

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Željka Babić

**Povezanost polimorfizama citokinskih
gena TNFalpha (-308G>A, -238G>A),
IL1alpha (-889C>T) i
IL10 (-1082G>A) s atopijskim
respiracijskim bolestima**

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Željka Babić

**Povezanost polimorfizama citokinskih
gena TNFalpha (-308G>A, -238G>A),
IL1alpha (-889C>T) i
IL10 (-1082G>A) s atopijskim
respiracijskim bolestima**

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu te u Coronel Institute of Occupational Health, Academic Medical Center (AMC) u Amsterdamu, Nizozemska.

Voditelj rada: prim. dr. sc. Jelena Macan, dr. med., znan. savj. u tr. zv.

Zahvaljujem se mentorici prim. dr. sc. Jelena Macan na stalnom vodstvu i pomoći u svim aspektima doktorskog istraživanja i pisanja doktorskog rada. Također se zahvaljujem suradnicama s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada dr. sc. Vedi Mariji Varnai i Jeleni Kovačić na statističkim savjetima i dr.sc. Ivani Sabolić Pipinić na savjetima oko pisanja disertacije. Također se zahvaljujem suradnici dr.sc. Sanji Kezić s AMC u Amsterdamu na genotipizaciji citokinskih polimorfizama.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Atopijske bolesti	1
1.2.	Uloga citokina u patofiziologiji atopijskih bolesti	4
1.3.	Povezanosti čimbenika osobne osjetljivosti ispitanika s atopijskim bolestima	7
1.4.	Povezanost čimbenika okoliša i načina života s atopijskim bolestima	10
1.5.	Međudjelovanje čimbenika osobne osjetljivosti, čimbenika okoliša i načina života u pojavi atopijskih bolesti	13
2.	HIPOTEZA	15
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	15
4.	ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA.....	17
4.1.	Ispitanici	17
4.2.	Metode istraživanja	21
4.2.1.	Upitnik o zdravstvenom stanju i načinu života	21
4.2.2.	Alergološko kožno testiranje metodom uboda	21
4.2.3.	Ispitivanje ventilacijske funkcije pluća i test bronhodilatatorom.....	22
4.2.4.	Vađenje venske krvi i mjerenje koncentracije ukupnih IgE protutijela u serumu	23
4.2.5.	Uzorkovanje obrisaka sluznice usne šupljine, izdvajanje DNA i genotipizacija citokinskih gena.....	23
4.2.6.	Definicije atopijskih bolesti, simptoma, pozitivnog kožnog testa ubodom i kontrolne skupine	25
4.2.7.	Statističke metode	26
5.	REZULTATI.....	31
5.1.	Prvi dio istraživanja: povezanost polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima	31
5.1.1.	Osobine ispitanika	31
5.1.2.	Atopijske bolesti i čimbenici negenske osobne osjetljivosti i čimbenici načina života i okoliša	36
5.1.3.	Simptomi atopijskih bolesti, čimbenici negenske osobne osjetljivosti i čimbenici načina života i okoliša	40
5.1.4.	Pokazatelji atopije, čimbenici negenske osobne osjetljivosti i čimbenici načina života i okoliša	43
5.1.5.	Atopijske bolesti i polimorfizmi citokinskih gena	46
5.1.6.	Simptomi atopijskih bolesti i polimorfizmi citokinskih gena	49
5.1.7.	Pokazatelji atopije i polimorfizmi citokinskih gena.....	50
5.1.9.	Pokazatelji plućne funkcije i polimorfizmi citokinskih gena.....	53

5.2. Drugi dio istraživanja: studija praćenja.....	55
5.2.1. Osobine ispitanika	55
5.2.2. Promjene u prisutnosti parametara atopije tijekom studije praćenja.....	59
5.2.3. Povezanost promjena parametara atopije tijekom razdoblja praćenja s čimbenicima osobne osjetljivosti i čimbenicima načina života i okoliša.....	64
6. RASPRAVA.....	70
6.1. Prvi dio istraživanja: povezanost polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima	70
6.1.1. Atopijske bolesti, simptomi atopijskih bolesti i pokazatelji atopije u mladoj odrasloj populaciji u Hrvatskoj	70
6.1.2. Čimbenici osobne osjetljivosti, načina života i okoliša	72
6.3.3. Učestalosti polimorfizama citokinskih gena u uzorku hrvatske populacije	76
6.1.4. Povezanost polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima, simptomima atopijskih bolesti i pokazateljima atopije	79
6.2. Studija praćenja	83
7. ZAKLJUČCI	88
8. KRATKI SADRŽAJ.....	91
9. SUMMARY	92
10. POPIS LITERATURE.....	93
11. KRATKA BIOGRAFIJA.....	115
PRILOG 1. PREGLED LITERATURNIH PODATAKA	117
PRILOG 2. UPITNIK O ZDRAVSTVENOM STANJU I NAČINU ŽIVOTA.....	128
PRILOG 3. OBJAVLJENI RADOVI VEZANI UZ TEMU DISERTACIJE	135

POPIS OZNAKA i KRATICA

A – alanin

AA – atopijska astma

AD – atopijski dermatitis

AR – atopijski rinitis

BMI – indeks tjelesne mase; engl. *body mass index*

BT – bronhodilatatorni test

C – citozin

DNA – deoksiribonukleinska kiselina; engl. *deoxyribonucleic acid*

FEV₁ – forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi

FVC – forsirani vitalni kapacitet

G – gvanin

IL – interleukin

ISAAC – engl. *International Study of Asthma and Allergy in Childhood*

KASP sustav – genotipizirajući sustav specifičnim PCR

MEF_{50%} – maksimalni ekspiratorni protok zraka pri 50% FVC-a

PCR – lančana reakcija polimerazom; engl. *polymerase chain reaction*

SPT – kožni test ubodom; engl. *skin prick test*

T – timin

TNF – tumor nekrotizirajući čimbenik; engl. *tumor necrosis factor*

1. UVOD

1.1. Atopijske bolesti

Alergija je poremećaj imunološkog sustava prilikom kojeg dolazi do pretjeranog odgovora na inače neškodljive, uobičajene razine tvari iz okoliša kao npr. pelud trava. Tvari koje potiču alergijski odgovor zovu se alergeni.

Atopija je podvrsta alergijske reakcije pri kojoj je pretjerani imunološki odgovor posredovan IgE protutijelima što se još naziva reakcija rane preosjetljivosti ili reakcija preosjetljivosti tipa 1, a pojava izazvanog ili prirođenog povećanja reaktivnosti organizma zove se senzibilizacija. Kao posljedica sklonosti proizvodnje IgE protutijela na određene okolišne alergene mogu se razviti ove atopijske bolesti: atopijska astma, atopijski rinitis i atopijski dermatitis.¹⁻³ Atopijska upala koja nastaje kontaktom alergena s gornjim dišnim putovima senzibilizirane osobe dovodi do pojave tipičnih simptoma atopijskog rinitisa: kihanje, svrbež nosa, otežani protok zraka kroz nos i bistri iscjedak iz nosa. Atopijska upala i sužavanje bronha (bronhokonstrikcija) nakon kontakta s alergenom u sluznici donjih dišnih puteva senzibilizirane osobe dovode do simptoma atopijske astme: sipljenja, stezanja u prsima, otežanog disanja i kašlja. Opstruktivne smetnje ventilacije uobičajeno utvrđujemo spirometrijom uz bronhodilatatorni test. Istraživanja su pokazala značajnu negativnu povezanost ukupnog i specifičnog IgE-a i spirometrijskih parametara FEV₁ i FVC u mladim odraslim osoba s astmom⁴. Također je pokazana pozitivna povezanost simptoma astme s pozitivnim bronhodilatatornim testom u odraslim osoba: sipljenje s FEV₁ te zaduha s FVC.⁵ Naposljetku, atopijska upala u koži dovodi do tipičnih simptoma atopijskog dermatitisa: crvenila, otekline, svrbeža i ekcematoznih promjena.^{1,3}

Atopijski marš je pojam koji opisuje pojavu da atopijski dermatitis u djetinjstvu

dovodi do razvoja atopijske astme i atopijskog rinitisa u adolescenciji. Većina teorija o uzrocima atopijskog marša slaže se da je najvažniji čimbenik za njegovo započinjanje poremećaj zaštitne funkcije kože. Povećana propusnost kože pogoduje senzibilizaciji alergenima i sustavnim promjena u imunološkom sustavu što na kraju dovodi do razvoja atopijskih simptoma ne samo kože nego i dišnog sustava.^{6,7}

Prevalencija senzibilizacije na inhalacijske alergene varira ovisno o zemljopisnoj lokaciji.⁸ U prvoj fazi europskog istraživanja *European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS), provedenom 1990. godine na odraslim osobama u zapadnoeuropskim zemljama, prevalencija senzibilizacije na uobičajene inhalatorne alergene kretala se od 17,1 % do 54,8 % (medijan 36,8 %). Najčešće se radilo o senzibilizaciji na alergene grinja *Dermatophagoides pteronyssinus* (ukupni medijan 21,7 %), peludi trava (16,9 %) i alergene mačke (8,8 %). Najopsežnije istraživanje koje se bavilo određivanjem prevalencije simptoma atopijskih bolesti bilo je *The International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) koje je započelo 1991.godine te se odvijalo u tri faze.⁹ Većina sudjelujućih zemalja prvu fazu obavila je tijekom 1994. i 1995. godine, drugu fazu 1998. godine, a treću fazu 2001.-2003. godine. U zadnjoj fazi sudjelovalo je oko 1 200 000 djece dobi 6-7 godina i adolescenata dobi 13-14 godina iz 98 zemalja. Kod ispitanika dobi 13-14 godina u zadnjih 12 mjeseci od uzimanja podataka upitnikom prosječna prevalencija simptoma astme bila je 14,1 %, rinokonjunktivitisa 14,6 % i ekcema 7,3 %. Podaci iz europskih zemalja pokazuju da je ovisno o regiji Europe (zapadna, sjeverna i istočna Europa) prevalencija simptoma astme kod dječaka starih 13-14 godina 8,9 - 13,8%, rinokonjunktivitisa 7,7-12,4 %, te ekcema 3,8-5,4 %, dok je kod njihovih vršnjakinja prevalencija simtoma astme 10,5-15,0 %, rinokonjunktivitisa 10,6-16,7 % i atopijskog dermatitisa 6,3-8,3 %.¹⁰ U trećoj fazi istraživanja ISAAC uočeno je kod ispitanika dobi 13-14 godina blago smanjenje prevalencije astme u odnosu na prijašnje faze istraživanja za zapadno europske zemlje i zemlje engleskog jezičnog područja svijeta.

Međutim, porast prevalencije astme u afričkim, južnoameričkim i azijskim zemljama doprinosi porastu globalne učestalosti astme i smanjenju razlika u prevalencijama među zemljama.¹¹ Izvještaj udruge *Global Initiative for Asthma* procjenjuje da od astme boluje 300 milijuna ljudi u svijetu, a s obzirom da je uočeno da svjetska prevalencija raste s porastom senzibilizacije i urbanizacije, procjenjuje se da bi do 2025. godine od astme moglo oboljeti još 100 milijuna ljudi.¹² U razdoblju 1985.-1999. godine u Hrvatskoj je u odraslih muškaraca uočen porast prevalencije pokazatelja atopije (istodobno prisutnih simptoma atopijskih bolesti i povišenih vrijednosti ukupnih IgE protutijela).¹³ Godine 2013 u studiji Banac i sur.¹⁴ također je uočen porast učestalosti alergijskih bolesti među polaznicima osnovnih škola u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Istraživanje je provedeno u dvije faze korištenjem metodologije ISAAC te je usporedbom adolescenata dobi 13-14 godina 2001./2002. i ponovno 2009./2010. godine uočen statistički značajan porast prevalencije astmatskih simptoma (8 % 2001./2002. vs. 14 % 2009./2010.), nosnih simptoma (18 % vs. 26 %) i ekcema (3% vs. 6%). Porast učestalosti atopije pripisuje se raznim čimbenicima, od porasta svijesti o atopijskim bolestima i poboljšanoj dijagnostici, do utjecaja psihosocijalnih čimbenika te povećanja izloženosti alergenima. Popularna je tzv. higijenska teorija prema kojoj se povećanje učestalosti atopijskih bolesti pripisuje smanjenju stimulacije imunološkog sustava infektivnim mikroorganizmima u dobrim higijenskim uvjetima što vodi usmjerenju imunološkog odgovora prema preosjetljivosti. Uz poboljšanu higijenu smanjena stimulacija smatra se posljedicom terapije antibioticima u djetinjstvu, kraćeg perioda dojenja te smanjenja broja članova obitelji. S druge strane, prehrambene teorije usredotočile su se na štetne učinke neodgovarajućeg unosa antioksidansa, esencijalnih masnih kiselina, D vitamina i soli u zapadnjačkoj prehrani, dok ekološka teorija ističe štetne učinke komponenti urbanog onečišćenja zraka i izloženosti duhanskom dimu na razvoj atopijskih bolesti.¹⁵⁻¹⁸

Kroničan tijek atopijskih bolesti i moguće povremene teške akutne epizode smanjuju

kvalitetu života bolesnika i financijski opterećuju i pojedinca, i zdravstveni sustav. Dostupno liječenje većinom je simptomatsko (bronhodilatatorima, kortikosteroidima, antihistaminicima), s iznimkom utišavanja preosjetljivosti primjenom specifične imunoterapije. Na žalost, imunoterapija je dostupna samo za neke alergene. Stoga se ulažu naponi da se razjašnjenjem mehanizama nastanka atopijskih bolesti omogući razvoj terapije koja će djelovati na uzrok bolesti i u konačnici omogućiti trajno smanjenje tereta atopijskih bolesti za pojedinca i društvo.^{1,12}

1.2. Uloga citokina u patofiziologiji atopijskih bolesti

Glavno patofiziološko obilježje atopijskih bolesti je indukcija tzv. T_H2 imunološkog odgovora tj. usmjerenje diferencijacije naivnih pomoćničkih limfocita T_H0 u pomoćničke limfocite T_H2 . Ovaj proces fiziološki je potaknut antigenima nametnika i u zdravom imunološkom sustavu djeluje u ravnoteži sa T_H1 odgovorom, tj. usmjerenjem naivnih pomoćničkih limfocita T_H0 u pomoćničke limfocite T_H1 . Stimulacija antigenima intracelularnih patogena (virusa i bakterija) aktivira T_H1 odgovor važan za učinkovitu borbu organizma protiv tih mikroorganizama. Kod atopijskih bolesti dolazi do prevage T_H2 nad T_H1 imunološkim usmjerenjem i nepotrebnog pokretanja T_H2 reakcije nakon kontakta s neopasnim antigenima iz okoliša.^{1,3}

Za odvijanje imunoloških reakcija općenito, pa tako i reakcija T_H2 i T_H1 imunološkog usmjerenja, važna je učinkovita usklađenost sudjelujućih stanica i posrednika upale. Jedna od najvažnijih skupina medijatora upale jesu citokini, ekstracelularne signalne molekule koje vezanjem na specifične stanične receptore reguliraju imunološke i upalne reakcije prenoseći i proupalne, i protoupalne signale. Do sad je opisano preko 70 citokina, interleukina (IL) označenih brojevima 1-35 i niz faktora rasta. Dokazano je da, osim imunoloških stanica, i razne druge vrste stanica izlučuju i reagiraju na citokine, npr. epitelne stanice, stanice

vezivnog tkiva i masne stanice. Važno je napomenuti da citokini djeluju u složenoj mreži fino podešenih međudjelovanja. Jedan imunološki proces može biti potaknut raznim citokinima, a jedan citokin može poticati više različitih imunoloških procesa. Citokini tijekom atopijske upale djeluju sustavno i lokalno. U koštanoj srži dovode do proliferacije imunoloških stanica bitnih za atopijsku upalu (npr. proliferacija eozinofila djelovanjem IL-5), a na mjestu atopijske upale (npr. u donjim dišnim putovima u slučaju atopijske astme) lokalno upravljaju i nadziru aktivnosti imunoloških stanica. Središnji citokini T_H2 odgovora su IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13 čijim djelovanjem se ostvaruju patofiziološki koraci atopijske upale. Citokin IL-4 izlučuju većinom T_H2 stanice, a u manjoj mjeri bazofili, ubilačke stanice (NK), mastociti i eozinofili. Taj citokin potiče diferencijaciju T_H0 u T_H2 pomoćničke limfocite, prekopčavanje imunoglobulina na IgE klasu i stimulaciju izražaja adhezivnih molekula na endotelu bitnih za regrutaciju imunoloških stanica na mjesto upale. Citokin IL-5 izlučuju T limfociti, mastociti i eozinofili, a potiče proliferaciju i preživljavanje eozinofila. Citokin IL-9 kojeg izlučuje podtip pomagačkih limfocita, limfociti T_H9 , potiče rast mastocita i stvaranje sluzi. Naposljetku, IL-13 izlučuju većinom T_H2 stanice, a u manjoj mjeri bazofili, mastociti i eozinofili, a uzrokuje prekopčavanje imunoglobulina na IgE klasu, stimulaciju izražaja adhezivnih molekula na endotelnim stanicama te bronhalnu hiper-reaktivnost. Njihovim zajedničkim djelovanjem na efektorske stanice dolazi do vazodilatacije, povećanja vaskularne propusnosti, kontrakcije glatke muskulature respiracijskih putova i povećane sekrecije sluzi što se u konačnici očituje opisanim simptomima atopijskih bolesti.^{1,3,19}

Međutim, sve je očitije da pored T_H1/T_H2 neravnoteže i drugi upalni putevi pridonose nastanku i težini atopijskih bolesti, pogotovo održavanje kronične upale djelovanjem proupalnih citokina prirodene imunosti interleukina 1 alfa (IL-1 α) i čimbenika nekroze tumora alfa (od eng. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α). Te citokine sintetizira i izlučuje niz imunoloških stanica (mastociti, T limfociti, monociti i neutrofili) te epitelne i glatke mišićne

stanice. TNF- α pospješuje atopijsku upalu pojačavanjem aktivnosti upalnih stanica (prvenstveno citotoksičnosti eozinofila i mastocita), privlačenjem neutrofila i monocita na mjesto upale te pojačavanjem bronhokonstrikcije. IL-1 α u atopijskoj upali aktivira T limfocite i stanice dišnog epitela te potiče proliferaciju limfocita B.^{3,19-22} Dakle, ti proupalni citokini pridonose pogoršanju i akutne faze upale (aktivacijom epitelnih stanica, vazodilatacijom, kontrakcijom glatkih mišića dišnih puteva), i kronične faze upale (podržavanjem kronične nespecifične upale) na što upućuju rezultati eksperimentalnih i epidemioloških istraživanja. Nakon provedenog testa provokacije alergenom, povišene razine TNF- α i IL-1 α nađene su u bronhoalveolarnom lavatu osoba s atopijskom astmom²³, a TNF- α u nazalnom lavatu osoba s alergijskim rinitisom.²⁴ Također je uočeno da izloženost alergenu povećava proizvodnju TNF- α u epidermisu osoba s atopijskim dermatitisom² i u limfocitima krvi osoba s akutnim atopijskim dermatitisom²⁶. Tijekom razmatranja patofizioloških mehanizama atopijske upale treba imati na umu i ulogu poremećaja protuupalnih signala. IL-10 je protuupalni citokin zadužen za suzbijanje alergijskih upala i izlučuju ga T i B limfociti, makrofazi i monociti. Protuupalni učinak ostvaruje preko inhibicije aktivnosti antigen-prezentirajućih stanica, limfocita i makrofaga te smanjenjem izlučivanja proupalnih citokina, među ostalima i TNF- α .^{3,19-21} Dakle, nedovoljni izražaj i aktivnost IL10 tijekom atopijskih bolesti mogli bi pridonositi njihovom kroničnom tijeku uslijed neobuzdavanja nepovoljnog imunološkog odgovora. Epidemiološkim istraživanjima uočeno je da su razine IL-10 bile snižene u bolesnika s atopijskim dermatitisom u usporedbi sa zdravim neatopičarima.²⁷

Razumljivo je stoga da su citokini postali zanimljiv cilj razvoja terapije koja će djelovati na uzroke atopijskih bolesti i nastoje se razjasniti utjecaji genskih čimbenika koji djelovanjem na razine citokina mogu utjecati na tijek atopijskih bolesti.

