
99. Perzanowski MS, Rönmark E, Platts-Mills TAE, Lundbäck B. Effect of cat and dog ownership on sensitization and development of asthma among preteenage children. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002; 166(5): 696-702.
100. Ownby DR, Johnson CC, Peterson EL. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *Jama*. 2002; 288(8): 963-72.
101. Nicolai T, Carr D, Weiland SK, Duhme H, Von Ehrenstein O, Wagner C i sur. Urban traffic and pollutant exposure related to respiratory outcomes and atopy in a large sample of children. *European respiratory journal*. 2003; 21(6): 956-63.
102. Zhao Z, Zhang Z, Wang Z, Ferm M, Liang Y, Norbäck D. Asthmatic symptoms among pupils in relation to winter indoor and outdoor air pollution in schools in Taiyuan, China. *Environmental health perspectives*. 2008: 90-7.

103. Braun-Fahrlaender C, Vuille JC, Sennhauser FH, Neu U, Kälinzle T, Grize L i sur. Respiratory health and long-term exposure to air pollutants in Swiss schoolchildren. SCARPOL Team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen. American journal of respiratory and critical care medicine. 1997; 155(3): 1042-9.
104. Morgenstern V, Zutavern A, Cyrys J, Brockow I, Gehring U, Koletzko S i sur. Respiratory health and individual estimated exposure to traffic-related air pollutants in a cohort of young children. Occupational and environmental medicine. 2007; 64(1): 8-16.
105. Shima M, Nitta Y, Adachi M. Traffic-related air pollution and respiratory symptoms in children living along trunk roads in Chiba Prefecture, Japan. Journal of epidemiology. 2003; 13(2): 108-19.
106. Brauer M, Hoek G, Smit HA, De Jongste JC, Gerritsen J, Postma DS i sur. Air pollution and development of asthma, allergy and infections in a birth cohort. European Respiratory Journal. 2007; 29(5): 879-88.
107. Magnus P, Nafstad P, Øie L, Carlsen KCLd, Becher G, Kongerud J i sur. Exposure to nitrogen dioxide and the occurrence of bronchial obstruction in children below 2 years. International journal of epidemiology. 1998; 27(6): 995-9.
108. Baldi I, Tessier JF, Kauffmann F, Jacqmin-Gadda H, Nejjarri C, Salamon R. Prevalence of asthma and mean levels of air pollution: results from the French PAARC survey. European respiratory journal. 1999; 14(1): 132-8.
109. Heymann PW, Carper HT, Murphy DD, Platts-Mills TAE, Patrie J, McLaughlin AP i sur. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. Journal of allergy and clinical immunology. 2004; 114(2): 239-47.
110. Johnston SL, Pattermore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L i sur. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. Bmj. 1995; 310(6989): 1225-9.

111. MacDowell AL, Bacharier LB. Infectious triggers of asthma. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2005; 25(1): 45-66.
112. Carroll KN, Hartert TV. The impact of respiratory viral infection on wheezing illnesses and asthma exacerbations. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2008; 28(3): 539-61.
113. Kusel MMH, de Klerk NH, Kebabdzic T, Vohma V, Holt PG, Johnston SL i sur. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007; 119(5): 1105-10.
114. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA i sur. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *New England Journal of Medicine*. 2009; 360(6): 588-98.
115. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F i sur. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005; 171(2): 137-41.
116. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM i sur. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *The Lancet*. 1999; 354(9178): 541-5.
117. Thomsen SF, van der Sluis S, Stensballe LG, Posthuma D, Skytthe A, Kyvik KO i sur. Exploring the association between severe respiratory syncytial virus infection and asthma: a registry-based twin study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009; 179(12): 1091-7.
118. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE i sur. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008; 178(7): 667-72.
119. Kotaniemi-Syrjänen A, Vainionpää R, Reijonen TM, Waris M, Korhonen K, Korppi M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy—the first sign of childhood asthma? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 111(1): 66-71.

120. Lemanske RF, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA i sur. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 116(3): 571-7.
121. Chinn S. Obesity and asthma. *Paediatric respiratory reviews*. 2006; 7(3): 223-8.
122. Flaherman V, Rutherford GW. A meta-analysis of the effect of high weight on asthma. *Archives of disease in childhood*. 2006; 91(4): 334-9.
123. Gilliland FD, Berhane K, Islam T, McConnell R, Gauderman WJ, Gilliland SS i sur. Obesity and the risk of newly diagnosed asthma in school-age children. *American journal of epidemiology*. 2003; 158(5): 406-15.
124. 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. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001; 163(6): 1344-9.
125. Ma Y, Zhao J, Han ZR, Chen Y, Leung TF, Wong GWK. Very low prevalence of asthma and allergies in schoolchildren from rural Beijing, China. *Pediatric pulmonology*. 2009; 44(8): 793-9.
126. Malik HU-R, Kumar K, Frieri M. Minimal difference in the prevalence of asthma in the urban and rural environment. *Clinical Medicine Insights Pediatrics*. 6: 33.
127. Priftis KN, Anthracopoulos MB, Nikolaou-Papanagiotou A, Mantziou V, Paliatsos AG, Tzavelas G i sur. Increased sensitization in urban vs. rural environment-Rural protection or an urban living effect? *Pediatric allergy and immunology*. 2007; 18(3): 209-16.
128. Pesek RD, Vargas PA, Halterman JS, Jones SM, McCracken A, Perry TT. A comparison of asthma prevalence and morbidity between rural and urban schoolchildren in Arkansas. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2010; 104(2): 125-31.
129. Ege MJ, Frei R, Bieli C, Schram-Bijkerk D, Waser M, Benz MR i sur. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007; 119(5): 1140-7.

130. Seaton A, Godden DJ, Brown K. Increase in asthma: a more toxic environment or a more susceptible population? *Thorax*. 1994; 49(2): 171.
131. Harik-Khan RI, Muller DC, Wise RA. Serum vitamin levels and the risk of asthma in children. *American journal of epidemiology*. 2004; 159(4): 351-7.
132. Rubin RN, Navon L, Cassano PA. Relationship of serum antioxidants to asthma prevalence in youth. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004; 169(3): 393-8.
133. Black PN, Sharpe S. Dietary fat and asthma: is there a connection? *European Respiratory Journal*. 1997; 10(1): 6-12.
134. Kim J-H, Ellwood PE, Asher MI. Diet and asthma: looking back, moving forward. *Respir Res*. 2009; 10(1): 49.
135. Chatzi L, Apostolaki G, Bibakis I, Skypala I, Bibaki-Liakou V, Tzanakis N i sur. Protective effect of fruits, vegetables and the Mediterranean diet on asthma and allergies among children in Crete. *Thorax*. 2007; 62(8): 677-83.
136. Wickens K, Barry D, Friezema A, Rhodius R, Bone N, Purdie G i sur. Fast foods-are they a risk factor for asthma? *Allergy*. 2005; 60(12): 1537-41.
137. Kramer MS. Breastfeeding and allergy: the evidence. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011; 59(Suppl. 1): 20-6.
138. Kull I, Almqvist C, Lilja G, Pershagen Gr, Wickman M. Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004; 114(4): 755-60.
139. Snijders BEP, Thijs C, Dagnelie PC, Stelma FF, Mommers M, Kummeling I i sur. Breast-feeding duration and infant atopic manifestations, by maternal allergic status, in the first 2 years of life (KOALA study). *The journal of pediatrics*. 2007; 151(4): 347-51. e2.
140. Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Martinez FD. Factors influencing the relation of infant feeding to asthma and recurrent wheeze in childhood. *Thorax*. 2001; 56(3): 192-7.

141. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO i sur. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *The Lancet*. 2002; 360(9337): 901-7.
142. Bjorksten B. Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer seminars in immunopathology*; 2004: Springer; 2004. p. 257-70.
143. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2001; 357(9262): 1076-9.
144. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH i sur. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 111(2): 389-95.
145. Martino D, Prescott S. Epigenetics and prenatal influences on asthma and allergic airways disease. *CHEST Journal*. 139(3): 640-7.
146. Custovic A, Rothers J, Stern D, Simpson A, Woodcock A, Wright AL i sur. Effect of day care attendance on sensitization and atopic wheezing differs by Toll-like receptor 2 genotype in 2 population-based birth cohort studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(2): 390-7 e9.
147. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J i sur. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409(6822): 860-921.
148. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004; 431(7011): 931-45.
149. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nature genetics*. 2001; 27(3): 234-5.
150. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Graves T i sur. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature*. 2008; 453(7191): 56-64.

151. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G i sur. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001; 409(6822): 928-33.
152. Maquat LE. The power of point mutations. *Nature genetics*. 2001; 27(1): 5-6.
153. Mayo O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Research and Human Genetics*. 2008; 11(03): 249-56.
154. Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ i sur. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*. 2001; 411(6834): 199-204.
155. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics*. 1995; 29(2): 311-22.
156. Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G i sur. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet*. 2001; 29(2): 233-7.
157. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics*. 1995; 29(2): 311-22.
158. Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nature Reviews Genetics*. 2005; 6(4): 287-98.
159. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994; 265(5181): 2037-48.
160. Dempfle A, Scherag A, Hein R, Beckmann L, Chang-Claude J, Schäfer H. Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *European Journal of Human Genetics*. 2008; 16(10): 1164-72.
161. Wong MY, Day NE, Luan JA, Wareham NJ. Estimation of magnitude in gene-environment interactions in the presence of measurement error. *Statistics in medicine*. 2004; 23(6): 987-98.



162. Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *The American Review of Respiratory Disease*. 1990; 142(6 Pt 1): 1351-8.
163. Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma. *Jornal De Pediatria*. 2008; 84(4): 68-75.
164. Weiss ST, Raby BA, Rogers A. Asthma genetics and genomics 2009. *Current opinion in genetics & development*. 2009; 19(3): 279-82.
165. Kabesch M. Candidate gene association studies and evidence for gene-by-gene interactions. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2005; 25(4): 681-708.
166. Moffatt MF. Genes in asthma: new genes and new ways. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2008; 8(5): 411-7.
167. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006; 7(2): 95-100.
168. Vercelli D. Advances in asthma and allergy genetics in 2007. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008; 122(2): 267-71.
169. Zhang J, Paré PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respiratory research*. 2008; 9(1): 4.
170. Wills-Karp M, Ewart SL. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5(5): 376-87.
171. LeSouef P. Genetics of asthma: what do we need to know? *Pediatric Pulmonology*. 1997; 24(S15): 3-8.
172. Postma DS, Koppelman GH. Genetics of asthma: where are we and where do we go? *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009; 6(3): 283-7.
173. Denham S, Koppelman GH, Blakey J, Wjst M, Ferreira MA, Hall IP i sur. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. *Respir Res*. 2008; 9:38.(doi): 10.1186/465-9921-9-38.

174. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S i sur. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007; 448(7152): 470-3.
175. Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's elements of medical genetics*: Elsevier Health Sciences; 2011.
176. Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J i sur. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEEA study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000; 162(5): 1812.
177. Ferreira MAR, O'Gorman L, Le Souëf P, Burton PR, Toelle BG, Robertson CF i sur. Robust estimation of experimentwise P values applied to a genome scan of multiple asthma traits identifies a new region of significant linkage on chromosome 20q13. *The American Journal of Human Genetics*. 2005; 77(6): 1075-85.
178. Bisgaard H, Bonnelykke K, Sleiman P, Brasholt M, Chawes B, Kreiner-Moller E i sur. Chromosome 17q21 gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009; 179(3): 179.
179. Galanter J, Choudhry S, Eng C, Nazario S, Rodriguez-Santana JR, Casal J i sur. ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008; 177(11): 1194.
180. Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K i sur. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121(3): 769-70.
181. Leung TF, Sy HY, Ng MCY, Chan IHS, Wong GWK, Tang NLS i sur. Asthma and atopy are associated with chromosome 17q21 markers in Chinese children. *Allergy*. 2009; 64(4): 621-8.