1.3. Povezanosti čimbenika osobne osjetljivosti ispitanika s atopijskim

bolestima

Atopijske bolesti nastaju međudjelovanjem velikog broja genskih i okolišnih čimbenika. Pozitivna obiteljska alergološka anamneza rizičan je čimbenik za razvoj atopijskih bolesti. Niz istraživanja potvrđuje povećanje rizika astme u slučaju pozitivne anamneze astme kod srodnika u prvom koljenu.²⁸ Prisutnost atopijskih bolesti bilo s majčine bilo s očeve strane povećava rizik pojave atopije i/ili atopijskih bolesti kod djece. Pri tome se čini da se nasljedna sklonost pojavi atopijskih simptoma jače veže za ženski spol, a nasljedna sklonost pojavi pokazatelja atopije, kao što su pozitivni kožni testovi na inhalacijske alergene i povišene vrijednosti IgE protutijela, za muški spol.¹⁷

Muškarci i žene imaju različite učestalosti atopijskih bolesti u određenoj životnoj dobi. Učestalost dišnih atopijskih simptoma (simptoma rinitisa i astme) je, u pravilu, do puberteta veća u dječaka, a nakon puberteta se učestalost izjednačava između spolova.²⁹⁻³³ Prva pojava sipljenja u adolescenciji češća je u djevojaka i ako se astma pojavi nakon djetinjstva, kod djevojaka je značajno češći teži oblik bolesti.²⁹ Što se tiče ekcema, primijećena je podjednaka učestalost ekcema u dječaka i djevojčica dok u pubertetu učestalost kod dječaka pada a kod djevojčica raste.^{34,35} U prijašnjem istraživanju na hrvatskim odraslim ispitanicima nađeno je da žene imaju značajno veći rizik prisutnosti simptoma atopijskih bolesti od muškaraca, a značajno manji rizik pozitivnih pokazatelja atopije³⁶. Slično tome, u doktorskom istraživanju 2015. godine koje je provela Sabolić Pipinić¹⁷ na hrvatskoj mladoj odrasloj populaciji, muškarci su imali učestalije pozitivne atopijske pokazatelje, učestalost atopijskih bolesti nije se značajno razlikovala među spolovima, ali je istodobna prisutnost 2 ili 3 atopijske bolesti prevladavala u žena, koje su imale čak 8 puta veći rizik od istodobne prisutnosti 2 ili 3 atopijske bolesti nego muškarci. Navedene spolne razlike objašnjavaju se utjecajem ženskih

spolnih hormona. Utjecaj endogenih estrogena očit je u znatnom povećanju rizika za razvoj astme nakon puberteta kod djevojaka koje su prvu menstruaciju dobile prije 12. godine života. Utjecaj egzogenih estrogena ovisi o prisutnosti drugih rizičnih čimbenika i trenutnim simptomima s obzirom da oralna kontracepcija u žena bez pozitivne obiteljske anamneze astme značajno povećava rizik trenutnog sipljenja, dok kod žena s aktivnom astmom smanjuje rizik sipljenja.³⁷ Bitan utjecaj ženskih spolnih hormona na imunološki sustav za razvoj atopijskih bolesti potvrđuju i istraživanja *in vitro* u kojima je uočena jača proliferacija Th2 limfocita nakon stimulacije perifernih limfocita osoba s atopijskom astmom ženskog spola u odnosu na muškarce s istom bolešću.³⁸

Genskim istraživanjima povezanosti kandidatnih gena (eng. *candidate gene associations studies*) i pretragom cijelog genoma (eng. *whole genome association studies*, GWAS) dosad je uočena povezanost atopijskih bolesti s preko stotinu genskih čimbenika. Većina pronađenih nasljednih promjena nalazi se u genima za diferencijaciju i regulatorne uloge T limfocita, regrutaciju i aktivaciju upalnih stanica, diferencijaciju i barijernu funkciju epitela te staničnu signalizaciju i regulaciju genskog izražaja.³⁹⁻⁴¹ Jedan od potvrđenih genskih čimbenika koji povećavaju rizik za razvoj atopijskog dermatitisa jesu mutacije u genu za filagrin, protein koji je važan dio strukture rožnatog dijela kože i važan čimbenik u funkcioniranju kožne barijere. Mutacije gena za filagrin koje dovode do gubitka funkcije toga proteina prisutne su u oko 10% populacije bijele rase zapadne Europe i Sjeverne Amerike, od čega su najčešće mutacije R501X i 2282del4, dok učestalost je istih mutacija među bolesnicima s atopijskim dermatitisom u istoj populaciji u rasponu od 15,8 % do 56 %.⁴²⁻⁴⁶ U hrvatskoj populaciji utvrđena je niska učestalost mutacija gena za filagrin R501X i 2282del4 od 2,6 %. Nosioци tih mutacija imali su povećan rizik od pojave kožnih simptoma koji su zajednički atopijskim i neatopijskim kožnim poremećajima, ali te mutacije nisu potvrđene kao etiološki čimbenici u pojavi atopije i atopijskih bolesti u ispitivanoj populaciji.¹⁷

S obzirom na vrstu proteina kodiranih genima, dio čimbenika genske osjetljivosti mogu činiti nasljedne promjene u genima za citokine. Posebice su važne promjene u slijedu baza regulatornih djelova gena u koje spadaju i promotori, koji utječu na jačinu vezanja čimbenika prepisivanja i posljedična izražaja citokina. U više istraživanja *in vitro* pokazano je da genski polimorfizam jedne baze (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) u genu za TNF- α označen $-308G>A$ pojačava vezanje čimbenika prepisivanja i povećava proizvodnju TNF- α ⁴⁷⁻⁴⁸, iako rezultati novije meta analize nisu potvrdili takvu povezanost.⁴⁹ Spomenuta meta analiza također nije potvrdila povezanost genskog polimorfizma TNF- α $-238G>A$ i proizvodnje TNF- α .⁴⁹ Na temelju rezultata istraživanja *in vitro* na perifernim mononuklearnim stanicama ljudske krvi smatra se da genski polimorfizam IL-10 $-1082G>A$ smanjuje proizvodnju IL-10⁵⁰, a IL-1 α $-889C>T$ povećava proizvodnju IL-1 α .⁵¹ Međutim, *in vitro* istraživanja na uzorcima kože osoba s iritativnim kontaktnim dermatitisom pokazuju da genetski polimorfizam IL-1 α $-889C>T$ smanjuje ekspresiju IL-1 α u koži.^{52,53} U epidemiološkim istraživanjima povezanosti navedenih genskih polimorfizama s atopijskim bolestima dobiveni su neujednačeni rezultati. U prilogu 1 sažeto je prikazan pregled dosadašnjih istraživanja od kojih se većina bavila povezanosti astme i genskog polimorfizma TNF- α $-308G>A$.⁵⁴⁻¹⁰² Promatran je utjecaj razlika u frekvenciji alela i distribuciji genotipova između oboljelih i kontrolnih ispitanika, kao i povećanje rizika obolijevanja u odnosu na određeni genotip, najčešće preko dominantnog modela. Procjenjivano je povećanje rizika u nositelja recesivnog alela (heterozigota i recesivnih homozigota) u odnosu na nenositelje (dominantne homozigote) zbog često veoma malog broja recesivnih homozigota. Kao što se vidi u prvom dijelu tablice priloga, otprilike u polovici asocijacijskih genskih istraživanja i jednom istraživanju GWAS nije pronađena povezanost, dok druga polovica istraživanja pokazuje taj polimorfizam kao značajan čimbenik razvoja bolesti. Zanimljivo, ni ta istraživanja nisu ujednačena, u većini je uočen povećan rizik prisutnosti astme, a u manjini

smanjeni rizik. Što se tiče atopijskog rinitisa i dermatitisa, povezanosti s TNF- α $-308G>A$ polimorfizmom rijetko su proučavane. Uz to postoji samo nekolicina istraživanja koja su se bavila drugim odabranim polimorfizmima i atopijskim bolestima, također sa suprotnim rezultatima. Neslaganju rezultata raznih epidemioloških istraživanja mogu pridonijeti utjecaj etničke pripadnosti i neujednačeno definiranje fenotipa ispitanika, većinom bez razdvajanja po atopijskom statusu.

1.4. Povezanost čimbenika okoliša i načina života s atopijskim bolestima

Istraživanja su pokazala utjecaj niza čimbenika okoliša i načina života na razvoj atopijskih bolesti kao što su indeks tjelesne mase, pušenje cigareta, izloženost gradskom onečišćenom zraku, dodir s kućnim ljubimcima i domaćim životinjama.

Rezultati dosadašnjih istraživanja slažu se da je indeks tjelesne mase (eng. *body mass index*, BMI) pozitivno povezan s nastankom atopijskih bolesti, pogotovo astme.¹⁰³⁻¹⁰⁶ Predloženo je više mehanizama utjecaja količine masnog tkiva u tijelu na razvoj respiracijskih atopijskih simptoma i na plućnu funkciju, uključujući mehanički utjecaj pretilosti na dišne puteve, poticanje i održavanje stanja blage sistemske upale zbog izlučivanja proupalnih citokina iz masnog tkiva, između ostalih i TNF- α , te modulacije imunološkog sustava citokinima specifičnim za masno tkivo, kao što je, npr. adiponektin. Čini se da utjecaj količine masnog tkiva na simptome atopijskih bolesti ovisi o spolu. U istraživanju na adolescentima s umjerenom do teškom astmom uočeno je da je viši BMI bio povezan s duljim trajanjem simptoma i više egzacerbacija astme u djevojaka.¹⁰⁴ Drugo istraživanje uočilo je da je kod djevojčica pozitivna povezanost BMI-a i rizika astme linearna dok krivulja povezanosti kod dječaka ima oblik slova U, tj. pothranjeni i pretili dječaci imali su povećan rizik.¹⁰⁶ Istraživanje na mladoj odrasloj hrvatskoj populaciji primjećuje da osobe s atopijskom astmom

i rinitisom imaju značajno niže vrijednosti BMI-a u odnosu na osobe bez tih bolesti. Također je uočeno da su pothranjene osobe u odnosu na osobe s normalnim ili prekomjernim BMI-om značajno češće imale prisutne 2 ili 3 atopijske bolesti.¹⁷

Brojna istraživanja potvrdila su štetan utjecaj onečišćenja zraka (npr. ozona, nitroznih plinova, krutih čestica iz ispušnih plinova motornih vozila, sastojaka duhanskog dima poput akrilata i policikličkih aromatskih ugljikovodika) na pojavu i težinu atopijskih bolesti.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Istraživanja *in vitro* pokazala su da sastojci duhanskog dima i gradskog onečišćenog zraka, osim oštećenja dišnih puteva, također specifično potiču imunološke stanice u smjeru Th2 atopijskog odgovora.¹¹¹ Epidemiološka istraživanja potvrđuju pozitivnu povezanost urbanog onečišćenog zraka i pušenja cigareta s atopijskim bolestima, bilo da su promatrane razine onečišćenja u zraku, udaljenost od glavne prometnice ili samo seosko/gradsko prebivalište. Tako je uočena pozitivna povezanost razina lebdećih čestica promjera 2,5 μm , NO_2 i čađe s astmom i peludnom hunjavicom u prvih 8 godina života¹¹², a istraživanje na adolescentima pokazalo je pozitivnu povezanost alergijskog rinitisa i više razine ugljikovog monoksida, dušikovih oksida (NO_x) te ozona iz prometa.¹¹³ Izloženost čak i umjerenim razinama NO_x i lebdećih čestica promjera 10 μm iz zraka onečišćenog prometom tijekom prvih godina života povećalo je rizik smanjenja plućne funkcije i pojave senzibilizacije u dobi od 4 godine.¹¹⁴ Zanimljivo, povišene razine NO_x u zraku povećavaju i rizik ekcema.¹¹⁵ Prebivalište unutar 50 metara od glavnih prometnica značajno povećava rizik astme kod odraslih¹¹⁶, a kod djece je nađena pozitivna povezanost s asmatičnim bronhitisom, peludnom hunjavicom, ekcemom i senzibilizacijom.¹¹⁵ Uočena je smanjena učestalost astme u adolescenata sa seoskim u odnosu na gradsko prebivalište.¹¹⁷ Pri razmatranju povoljnog utjecaja seoskog prebivališta na atopijske bolesti treba uzeti u obzir i druge povoljne utjecaje osim odsutnosti onečišćenja zraka. Djeca na seoskim gospodarstvima izložena su širem spektru mikroorganizama, a raznolikost mikroorganizama obrnuto je povezana s rizikom atopije.¹¹⁸ Što se tiče pušenja

cigareta, rezultati epidemioloških istraživanja upućuju na značajnu pozitivnu povezanost pušenja s teškim simpljenjem.¹¹⁹ Seosko/gradsko prebivalište i pušački status stoga su važni okolišni čimbenici koje treba uzeti u obzir tijekom istraživanja atopijskih bolesti.

Brojna istraživanja upućuju na povezanost kontakta sa životinjama i atopijskih bolesti, no rezultati variraju s obzirom na vrstu životinje i životno razdoblje izloženosti. Izgleda da je rano djetinjstvo povoljno vremensko razdoblje za zaštitni učinak dodira sa životinjama, a da izloženost u kasnijoj dobi ili nema utjecaja, ili je povezana s nastankom odnosno pogoršanjem atopijskih bolesti. Istraživanja su pokazala da je kontakt s kućnim ljubimcima prije 2. godine života povezan sa manje pozitivnih reakcija na kožni test ubodom (SPT) u odrasloj dobi, pogotovo na alergene mačke, a da kontakt s ljubimcima u odrasloj dobi ne utječe na razinu senzibilizacije.¹²⁰ Meta analizom uočeno je povećanje rizika za astmu i sipljenje u slučaju držanja ljubimaca u kasnom djetinjstvu (poslije 6. godine), a smanjenje rizika ako je kontakt bio u ranom djetinjstvu.¹²¹ Međutim, taj zaštitni učinak može se objasniti i izbjegavanjem držanja kućnih ljubimaca u obiteljima s pozitivnom alergološkom anamnezom.^{121,122} Meta analiza povezanosti kontakta s ljubimcima u ranom djetinjstvu i pojave atopijskog dermatitisa pokazala je zaštitni učinak kontakta s psom, dok kontakt s mačkom nije imao učinka na rizik.¹²³ U trećoj fazi istraživanja ISAAC na adolescentima u dobi 13-14 godina uočeno je da kontakt s mačkom i psom značajno povećava izgleda za trenutne simptome astme, rinokonjuktivitisa i ekcema.¹²⁴ U nedavnom istraživanju na mladoj odrasloj hrvatskoj populaciji nisu nađene povezanosti kontakta s psom bilo u kasnom, bilo u ranom djetinjstvu s atopijskim bolestima i pokazateljima atopije, dok su ispitanici koji su bili u kontaktu s mačkom u ranom djetinjstvu češće imali atopijski dermatitis nego ispitanici koji nisu imali mačku.¹⁷ Što se tiče ostalih kućnih ljubimaca, istraživanja upućuju da kontakt s pticom djeluje zaštitno protiv pojave ekcema u prvoj godini života¹²⁵, a kontakt s glodavcem u kasnom djetinjstvu utvrđen je kao nezavisni čimbenik rizika za pojavu atopijske astme i rinitisa.¹⁷

1.5. Međudjelovanje čimbenika osobne osjetljivosti, čimbenika okoliša i načina života u pojavi atopijskih bolesti

Niz provedenih istraživanja potvrđuje važnost istodobnog razmatranja međusobnog utjecaja genetskih i okolišnih čimbenika u pojavnosti atopijskih poremećaja. Međudjelovanja genetskih i okolišnih čimbenika u pojavnosti dišnih poremećaja najviše su istraživana u uvjetima izloženosti onečišćivačima zraka. Ventilacijska plućna funkcija ispitivana je u ispitanika s divljim alelom (alelom G) na mjestu -308 TNF- α gena u uvjetima kontrolirane izloženosti ozonu.¹²⁶ Zaštitni učinak tog alela na pojavu astme bio je izražen pri izloženosti niskim razinama ozona, dok se pri visokim razinama ozona izgubio.¹²⁸ Sličan gubitak zaštitnog učinka uočen je u pušača duhana u odnosu na nepušače.⁶³ Nadalje, uočeno je da genski polimorfizam TNF α -308G>A pojačava rizičan utjecaj drugih genetskih čimbenika na atopiju pri visokim razinama NO_x u zraku, točnije da kod djece sa Ile105Val/Val105Val genotipom gena za antioksidacijski enzim glutation S-transferaze P1 (GST P1) izloženost NO_x u zraku povećava rizik senzibilizacije definirane povišenim vrijednostima specifičnih IgE (>0,35 kU/l) na jedan ili više inhalacijskih ili nutritivnih alergena, a ovaj rizik još je veći ako su djeca nositelji i genskog polimorfizma TNF-308 G>A.⁷⁵ Interakcija polimorfizama gena za antioksidacijske enzime, kao što su glutation S transferaze P1, M1 i T1, mijeloperoksidaza, s izloženošću štetnostima urbanog onečišćenja zraka i duhanskog dima majke tijekom prenatalnog razvoja povećava rizik astme i bronhalne hiperreaktivnosti djeteta. S druge strane, interakcija polimorfizama gena za komponente prirodene imunosti majke kao što su tzv. *toll-like receptor*, *cluster of differentiation 14* (CD14) s prenatalnom izloženošću endotoksinu u seoskom okolišu djeluje zaštitno protiv razvoja astme djeteta.¹²⁷

Pažljiva kontrola za čimbenike osobne osjetljivosti, načina života i okoliša rijetko je primjenjivana u prijašnjim istraživanjima povezanosti polimorfizama citokinskih gena s

atopijskim bolestima (prilog 1), a istraživanja u kojima je provedena kontrola odnose se isključivo na povezanost astme i polimorfizma TNF- α -308G>A. Stoga je istraživanje koje istodobno uzima u obzir osobne genske i okolišne čimbenike vrijedan doprinos znanju o međudjelovanju osobnih i okolišnih čimbenika povezanih s atopijskim bolestima čime se bavi ova disertacija.