182. Madore AM, Tremblay K, Hudson TJ, Laprise C. Replication of an association between 17q21 SNPs and asthma in a French-Canadian familial collection. *Human genetics*. 2008; 123(1): 93-5.
183. Sleiman PM, Annaiah K, Imielinski M, Bradfield JP, Kim CE, Frackelton EC i sur. ORMDL3 variants associated with asthma susceptibility in North Americans of European ancestry. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122(6): 1225-7.
184. Tavendale R, Macgregor DF, Mukhopadhyay S, Palmer CNA. A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008; 121(4): 860-3.
185. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S i sur. A Large-Scale, Consortium-Based Genomewide Association Study of Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2010; 363(13): 1211-21.
186. Dizier M-HIn, Bouzigon E, Guilloud-Bataille M, Siroux Vr, Lemainque A, Boland A i sur. Evidence for gene x smoking exposure interactions in a genome-wide linkage screen of asthma and bronchial hyper-responsiveness in EGEA families. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15(7): 810-5.
187. Flory JH, Sleiman PM, Christie JD, Annaiah K, Bradfield J, Kim CE i sur. 17q12-21 variants interact with smoke exposure as a risk factor for pediatric asthma but are equally associated with early-onset versus late-onset asthma in North Americans of European ancestry. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009; 124(3): 605.
188. Wu H, Romieu I, Sienna Monge JJ, Li H, Del Rio Navarro BE, London SJ. Genetic variation in ORM1 like 3 (ORMDL3) and gasdermin like (GSDML) and childhood asthma. *Allergy*. 2009; 64(4): 629-35.
189. Rogers AJ, Raby BA, Lasky-Su JA, Murphy A, Lazarus R, Klanderman BJ i sur. Assessing the reproducibility of asthma candidate gene associations using genome-wide data. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009; 179(12): 1084-90.

190. Verlaan DJ, Berlivet S, Hunninghake GM, Madore AM, Larivière M, Moussette S i sur. Allele-specific chromatin remodeling in the ZBP2/GSDMB/ORMDL3 locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease. *The American Journal of Human Genetics*. 2009; 85(3): 377-93.
191. Ferreira MAR, McRae AF, Medland SE, Nyholt DR, Gordon SD, Wright MJ i sur. Association between ORMDL3, IL1RL1 and a deletion on chromosome 17q21 with asthma risk in Australia. *European journal of human genetics*. 2011; 19(4): 458-64.
192. Binia AD, Khorasani N, Bhavsar PK, Adcock I, Brightling CE, Chung KF i sur. Chromosome 17q21 SNP and severe asthma. *Journal of human genetics*. 2011; 56(1): 97.
193. Marinho S, Custovic A, Marsden P, Smith JA, Simpson A. 17q12-21 variants are associated with asthma and interact with active smoking in an adult population from the United Kingdom. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2012; 108(6): 402-11. e9.
194. Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, Herrero E, Balcells S, González-Duarte R. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biology*. 2002; 3(6): 1.
195. Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, Valverde MA, Vicente R. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Human molecular genetics*. 2010; 19(1): 111.
196. Todd DJ, Lee A-H, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature reviews immunology*. 2008; 8(9): 663-74.
197. Siow D, Sunkara M, Dunn TM, Morris AJ, Wattenberg B. ORMDL/serine palmitoyltransferase stoichiometry determines effects of ORMDL3 expression on sphingolipid biosynthesis. *J Lipid Res*. 2015; 56(4): 898-908.
198. Tamura M, Tanaka S, Fujii T, Aoki A, Komiyama H, Ezawa K i sur. Members of a novel gene family, Gsdm, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics*. 2007; 89(5): 618-29.

199. Saeki N, Kuwahara Y, Sasaki H, Satoh H, Shiroishi T. Gasdermin (Gsdm) localizing to mouse Chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mammalian Genome*. 2000; 11(9): 718-24.
200. Saeki N, Kim DH, Usui T, Aoyagi K, Tatsuta T, Aoki K i sur. GASDERMIN, suppressed frequently in gastric cancer, is a target of LMO1 in TGF- $\beta$ -dependent apoptotic signalling. *Oncogene*. 2007; 26(45): 6488-98.
201. Saeki N, Usui T, Aoyagi K, Kim DH, Sato M, Mabuchi T i sur. Distinctive expression and function of four GSDM family genes (GSDMA-D) in normal and malignant upper gastrointestinal epithelium. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2009; 48(3): 261-71.
202. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D i sur. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(16): 6062-7.
203. Carl-McGrath S, Schneider-Stock R, Ebert M, Röcken C. Differential expression and localisation of gasdermin-like (GSDML), a novel member of the cancer-associated GSDMDC protein family, in neoplastic and non-neoplastic gastric, hepatic, and colon tissues. *Pathology*. 2008; 40(1): 13-24.
204. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human ZPBP-like gene in silico. *International journal of molecular medicine*. 2003; 12(3): 399-404.
205. Lin Y-N, Roy A, Yan W, Burns KH, Matzuk MM. Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2007; 27(19): 6794-805.
206. Schmitt C, Tonnelle C, Dalloul A, Chabannon C, Debre P, Rebollo A. Aiolos and Ikaros: regulators of lymphocyte development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis*. 2002; 7(3): 277-84.
207. Wang J-H, Avitahl N, Cariappa A, Friedrich C, Ikeda T, Renold A i sur. Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity*. 1998; 9(4): 543-53.

208. Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E i sur. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *The EMBO Journal*. 1997; 16(8): 2004-13.
209. Caballero R, Setien F, Lopez-Serra L, Boix-Chornet M, Fraga MF, Ropero S i sur. Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. *Journal of cell science*. 2007; 120(15): 2619-30.
210. Billot K, Parizot C, Arrouss I, Mazier D, Debre P, Rogner UC i sur. Differential aiolos expression in human hematopoietic subpopulations. *Leukemia research*. 2010; 34(3): 289-93.
211. Cortés M, Georgopoulos K. Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2004; 199(2): 209-19.
212. Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E i sur. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*. 1999; 10(3): 345-55.
213. Romero F, Martínez-A C, Carlos, Camonis J, Rebollo A. Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. *The EMBO journal*. 1999; 18(12): 3419-30.
214. Rebollo A, Ayllón V, Fleischer A, Martínez-A C, Zaballos A. The association of Aiolos transcription factor and Bcl-xL is involved in the control of apoptosis. *The Journal of Immunology*. 2001; 167(11): 6366-73.
215. Sun J, Matthias G, Mihatsch MJ, Georgopoulos K, Matthias P. Lack of the transcriptional coactivator OBF-1 prevents the development of systemic lupus erythematosus-like phenotypes in Aiolos mutant mice. *The Journal of Immunology*. 2003; 170(4): 1699-706.
216. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*. 1996; 65(1): 635-92.

217. Dong KC, Berger JM. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature*. 2007; 450(7173): 1201-5.
218. Lang AJ, Mirski SEL, Cummings HJ, Yu Q, Gerlach JH, Cole SPC. Structural organization of the human TOP2A and TOP2B genes. *Gene*. 1998; 221(2): 255-66.
219. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002; 3(6): 430-40.
220. Carpenter AJ, Porter ACG. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase II $\alpha$  mutant human cell line. *Molecular biology of the cell*. 2004; 15(12): 5700-11.
221. Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH. Proliferation-and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1991; 2(4): 209-14.
222. Li T-K, Liu LF. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2001; 41(1): 53-77.
223. Toyoda E, Kagaya S, Cowell IG, Kurosawa A, Kamoshita K, Nishikawa K i sur. NK314, a topoisomerase II inhibitor that specifically targets the  $\alpha$  isoform. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(35): 23711-20.
224. Alchanati I, Teicher C, Cohen G, Shemesh V, Barr HM, Nakache P i sur. The E3 ubiquitin-ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Top2alpha cleavage complex-a potentially new drug target. *PLoS One*. 2009; 4(12).
225. Wang Y-H, Takanashi M, Tsuji K, Tanaka N, Shiseki M, Mori N i sur. Level of DNA topoisomerase II $\alpha$  mRNA predicts the treatment response of relapsed acute leukemic patients. *Leukemia research*. 2009; 33(7): 902-7.
226. Coss A, Tosetto M, Fox EJ, Sapetto-Rebow B, Gorman S, Kennedy BnN i sur. Increased topoisomerase II $\alpha$  expression in colorectal cancer is associated with advanced

disease and chemotherapeutic resistance via inhibition of apoptosis. *Cancer letters*. 2009; 276(2): 228-38.

227. O'malley FP, Chia S, Tu D, Shepherd LE, Levine MN, Bramwell VH i sur. Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009; 101(9): 644-50.

228. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A i sur. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005; 26(2): 319-38.

229. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R i sur. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005; 26(5): 948-68.

230. Stanojevic S, Wade A, Cole TJ, Lum S, Custovic A, Silverman M i sur. Spirometry centile charts for young Caucasian children: the Asthma UK Collaborative Initiative. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180(6): 547-52.

231. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics*. 2003; 33: 228-37.

232. Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*. 2000; 67(1): 170-81.

233. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21(2): 263-5.

234. Martinez FD. Genes, environments, development and asthma: a reappraisal. *European Respiratory Journal*. 2007; 29(1): 179-84.

235. Mason RJ, Broaddus VC, Martin TR, King Jr TE, Schraufnagel D, Murray JF i sur. Murray and Nadel's textbook of respiratory medicine: 2-volume set: Elsevier Health Sciences; 2010.str. 883.

236. Lai CKW, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S. The ISAAC Phase Three Study Group: Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms:



Phase Three of the International Study of Asthma and allergies in childhood (ISAAC). Thorax. 2009; 64: 476-83.

237. Brand PLP, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A i sur. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. European Respiratory Journal. 2008; 32(4): 1096-110.

238. Silverman M, Wilson N. Wheezing phenotypes in childhood. Thorax. 1997; 52(11): 936-7.

239. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? Thorax. 1999; 54(3): 268-72.

240. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. Thorax. 2002; 57(7): 643-8.

241. de Blic J, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Jaubert F, Scheinmann P, Gosset P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004; 113(1): 94-100.

242. Lee M-J. Marihuana and tobacco use in pregnancy. Obstetrics and gynecology clinics of North America. 1998; 25(1): 65-83.

243. Frkovic A, Katalinic S. Smoking and alcohol in pregnancy. Maternal-fetal conflict of interest. Gynaecologia et Perinatologia. 2006; 15(3): 166-71.

244. Latin V, Matijevic R, Dukic V. Pusenje i trudnoća. Medicina. 1997; 33: 35–9.

245. Frkovic A, Cuk D, Mamula O. Majcino pusenje i ishod trudnoće. Gynaecol Perinatol. 2000; (9): 7–10.

246. Grguric J, Pospis M, Matinica M. Promjene ucestalosti pusenja roditelja tijekom perinatalnog razdoblja: rezultati ELSPAC-a. Gynaecol Perinatol. 2001; (10): 15–20.

247. Bossé Y, Hudson TJ. Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes. Annu Rev Med. 2007; 58: 171-84.

248. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. Nature reviews immunology. 2008; 8(3): 169-82.