2. HIPOTEZA

Polimorfizmi citokinskih gena TNF- α -308G>A i -238G>A, IL-1 α -889C>T i IL-10 -1082G>A rizični su genski čimbenici koji mogu pridonijeti razvoju i/ili pogoršanju postojeće dijagnoze atopijskih bolesti.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. OPĆI CILJ

Opći cilj je istražiti povezanost genskih polimorfizma citokinskih gena TNF- α -308G>A i -238G>A, IL-1 α -889C>T i IL-10 -1082G>A s pojavom i tijekom atopijskog rinitisa, atopijske astme i atopijskog dermatitisa u povezanosti s čimbenicima negenske osobne osjetljivosti i čimbenicima načina života i okoliša.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

Uz nadzor osobne osjetljivosti (dob, spol, indeks tjelesne mase, pozitivna obiteljska alergološka anamneza) i čimbenike načina života (pušenje cigareta, držanje kućnih ljubimaca) te okoliša (prebivalište u seoskom ili gradskom području kontinentalne ili primorske Hrvatske) u uzorku odraslog stanovništva Hrvatske odredit će se:

- frekvencije alela i genotipova za TNF- α na položajima -308 i -238, za IL-1 α na položaju -889 i za IL-10 na položaju -1082;
- rizik za pojavu atopijskih respiracijskih bolesti (atopijskog rinitisa ili atopijske astme) te atopijskog dermatitisa u nositelja recesivnog alela (recesivnih homozigota i heterozigota promatranih zajedno) u odnosu na nenositelje (dominantne homozigote);

- povezanost prisutnosti recesivnog alela s pokazateljima atopije (pozitivan test ubodom, povišen ukupan serumski IgE) i ventilacijske funkcije pluća (spirometrijski parametri, rezultat bronhodilatatornog testa);
- je li se tijekom razdoblja praćenja promijenio rizik za prisutnost atopijskih bolesti u nositelja polimorfizama u odnosu na nenositelje uz kontrolu čimbenika osobne osjetljivosti te čimbenike načina života i okoliša;
- jesu li se tijekom razdoblja praćenja promijenili pokazatelji atopije i ventilacijske funkcije pluća u ovisnosti o nalazu promatranih genskih polimorfizama uz kontrolu čimbenika osobne osjetljivosti te čimbenike načina života i okoliša.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ispitanici

Ispitanici su uključeni u sklopu prospektivnog istraživanja tijekom znanstvenoistraživačkog projekta „Alergotoksični učinci čimbenika općeg i radnog okoliša” financiranog od strane Ministarstva znanosti obrazovanja i sporta, u trajanju od 2007. do 2013. godine; broj projekta: 022-0222411-2410, voditelj prim. dr. sc. Jelena Macan. Projektno istraživanje započelo je presječnim istraživanjem uključivanjem ispitanika i skupljanjem podataka tijekom 2008. i 2009. godine i rezultati tih istraživanja su objavljeni.^{17,18,128} Ispitanici te faze istraživanja bili su studenti Sveučilišta u Zagrebu, prve godine Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Rudarsko-geološko-naftnog fakulteta, Veterinarskog fakulteta, Tekstilno-tehnološkog fakulteta, Filozofskog fakulteta, Šumarskog fakulteta i Kineziološkog fakulteta. Nakon upoznavanja s ciljevima projekta kratkim usmenim predavanjima u istraživanje su uključene osobe obaju spolova, dobi 18 i više godina, koje su na to dragovoljno pristale potpisivanjem na obrascu informiranog pristanka za sudjelovanje u ispitivanjima, sukladno etičkim načelima Helsinške deklaracije o ljudskim pravima i Zakonom o potvrđivanju Konvencije o zaštiti ljudskih prava i dostojanstva ljudskog bića u pogledu primjene biologije i medicine (NN MU 13-2003) uz suglasnosti Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Protokol istraživanja sadržavao je ove dijelove:

- ispunjavanje upitnika o zdravstvenom stanju i načinu života;
- atopijsko kožno testiranje pomoću testa ubodom (SPT);
- ispitivanje ventilacijske funkcije pluća i test bronhodilatatorom;

- vađenje venoske krvi i mjerenje koncentracije ukupnih IgE protutijela u krvnom serumu;
- uzorkovanje i izolacija DNA (obrisi bukalne sluznice).

Ukoliko su tijekom uzimanja podataka o zdravstvenom stanju utvrđene kontraindikacije (akutna faza alergijske bolesti, antialergijska ili druga relevantna terapija u tijeku, postojanje kožnih promjena na mjestu aplikacije alergena i/ili trudnoća) navedene kliničke pretrage nisu provedene.

U istraživanje je bilo ukupno uključeno 440 ispitanika koji su temelj i ovog doktorskog istraživanja čiji hodogram je prikazan na slici 1. Temelj prvog dijela istraživanja bio je uzorak od 437 ispitanika uključenih u istraživanje 2008./2009., kojima je uzet obrisak sluznice usne šupljine raspoloživ za genotipizaciju citokinskih polimorfizama, a temelj drugog dijela istraživanja bio je ukupni uzorak od 440 ispitanika. Drugi dio istraživanja je studija praćenja ispitanika prvog dijela i uključivanje ispitanika i skupljanje podataka odvijali su se 2012.-2014.

Ispitanici su kontaktirani telefonski i tom prilikom su upoznati o namjeri proširenja istraživanja u smislu genotipizacije polimorfizama TNF- α -308G>A i -238G>A, IL-1 α -889C>T i IL-10 -1082G>A i sudjelovanja u studiji praćenja, tj. ponavljanju istraživačkog protokola iz 2008. i 2009. godine:

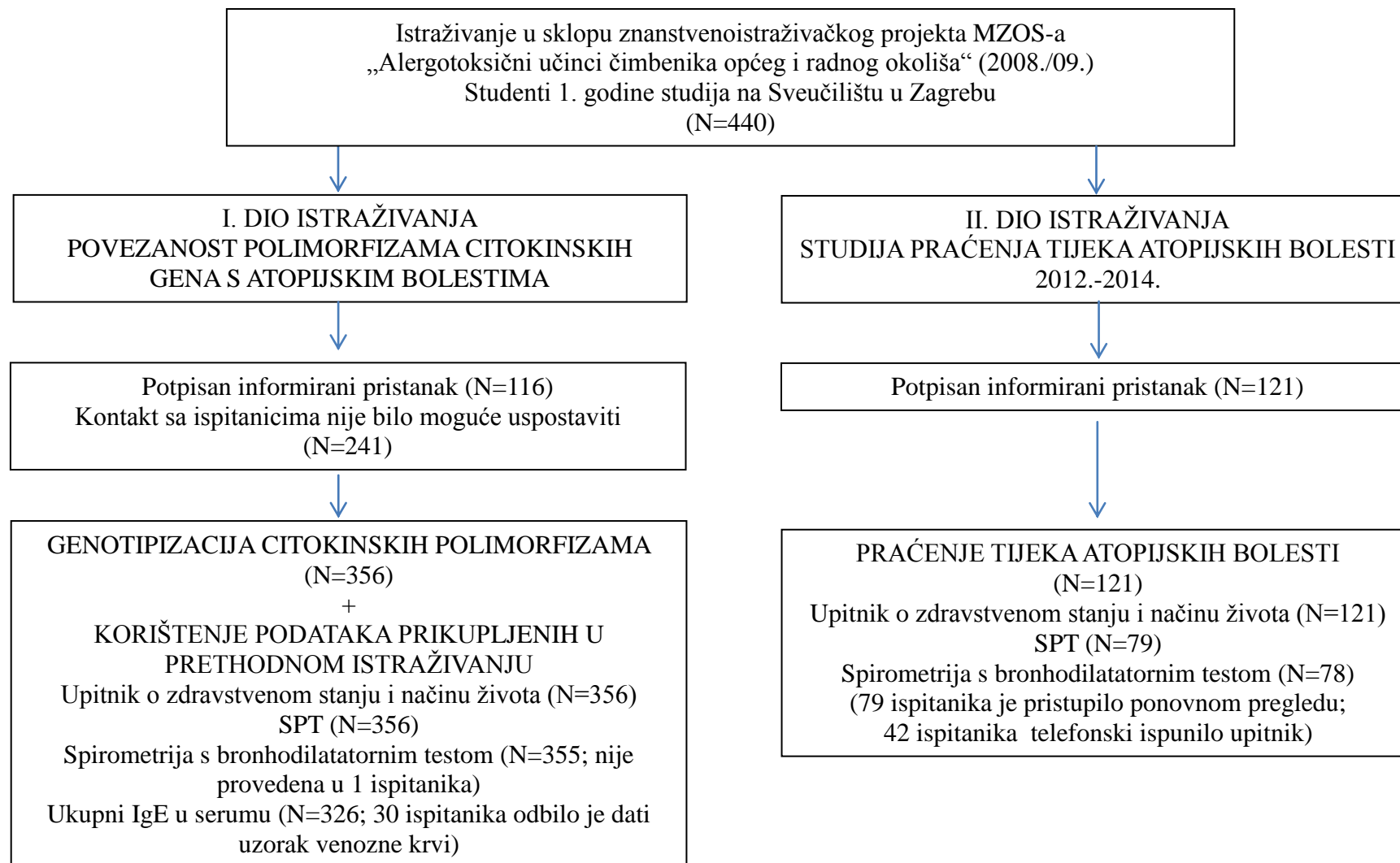
- ispunjavanje upitnika o zdravstvenom stanju i načinu života;
- atopijsko kožno testiranje pomoću testa ubodom (SPT);
- ispitivanje ventilacijske funkcije pluća

Zbog financijske ograničenosti nisu ponovljeni test bronhodilatatorom i mjerenje koncentracije ukupnih IgE protutijela u serumu. Zbog promjena telefonskog broja i

neodgovaranja na ponavljana zvanja nismo bili u mogućnosti stupiti u kontakt s 241 ispitanikom. Od ostalih s kojima smo stupili u kontakt 14 je usmeno zamolilo da ih se ne uvrštava u daljnja istraživanja, a 182 je dalo dopuštenje da im se na kućnu adresu dostavi novi informirani pristanak u kojem su detaljnije opisani svrha, ciljevi i provedba istraživanja. Informirane potpisane suglasnosti za upotrebu prikupljenih obrisaka sluznice usne šupljine za genotipiziranje polimorfizama citokinskih gena primljene su poštom na adresu Instituta. Ukupno ih je bilo 116 (tj. odaziv 64% od poslanih 182 dopisa kontaktiranim osobama). Jedna osoba dobi 44 godina isključena je iz istraživanja radi postizanja uskog raspona dobi ispitanika. Zaključno, 115 ispitanika koji su potpisali informirani pristanak te 241 ispitanik s kojim nije uspostavljen kontakt bili su ispitanici prvog dijela doktorskog istraživanja, tj. ukupno 356 osoba. Odluka o uključivanju ispitanika do kojih nismo uspjeli doprijeti temeljena je na najnovijim smjernicama za etička pitanja u epidemiološkim istraživanjima u kojima se navodi da uz vođenje računa o zaštiti tajnosti podataka o ispitanicima novo istraživanje ne predstavlja štetu po ispitanike.^{129,130} Također, odbijanje sudjelovanja neosporno je samo u slučaju da prvobitni informirani pristanak sadrži stavku da se može izraziti želja ne sudjelovanja u daljnjim istraživanjima što informirani pristanak prve faze projektnog istraživanja nije sadržavao.

Ispitanici drugog dijela ovog doktorskog istraživanja bili su podskupina ispitanika koji su pri dolasku ili putem pošte potpisali informirani pristanak za određivanje citokinskih genskih polimorfizama i sudjelovanje u studiji praćenja. Sedamdeset i devet ispitanika odazvalo se na dolazak i ponavljanje protokola istraživanja, a 42 osobe ispunile su skraćeni upitnik telefonski.

Slika 1. Hodogram doktorskog istraživanja



4.2. Metode istraživanja

4.2.1. Upitnik o zdravstvenom stanju i načinu života

Isti upitnik je korišten u početnom istraživanju i studiji praćenja (Prilog 2). Opći dio upitnika sadržavao je pitanja o dobi, spolu, visini, težini, obilježjima dosadašnjih prebivališta (grad ili selo, kontinentalni ili primorski dio Hrvatske) u kojem su proveli više od pola života ili 10 i više godina, kontaktu sa životinjama barem godinu dana (pas, mačka, glodavci, ptice) prvi puta u ranom djetinjstvu (<7 godina starosti) ili kasnom djetinjstvu i (≥ 7 god.), obiteljskoj alergološkoj anamnezi (prijavljena peludna hunjavica, astma i/ ili alergijska kožna bolest kod majke i/ili oca) te o navici pušenja duhana/cigareta (pušačima su smatrani aktivni pušači i osobe koje su prestale pušiti prije manje od 6 mjeseci). Indeks tjelesne mase (eng. *body mass index*, BMI) izračunat je dijeljenjem tjelesne mase u kilogramina s kvadratom visine u metrima te su korištene sljedeće kategorije za oznaku ispitanika: „normalnim“ smatrane su vrijednosti 18.5-24.9; „pothranjenim“ vrijednosti manje od 18.5; „prekomjernim“ iznad 25. Zdravstveni dio upitnika oblikovan je prilagodbom upitnika iz istraživanja *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*.⁷⁹ Sadržavao je pitanja o atopijskim simptomima gornjeg i donjeg respiracijskog sustava te kože.

Skraćeni upitnik korišten u drugom dijelu istraživanja pri telefonskom razgovoru s ispitanicima koji su odbili ponovni dolazak i ponavljanje protokola istraživanja sadržavao je pitanja o atopijskim simptomima kože, gornjeg i donjeg respiracijskog sustava te pitanja o tjelesnoj težini i pušačkom statusu.

4.2.2. Alergološko kožno testiranje metodom uboda

Alergološko kožno testiranje provedeno je standardnom metodom testa ubodom^{131,132} (eng. *skin prick test*, SPT) u početnom istraživanju i studiji praćenja s komercijalnim pripravcima uobičajenih inhalacijskih alergena (mješavina peludi trava; peludi breze- *Betula verrucosa* i

lijeske- *Corylus avellana*; peludi korova *Ambrosia elatior* i *Artemisia vulgaris*; grinje *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* i *Lepidoglyphus destructor*; plijesni *Cladosporium herbarum* i *Alternaria alternata*; dlaka mačke i psa; Allergopharma[®], Njemačka). Rezultat testa komercijalnom otopinom histamina (10 mg/mL histamina) služio je kao pozitivna kontrola kožne reakcije, a rezultat testa komercijalnom otopinom pufera kao negativna kontrola (Allergopharma[®], Njemačka). Kožna reakcija mjerena je nakon 15 minuta. Izmjeren je u milimetrima najveći promjer urtike (D) i promjer okomit na njega na polovici njegove dužine (d). Rezultat je izražen kao srednji promjer urtike izračunat prema jednadžbi $(D+d)/2$. Pozitivnom reakcijom smatrana je razlika u srednjem promjeru urtike ≥ 3 mm u odnosu na negativnu kontrolu u istog ispitanika.

4.2.3. Ispitivanje ventilacijske funkcije pluća i test bronhodilatatorom

Ventilacijska funkcija pluća ispitana je u početnom istraživanju i studiji praćenja određivanjem krivulje protok-volumen tijekom forsiranog izdisaja, pomoću spirometra Masterscope[®], Version 5.0 (Jaeger[®], VIASYS Healthcare GmbH[®], Njemačka). Spirometrija je u svakog ispitanika provedena najmanje dva puta, a najbolja vrijednost uzeta je za analizu. Parametri ventilacijske funkcije pluća korišteni u istraživanju, iskazani u postotku od očekivanih vrijednosti, bili su:

- forsirani vitalni kapacitet (FVC);
- forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1);
- maksimalni ekspiratorni protok zraka pri 50% FVC -a (MEF50).

Bronhodilatatorni test (BT) proveden je u početnom istraživanju na sljedeći način: ispitanik nakon učinjene početne spirometrije primi dva udaha (400 µg) aerosola Ventolin[®] i

spirometrija se ponovi nakon stanke od 20 minuta. Pozitivnim testom smatran je porast vrijednosti FEV1 $\geq 0,2$ L ili porast ≥ 12 % početne vrijednosti.¹³³

4.2.4. Vađenje venoske krvi i mjerenje koncentracije ukupnih IgE protutijela u serumu

U početnom istraživanju koncentracija ukupnih IgE protutijela u serumu iz uzorka venske krvi izmjerena je metodom ELISA (IASON[®], Austrija).¹³⁴ Povišenim vrijednostima ukupnog IgE smatrana je koncentracija veća od 150 kIU/L.

4.2.5. Uzorkovanje obrisaka sluznice usne šupljine, izdvajanje DNA i genotipizacija citokinskih gena

U početnom istraživanju DNA je izolirana iz stanica bukalne sluznice koje su prikupljene brisanjem usne šupljine s unutrašnje strane obraza pamučnom vaticom na plastičnom štapiću (Medispo[®], Nizozemska). Svakom ispitaniku uzet je jedan obirsak bukalne sluznice koja je prethodno isprana vodom. Nakon uzorkovanja, svaki obrisak uronjen je u 2 mL lizatnog pufera (Puregene[®] Cell Lysis Solution; Gentra Systems[®], SAD) i pohranjen na temperaturi +4°C do postupka izolacije genomske DNA. Genomska DNA izdvojena je iz liziranih uzoraka pomoću kompleta reagensa za izdvajanje DNA metodologijom "KlearGen" (KBioscience Ltd., Hoddesdon EN11 0EX, UK; <http://www.kbioscience.co.uk>). Polimorfizmi citokinskih gena TNF- α -308G>A, TNF- α -238G>A, IL-1 α -889C>T i IL-10 -1082G>A genotipizirani su u suradnom laboratoriju Akademskog medicinskog centra iz Amsterdama, Nizozemska, pomoću KASP SNP sustava mjerenja (od engl. *Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system*) temeljenom na homogenom transferu florescentne energije rezonancije (eng. *Fluorescent Resonance Energy Transfer*, FRET) u spoju s kompetitivnim PCR specifičnim za alele (KBioscience Ltd., Hoddesdon EN11 0EX, UK).^{135,136} Testovi provjere kakvoće bili su dvostruko slijepi uzorci i provjera Hardy-Weinbergove ravnoteže. U tablici 1. prikazane su korištene početnice, dizajnirane za upotrebu u sklopu genotipizirajućeg sustava KASP.

Tablica 1. Početnice korištene u sklopu KASP sustava prilikom genotipizacije citokinskih gena

Genski lokus	Početnica za alel 1	Početnica za alel 2	Zajednička početnica	Alel 1	Alel 2
TNF-α -308	GGAGGCTGAACCCCGTCCT	GAGGCTGAACCCCGTCCC	GAGGCAATAGGTTTTGAGGG GCAT	A	G
TNF-α -238	CCCCATCCTCCCTGCTCT	CCCCATCCTCCCTGCTCC	CCAGAAGACCCCCCTCGGAA T	A	G
IL-1α -889	GAAATTCTTTAATAATAGTAA CCAGGCAACAT	AATTCTTTAATAATAGTAACCA GGCAACAC	GAAGGCATGGATTTTTTGAGC CTTCAAT	T	C
IL-10 -1082	CAACACTACTAAGGCTTCTT TGGGAA	AACACTACTAAGGCTTCTTTG GGAG	CTTACTTTCCTCTTACCTATCC CTACTT	A	G

Legenda: KASP = *Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system*; PCR = *Polymerase Chain Reaction*; TNF α = čimbenik nekroze tumora α ; IL-1 α = interleukin 1 α ; IL-10= interleukin 10; A = alanin; C = citozin; G = gvanin; T = timin.

4.2.6. Definicije atopijskih bolesti, simptoma, pozitivnog kožnog testa ubodom i kontrolne skupine

Prisutnost atopijskih bolesti, simptoma i pozitivnog SPT-a u ispitanika definirana je na sljedeći način:

Atopijska astma: prijava otežanog disanja i/ili sipljenje u prsima u mirovanju tijekom proteklih godinu dana i pozitivan SPT na barem jedan testirani inhalatorni alergen.

Atopijski rinitis: prijava barem dva nosna simptoma (otežano disanje kroz nos, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) tijekom proteklih godinu dana i pozitivan SPT na barem jedan testirani inhalatorni alergen.

Atopijski dermatitis: prijava barem dva kožna simptoma (ekcem – vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) tijekom proteklih godinu dana i pozitivan SPT na barem jedan testirani inhalatorni alergen.

Atopijska respiracijska bolest: prisutnost atopijskog rinitisa i/ili atopijske astme.

Prisutnost astmatskih simptoma: prijava sipljenja u prsima i/ili otežanog disanja u mirovanju tijekom proteklih godinu dana.

Prisutnost nosnih simptoma: prijava barem dva nazalna simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) tijekom proteklih godinu dana.

Prisutnost kožnih simptoma: prijava barem dva kožna simptoma (ekcem – vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) tijekom proteklih godinu dana

Pozitivan test ubodom (SPT): pozitivna kožna reakcija na barem jedan testirani inhalacijski alergen.

Kontrolna skupina za statističke analize koje su uključivale atopijske bolesti, simptome i nalaz SPT-a: ispitanici bez prijave simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i s negativnim SPT-om.

4.2.7. Statističke metode

Za prikaz osobine ispitanika koristila sam metode deskriptivne statistike. Uočene frekvencije genotipa u kontrolnoj skupini ispitanika iz početnog istraživanja usporedila sam se s očekivanom Hardy-Weinbergovom distribucijom χ^2 testom. U slučaju da je očekivana frekvencija u skupini bila manja od 5, uspoređivala sam Fisherovim egzaktnim multinomijalnim testom.

Postojanje značajnih povezanosti između promatranih kategorijskih ishoda i nositeljstva pojedinog polimorfizma (TNF- α -308G>A, IL-1 α -889C>T ili IL-10 -1082G>A), čimbenika negenske osobne osjetljivosti ispitanika i čimbenika načina života i okoliša ispitala sam χ^2 testom ili Fisherovim egzaktnim testom, pri čemu je skupina ispitanika s pojedinim ishodom uspoređivana s kontrolnom skupinom. Promatrani kategorijski ishodi bila su:

- atopijska astma;
- atopijski rinitis;
- atopijska respiracijska bolest (astma i/ili rinitis);
- atopijski dermatitis;
- asmatski simptomi;
- nosni simptomi;
- respiracijski simptomi (dišni i/ili nosni simptomi);

- kožni simptomi;
- pozitivan SPT;
- kategorija povišenih vrijednosti IgE-a (>150 kU/l);
- pozitivan bronhodilatatorni test (BT).

Postojanje značajne povezanosti između kontinuiranih ishoda, logaritamski transformiranih vrijednosti ukupnog IgE-a te spirometrijskih parametara, i nositeljstva pojedinog polimorfizma (TNF- α -308G>A, IL-1 α -889C>T ili IL-10 -1082G>A), čimbenika negenske osobne osjetljivosti ispitanika i čimbenika načina života i okoliša ispitano je pomoću Studentovog *t*-testa (parametri plućne funkcije i logaritamski transformirani IgE bili su normalno distribuirani što je provjereno Shapiro-Wilksov testom i/ili pregledom histograma raspodjele frekvencija vrijednosti).

Rizik za prisutnost pojedinih ishoda u odnosu na kontrolnu skupinu u nositelja polimorfizma u odnosu na nenositelje ispitan je složenom statističkom analizom, tj. multiplom logističkom regresijom u slučaju kategorijskih ishoda i multiplom linearnom regresijom u slučaju kontinuiranih ishoda. Čimbenici osobne osjetljivosti ispitanika i čimbenici načina života i okoliša bili su uvršteni u modele kao prediktori ako su u jednostavnoj analizi (ispitivanjem povezanosti χ^2 testom ili Fisherovim egzaktnim testom) pokazali značajnu povezanost za promatrani ili slični ishod:

- za atopijske bolesti, simptome atopijskih bolesti, SPT nalaz, kategorijski promatran IgE i kontinuirano promatran logaritamski transformiran IgE u početnom istraživanju: spol, kontinentalno/primorsko prebivalište, obiteljska alergološka anamneza, kontakt s mačkom, kontakt s glodavcem;

- za atopijske bolesti, simptome atopijskih bolesti i SPT nalaz u studiji praćenja: spol, obiteljska alergološka anamneza;
- za spirometrijske parametre plućne funkcije u početnom istraživanju i studiji praćenja: spol, BMI kategorije
- za BT: spol, kontakt s mačkom, kontakt s psom, kontakt s glodavcem

U opisanim složenim modelima nije uključen polimorfizam $TNF-\alpha$ -238G>A zbog malog broja nositelja tog polimorfizma (10 osoba, tj. 3% ukupnog uzorka prvobitnog istraživanja). Ishodi su uspoređivani s kontrolnom skupinom.

U modelima multiple logističke regresije nije uočena kolinearnost nezavisnih varijabli (provjereno pregledom necentriranih čimbenika inflacije varijance). Valjanost modela multiple linearne regresije ocjenjena je provjerom normalnosti distribucije predviđenih residuala modela pregledom histograma distribucije.

Studija praćenja uključivala je ispitivanje pojave/povlačenja bolesti, simptoma i pozitivnog nalaza SPT-a tijekom razdoblja praćenja. Prvo je χ^2 testom ili Fisherovim egzaktnim testom ispitano postojanje značajnih razlika u karakteristikama ispitanika, frekvencijama nositeljstva polimorfizama i učestalosti promatranih ishoda zabilježenih tijekom početne faze istraživanja između skupina ispitanika koji su se odazvali na ponovni dolazak i onih koji nisu. Na isti način ispitano je postojanje razlika između skupine ispitanika za koju su u studiji praćenja skupljeni podaci o simptomatologiji (tj. skup ispitanika koji su se odazvali na ponovni dolazak i ispitanika koji su samo ispunili anketu) i ostatka ispitanika početne faze istraživanja. Promjena učestalosti atopijskih bolesti, simptoma i markera atopije tijekom razdoblja praćenja ispitala se McNemarovim testom. Razlika u srednjim vrijednostima plućnih parametara ovisno o fazi istraživanja ispitala se t -testom za uparene

uzorke. Promjena izgleda za prisutnost atopijskih bolesti nositelja recesivnog alela u odnosu na nenositelje ispitana je pomoću GEE modela (engl. *generalized estimating equations*), pri čemu je zavisna varijabla bila prisutnost bolesti, a prediktori prisutnost alela i vrijeme (s dvije moguće vrijednosti: početak ili kraj praćenja) te interakcija te dvije varijable. Ukoliko interakcija nije bila statistički značajna, zaključeno je da nema razlike u promjeni izgleda za prisutnost bolesti između nositelja recesivnog alela i nenositelja. Isti postupak primijenjen je kako bi se ispitala promjena rizika za prisutnost simptoma, pokazatelja atopije te promjena vrijednosti parametara dišne funkcije u ovisnosti o nalazu promatranih genskih polimorfizama. Rezultati vezani uz pojavu/povlačenje atopijskih bolesti i pokazatelja atopije su zbog malog broja ishoda u studiji praćenja prikazani opisno. Pojava i povlačenje atopijskih simptoma dodatno su ispitani χ^2 testom ili Fisherovim egzaktnim testom pri čemu su u slučaju pojave simptoma uspoređivane kategorije bile kategorija ispitanika s prijavom simptoma u studiji praćenja i neprijavljenim simptomima u početnom istraživanju, te kategorija ispitanika s neprijavljenim simptomima u obje faze. Sukladno tome, u slučaju povlačenja simptoma uspoređivane kategorije bile su kategorija ispitanika s prijavom simptoma u početnom istraživanju i neprijavljenim simptomima u studiji praćenja te kategorija ispitanika s neprijavljenim simptomima u obje faze. Između navedenih skupina statistički su uspoređivane razlike s obzirom na nepromjenive čimbenike tj. nositeljstvo polimorfizama, spol i obiteljsku alergološku anamnezu χ^2 testom ili Fisherovim egzaktnim testom. Za promjenjive čimbenike (promjene pušačkog statusa, promjene kategorije indeksa tjelesne mase, promjena gradskog/seoskog prebivališta, početak kontakta s mačkom, psom, pticom i glodavcem) nezavisne kategorije bile su kategorija ispitanika s promjenom (npr. ispitanici koji su tijekom razdoblja praćenja počeli pušiti) i kategorija ispitanika koji nisu ni u jednoj fazi istraživanja prijavili taj čimbenik (npr. nepušači). Za promjene kategorija BMI-ja

razmatrane kategorije bile su kategorija ispitanika s prelaskom u višu/nišu BMI kategoriju i kategorija ispitanika s normalnim BMI-jom tijekom razdoblja praćenja.

Povezanosti s $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnima. Za statističku obradu korišten je licencirani statistički program STATA/SE 10.1 for Windows (StataCorp LP[®], College Station[®], USA).

5. REZULTATI

5.1. Prvi dio istraživanja: povezanost polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima

5.1.1. Osobine ispitanika

Osobine ispitanike prvog dijela doktorskog istraživanja s obzirom na negenske čimbenike osobne osjetljivosti i čimbenike načina života i okoliša prikazane su u tablici 2. Većina ispitanika bile su žene. Prije upisa fakulteta ispitanici su većinom živjeli u kontinentalnom dijelu Hrvatske (79 %) i u gradovima (74 %). Prevladavali su nepušači (63 %) i osobe normalnog indeksa tjelesne mase (77 %). Dob ispitanika bila je unutar relativno uskog raspona godina (18-29, interkvartilni raspon 18-19, medijan 19). Držanje psa kao kućnog ljubimca, u ranom i kasnijem djetinjstvu bilo je često (62 %) kao i držanje mačke (42 %), dok su rjeđi izbor kućnog ljubimca bile ptice (21 %) i glodavci (19 %). Što se tiče pozitivne obiteljske alergološke anamneze, otprilike trećina ispitanika (27 %) prijavila je jednu ili više alergijskih bolesti u jednog ili oba roditelja.

Tablica 2. Učestalost negenskih čimbenika osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša među ispitanicima prvog dijela doktorskog istraživanja (ukupan N=356).

	N (%)
Muškarci	92 (26)
Primorsko / mediteransko prebivalište	280 (79) / 75 (21)
Gradsko / seosko prebivalište	264 (74) / 91 (26)
Pušači	133 (37)
BMI kategorije:	
Normalni	274 (77)
Pothranjeni	45 (13)
Prekomjerni	37 (10)
Kontakt s mačkom:	
u ranom djetinjstvu	85 (24)
u kasnom djetinjstvu	65 (18)
Kontakt s psom:	
u ranom djetinjstvu	115 (32)
u kasnom djetinjstvu	108 (30)
Kontakt s pticom:	
u ranom djetinjstvu	38 (11)
u kasnom djetinjstvu	34 (10)
Kontakt s glodavcem:	
u ranom djetinjstvu	25 (7)
u kasnom djetinjstvu	41 (12)
Pozitivna obiteljska alergološka anamneza	95 (27)

Legenda: Kontinentalno/mediteransko prebivalište, gradsko/seosko prebivalište: određeno prema prebivalištu gdje su proveli više od pola života ili 10 i više godina; Pušači: aktivni pušači i osobe koje su prestale pušiti prije manje od 6 mjeseci; Kontakt s mačkom, psom, pticom, glodavcem: kontakt u trajanju barem godinu dana, prvi puta u ranom djetinjstvu (<7 godina starosti) ili kasnom djetinjstvu i kasnije (≥7 godina starosti); BMI: indeks tjelesne mase, kategorija „normalni“ uključivala je vrijednosti BMI-a od 18.5-24.9; „pothranjeni“ vrijednosti <18.5, a „prekomjerni“ vrijednosti iznad 25; Pozitivna obiteljska alergološka anamneza: prijavljena peludna hunjavica, astma i/ ili alergijska kožna bolest kod majke i/ili oca.

U tablici 3. prikazane su učestalosti nositeljstva proučavanih genskih polimorfizama: 77 osoba (23 % uspješno genotipiziranih ispitanika) bili su nositelji TNF- α -308G>A polimorfizma; 10 (3 %) TNF- α -238G>A; 156 (47 %) IL-1 α -889C>T; 276 (82 %) IL-10 -1082G>A polimorfizma. Nije bilo značajne razlike u učestalosti nositeljstva proučavanih genetičkih polimorfizama između ispitanika iz kontinentalne i primorske regije Hrvatske.

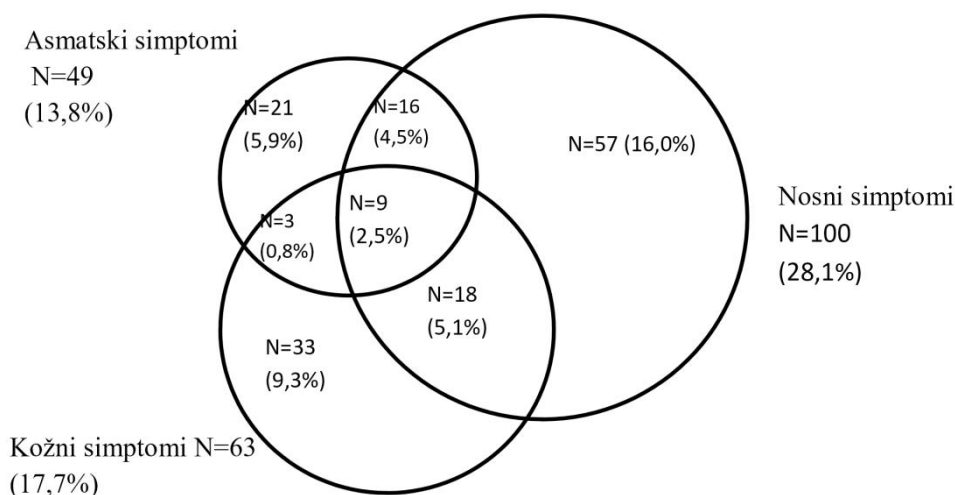
Tablica 3. Uspješnost genotipizacije i učestalost nositeljstva polimorfizama citokinskih gena među ispitanicima prvog dijela doktorskog istraživanja (ukupan N=356).

Genski polimorfizam	Uspješnost genotipizacije N (%)	Nositelji genskog polimorfizma N (%)
TNF-α-308 G>A	337 (95)	77 (23)
TNF-α-238 G>A	328 (92)	10 (3)
IL-10-1082 G>A	338 (95)	276 (82)
IL-1α-889 C>T	334 (94)	156 (47)

Legenda: TNF α -308 G>A i TNF α -238 G>A: genski polimorfizmi u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL10-1082 G>A genski polimorfizmi u genu za interleukin (IL) 10; IL1 α -889 C>T genski polimorfizmi u genu za interleukin (IL) 1 α .

Putem ISAAC upitnika 49 ispitanika (14 % od ukupnog uzorka) prijavilo je astmatske simptome tijekom proteklih godinu dana, 100 (28 %) je prijavilo nosne simptome, a 63 (18 %) kožne simptome. Otprilike polovica od 157 ispitanika (44 %) koji su prijavili simptome prijavilo je dvije ili više skupina simptoma što je prikazano na slici 2. Respiracijske simptome (tj. astmatske i/ili nosne simptome) prijavilo je 124 ispitanika (35 %).

Slika 2. Učestalost simptoma atopijskih bolesti među ispitanicima prvog dijela istraživanja.

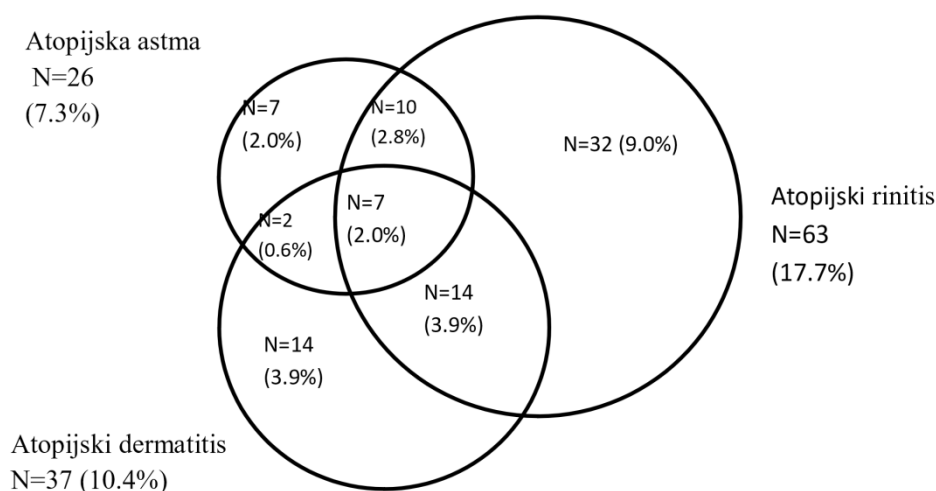


Legenda: Krugovi predstavljaju pojedine skupine simptoma. U krugove su upisane pripadajuće učestalosti iskazane kao broj ispitanika i postotak od ukupnog uzorka ispitanika (N=356). Asmatski simptomi: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana; Nosni simptomi: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana; Kožni simptomi: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem - vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana.

Pozitivan SPT imalo je 145 ispitanika (41 %), a povišene vrijednosti IgE protutijela (>150 kU/l) 57 ispitanika (17 %). Izmjereni ukupni IgE kretao se u rasponu 0,2-987,7 kU/l (medijan 18,95; IQR 10,7-101,3 kU/l).

Kada su u obzir uzeti istodobna prisutnost simptoma i pozitivan SPT uočene su sljedeće učestalosti atopijskih bolesti: 26 ispitanika (7 %) imalo je atopijsku astmu, 63 (18 %) atopijski rinitis, 72 (20 %) atopijsku astmu i/ili rinitis (tj. atopijsku respiracijsku bolest), a 37 (10 %) atopijski dermatitis. Kao i u slučaju simptoma, otprilike trećina ispitanika s atopijskim bolestima imala je dvije ili više bolesti, što je zornije prikazano na slici 3.

Slika 3. Učestalost atopijskih bolesti među ispitanicima prvog dijela doktorskog istraživanja.



Legenda: Krugovi predstavljaju pojedine skupine simptoma. U krugove su upisane pripadajuće učestalosti iskazane kao broj ispitanika i postotak od ukupnog uzorka ispitanika (N=356). Atopijska astma: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na bar 1 inhalatorni alergen; atopijski rinitis: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na bar 1 inhalatorni alergen; atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen.