249. Bisgaard H, Simpson A, Palmer CN, Bønnelykke K, Mclean I, Mukhopadhyay S i sur. Gene-environment interaction in the onset of eczema in infancy: filaggrin loss-of-function mutations enhanced by neonatal cat exposure. *PLoS Med.* 2008; 5(6): e131.
250. Ramadas RA, Sadeghnejad A, Karmaus W, Arshad SH, Matthews S, Huebner M i sur. Interleukin-1R antagonist gene and pre-natal smoke exposure are associated with childhood asthma. *European Respiratory Journal.* 2007; 29(3): 502-8.
251. 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. *Respiratory research.* 2008; 9(1): 1.
252. Kauffmann F, Demenais F. Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: challenges and perspectives. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2012; 130(6): 1229-40.
253. Valk RJP, Duijts L, Kerkhof M, Willemsen SP, Hofman A, Moll HA i sur. Interaction of a 17q12 variant with both fetal and infant smoke exposure in the development of childhood asthma-like symptoms. *Allergy.* 2012; 67(6): 767-74.
254. Bräuner EV, Loft S, Raaschou-Nielsen O, Vogel U, Andersen PS, Sørensen M. Effects of a 17q21 chromosome gene variant, tobacco smoke and furred pets on infant wheeze. *Genes and immunity.* 2012; 13(1): 94-7.
255. Halapi E, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Bjornsdottir US, Thorleifsson G, Helgadottir H i sur. A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma. *European Journal of Human Genetics.* 2010; 18(8): 902-8.
256. Murphy A, Chu JH, Xu M, Carey VJ, Lazarus R, Liu A i sur. Mapping of numerous disease-associated expression polymorphisms in primary peripheral blood CD41 lymphocytes. *Human molecular genetics.* 2010; 19(23): 4745-57.
257. Bisgaard H, Simpson A, Palmer CNA, Bonnelykke K, McLean I, Mukhopadhyay S i sur. Gene-environment interaction in the onset of eczema in infancy: filaggrin loss-of-function mutations enhanced by neonatal cat exposure. *PLoS Medicine.* 2008; 5(6): 934-40.

## 10. POPIS TABLICA I SLIKA

<b>Tablica</b>	<b>Naziv tablice</b>	<b>stranica</b>
1.	Kronološki pregled istraživanja prevalencije astme u djece u Hrvatskoj (modificirano prema <sup>12)</sup> )	4
2.	Objavljena <i>linkage</i> istraživanja za povezanost regije 17q12-21 s astmom i plućnom funkcijom	32
3.	Objavljena istraživanja povezanosti regije 17q12-21 s astmom i plućnom funkcijom	33-39
4.	Demografska obilježja ispitivane populacije	58
5.	Sumirane genotipske informacije za 51 tipiziran SNP u regiji 17q12-21	60
6.	Povezanost genetskih varijanti u regiji 17q12-21 s astmom	63
7.	Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, ranog izlaganja pušenju i astme	64
8.	Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, posjedovanja krznenih ljubimaca u kući tijekom prve godine života i	68

za vrijeme istraživanja u odnosu na astmu

9. Povezanosti genetskih varijanti u regiji 17q12-21 i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme 69
10. Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, ranog izlaganja pušenju i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme 70
11. Značajna međudjelovanja u genetskih varijanti u regiji 17q12-21, trenutnog posjedovanja krznenog ljubimca i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme 71
12. Genetske varijante u regiji 17q12-21 i mjere plućne funkcije 74
13. Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, ranog izlaganja pušenju i plućne funkcije kod djece s astmom 75
14. Značajna međudjelovanja genetskih varijanti u regiji 17q12-21, posjedovanja krznenih ljubimaca u kući tijekom prve godine života i plućne funkcije kod djece s astmom 76
15. Skupna usporedba povezanosti polimorfizama u regiji 17q12-21 i astme u objavljenim istraživanjima u euroazijskim populacijama uključujući istraživanje u hrvatske djece školske dobi 86-87

<b>Slika</b>	<b>Naziv slike</b>	<b>stranica</b>
1.	Promjene u prevalenciji astme tijekom zadnjih desetljeća u svijetu u djece i mladih odraslih osoba (modificirano prema <sup>11</sup> )	3
2.	Struktura DNK i nukleotida	20
3.	Jednonukleotidni polimorfizam, SNP (engl. <i>Single nucleotide polymorphism</i> )	21
4.	Metode otkrivanja gena za koje se sumnja da sudjeluju u nastanku astme (modificirano prema <sup>170</sup> )	27
5.	Kako gen postaje kandidatski? (modificirano prema <sup>165164</sup> )	29
6.	Regija 17q12-21 i gen ORMDL3	49
7.	Genome Variation Server	49
8.	Primjer podataka dostupnih za gen ORMDL3	50
9.	GVS- primjer sumiranih podataka za gen ORMDL3	52
10.	Sequenom® Spectropoint Nanodispenser® i maseni spektrometar	53

11.	Primjer za prozor u programu Typer Analyser	54
12.	Prozor u programu Typer Analyser za jednu pločicu ( <i>plate/plex</i> )	54
13.	Dijagram tijeka međunarodnog istraživanja dio kojeg je i istraživanje regije 17q12-21	57
14.	Grafički prikaz LD-a ( $r^2$ ) 35 genotipiziranih polimorfizama gena regije 17q12-21 za ispitanu skupinu djece (N=837) koji su korišteni u statističkoj analizi	61
15.	Grafički prikaz LD-a ( $r^2$ ) genotipiziranih polimorfizama gena regije 17q12-21 za ispitanu skupinu djece (N=837) koji su korišteni u statističkoj analizi	62
16.	Međudjelovanje genetske varijante na genu ORMDL3, ranog izlaganja pušenju i astme: Rano izlaganje pušenju značajno povećava rizik za astmu među homozigotima za alel T na SNP-u rs4795405, a izlaganje pušenju nema učinak na rizik za astmu među nositeljima alela C.	65
17. a-c	Međudjelovanje genetske varijante na genu GSDMA, posjedovanja mačke ili psa tijekom prve godine života i astme: Posjedovanje mačke, psa ili jednog i drugog tijekom prve godine života značajno smanjuje rizik za astmu među homozigotima za alel A na SNP-u rs921651; dok posjedovanje krznenog ljubimca nije imalo učinak među nositeljima alela G.	67
18.	Međudjelovanje genetske varijante za SNP rs4795403 na genu ORMDL3 i posjedovanja krnenog ljubimca u kući za vrijeme	72

istraživanja i prijema u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme: posjedovanje krznenog ljubimca u kući među djecom s astmom značajno povećava rizik za prijem u bolnicu zbog akutne egzacerbacije astme kod nositelja alela T, dok posjedovanje kućnog ljubimca u kući za vrijeme istraživanja nije imalo učinka kod homozigota za alel C.