Parametri ventilacijske funkcije pluća FVC, FEV₁ i MEF_{50%}, iskazani kao postotak očekivanih vrijednosti s obzirom na dob, spol i BMI, prikazani su u tablici 4. Parametri su bili normalno distribuirani. Što se tiče patoloških vrijednosti parametara ventilacijske funkcije pluća, 15 ispitanika (4 %) imalo je FVC vrijednosti manje od 80% predviđenih, 14 (4 %) imalo je FEV₁ vrijednosti manje od 80% predviđenih, a 12 ispitanika (3 %) imalo je MEF_{50%} vrijednosti manje od 60 % predviđenih. Pozitivan rezultat testa bronhodilatatorom imalo je 107 ispitanika (30 %).

Tablica 4. Parametri ventilacijske funkcije pluća (N=355)

	Srednja vrijednost	SD	Raspon	Interkvartilni raspon
FVC	99,95	11,93	52,9-138,9	92,4 – 107,3
FEV₁	101,4	11,77	59,7-140,2	93,5 – 109,8
MEF_{50%}	95,97	21,26	42,3-148,5	79,5 – 111,5

Legenda: Vrijednosti su iskazane kao postotak očekivanih vrijednosti s obzirom na dob, spol i BMI. FVC - forsirani vitalni kapacitet, FEV₁ - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi, MEF_{50%} - maksimalni ekspiratorni protok zraka pri 50% FVC-a; SD - standardna devijacija.

5.1.2. Atopijske bolesti i čimbenici negenske osobne osjetljivosti i čimbenici načina života i okoliša

Zastupljenosti čimbenika negenske osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša po skupinama ispitanika s atopijskim bolestima i kontrolnim ispitanicima prvog dijela istraživanja prikazane su u tablici 5. Ispitivanje povezanosti tih čimbenika s atopijskim bolestima uključivalo je jednostavnu statističku provjeru značajnih razlika u učestalosti čimbenika između skupine ispitanika s atopijskom bolesti i kontrolnih ispitanika te složenu statističku analizu preko modela multiple logističke regresije s pojedinom atopijskom bolešću kao ishodom te spolom, kontinentalnim/primorskim prebivalištem, obiteljskom alergološkom anamnezom, kontaktom s mačkom, kontaktom s glodavcem i polimorfizmima citokinskih gena kao prediktorima.

Osobe s **atopijskom astmom** češće su prijavile **kontakt s glodavcem u kasnijem djetinjstvu** u odnosu na kontrolnu skupinu (23 % vs. 9 %; $\chi^2 = 4,726$, $p = 0,030$), što je potvrđeno složenom analizom (OR =5,34; 95% CI 1,39-20,48; $p=0,015$; P modela 0,027; pseudo $R^2 = 0,16$). U istom modelu uočena je značajna pozitivna povezanost s **pozitivnom**

obiteljskom alergološkom anamnezom (OR =3,67; 95% CI 1,14-11,82; p=0,029) koja se nije pokazala jednostavnom analizom.

Ispitanici s **atopijskim rinitisom** također su u odnosu na kontrolnu skupinu češće prijavljivali **kontakt s glodavcem u kasnijem djetinjstvu** (22 % vs. 9 %; $\chi^2 = 6,359$, p = 0,012) što je potvrđeno i složenom analizom (OR =4,47; 95% CI 1,49-13,42; p=0,008; P modela <0,001; pseudo $R^2 = 0,22$). Osobe s atopijskim rinitisom u odnosu na kontrolnu skupinu češće su imale **kontinentalno prebivalište** (89 % vs. 76 %; $\chi^2 = 4.263$, p = 0,039) što je potvrđeno i složenom analizom (OR 2,96; 95% CI 1,00-8,78, p=0,039; P modela < 0,001; pseudo $R^2 =0,22$), dok su samo u složenoj no ne i jednostavnoj analizi uočene značajno pozitivne povezanosti ove bolesti s muškim spolom (OR = 2,57; 95% CI 1,05-6,29; p=0,039; P modela <0,001; pseudo $R^2 = 0,22$) i kontaktom s mačkom u kasnom djetinjstvu (OR= 2,93; 95% CI 1,10-7,79 p=0,031; P modela <0,001; pseudo $R^2 = 0,22$).

Osobe s **atopijskim respiracijskom bolešću** u odnosu na kontrolnu skupinu češće su prijavljivale **kontakt s glodavcem u kasnijem djetinjstvu** (19 % vs. 9 %; $\chi^2 =4,729$, p = 0,030) što je potvrđeno i složenom analizom (OR = 3,81; 95% CI 1,29-11,25; p=0,016; P modela <0,001, pseudo $R^2 =0,20$), dok su samo u složenoj no ne i jednostavnoj analizi uočene značajno pozitivne povezanosti s muškim spolom (OR 2,70; 95% CI 1,19-6,14 p=0,018), kontaktom s mačkom u kasnom djetinjstvu (OR 2,95; 95% CI 1,15-7,59 p=0,025) i pozitivnom obiteljskom alergološkom anamnezom (OR 6,29; 95% CI 2,84-13,91, p=0,000).

Ispitanici s **atopijskim dermatitisom** u odnosu na kontrolne ispitanike češće su prijavljivali **kontakt s mačkom u ranom djetinjstvu** (43 % vs. 21 %; $\chi^2 = 7,919$, p = 0,005) što je potvrđeno složenom analizom (OR = 4,35; 95% CI 1,63-11,58; p=0,003; P modela = 0,001, pseudo $R^2 =0,18$) te **pozitivnu obiteljsku alergološku anamnezu** (43 % vs. 18 %; $\chi^2 = 10,432$, p = 0,001) što je također potvrđeno složenom analizom (OR = 5,78; 95% CI 2,25-14,84; p<0,001; P modela =0,001, pseudo $R^2 =0,18$). Dodatno, značajna pozitivna povezanost

atopijskog dermatitisa i kontakta s glodavcem u kasnom djetinjstvu uočena je samo u složenoj statističkoj analizi (OR = 3,80; 95% CI 1,10-13,17; p=0,035; P modela =0,001, pseudo R² =0,18). Nisu uočene druge značajne povezanosti atopijskih bolesti i negenskih čimbenika osobne osjetljivosti i čimbenike načina života i okoliša u prvom dijelu istraživanja.

Tablica 5. Učestalost negenskih čimbenika osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša među skupinama ispitanika prvog dijela doktorskog istraživanja u odnosu na prisutnost atopijskih bolesti (N=356).

N (%)	Atopijska astma (N=26)	Atopijski rinitis (N=63)	Atopijska respiracijska bolest (N=72)	Atopijski dermatitis (N=37)	Kontrolni ispitanici (N=140)
Muškarci	8 (31)	18 (29)	22 (31)	8 (22)	28 (20)
Kontinentalno / primorsko prebivalište	21 (81) / 5 (19)	56 (89)* / 7 (11)*	62 (86) / 10 (14)	28 (76) / 9 (24)	107 (76) / 33 (24)
Gradsko / seosko prebivalište	22 (85) / 4 (15)	47 (75) / 16 (25)	55 (76) / 17 (24)	28 (76) / 9 (24)	104 (74) / 36 (26)
Pušači	9 (35)	21 (33)	26 (36)	14 (38)	45 (32)
BMI kategorije:					
Normalni	22 (85)	50 (79)	59 (82)	31 (84)	106 (76)
Pothranjeni	4 (15)	9 (14)	9 (13)	5 (14)	17 (12)
Prekomjerni	0 (0)	4 (6)	4 (6)	1 (3)	17 (12)
Kontakt s mačkom:					
u ranom djetinjstvu	6 (23)	14 (22)	18 (25)	16 (43)*	29 (21)
u kasnom djetinjstvu	5 (19)	16 (25)	17 (24)	5 (14)	21 (15)
Kontakt s psom:					
u ranom djetinjstvu	6 (23)	22 (35)	24 (33)	15 (41)	42 (30)
u kasnom djetinjstvu	9 (35)	15 (24)	18 (25)	8 (22)	46 (33)
Kontakt s pticom:					
u ranom djetinjstvu	2 (8)	5 (8)	6 (8)	2 (5)	14 (10)
u kasnom djetinjstvu	2 (8)	7 (11)	7 (10)	4 (11)	15 (11)
Kontakt s glodavcem:					
u ranom djetinjstvu	3 (12)	4 (6)	6 (8)	3 (8)	9 (6)
u kasnom djetinjstvu	6 (23)*	14 (22)*	14 (19)*	6 (16)	13 (9)
Pozitivna obiteljska anamneza alergijskih bolesti u roditelja	7 (27)	28 (45)	31 (44)	16 (43)*	25 (18)

Legenda: Kontinentalno/mediteransko prebivalište, gradsko/seosko prebivalište: određeno prema prebivalištu gdje su proveli više od pola života ili 10 i više godina; Pušači: aktivni pušači i osobe koje su prestale pušiti prije manje od 6 mjeseci. Kontakt s mačkom, psom, pticom, glodavce: kontakt u trajanju barem godinu dana, prvi puta u ranom djetinjstvu (dob <7 godina) ili kasnom djetinjstvu i kasnije (dob ≥7 godina); BMI: indeks tjelesne mase, kategorija „normalni“ uključivala je BMI-a od 18.5-24.9; „pothranjeni“ BMI <18.5, a „prekomjerni“ BMI iznad 25; Pozitivna obiteljska alergološka anamneza: prijavljena peludna hunjavica, astma i/ili alergijska kožna bolest kod majke i/ili oca. Atopijska astma: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana+pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijski rinitis: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana+pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijska respiracijska bolest: prisutnost atopijske astme i/ili atopijskog rinitisa; Atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem-vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Kontrolni ispitanici: ispitanici bez prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a. * Statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na kontrolnu skupinu, testirano χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

5.1.3. Simptomi atopijskih bolesti, čimbenici negenske osobne osjetljivosti i čimbenici načina života i okoliša

Zastupljenosti čimbenika negenske osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša po skupinama ispitanika sa simptomima atopijskih bolesti i kontrolnim ispitanicima prvog dijela doktorskog istraživanja prikazane su u tablici 6.

Ispitivanje povezanosti tih čimbenika s simptomima atopijskim bolestima uključivalo je jednostavnu statističku provjeru značajnih razlika u učestalosti čimbenika između skupine ispitanika s pojedinom skupinom simptoma i kontrolnih ispitanika te složenu statističku analizu preko modela multiple logističke regresije s pojedinom skupinom simptoma kao ishodom te spolom, kontinentalnim/primorsko prebivalištem, obiteljskom alergološkom anamnezom, kontaktom s mačkom, kontaktom s glodavcem i polimorfizmima citokinskih gena kao prediktorima.

Ispitanici s **nosnim simptomima** u odnosu na kontrolne ispitanike češće su prijavljivali **kontinentalno prebivalište** (87 % vs. 76 %, $\chi^2 = 4,208$, $p = 0,040$), **kontakt s glodavcem u kasnom djetinjstvu** (21 % vs. 9 %, $\chi^2 = 6,578$, $p = 0,010$) te **pozitivnu obiteljsku alergološku anamnezu** (43 % vs. 18 %, $\chi^2 = 18,349$, $p < 0,001$), što je potvrđeno u složenoj analizi (P modela $< 0,001$; pseudo $R^2 = 0,14$: kontinentalno prebivalište OR= 2,34; 95% CI 1,01-5,41; $p=0,047$; kontakt s glodavcem u kasnom djetinjstvu OR= 2,34; 95% CI 1,01-5,41; $p=0,047$; pozitivna obiteljska alergološka anamneza OR = 5,03, 95% CI 2.53-10.02; $p<0,001$).

Osobe s **respiracijskim simptomima** u odnosu na kontrolne ispitanike slično tome češće su prijavljivale **kontakt s glodavcem kasnom djetinjstvu** (19 % vs. 9 %, $\chi^2 = 4,254$, $p = 0,039$) i **pozitivnu obiteljsku alergološku anamnezu** (38 % vs. 18 %, $\chi^2 = 13,395$, $p < 0,001$). Te povezanosti potvrđene su i složenom analizom (P modela $< 0,001$; pseudo $R^2 =$

0,10: kontakt s glodavcem u kasnom djetinjstvu OR= 2,51; 95% CI 1,05-6,03; p=0,039; pozitivna obiteljska alergološka anamneza OR = 3,85; 95% CI 2,01-7,37; p<0,001), a samo složenom analizom uočena je značajna pozitivna povezanost kontakta s mačkom u kasnom djetinjstvu (OR= 2,40; 95% CI 1,11-5,22, p=0,027).

Ispitanici s **kožnim simptomima** u odnosu na kontrolne ispitanike češće su prijavljivali **kontakt s mačkom u ranom djetinjstvu** (44 % vs. 24 %; $\chi^2 = 6,745$, p = 0,009) i **pozitivnu obiteljsku alergološku anamnezu** (35 % vs. 18 %; $\chi^2 = 6,964$, p = 0,008). Te povezanosti potvrđene su i složenom analizom (P modela = 0,001; pseudo R² = 0,13: kontakt s mačkom u ranom djetinjstvu: OR = 3,13; 95% CI 1,39 – 7,06; p=0,006; pozitivna obiteljska alergološka anamneza: OR = 3,69; 95% CI 1,66 – 8,20, p=0,001), a samo složenom analizom uočena je značajna pozitivna povezanost kontakta s glodavcem u kasnom djetinjstvu (OR = 3,07; 95% CI 1,07 – 8,78, p=0,037).

Nije bilo drugih značajnih povezanosti simptoma atopijskih bolesti i čimbenika negenske osobne osjetljivosti, načina života i okoliša kod ispitanika u prvom dijelu istraživanja.

Tablica 6. Učestalost čimbenika negenske osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša po skupinama ispitanika sa atopijskim simptomima prvog dijela istraživanja (N=356).

N (%)	Dišni simptomi (N=49)	Nosni simptomi (N=100)	Respiracijski simptomi (N=124)	Kožni simptomi (N=63)	Kontrolni ispitanici (N=140)
Muškarci	10 (20)	26 (26)	32 (26)	13 (21)	28 (20)
Kontinentalno / primorsko prebivalište	38 (78) / 11 (22)	87 (87) / 13 (13)*	105 (85) / 19 (15)	49 (78) / 14 (22)	107 (76) / 33 (24)
Gradsko / seosko prebivalište	38 (78) / 11 (22)	71 (71) / 29 (29)	91 (73) / 33 (27)	45 (71) / 18 (29)	104 (74) / 36 (26)
Pušači	20 (41)	35 (35)	48 (39)	28 (44)	45 (32)
BMI kategorije:					
Normalni	43 (88)	80 (80)	103 (83)	48 (76)	106 (76)
Pothranjeni	5 (10)	15 (15)	15 (12)	9 (14)	17 (12)
Prekomjerni	1 (2)	5 (5)	6 (5)	6 (10)	17 (12)
Kontakt s mačkom:					
u ranom djetinjstvu	12 (24)	25 (25)	31 (25)	23 (37)*	29 (21)
u kasnom djetinjstvu	10 (20)	19 (19)	25 (20)	11 (17)	21 (15)
Kontakt s psom:					
u ranom djetinjstvu	14 (29)	40 (40)	46 (37)	26 (41)	42 (30)
u kasnom djetinjstvu	16 (33)	21 (21)	29 (23)	14 (22)	46 (33)
Kontakt s pticom:					
u ranom djetinjstvu	9 (18)	13 (13)	17 (14)	5 (8)	14 (10)
u kasnom djetinjstvu	6 (12)	10 (10)	12 (10)	5 (8)	15 (11)
Kontakt s glodavcem:					
u ranom djetinjstvu	5 (10)	6 (6)	9 (7)	5 (8)	9 (6)
u kasnom djetinjstvu	8 (16)	21(21)*	22 (18)*	10 (16)	13 (9)
Pozitivna obiteljska alergološka anamneza	12 (24)	43 (43)*	47 (38)*	22 (35)*	25 (18)

Legenda: Gradsko/seosko prebivalište: određeno prema prebivalištu gdje su proveli više od pola života ili 10 i više godina; Pušači: aktivni pušači i osobe koje su prestale pušiti prije manje od 6 mjeseci. Kontakt s mačkom, psom, pticom, glodavcem: kontakt u trajanju barem godinu dana, prvi puta u ranom djetinjstvu (dob <7 godina) ili kasnom djetinjstvu i kasnije (dob ≥7 godina); BMI: indeks tjelesne mase, kategorija „normalni“ uključivala je BMI-a od 18.5-24.9; „pothranjeni“ BMI <18.5, a „prekomjerni“ BMI iznad 25; Pozitivna obiteljska alergološka anamneza: prijavljena peludna hunjavica, astma i/ili alergijska kožna bolest kod majke i/ili oca. Astmatski simptomi: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana; Nosni simptomi: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana; Respiracijski simptomi: prisutnost astmatskih i/ili nosnih simptoma; Kožni simptomi: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem - vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana; Kontrolni ispitanici: ispitanici bez prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a; * Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu, testirano χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

5.1.4. Pokazatelji atopije, čimbenici negenske osobne osjetljivosti i čimbenici načina života i okoliša

Zastupljenosti čimbenika negenske osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša po skupinama ispitanika s pozitivnim SPT-om i kontrolnim ispitanicima te ispitanicima s povišenim ili normalnim vrijednostima ukupnih IgE protutijela prvog dijela istraživanja, prikazane su u tablici 7.

Tablica 7. Učestalost čimbenika negenske osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša po skupinama ispitanika s pokazateljima atopije u prvom dijelu istraživanja (N=356).

N (%)	Pozitivni SPT (N=145)	Kontrolni ispitanici (N=140)	IgE ≥150 kU/l (N=57)	IgE <150 kU/l (N=269)
Muškarci	49 (34)*	28 (20)	22 (39)*	63 (23)
Kontinentalno / primorsko prebivalište	115 (80) / 29 (20)	107 (76) / 33 (24)	50 (88) / 7 (12)	206 (77) / 62 (23)
Gradsko / seosko prebivalište	110 (76) / 34 (24)	104 (74) / 36 (26)	43 (75) / 14 (25)	200 (75) / 68 (25)
Pušači	56 (39)	45 (32)	16 (28)	16 (18)
BMI kategorije:				
Normalni	113 (78)	106 (76)	45 (79)	211 (78)
Pothranjeni	19 (13)	17 (12)	4 (7)	34 (13)
Prekomjerni	13 (9)	17 (12)	8 (14)	24 (9)
Kontakt s mačkom u ranom djetinjstvu^b u kasnom djetinjstvu	38 (26) 31 (21)	29 (21) 21 (15)	16 (28) 9 (16)	64 (24) 50 (19)
Kontakt s psom u ranom djetinjstvu u kasnom djetinjstvu	45 (31) 45 (31)	42 (30) 46 (33)	20 (35) 18 (32)	87 (32) 80 (30)
Kontakt s pticom: u ranom djetinjstvu u kasnom djetinjstvu	11 (8) 13 (9)	14 (10) 15 (11)	5 (9) 3 (5)	31 (12) 30 (11)
Kontakt s glodavcem: u ranom djetinjstvu u kasnom djetinjstvu	11 (8) 17 (12)	9 (6) 13 (9)	7 (12) 8 (14)	17 (6) 28 (10)
Pozitivna obiteljska alergološka anamneza	50 (35)*	25 (18)	20 (35)	71 (26)

Legenda: Pozitivan SPT: pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen. Kontrolni ispitanici: ispitanici bez prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a; IgE: ukupna IgE protutijela u serumu; Gradsko/seosko prebivalište: određeno prema prebivalištu gdje su proveli više od pola života ili 10 i više godina; Pušači: aktivni pušači i osobe koje su prestale pušiti prije manje od 6 mjeseci. Kontakt s mačkom, psom, pticom, glodavcem: kontakt u trajanju barem godinu dana, prvi puta u ranom djetinjstvu (dob <7 godina) ili kasnom djetinjstvu i kasnije (dob ≥7 godina); BMI: indeks tjelesne mase, kategorija „normalni“ uključivala je BMI-a od 18.5-24.9; „pothranjeni“ BMI <18.5, a „prekomjerni“ BMI iznad 25; Pozitivna obiteljska alergološka anamneza: prijavljena peludna hunjavica, astma i/ili alergijska kožna bolest kod majke i/ili oca; * Statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na kontrolnu skupinu (analiza SPT-a) ili u odnosu na osobe s normalnim IgE vrijednostima (analiza kategorija povišenih/normalnih IgE vrijednosti), testirano χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

Ispitivanje povezanosti čimbenika negenske osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša s pokazateljima atopije uključivalo je jednostavnu statističku provjeru značajnih razlika u učestalosti čimbenika između skupine ispitanika s pozitivnim pokazateljem atopije i kontrolnih ispitanika te složenu statističku analizu preko modela multiple logističke regresije s pojedinim pokazateljem atopije kao ishodom te spolom, kontinentalnim/primorskim prebivalištem, obiteljskom alergološkom anamnezom, kontaktom s mačkom, kontaktom s glodavcem i polimorfizmima citokinskih gena kao prediktorima. Osobe s **pozitivnim SPT-om** u odnosu na kontrolnu skupinu češće su bile **muškarci** (34 % vs. 20 %, $\chi^2 = 6,872, p = 0,009$) i češće su imale **pozitivnu obiteljsku alergološku anamnezu** (35 % vs. 18 %, $\chi^2 = 10,171, p = 0,001$). Te povezanosti potvrđene su složenom analizom (P modela $< 0,001$; pseudo $R^2 = 0,09$: muški spol OR = 2,43; 95% CI 1,33- 4,46, $p = 0,004$; pozitivna obiteljska alergološka anamneza OR = 3,25; 95%CI 1,75-6,06; $p < 0,001$), a samo u složenoj analizi se uočila značajna pozitivna povezanost kontakta s mačkom u ranom (OR = 2,04; 95% CI 1,06-3,90, $p = 0,032$) i u kasnom djetinjstvu (OR 2,37; 95% CI 1,14-4,92, $p = 0,021$). **Muškarci** su također imali značajno veće **vrijednosti ukupnog IgE-a** nego žene (srednja vrijednost logIgE-a kod muškaraca = 3,75 vs. srednja vrijednost logIgE-a kod žena = 3,14 , $t = -2.6706, p = 0.008$) što je potvrđeno složenom analizom (muški spol: koef. = 0,68, 95% CI 0,21 – 1,15, $p = 0,004$; P model 0,062, adjusted $R^2 = 0,03$). Slično tome, osobe **iznad granične vrijednosti od 150 kU/l ukupnog IgE-a** u odnosu na osobe ispod granične vrijednosti značajno češće su bili muškarci (39% vs. 23%, $\chi^2 = 5,620 p = 0,018$) što je potvrđeno složenom analizom (muški spol: OR = 2,12, 95% CI 1,10 – 4,07, $p = 0,025$; P modela = 0,089, adjusted $R^2 = 0,061$).

5.1.5. Atopijske bolesti i polimorfizmi citokinskih gena

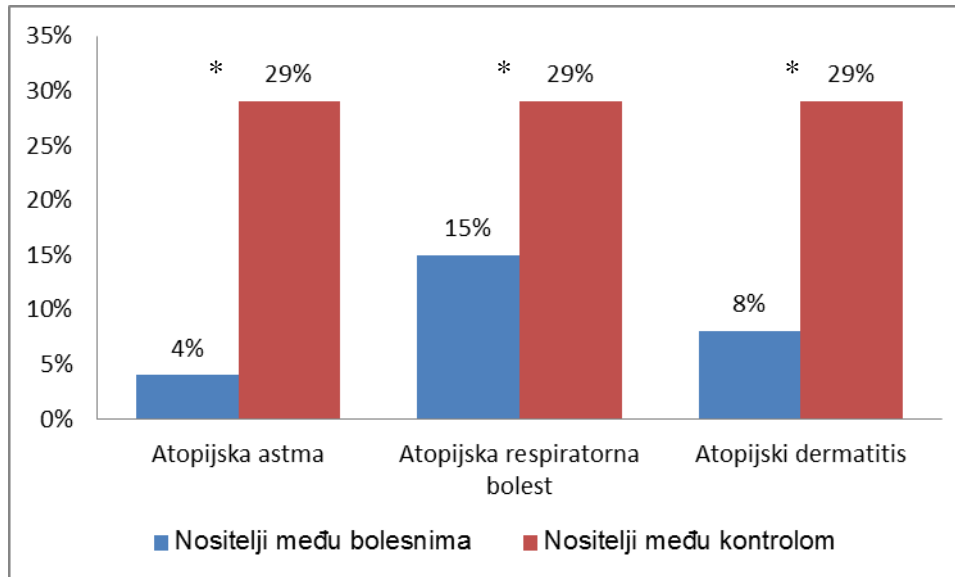
Jednostavnom statističkom analizom podataka skupljenih u prvom dijelu istraživanja uočena je značajna negativna povezanost genskog polimorfizma **TNF α -308G>A** s **atopijskom astmom**: nositelji tog polimorfizma bili su sedam puta učestaliji među kontrolnim ispitanicima nego ispitanicima s atopijskom astmom (29 % vs. 4 %; Fisherov egzaktni test, p=0,021). Iako nije uočena značajna povezanost s atopijskim rinitisom, nositelji ovog polimorfizma bili su dvaput učestaliji među kontrolnim ispitanicima nego ispitanicima s **atopijskom respiracijskom bolešću** (29 % vs. 15 %; χ^2 4,340, p=0,037). Taj polimorfizam je također bio značajno negativno povezan s **atopijskim dermatitisom**, s otprilike 3,5 više nositelja među kontrolnim ispitanicima nego ispitanicima s atopijskim dermatitisom (29 % vs. 8 %; Fisherov egzaktni test, p=0,009). Rezultati jednostavne analize prikazani su u tablici 8. i na slici 4.

Tablica 8. Učestalost nositeljstva citokinskih polimorfizama po skupinama ispitanika s atopijskim bolestima i kontrolnim ispitanicima prvog dijela doktorskog istraživanja (N=356).

	Atopijska astma (N=26)	Atopijski rinitis (N=63)	Atopijska respiracijska bolest (N=72)	Atopijski dermatitis (N=37)	Kontrolni ispitanici (N=140)
TNF-α -308 G>A	1/24 (4)*	10/57 (18)	10/66 (15)*	3/37 (8)*	38/133 (29)
TNF-α -238 G>A	1/25 (4)	2/59 (3)	3/68 (4)	0/36 (0)	2/127 (2)
IL-10 -1082 G>A	20/25 (80)	52/58 (90)	58/67 (87)	28/37 (76)	107/132 (81)
IL1 -α-889 C>T	10/24 (42)	21/57 (37)	23/66 (35)	15/37 (41)	62/131 (47)

Legenda: Atopijska astma: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijski rinitis: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijska respiracijska bolest: prisutnost atopijske astme i/ili atopijskog rinitisa; Atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem - vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Kontrolni ispitanici: ispitanici bez prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a; TNF α -308 G>A i TNF α -238 G>A: genski polimorfizmi u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL10-1082 G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL1 α -889 C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α ; * Statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na kontrolnu skupinu, testirano χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

Slika 3. Značajne povezanosti genskog polimorfizma TNF α -308G>A i atopijskih bolesti (N=356).



Legenda: Atopijska astma: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana+pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijska respiracijska bolest: prisutnost atopijske astme i/ili atopijskog rinitisa; Atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem - vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Kontrolni ispitanici: ispitanici bez ranije definirane prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a; TNF- α -308 G>A: genski polimorfizam u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; *Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu, testirano χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

Složena statistička analiza koja je uključivala kontrolu za čimbenike negenske osobne osjetljivosti ispitanika i čimbenike načina života i okoliša (spol, kontinentalno/primorsko prebivalište, obiteljska alergološka anamneza, kontakt s mačkom, kontakt s glodavcem; Tablica 9.) potvrdila je rezultate jednostavne analize samo za atopijski dermatitis, ne i za atopijsku astmu i atopijsku respiracijsku bolest. **Atopijski dermatitis** bio je negativno povezan s **TNF α -308G>A polimorfizmom** s graničnom značajnošću (Tablica13.: OR = 0,27; 95% CI 0,07–1,00, $p = 0,050$; P modela = 0,001; pseudo $R^2 = 0,18$). Samo u složenoj statističkoj analizi uočena je granično značajna negativna povezanost genskog **polimorfizma IL1 α -889C>T** s **atopijskom respiracijskom bolešću** (Tablica 9.: OR= 0,49; 95% CI 0,24-

1,02, $p=0.056$; P modela $<0,001$; pseudo $R^2=0,20$). U prvom dijelu istraživanja nisu uočene druge značajne povezanosti atopijskih bolesti i polimorfizama citokinskih gena.

Tablica 9. Modeli logističke regresije kojima je nađena značajna povezanost atopijskih bolesti i polimorfizama citokinskih gena.

Prediktori	Atopijski dermatitis			Prediktori	Atopijska respiracijska bolest		
	OR	95% CI	P		OR	95% CI	P
Nositelj TNF- α -308G>A	0,27*	0,07-1,00	0,050	Nositelj TNF- α -308G>A	0,46	0,18-1,16	0,099
Nositelj IL-10 -1082G>A	0,66	0,23-1,86	0,428	Nositelj IL-10 -1082G>A	1,13	0,42-3,03	0,809
Nositelj IL-1 α -889G>A	0,72	0,31-1,65	0,435	Nositelj IL-1α -889G>A	0,49	0,24-1,02	0,056
Muški spol	1,29	0,45-3,77	0,634	Muški spol	2,70*	1,19-6,14	0,018
Konitentalno vs. primorsko prebivalište	1,29	0,50-3,37	0,598	Konitentalno vs. primorsko prebivalište	2,40	0,93-6,20	0,071
Pozitivna obiteljska alergološka anamneza	5,78	2,25-14,84	0,000*	Pozitivna obiteljska alergološka anamneza	6,29*	2,84-13,91	0,000
Kontakt s mačkom: U ranom djetinjstvu U kasnom djetinjstvu	4,35* 2,05	1,63-11,58 0,58-7,26	0,003 0,266	Kontakt s mačkom: U ranom djetinjstvu U kasnom djetinjstvu	2,34 2,95*	0,96-5,69 1,15-7,59	0,062 0,025
Kontakt s glodavcem: U ranom djetinjstvu U kasnom djetinjstvu	0,72 3,80*	0,13-3,88 1,10-13,17	0,702 0,035	Kontakt s glodavcem: U ranom djetinjstvu U kasnom djetinjstvu	1,28 3,81*	0,35-4,69 1,29-11,25	0,703 0,016

Legenda: OR: omjer rizika, 95% CI: 95% interval pouzdanosti; TNF- α -308 G>A: genski polimorfizam u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL-10 -1082 G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL-1 α -889 C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α . Pozitivna obiteljska alergološka anamneza: prijavljena peludna hunjavica, astma i/ ili alergijska kožna bolest kod majke i/ili oca. Kontinentalno / primorsko prebivalište, gradsko / seosko prebivalište: određeno prema naselju (naseljima) gdje su proveli više od pola života ili 10 i više godina; Kontakt s mačkom, psom, glodavcem: kontakt u trajanju barem godinu dana, prvi puta u ranom djetinjstvu (<7 godina starosti) ili kasnom djetinjstvu i kasnije (≥ 7 godina starosti); Atopijska respiracijska bolest: prisutnost atopijske astme i/ili atopijskog rinitisa; Atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem- vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; * Statistički značajna razlika ($p<0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu bez ranije definirane prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a

5.1.6. Simptomi atopijskih bolesti i polimorfizmi citokinskih gena

Zastupljenosti nositeljstva polimorfizma po skupinama ispitanika sa atopijskim simptomima i kontrolnim ispitanicima prvog dijela istraživanja prikazane u tablici 10.

Tablica 10. Učestalost nositeljstva polimorfizama po skupinama ispitanika sa simptomima i kontrolnim ispitanicima prvog dijela istraživanja (N=356).

Genski polimorfizam	Asmatski simptomi (N=49)	Nosni simptomi (N=100)	Respiracijski simptomi (N=124)	Kožni simptomi (N=63)	Kontrolni ispitanici (N=140)
TNF-α -308G>A	6/47 (13)*	20/92 (22)	23/116 (20)	7/59 (12)*	38/133 (29)
TNF-α -238G>A	2/47 (4)	2/91 (2)	4/114 (4)	1/60 (2)	2/127 (2)
IL-10 -1082G>A	34/48 (71)	77/92 (84)	93/116 (80)	46/61 (75)	107/132 (81)
IL-1α -889C>T	23/45 (51)	40/91 (44)	50/114 (44)	26/59 (44)	62/131 (47)

Legenda: Astmatski simptomi: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana; Nosni simptomi: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana; Respiracijski simptomi: prisutnost astmatskih i/ili nosnih simptoma; Kožni simptomi: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem-vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana; Kontrolni ispitanici: ispitanici bez prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a; TNF- α -308 G>A i TNF- α -238 G>A: genski polimorfizmi u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL-10 -1082 G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL-1 α -889 C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α . * Statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na kontrolnu skupinu, testirano χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

Uočeno je da su **astmatski simptomi** bili značajno rjeđi među nositeljima genskog polimorfizma **TNF- α -308 G>A** (13 % ispitanika s astmatskim simptomima vs 29 % kontrolnih ispitanika bili su nositelji ovog polimorfizma; $\chi^2 = 4,697$, p = 0,030). **Kožni simptomi** bili su također značajno rjeđi kod nositelja tog polimorfizma (12 % ispitanika s kožnim simptomima vs. 29 % kontrolnih ispitanika bili su nositelji ovog polimorfizma; $\chi^2 = 6,357$, p = 0,012). Složena analiza pomoću modela multiple logističke regresije s pojedinom skupinom simptoma kao ishodom i genskim polimorfizmima TNF- α -308G>A, IL-1 α -889C>T ili IL-10 -1082G>A, spolom, kontinentalnim/primorskim prebivalištem, obiteljskom alergološkom anamnezom, kontaktom s mačkom i kontaktom s glodavcem kao prediktorima potvrdila je rezultate jednostavne analize samo za kožne simptome (Tablica 11.: OR = 0,29;

95% CI 0,10–0,83, $p = 0,021$). Nije bilo drugih značajnih povezanosti simptoma atopijskih bolesti i polimorfizama citokinskih gena u prvom dijelu istraživanja.

Tablica 11. Model logističke regresije kojima je nađena značajna povezanost skupina simptoma i polimorfizama citokinskih gena.

Prediktori	Kožni simptomi		
	OR	95% CI	P
Nositelj TNF-α -308G>A	0,29*	0,10-0,83	0,021
Nositelj IL-10 -1082G>A	0,59	0,25-1,40	0,232
Nositelj IL-1 α -889G>A	0,80	0,40-1,60	0,523
Muški spol	1,08	0,45-2,60	0,855
Konitalno vs. primorsko prebivalište	1,36	0,60-3,07	0,461
Pozitivna obiteljska alergološka anamneza	3,69*	1,66-8,20	0,001
Kontakt s mačkom:			
U ranom djetinjstvu	3,13*	1,39-7,06	0,006
U kasnom djetinjstvu	1,76	0,62-4,96	0,285
Kontakt s glodavcem:			
U ranom djetinjstvu	0,84	0,20-3,46	0,806
U kasnom djetinjstvu	3,07*	1,07-8,78	0,037

Legenda: OR: omjer rizika, 95% CI: 95% interval pouzdanosti; TNF- α -308 G>A: genski polimorfizam u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL-10 -1082 G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL-1 α -889 C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α . Pozitivna obiteljska alergološka anamneza: prijavljena peludna hunjavica, astma i/ ili alergijska kožna bolest kod majke i/ili oca. Kontinentalno / primorsko prebivalište, gradsko / seosko prebivalište: određeno prema naselju (naseljima) gdje su proveli više od pola života ili 10 i više godina; Kontakt s mačkom, psom, glodavcem: kontakt u trajanju barem godinu dana, prvi puta u ranom djetinjstvu (<7 godina starosti) ili kasnom djetinjstvu i kasnije (≥ 7 godina starosti); Kožni simptomi: prijava 2 ili više kožnih simptoma (vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana; * statistički značajni omjer rizika ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu bez ranije definirane prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a

5.1.7. Pokazatelji atopije i polimorfizmi citokinskih gena

Zastupljenosti nositeljstva polimorfizama po skupinama ispitanika s pozitivnim SPT-om, kontrolnim ispitanicima, te ispitanicima s povišenim ili normalnim vrijednostima ukupnih IgE protutijela u prvom dijelu istraživanja prikazane su u tablici 12. Nositelji polimorfizma TNF- α -308 G>A bili značajno manje zastupljeni među osobama s pozitivnim SPT-om u odnosu na kontrolne ispitanike (17 % vs. 29 %; $\chi^2 = 4,936$, $p = 0,026$) što međutim nije

potvrđeno složenom statističkom analizom pomoću modela multiple logističke regresije s pokazateljem atopije kao ishodom i genskim polimorfizmima TNF- α -308G>A, IL-1 α -889C>T ili IL-10 -1082G>A, spolom, kontinentalnim/primorskim prebivalištem, obiteljskom alergološkom anamnezom, kontaktom s mačkom i kontaktom s glodavcem i kao prediktorima. Nije bilo drugih značajnih povezanosti pokazatelja atopije i polimorfizama citokinskih gena u prvom dijelu istraživanja.