19. Međudjelovanje genetske varijante SNP-a rs9635726 u genu IKZF3, posjedovanja krznenog ljubimca u kući tijekom prve godine života i plućne funkcije: posjedovanje krznenog ljubimca u kući tijekom prve godine života kod djece s astmom značajno povećava FEV1 % prediktivni za nositelje alela T, dok posjedovanje krznenog ljubimca nije imalo učinka na FEV1 % prediktivni kod homozigota za alel C. 77

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27.6.1978. godine u Slavonskome Brodu. 2003. godine diplomirao sam na Medicinskom fakultetu u Zagrebu te se zaposlio u Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević" u Slavonskome Brodu na Odjelu za pedijatriju. Od 2006. do 2010. godine specijaliziram pedijatriju u KBC-u Zagreb, a 2014. godine završavam subspecijalizaciju iz dječje pulmologije.

Od 2006. godine sudjelujem na znanstvenom projektu prof. dr. sc. Nede Aberle „Utjecaj genetičkih i okolišnih činitelja na razvoj astme u djece“ pod pokroviteljstvom Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta. Projekt se odvijao u suradnji s prof. dr. sc. Adnanom Čustovićem sa Sveučilišta u Manchesteru. Za edukacijski boravak u Centru za istraživanje i obrazovanje u Manchesteru dobio sam Istraživačku stipendiju Europskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju (EAACI Research Fellowship) 2010. godine. Aktivno sam sudjelovao na više domaćih i međunarodnih kongresa, tečajeva trajnog usavršavanja i međunarodnih škola, a koautor sam nekoliko znanstvenih članaka od kojih je šest indeksirano u Current Contestu.

2014. godine nagrađen sam nagradom za publikacije članova Hrvatskog pedijatrijskog društva „ERNST MAYERHOFER“ za članak *17q12-21 and asthma: interactions with early-life environmental exposures* koji je proizašao iz ove doktorske disertacije.

Od 2010. godine u naslovnom sam suradničkom zvanju asistenta na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.



## **12. DODATCI**

### **12.1. Upitnik o respiracijskom sustavu i okolišu**

## Upitnik o respiracijskom sustavu i okolišu Vaša kuća

**P1** Dijeli li Vaše dijete, ili je dijelilo, spavaću sobu s drugim ljudima (odraslim ili djecom)? Ako je, napišite točan broj:

<u>Trenutno</u>					<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>				
koliko					koliko				
Da	Ne	Ne znam	Odraslih	Djece	Da	Ne	Ne znam	Odraslih	Djece
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mačka	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Druga životinja s dlakama (krznom)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ptica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ostalo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Napišite točno  
koja životinja

---

**P3** Ima li Vaše dijete, ili je imalo, barem jedanput kontakt s 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	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mačka	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Domaća životinja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ptica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ostale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Napišite točno koja životinja	_____			_____		

**P4** Puši li majka, otac ili neka druga bliska osoba 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	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otac	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Druga bliska osoba	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako nitko ne puši trenutno, preskočite 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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Struja	Plin	Ne znam	Ostalo	Napišite točno koje drugo gorivo
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<hr/>

**P7** Imate, ili ste imali, centralno grijanje?

<u>Trenutno</u>			<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>		
Da	Ne	Ne znam	Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Struja	Plin	Ne znam	Ostalo	Napišite točno koje drugo gorivo
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<hr/>

**P9** Ima li, ili je bilo, vlažnih mrlja na zidovima ili stropu u djetetovom domu?

	<u>Trenutno</u>			<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>		
Da	Ne	Ne znam	Yes	No	Don't Know	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**P10** Imali, ili je bilo, vidljive plijesni ili gljivica na zidovima ili stropu u djetetovom domu?

	<u>Trenutno</u>			<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>		
Da	Ne	Ne znam	Da	Ne	Ne znam	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Navedite što  
drugo koristi

Navedite što je  
drugo koristilo

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

Trenutno

Tijekom djetetove prve godine života

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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P16** Je li madrac, jastuk ili pokrivač (jorgan) roditelja obložen, ili je bio obložen, kakvim materijalom?

**1. 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	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jastuk	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pokrivač (jorgan)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P17** Jeste li napravili kakve promjene u vašem domu zato što 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	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prestali ili smanjili pušenje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Promijenili jastuke	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Promijenili pokrivače	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Promijenili pokrov na podu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Druge promjene	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Napišite druge promjene	<hr/>					

**P18** Kako biste opisali okolinu djetetovog doma?

	<u>Trenutno</u>	<u>Tijekom djetetove prve godine života</u>
Seoska, otvoreni prostori i polja u blizini	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Suburbana, s puno parkova i vrtova	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Suburbana, s nekoliko parkova i vrtova	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Urbana, bez parkova i vrtova	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ne znam	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



### 1.1.1.RANI DANI

**P19** Ima li vaše dijete ima brata ili sestru?

	Da	Ne	Ne znam	Koliko
Starije braće	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Starijih sestara	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P20** Ima li vaše dijete ima mlađe braće ili sestara?