Tablica 12. Učestalost nositeljstva polimorfizma po skupinama ispitanika s pokazateljima atopije tijekom prve faze doktorskog istraživanja (N=356)

Genski polimorfizam	Pozitivni SPT (N=145)	Kontrolni ispitanici (N=140)	IgE \geq150 kU/l (N=57)	IgE <150 kU/l (N=269)
TNF-α -308G>A	24/139 (17)*	38/133 (29)	9/54 (17)	62/256 (24)
TNF-α -238G>A	6/138 (4)	2/127 (2)	4/56 (7)	5/248 (2)
IL-10 -1082G>A	119/140 (85)	107/132 (81)	49/55 (89)	206/256 (80)
IL-1α -889C>T	60/139 (43)	62/131 (47)	29/55 (53)	117/253 (46)

Legenda: Pozitivan SPT: pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen. Kontrolni ispitanici: ispitanici bez prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a; IgE: ukupna IgE protutijela u serumu; TNF- α -308G>A i TNF- α -238G>A: genski polimorfizmi u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL-10 -1082G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL1 α -889 C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α ; * Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu (analiza SPT-a) ili u odnosu na osobe s normalnim IgE vrijednostima (analiza kategorija povišenih/normalnih IgE vrijednosti), testirano χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

5.1.8. Pokazatelji ventilacijske funkcije pluća, čimbenici negenske osobne osjetljivosti i čimbenici načina života i okoliša

Ispitivanje povezanosti čimbenika negenske osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša s pokazateljima ventilacijske funkcije pluća uključivalo je jednostavnu statističku provjeru značajne povezanosti pojedinog čimbenika sa srednjim vrijednostima parametra ventilacijske funkcije pluća te složenu statističku analizu preko modela multiple

linearne regresije s pojedinim parametrom ventilacijske funkcije kao ishodom te spolom, kategorijama BMI-ja i polimorfizmima citokinskih gena kao prediktorima. Uočeno je da su **muškarci** imali značajno više vrijednosti **FVC i FEV₁** od žena (srednja vrijednost FVC kod muškaraca bila je 104,48%, a kod žena 98,36%; $t = -4,346$, $p < 0,001$; srednja vrijednost FEV₁ kod muškaraca 105,16%, a kod žena 100,09%, t -test $p = 0,000$) što je potvrđeno složenom analizom (FVC, muški spol: koef. = 4,38; 95% CI = 1,44-7,33, $p = 0,004$; P modela $< 0,001$; adjusted $R^2 = 0,09$; FEV₁, muški spol: koef. = 4,52, 95% CI=1,57 – 7,48; $p = 0,003$; P modela $< 0,001$; adjusted $R^2 = 0,06$). Nađene su i značajne povezanosti s **BMI-om: kategorija pothranjenih** u odnosu na osobe normalnog BMI-a imala je značajno manje vrijednosti **FVC i FEV₁** (srednja vrijednost FVC kod pothranjenih bila je 93,30%, a kod osoba normalnog BMI-a 100,01%, $t = 3,622$, $p < 0,001$; srednja vrijednost FEV₁ kod pothranjenih bila je 96,12%, a kod osoba normalnog BMI-a 101,57%), što je potvrđeno složenom analizom (FVC: koef. = -6,23; 95% CI = -10,04 – (-2,41); $p = 0,001$; P modela $< 0,001$; adjusted $R^2 = 0,09$; FEV₁: koef. = -4,52, 95% CI= -8,35 – (-0,70); $p = 0,021$; P modela $< 0,001$; adjusted $R^2 = 0,06$). S druge strane, osobe **prekomjerne tjelesne težine** u odnosu na normalne imale su značajno više vrijednosti **FVC i FEV₁** (srednja vrijednost FVC kod osoba prekomjerne tjelesne težine bila je 107,58%, a kod osoba normalnog BMI-a 100,01%; $t = -3,743$, $p < 0,001$; srednja vrijednost FEV₁ kod osoba prekomjerne tjelesne težine bila je 106,58%, a kod osoba normalnog BMI-a 101,57%, $t = -2,429$; $p = 0,016$). Složena analiza potvrdila je povezanost FVC i kategorije prekomjerne tjelesne težine (OR=6,11; 95% CI 1,74 - 10,49; $p = 0,006$; P modela $< 0,001$; adjusted $R^2 = 0,09$), no ne i povezanost FEV₁. Ispitivanje povezanosti čimbenika negenske osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša s rezultatom BT-a uključivalo je jednostavnu statističku provjeru značajne razlike u učestalosti čimbenika između ispitanika s pozitivnim i ispitanika s negativnim BT-om te složenu statističku analizu preko modela multiple logističke regresije s rezultatom BT-a kao ishodom te spolom,

kontaktom s mačkom, kontaktom sa psom, kontaktom sa glodavcem i polimorfizmima citokinskih gena kao prediktorima. Među osobama s **pozitivnim BT** značajno su više bili zastupljeni muškarci: pozitivan test imalo je 39 **muškaraca** (42 % svih muškaraca) u odnosu na 68 žena (26 % svih žena), $\chi^2 = 8,468$; $p=0,004$) što je potvrđeno složenom analizom (muški spol: OR = 1,93; 95% CI 1,13 – 3,32, $p=0,017$; P modela = 0,005; pseudo $R^2 = 0,06$). Osobe s pozitivnim BT u odnosu na osobe s negativnim BT češće su prijavljivale kontakt s mačkom u ranom djetinjstvu (39% vs. 25%; $\chi^2 = 5,443$; $p = 0,020$), kontakt s psom u ranom djetinjstvu (58%; vs. 41%; $\chi^2 = 5,449$, $p = 0,020$) te **kontakt s glodavcem u ranom djetinjstvu** (15% vs. 5%; $\chi^2 = 9,748$, $p = 0,002$). Složena analiza (P modela = 0,005; pseudo $R^2 = 0,06$) potvrdila je samo povezanost kontakta s glodavcem u ranom djetinjstvu (OR = 3,13; 95% CI 1,25 – 7,83, $p=0,015$) sa pozitivnim BT. Dodatno se uočila značajna pozitivna povezanost s kontaktom s mačkom u kasnom djetinjstvu (OR = 2,01; 95% CI 1,03 – 3,90; $p=0,040$) koja nije uočena jednostavnom analizom. Nisu uočene druge značajne povezanosti parametara plućne funkcije i BT s čimbenicima negenske osobne osjetljivosti i čimbenicima načina života i okoliša u prvom dijelu istraživanja.

5.1.9. Pokazatelji plućne funkcije i polimorfizmi citokinskih gena

Ispitivanje povezanosti polimorfizama citokinskih gena s pokazateljima ventilacijske funkcije pluća uključivalo je jednostavnu statističku provjeru značajne povezanosti nositeljstva pojedinog polimorfizma sa srednjim vrijednostima parametra ventilacijske funkcije pluća te složenu statističku analizu preko modela multiple linearne regresije s pojedinim parametrom ventilacijske funkcije kao ishodom te spolom, kategorijama BMI-ja i polimorfizmima citokinskih gena kao prediktorima. Jednostavnom linearnom regresijskom analizom uočena je značajna negativna povezanost genskog polimorfizma IL-10 $-1082G>A$ i $MEF_{50\%}$: nositelji IL-10 $-1082G>A$ imali su prosječno niže vrijednosti $MEF_{50\%}$ u odnosu na

nenositelje (94,58% vs. 101,16%, $t = 2,1668$, $p=0,031$). Povezanost je potvrđena složenom analizom (koef. -7,18; 95% CI -13,59 - (-0,76); $p=0,028$; P modela = 0,205, adjusted $R^2 = 0,01$). Nisu uočene druge značajne povezanosti parametara plućne funkcije s polimorfizmima citokinskih gena. Ispitivanje povezanosti polimorfizama citokinskih gena s rezultatom BT-a uključivalo je jednostavnu statističku provjeru značajne razlike u učestalosti nositeljstva pojedinog polimorfima između ispitanika s pozitivnim i ispitanika s negativnim BT-om te složenu statističku analizu preko modela multiple logističke regresije s rezultatom BT-a kao ishodom te spolom, kontaktom s mačkom, kontaktom sa psom, kontaktom sa glodavcem i polimorfizmima citokinskih gena kao prediktorima. Nisu uočene značajne povezanosti rezultata BT s polimorfizmima citokinskih gena.

5.2. Drugi dio istraživanja: studija praćenja

5.2.1. Osobine ispitanika

Drugi dio istraživanja bilo je **praćenje** ispitanika iz početnog istraživanja. Primijećeno je da je pušača bilo značajno manje među ispitanicima studije praćenja (N=121) u odnosu na one koji se nisu odazvali (N=235) (29 % vs. 42 %; $\chi^2 = 5,572$; $p=0,018$). Kožni simptomi bili su manje učestali među ispitanicima studije praćenja u odnosu na one koji se nisu odazvali (11 % vs. 21 %; $\chi^2 6,084$; $p=0,014$). Nositelji genskog polimorfizma IL-10 -1082G>A bili su značajno češći među ispitanicima studije praćenja (101 od 115 praćenih ispitanika s uspješnom genotipizacijom, 88%) u odnosu na ispitanike koji nisu sudjelovali u praćenju (175 od 223 ispitanika, 78 %; $\chi^2 4,429$; $p=0,035$). Nije bilo drugih značajnih razlika u karakteristikama ispitanika, frekvencijama nositeljstva polimorfizama i učestalosti promatranih ishoda između ispitanika studije praćenja i ispitanika koji se nisu odazvali praćenju. Učestalost **negenskih čimbenika osobne osjetljivosti i čimbenike načina života i okoliša** u ispitanika studije praćenja prikazane su u tablici 13.

Tablica 13. Učestalost negenskih čimbenika osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša među ispitanicima drugog dijela istraživanja.

	Početno istraživanje N (%)	Praćenje N (%)	p
Muškarci (N=121)	29 (24)		-
Pozitivna obiteljska alergološka anamneza (N=121)	32 (27)		-
Pušači (N=121)	35 (29)	29 (24)	0,109
BMI kategorije (N=121):			Referentna kategorija
Normalna	90 (74)	90 (75)	0,524
Pothranjena	15 (12)	11 (9)	0,581
Prekomjerna	16 (13)	19 (16)	
Gradsko/seosko prebivalište (N=79)	59 (75) / 20 (25)	73 (92) / 6 (8)	0,001

Kontakt s mačkom (N=79): u ranom djetinjstvu kasnije	17 (22) 16 (20)	17 (22) 22 (28)	- 0,031
Kontakt sa psom (N=79): u ranom djetinjstvu kasnije	28 (35) 23 (29)	28 (35) 30 (38)	- 0,008
Kontakt s pticom (N=79): u ranom djetinjstvu kasnije	10 (13) 5 (6)	10 (13) 9 (11)	- 0,125
Kontakt s glodavcem (N=79): u ranom djetinjstvu kasnije	5 (6) 7 (9)	5 (6) 11 (14)	- 0,125

Legenda: Gradsko / seosko prebivalište: određeno prema naselju (naseljima) gdje su proveli više od pola života ili 10 i više godina; Pušači: aktivni pušači i osobe koje su prestale pušiti prije manje od 6 mjeseci. Kontakt s mačkom, psom, pticom, glodavcem: kontakt u trajanju barem godinu dana, prvi puta u ranom djetinjstvu (dob <7 godina) ili kasnom djetinjstvu i kasnije (dob ≥7 godina); BMI: indeks tjelesne mase, kategorija „normalni“ uključivala je vrijednosti BMI-a od 18.5-24.9; „pothranjeni“ vrijednosti <18.5, a „prekomjerni“ vrijednosti iznad 25; Pozitivna obiteljska alergološka anamneza: prijavljena peludna hunjavica, astma i/ ili alergijska kožna bolest kod majke i/ili oca. Razlike između prvog i drugog dolaska u proporciji ispitanika s pojedinom osobinom ispitanice su McNemarov testom

Među ispitanicima studije praćenja udjel ispitanika sa seoskim prebivalištem se značajno smanjio tijekom razdoblja praćenja (25 % vs. 8 %; ekzaktni McNemarov test, χ^2 12,25; $p=0,001$), a udio ispitanika koji imaju kontakt sa mačkom i psom se značajno povećao (mačka: 20 % vs. 28 %, ekzaktni McNemarov test, χ^2 6,00; $p=0,031$; pas: 29 % vs. 38 %, ekzaktni McNemarov test, χ^2 7,00; $p=0,008$). Nije bilo drugih značajnih razlika tijekom perioda praćenja.

U tablici 14. prikazane su učestalosti nositeljstva proučavanih genskih polimorfizama u ispitanika studije praćenja (N=121): 24 osoba (21 % uspješno genotipiziranih ispitanika) bili su nositelji TNF- α -308G>A polimorfizma, 3 (3 %) TNF- α -238G>A polimorfizma, 54 (47 %) IL-1 α -889C>T te 101 (87 %) IL-10 -1082G>A polimorfizma.

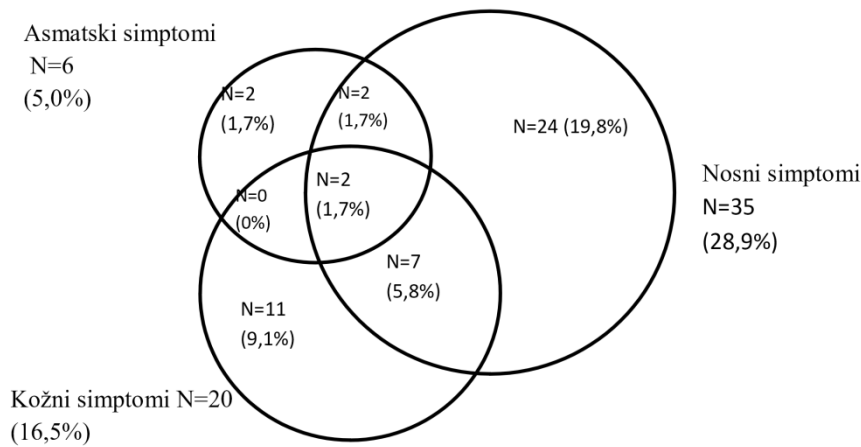
Tablica 14. Uspješnost genotipizacije i učestalost nositeljstva polimorfizama citokinskih gena među ispitanicima studije praćenja (N=121).

	Uspješnost genotipizacije N (%)	Nositelji genskog polimorfizma N (%)
TNF-α -308G>A	115 (95)	24 (21)
TNF-α -238G>A	112 (93)	3 (3)
IL-10 -1082G>A	114 (94)	101 (87)
IL-1α -889C>T	116 (96)	54 (47)

Legenda: TNF- α -308G>A i TNF- α -238G>A: genski polimorfizmi u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL-10 -1082G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL-1 α -889C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α .

Od 121 dostupna odgovora na ISAAC pitanja o simptomima, 6 ispitanika (5 %) prijavilo je asmatske simptome tijekom proteklih godinu dana, 35 (30 %) prijavilo je barem dva od analizirana četiri nosna simptoma tijekom proteklih godinu dana, a 20 (17 %) barem dva od četiri kožna simptoma tijekom proteklih godinu dana. Dio ispitanika prijavio je dvije ili više skupina simptoma što je zornije prikazano na slici 5. Respiracijske simptome (tj. astmatske i/ili nosne simptome) prijavilo je 37 ispitanika (31 %). Bez iskazanih skupina simptoma bilo je 73 (60 %) ispitanika studije praćenja.

Slika 5. Učestalost simptoma atopijskih bolesti među ispitanicima studije praćenja (N=121).

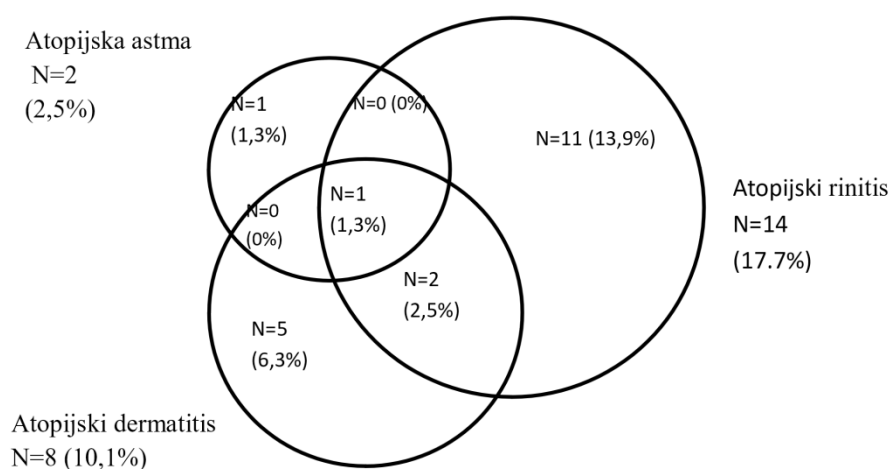


Legenda: Krugovi predstavljaju pojedine skupine simptoma. U krugove su upisani pripadajuće učestalosti iskazane kao broj ispitanika i postotak od ukupnog uzorka ispitanika (N=121). Asmatski simptomi: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana; Nosni simptomi: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana; Kožni simptomi: prijava 2 ili više kožnih simptoma (vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana.

Što se tiče **pokazatelja atopije**, kao i u slučaju prvog dijela doktorskog istraživanja **pozitivan SPT** imala je skoro polovina ispitanika (32 od 79 ispitanika, 41 %).

Kada su se u obzir uzeli istovremena prisutnost simptoma i pozitivan SPT uočile su se sljedeće **učestalosti atopijskih bolesti**: 2 ispitanika (3 %) imalo je atopijsku astmu, 14 (18 %) atopijski rinitis, 15 (19 %) jednu ili obje bolesti (tj. atopijsku respiracijsku bolest), a 8 (10 %) atopijski dermatitis. Istodobna prisutnost dvije ili više bolesti prikazana je na slici 6.

Slika 6. Učestalost atopijskih bolesti među ispitanicima studije praćenja (N=79)



Legenda: Krugovi predstavljaju pojedine skupine simptoma. U krugove su upisani pripadajuće učestalosti iskazane kao broj ispitanika i postotak od ukupnog uzorka ispitanika (N=356). Atopijska astma: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijski rinitis: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem- vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen.

5.2.2. Promjene u prisutnosti parametara atopije tijekom studije praćenja

Tablica 15. prikazuje usporedbu zastupljenosti atopijskih bolesti, atopijskih simptoma i SPT statusa u razdoblju praćenja ispitanika. Nije bilo značajnih promjena u udjelu ispitanika s pojedinom atopijskom bolešću, atopijskim simptomima ili pozitivnim SPT-om tijekom razdoblja praćenja.

Tablica 15. Usporedba zastupljenosti atopijskih bolesti, simptoma i pokazatelja atopije u ispitanika po fazama istraživanja (prvi dio istraživanja, N=356; studija praćenja, N=121 za atopijske simptome, N=79 za atopijske bolesti i SPT).

	Prvi dio istraživanja N (%)	Studija praćenja N (%)	p
Atopijske bolesti (N=79)			
Atopijska astma	26 (7)	2 (3)	1,000
Atopijski rinitis	63 (18)	14 (18)	0,180
Atopijska respiracijska bolest	72 (20)	15 (19)	0,180
Atopijski dermatitis	37 (10)	8 (10)	0,219
Pokazatelji atopije (N=79)			
Pozitivan SPT	145 (41)	32 (41)	0,688
Atopijski simptomi (N=121)			
Asmatski simptomi	49 (14)	6 (5)	0,092
Nosni simptomi	100 (28)	35 (29)	0,257
Respiracijski simptomi	124 (35)	37 (31)	0,858
Kožni simptomi	63 (18)	20 (17)	0,230

Legenda: Atopijska astma: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana+pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijski rinitis: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana+pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijska respiracijska bolest: prisutnost atopijske astme i/ili atopijskog rinitisa; Atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Astmatski simptomi: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana; Nosni simptomi: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana; Respiracijski simptomi: prisutnost astmatskih i/ili nosnih simptoma; Kožni simptomi: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem-vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana; pozitivan SPT: pozitivan rezultat SPT-a na barem 1 inhalatorni alergen. Razlike između prvog i drugog dolaska u proporciji ispitanika s pojedinom osobinom ispitanice su McNemarov testom.