	Da	Ne	Ne znam	Koliko
Mlađe braće	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mlađih sestara	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

	Koliko		Koliko
Muškarci, odrasli	<input type="checkbox"/>	Žene, odrasle	<input type="checkbox"/>
Stariji dječaci	<input type="checkbox"/>	Starije djevojčice	<input type="checkbox"/>
Mlađi dječaci	<input type="checkbox"/>	Mlađe djevojčice	<input type="checkbox"/>

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

Da

Ne

Ne znam

**P23** Je li uobičajeno da vaše dijete kašlje kada je prehladeno?

Da

Ne

Ne znam

**P24** Je li uobičajeno da vaše dijete kašlje tijekom dana, neovisno o prehladama?

Da

Ne

Ne znam

**P25** Je li uobičajeno da vaše dijete kašlje po noći, neovisno o prehladama?

Da

Ne

Ne znam

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

Da

Ne

Ne znam

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P28** Kašlje li vaše dijete kada je izloženo hladnom zraku, neovisno o prehladama?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P29** Ako kašlje, je li kašalj:

Suh	Produktivan	Dijete ne kašlje	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### **Neprohodnost dišnih putova i sekret**

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako ste na 31. i 32. pitanje odgovorili s "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 s “NE” preskočite na 34. pitanje**

**P33** Prije koliko godina se to dogodilo?

Broj god.

## **1.2. Astma**

**P34** Je li jvaše dijete **ikada** imalo tegoba zbog astme?

Da

Ne

Ne znam

**P35** Ima li vaše dijete sada ima astmu?

Da

Ne

Ne znam

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

Da

Ne

Ne znam

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

Da

Ne

Ne znam

**Ako ste odgovorili s “ne” na 37. pitanje, preskočite na 48. pitanje**

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

Dob

U godinama                      mjesecima

**P39** Je li vaše dijete imalo sipnju i zviždanje u prsima u proteklih 12 mjeseci?

Da

Ne

Ne znam

**Ako ste odgovorili s “NE” na 39. pitanje, preskočite na 48. pitanje**

**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 je često, u prosjeku, 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** Je li 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** Je li vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, ikada imalo sipnju i je li mu zviždalo u prsima tijekom ili nakon fizičkog napora?

Da

Ne

Ne znam

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

Da

Ne

Ne znam

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

Da

Ne

Ne znam

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

Da

Ne

Ne znam

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

Vrijeme	Pelud	Emocije	Dim	Prašina	Kućni ljubimci	Vunena odjeća
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prehlade ili gripa	Dim cigarete	Hrana i piće	Sapuni, sprejevi ili deterdženti	Nešto drugo	Ništa	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Napišite što ga je drugo smetalo:

---

### Zbrinjavanje astme

**P48** Je li se vaše dijete ikada u životu probudilo s nedostatkom zraka, kratkim dahom?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P50** Je li 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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako je odgovor "DA" molimo napišite koji lijek:**

Lijek	Ordinirani lijekovi		
	U napadaju sipnje i zviždanja u prsima	Redovito	Ne znam
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Lijekovi	Dodatni lijekovi		
	U napadaju sipnje i zviždanja u prsima	Redovito	Ne znam
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako ste odgovorili s "NE" na 34.,35., 36.,37. i 50. pitanje, onda preskočite na 58. pitanje**

### Zbrinjavanje astme

**P51** Je li 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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako je odgovor "DA" molimo napišite koji lijek:**

Lijek	Ordinirani lijekovi		
	U napadaju sipnje i zviždanja u prsima	Redovito	Ne znam
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



Lijekovi	Dodatni lijekovi		
	U napadaju sipnje i zviždanja u prsima	Redovito	Ne znam
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P52** Imate li napisani plan koji vam govori kako zbrinjavati astmu kod vašeg djeteta?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Obiteljski liječnik	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hitna služba (Hitna pedijatrijska ambulanta)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### Za redovitu kontrolu astme?

	Nijedan	1 do 3	4 do 12	Više od 12	Ne znam
Medicinska sestra	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Obiteljski liječnik	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hitna služba (Hitna pedijatrijska ambulanta)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

nijednom      1      2      Više od 2 puta      Ne znam  
                       

**P56** Je li vaše dijete u proteklih 12 mjeseci bilo na akupunkturi, kod kiropraktičara, homeopata, 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** Je li vaše dijete ikada imalo simptome polenoze, tzv. „peludnu hunjavicu“?

Da      Ne      Ne znam  
           

**P59** Ima li vaše dijete sada polenozu, tzv. „peludnu hunjavicu“?

Da      Ne      Ne znam  
           

**P60** Je li vam liječnik ikada rekao da vaše dijete ima polenozu, tj. „peludnu hunjavicu“?

Da      Ne      Ne znam

**P61** Je li vaše dijete ikada imalo tegoba sa šmrcanjem, curenjem nosa ili neprohodnim nosom kada NIJE bilo prehladeno?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

**P62** Je li vaše dijete, u proteklih 12 mjeseci, imalo tegoba sa šmrcanjem, curenjem nosa ili neprohodnim nosom, kada NIJE bilo prehladeno?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### 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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ne znam					
<input type="checkbox"/>					

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

Ništa	Malo	Umjereno	Puno	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Zbrinjavanje rinitisa

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

**Ako je koristilo nešto, napišite što:**

Ordinirani lijekovi			
Lijekovi	Kada je iritacija	Redovito	Ne znam
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dodatni lijekovi			
Lijekovi	Kada je iritacija	Redovito	Ne znam
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Medicinsku sestru	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Obiteljskog liječnika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Specijalista	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hitnu službu (ili Hitnu pedijatrijsku ambulantu)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Ekcem

**P70** Je li vaše dijete ikada imalo ekcem?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P71** Ima li vaše dijete sada ekcem?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P72** Je li vam liječnik ikadarekao da vaše dijete ima ekcem?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

**P75** Je li 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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Oko vrata	Oko ušiju	Oko očiju	Ne znam	Napišite koje drugo mjesto
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

---

**P76** U kojoj se godini osip prvi puta pojavio?

Prije 2. godine	2 do 4 godine	U 5. godini ili više	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P77** Je li osip u potpunosti nestao u proteklih 12 mjeseci?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Zbrinjavanje ekcema

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

**Ako je koristilo nešto, napišite što:**

Ordinirani lijekovi			
Lijekovi	Kada je iritacija	Redovito	Ne znam
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dodatni lijekovi			
Lijekovi	Kada je iritacija	Redovito	Ne znam
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako ste na pitanja 70, 71, 72 i 79 odgovorili s “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	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Medicinsku sestru	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Obiteljskog liječnika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Specijalista	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hitnu službu (ili Hitnu pedijatrijsku ambulantu)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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 <input type="checkbox"/>	1, blag: suha koža, samo masti ili masti i blagi steroidi <input type="checkbox"/>
2, umjeren: šire raspoređene masti i steroidi <input type="checkbox"/>	3, teški: inficirani / izgreban do krvi, široko raspoređene steroidne kreme +/- antibiotik <input type="checkbox"/>

### Alergija na hranu

**P84** Izbjegava li vaše dijete neku od slijedeće hrane?

	Da	Ne	Ne znam
Kikiriki	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cijelo jaje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mlijeko	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ribu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sjeme sezama	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P85** Je li vaše dijete imalo kakvih tegoba (simptoma) kada jede kikiriki?

Da      Ne      Ne znam  
           

**Ako ste odgovorili s "NE" na 85. pitanje preskočite na 89. pitanje**



**P86** Kada je vaše dijete zadnji put reagiralo na kikiriki?

Dob

U godinama	U mjesecima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P87** Oliko je prošlo minuta do početka reakcije nakon što je dijete pojelo kikiriki?

Minuta

**P88** Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Navedite koje ostale tegobe			

---

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako ste odgovorili s "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
<input type="text"/>	<input type="text"/>

**P92** Koliko je prošlo minuta do početka reakcije nakon što je dijete pojelo orašid?

Minuta

**P93** Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Navedite koje ostale tegobe

---

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

**P94** Je li vaše dijete imalo ikakvih tegoba (simptoma) dok je jelo jaja (npr. kuhana jaja, pečena jaja)?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako ste odgovorili s "NE" na 94. pitanje, preskočite na 98. pitanje**

**P95** Kada je vaše dijete zadnji put reagiralo na jaje?

Dob

Godine	Mjeseci
<input type="text"/>	<input type="text"/>

**P96** Koliko je prošlo minuta do početka reakcije nakon što je dijete pojelo jaje?

Minuta

**P97** Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Navedite koje ostale tegobe

---

**P98** Je li vaše dijete imalo kakvih tegoba s konzumacijom mlijeka?

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako ste odgovorili s "NE" na 98. pitanje preskočite na 102. pitanje**

**P99** Kada je vaše dijete zadnji puta reagiralo na mlijeko?

Dob

Godine	Mjeseci
<input type="text"/>	<input type="text"/>

**P100** Koliko je prošlo minuta do početka reakcije nakon što je dijete pojelo mlijeko?

Minuta

**P101** Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljevi	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Navedite koje  
ostale tegobe

---

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**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
<input type="text"/>	<input type="text"/>

**P105** Koliko je prošlo minuta do početka reakcije nakon što je dijete pojelo ribu?

Minuta

**P106** Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu,  promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje,  stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljevi	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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** Jeli vaše dijete imalo kakvih tegoba dok je jelo sjeme sezama?

Da

Ne

Ne znam

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

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

Godine

Dob

Mjeseci

**P109** Koliko je prošlo minuta do početka reakcije nakon što je dijete pojelo sjeme sezama?

Minuta

**P110** Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip

Oticanje lica, usana ili jezika

Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas

Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima

Povraćanje, proljev

Loše osjećanje, nesvjestica

Ostalo

Ne znam

Navedite koje ostale tegobe

---

**P111** Je li vaše dijete imalo kakvih tegoba kada je dodirivalo svježe jaje ili jelo hranu koja sadrži svježa jaja( npr. majoneza ili čokoladno jelo s tučenim vrhnjem)?

Da

Ne

Ne znam

**Ako ste odgovorili s “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?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Koliko minuta nakon uzimanja hrane su se pojavile tegobe?

Minute

Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Koliko minuta nakon uzimanja hrane su se pojavile tegobe?

Minute

Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Koliko minuta nakon uzimanja hrane su se pojavile tegobe?

Minute

Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip

Oticanje lica, usana ili jezika

Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas

Teškoće disanja, zviždanje, 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?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Navedite koje ostale tegobe

---

**P119** Je li vaše dijete imalo nekakvu alergijsku reakciju u slijedećim situacijama?

	Da	Ne	Ne znam
Igrajući se s balonima	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Koristeći gumene rukavice	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Noseći kapu za plivanje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Igrajući se s gumenim igračkama	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kod zubara	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**P120** Koliko minuta nakon kontakta je reakcija započela?

Minuta

**P121** Koje tegobe su se pojavile kod vašeg djeteta?

svrbež +/- osip	Oticanje lica, usana ili jezika	Teškoće gutanja, stezanje u grlu, promukli glas	Teškoće disanja, zviždanje, stezanje u prsima
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Povraćanje, proljev	Loše osjećanje, nesvjestica	Ostalo	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
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
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Da	Ne	Ne znam
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Ako je, napišite koja bolest?**

---

---

---

---

**P124 Je li vaše dijete na nekoj dugotrajnoj terapiji koja do sada nije spomenuta?**

Da

Ne

Ne znam

**Ako je, napišite kojoj:**

---

---

---

---

**P125 Je li vaše dijete ikada hospitalizirano?**

Bolnica	Datum
Razlog	

Bolnica	Datum
Razlog	

Bolnica	Datum
Razlog	

Bolnica	Datum
Razlog	

Bolnica	Datum
Razlog	

**P126 Ima li majka djeteta, sada, ima nešto od navedenog?**

Astma      Ekcem      Polenožu      Ništa      Ne znam  
                       

**P127 Ima li otac djeteta, sada, ima nešto od navedenog?**

Astma      Ekcem      Polenožu      Ništa      Ne znam