Tablica 16. pokazuje promjene učestalosti atopijskih bolesti tijekom razdoblja praćenja. Tijekom perioda praćenja 57 (72%) ispitanika bilo je bez ikoje atopijske bolesti. Najveće promjene zabilježene su za atopijski rinitis koji se pojavio u 7 ispitanika, a nestao u 2 ispitanika.

Tablica 16. Promjene učestalosti atopijskih bolesti kod praćenih ispitanika (N=79)

	Atopijska astma N (%)	Atopijski rinitis N (%)	Atopijska respiracijska bolest N (%)	Atopijski dermatitis N (%)
Pojava bolesti	1 (1)	7 (9)	7 (9)	5 (6)
Povlačenje bolesti	1 (1)	2 (3)	2 (3)	1 (1)
Bolesni	1 (1)	7 (9)	8 (10)	3 (4)
Bez bolesti	76 (96)	63 (80)	62 (78)	70 (89)

Rezultati su prikazani kao broj ispitanika (postotak od ukupnog broja praćenih ispitanika, N=79). Atopijska astma: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana+pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijski rinitis: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijska respiracijska bolest: prisutnost atopijske astme i/ili atopijskog rinitisa; Atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem-vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Pojava bolesti: odsutnost pojedine bolesti u prvom dijelu istraživanja i prisutnost u studiji praćenja. Povlačenje bolesti: prisutnost pojedine bolesti u prvom dijelu istraživanja i odsutnost u studiji praćenja. Bolesni: ispitanici koji su u oba dijela istraživanja imali tu atopijsku bolest. Bez bolesti: ispitanici koji ni u jednom dijelu istraživanja nisu imali tu atopijsku bolest.

Kod 6 ispitanika s pojavom atopijskog rinitisa tijekom razdoblja praćenja zabilježen je asimptomatski pozitivan SPT u prvom dijelu istraživanja, najčešće s pozitivnom kožnom reakcijom na grinje roda *Dermatophagoides* (5 ispitanika). Svih 6 ispitanika je u prvom dijelu istraživanja imalo pozitivan SPT na prašinske grinje *Dermatophagoides* i/ili *Lepidoglyphus spec.* (tablica 17).

Tablica17. Pozitivne kožne reakcije na pojedine alergene u SPT u prvom dijelu istraživanja za ispitanike sa pojavom atopijskog rinitisa tijekom studije praćenja (N=6).

Ispitanici N=6	Pelud trava	Pelud stabala	Pelud korova	<i>Dermatophagoides pteronysinus</i> i/ili <i>farinae</i>	Mačka	Pas	<i>Lepidoglyphus destructor</i>
+SPT	3	2	2	5	4	3	3

Legenda: +SPT: kožna reakcija veća od 3 mm u odnosu na negativnu kontrolnu otopinu; pelud trava: komercijalna mješavina peludi trava; pelud stabala: pelud *Betula verrucosa* i ili *Corylus avelana*; pelud korova: pelud *Ambrosia elatior* i/ili *Artemisia vulgaris*

Tablica 18. pokazuje promjene učestalosti pojedinih skupina simptoma atopijskih bolesti tijekom razdoblja praćenja. U tom razdoblju 56 ispitanika (46%) bilo je bez ijedne skupine simptoma. Najveće promjene zabilježene su za respiracijske simptome koji su se pojavili u 16 (13%), a povukli u 15 (12%) ispitanika. Pri tome su se nosni simptomi češće pojavili, a astmatski simptomi su se češće povukli.

Tablica18. Promjene učestalosti simptoma atopijskih bolesti kod praćenih ispitanika (N=121)

	Asmatski simptomi N (%)	Nosni simptomi N (%)	Respiracijski simptomi N (%)	Kožni simptomi N (%)
Pojava simptoma	3 (2)	17 (14)	16 (13)	16 (13)
Povlačenje simptoma	10 (8)	11 (9)	15 (12)	9 (7)
Sa simptomima	3 (2)	18 (15)	21(17)	4 (3)
Bez simptoma	105 (87)	75 (62)	69 (57)	92 (76)

Legenda: Rezultati su prikazani kao broj ispitanika (postotak od ukupnog broja ispitanika s praćenom simptomatologijom, N=121). Astmatski simptomi: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana; Nosni simptomi: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana; Respiracijski simptomi: prisutnost astmatskih i/ili nosnih simptoma; Kožni simptomi: prijava 2 ili više kožnih simptoma (vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana. Pojava simptoma: odsutnost simptoma u prvom dijelu istraživanja i prisutnost u studiji praćenja. Povlačenje simptoma: prisutnost simptoma u prvom dijelu istraživanja i odsutnost u fazi praćenja. Sa simptomima: ispitanici koji su u oba dijela istraživanja imali tu skupinu simptoma. Bez simptoma: ispitanici koji ni u jednom dijelu istraživanja nisu imali tu skupinu simptoma.

Kod 4 (5 %) ispitanika došlo je do pojave pozitivnog SPT-a, kod 2 (3 %) do povlačenja pozitivnog SPT-a, a 45 (57 %) imalo je negativan SPT u oba dijela istraživanja.

Promjene parametara ventilacijske funkcije pluća FVC%, FEV₁ i MEF_{50%} tijekom studije praćenja, iskazanih kao postotak očekivanih vrijednosti s obzirom na dob, spol i BMI, prikazane su u Tablici 19. Vrijednosti parametara ventilacijske funkcije pluća bile su značajno više u studiji praćenja u odnosu na prvi dio istraživanja (FVC: 104,9% vs. 99,6% , t =-8,069, p<0,001; FEV₁ :105,6% vs. 102,4%, t=-4,428, p<0,001; 100,8% vs. 97,2%, t=-2,591 , p=0,011). Što se tiče patoloških vrijednosti parametara ventilacijske funkcije pluća, u studiji praćenja 2 ispitanika (3%) su imala FVC vrijednosti manje od 80% predviđenih, svi ispitanici su imali FEV₁ vrijednosti veće od 80% predviđenih, a 1 ispitanik (1 %) imao je MEF_{50%} vrijednosti manje od 60% predviđenih.

Tablica 19. Promjene parametara ventilacijske funkcije pluća u ispitanika studije praćenja (N=79)

	Prvi dio istraživanja (N=355)			Studija praćenja (N=79)			p
	Srednja vrijednost ± SD	Raspon	IQ raspon	Srednja vrijednost ± SD	Raspon	IQ raspon	
FVC	99,6±12,2	73,1-137	92-106,9	104,9±13,0	77,8-140,4	96-113,4	<0,001
FEV₁	102,4±12,4	75,6-140,2	94,7-110,2	105,6±13,1	80,6-133,8	94,3-113,7	<0,001
MEF_{50%}	97,2±21,7	55,8-148,5	81,1-115,1	100,8±24,1	59-166,6	83,3-115,5	0,011

Legenda: FVC - forsirani vitalni kapacitet, FEV₁ - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi, MEF_{50%} - maksimalni ekspiratorni protok zraka pri 50% FVC-a; SD: standardna devijacija; Raspon: ukupni raspon; IQ raspon: interkvartilni raspon- raspon između 25. i 75. percentila vrijednosti parametra. Razlike u vrijednostima parametara dišne funkcije ovisno o dijelovima istraživanja testirane su t-testom za uparene uzorke.

5.2.3. Povezanost promjena parametara atopije tijekom razdoblja praćenja s čimbenicima osobne osjetljivosti i čimbenicima načina života i okoliša

Tablica 20. prikazuje promjene čimbenika načina života i okoliša tijekom razdoblja praćenja.

Tablica 20. Promjene čimbenika načina života i okoliša među praćenim ispitanicima.

Čimbenik	N(%)
Promjena pušačkog statusa (N=121)	
Počeli pušiti	2 (2)
Prestali pušiti	8 (7)
Promjena BMI kategorije (N=121)	
U višu	21 (17)
U nižu	14 (12)
Promjena prebivališta (N=79)	
Preselili u grad	15 (19)
Preselili na selo	1 (1)
Novi kontakt sa životinjama (N=79)	
Mačka	6 (8)
Pas	7 (9)
Ptica	4 (5)
Glodavac	4 (5)

Legenda: Pušači: aktivni pušači i osobe koje su prestale pušiti prije manje od 6 mjeseci. Kontakt sa životinjama: kontakt s mačkom, psom, pticom, glodavcem u trajanju barem godinu dana; BMI: indeks tjelesne mase.

Usporedbom kategorija ispitanika s **pojavom ili povlačenjem atopijskih bolesti** i ispitanika bez bolesti, tijekom razdoblja praćenja nisu uočene značajne razlike s obzirom na čimbenike osobne osjetljivosti (spol, obiteljska alergološka anamneza). Zbog malog broja ispitanika s promjenom čimbenika načina života i okoliša u ukupnom uzorku (tablica 20) ovi su čimbenici kod ispitanika s pojavom ili povlačenjem bolesti razmatrani samo opisno. Nisu uočene promjene čimbenika načina života i okoliša u kategoriji ispitanika s pojavom ili povlačenjem bolesti.

Usporedbom kategorija ispitanika s **pojavom ili povlačenjem atopijskih simptoma** i ispitanika bez tih simptoma, tijekom razdoblja praćenja nisu uočene statistički značajne razlike s obzirom na čimbenike osobne osjetljivosti (spol, obiteljska alergološka anamneza) kao ni čimbenike okoliša i životnih navika (promjena pušačkog statusa, promjena BMI kategorije). U skupini ispitanika sa povlačenjem respiracijskih simptoma troje od četiri pušača prestali su pušiti tijekom razdoblja praćenja.

Tablica 21. prikazuje zastupljenosti nositeljstva analiziranih polimorfizama citokinskih gena po skupinama ispitanika s atopijskim bolestima i kontrolnim ispitanicima studije praćenja. Nisu uočene značajne promjene povezanosti atopijskih bolesti i polimorfizama citokinskih gena tijekom razdoblja praćenja.

Tablica 21. Učestalost nositeljstva polimorfizma po skupinama ispitanika s atopijskim bolestima i kontrolnim ispitanicima studije praćenja

(N=79)

	Atopijska astma		Atopijski rinitis		Atopijska respiracijska bolest		Atopijski dermatitis		Kontrolni ispitanici
	Početno istraživanje N=2 (3%)	Praćenje N=2 (3%)	Početno istraživanje N=9 (11%)	Praćenje N=14 (18%)	Početno istraživanje N=10 (17%)	Praćenje N=15 (19%)	Početno istraživanje N=4 (5%)	Praćenje N=8 (10%)	Praćenje N=33 (42%)
TNF-α-308G>A	0/2 (0)	0/2 (0)	3/9 (33)	4/14 (29)	3/10 (30)	4/15 (27)	1/4 (25)	2/7 (29)	5/30 (17)
TNF-α-238G>A	0/2 (0)	0/2 (0)	0/9 (0)	0/14 (0)	0/10 (0)	0/15 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)	0/27 (0)
IL-1 -1082G>A	1/2 (50)	1/2 (50)	8/8 (100)	12/13 (92)	8/9 (89)	12/14 (86)	4/4 (100)	8/8 (100)	26/30 (86)
IL-1α -889C>T	2/2 (100)	1/2 (50)	5/8 (63)	9/13 (69)	6/9 (67)	10/14 (71)	2/4 (50)	4/7 (57)	15/30 (50)

Legenda: Atopijska astma: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana+pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijski rinitis: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana+pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Atopijska respiracijska bolest: prisutnost atopijske astme i/ili atopijskog rinitisa; Atopijski dermatitis: prijava 2 ili više kožnih simptoma (ekcem-vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana + pozitivan SPT na barem 1 inhalatorni alergen; Kontrolni ispitanici: ispitanici bez prije definirane prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a; TNF- α -308G>A i TNF- α -238G>A: genski polimorfizmi u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL-10 -1082G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL-1 α -889C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α .

U modelima **multiple logističke regresije za ponavljana mjerenja** nisu uočene značajne povezanosti promjene rizika za prisutnost atopijskih bolesti tijekom razdoblja praćenja i polimorfizma citokinskih gena. Također nisu uočene značajne razlike između učestalosti nositelja polimorfizama između kategorija osoba kod kojih je došlo do pojave/povlačenja pojedine bolesti s kategorijom osoba koje ni na jednom dolasku nisu prijavile bolest.

Tablica 22. prikazuje zastupljenosti nositeljstva analiziranih polimorfizama citokinskih gena po skupinama ispitanika s atopijskim simptomima i kontrolnim ispitanicima studije praćenja.

Tablica 22. Učestalost nositeljstva polimorfizama citokinskih gena po skupinama ispitanika sa simptomima i kontrolnim ispitanicima studije praćenja (N=121).

Genski polimorfizam	Asmatski simptomi		Nosni simptomi		Respiracijski simptomi		Kožni simptomi		Kontrolni ispitanici
	Početno istraživanje N=13 (11%)	Praćenje N=6 (5%)	Početno istraživanje N=29 (24%)	Praćenje N=35 (29%)	Početno istraživanje N=36 (30%)	Praćenje N=37 (31%)	Početno istraživanje N=13 (11%)	Praćenje N=20 (17%)	Praćenje N=73 (60%)
TNF-α-308G>A	1/13 (8)	1/6 (17)	7/28 (25)	9/35 (26)	8/35 (23)	9/37 (24)	1/13 (8)	5/19 (26)	13/68 (19)
TNF-α-238G>A	0/12 (0)	0/6 (0)	0/28 (0)	1/35 (3)	0/34 (0)	1/37 (3)	0/13 (0)	0/20 (0)	2/64 (3)
IL-10-1082G>A	10/13 (77)	4/6 (67) *	25/27 (93)	30/34 (88)	30/34 (88)	31/36 (86)	12/13 (92)	18/20 (90)	60/68 (88)
IL-1α-889C>T	7/12 (58)	2/6 (33)	16/26 (62)	16/33 (48)	19/33 (58)	17/35 (49)	4/13 (31)	10/19 (53)	31/69 (45)

Legenda: Astmatski simptomi: prijava sipljenja i/ili otežanog disanja u mirovanju u proteklih godinu dana; Nosni simptomi: prijava 2 ili više nosnih simptoma (otežano disanje, iscjedak iz nosa, kihanje, svrbež nosa) u proteklih godinu dana; Respiracijski simptomi: prisutnost astmatskih i/ili nosnih simptoma; Kožni simptomi: prijava 2 ili više kožnih simptoma (vodeni mjehurići koji svrbe, crvenilo, svrbež, osip) u proteklih godinu dana; Kontrolni ispitanici: ispitanici bez ranije definirane prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a; TNF- α - 308G>A i TNF- α -238G>A: genski polimorfizmi u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL-10 -1082 G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL-1 α -889C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α . * statistički značajna razlika ($p<0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu, testirano χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

Uočeno je da su **asmatski simptomi** bili negativno povezani s genskim polimorfizmom **IL10 -1082G>A** s graničnom značajnošću, no samo u složenoj analizi kontroliranoj za spol i obiteljsku alergološku anamnezu (OR = 0,11; 95% CI 0,01 – 1,05; p= 0.055 ; P modela = 0,377, pseudo R² = 0,13). Nije bilo drugih značajnih povezanosti simptoma atopijskih bolesti i polimorfizama citokinskih gena u studiji praćenja. U modelima **multiple logističke regresije za ponavljana mjerenje** nisu uočene značajne povezanosti promjene rizika za prisutnost pojedine skupine simptoma tijekom razdoblja praćenja i polimorfizma citokinskih gena. Također nisu uočene značajne razlike između učestalosti nositelja polimorfizama između kategorija osoba kod kojih je došlo do pojave/povlačenja simptoma s kategorijom osoba koje ni na jednom dolasku nisu prijavile te simptome.

Usporedbom kategorija ispitanika s **promjenom SPT** statusa tijekom praćenja (N=6) i ispitanika s negativnim SPT-om tijekom razdoblja praćenja nisu uočene značajne razlike s obzirom na čimbenike osobne osjetljivosti (spol, obiteljska alergološka anamneza). Zbog malog broja ispitanika s promjenom čimbenika načina života i okoliša u ukupnom uzorku (Tablica 20.) ovi su čimbenici kod ispitanika s promjenom SPT statusa tijekom praćenja razmatrani samo opisno. Nisu uočene promjene čimbenika načina života i okoliša u kategoriji ispitanika s promjenom SPT statusa. U modelima **multiple logističke regresije za ponavljana mjerenje** nisu uočene značajne povezanosti rizika za promjenu SPT statusa tijekom razdoblja praćenja i polimorfizama citokinskih gena. Također nisu uočene značajne razlike u učestalosti nositeljstva polimorfizama između kategorija osoba kod kojih je došlo do promjene nalaza SPT-a s kategorijom osoba koje su na oba dolaska imale negativan SPT.

Multiplom regresijom za ponavljana mjerenja nisu uočene značajne povezanosti promjena vrijednosti parametara ventilacijske funkcije pluća i nositeljstva polimorfizama citokinskih gena tijekom razdoblja praćenja.

6. RASPRAVA

6.1. Prvi dio istraživanja: povezanost polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima

6.1.1. Atopijske bolesti, simptomi atopijskih bolesti i pokazatelji atopije u mladoj odrasloj populaciji u Hrvatskoj

Među ispitanicima prvog dijela doktorskog istraživanja (studenti prve godine Sveučilišta u Zagrebu obrađeni 2008./2009.) najzastupljenija atopijska bolest bila je atopijski rinitis s učestalošću 18%, iza koje je slijedio atopijski dermatitis s učestalošću 10%, a atopijska astma bila je najrjeđa, s učestalošću 7 %. Simptomi atopijskih bolesti bili su češći, nađena učestalost za nosne simptome bila je 28%, za kožne simptome 18% i za astmatske simptome 14%. Rezultati usporedivih prijašnjih istraživanja provedenih u Hrvatskoj po ISAAC-ovoj metodologiji prikazana su sažeto u tablici 23. Može se primijetiti da je učestalost atopijskih dišnih i kožnih simptoma u ovom istraživanju veća nego učestalosti nađene u ISAAC istraživanjima prve i druge faze iz razdoblja 2001.-2005. na hrvatskim učenicima u dobi od 12 do 14 godina. Slične učestalosti simptoma atopijskih dišnih bolesti nađene su u ovom istraživanju i u trećoj fazi ISAAC istraživanja u Primorsko goranskoj županiji¹⁴, a oba istraživanja provedena su u istom razdoblju (2008.-2010.). To možemo protumačiti potvrdom porasta učestalosti simptoma atopijskih dišnih bolesti u populaciji hrvatskih adolescenata tijekom prvog desetljeća 21. stoljeća. Učestalost simptoma atopijskog dermatitisa u ovoj studiji je, međutim, oko dva do tri puta veća od svih prijašnjih istraživanja, uključujući i treću fazu ISAAC studije.¹⁴ Treba napomenuti da je dizajn ovog istraživanja uključivao ispitanike koji su dobrovoljno pristupili istraživanju, što vjerojatno znači da se u studiju uključilo više ispitanika s atopijskim simptomima u odnosu na opću populaciju, jer su ispitanici sa simptomima bili zainteresiraniji za rezultate koje im je istraživanje pružalo za

njihove tegobe.

Tablica 23. Pregled istraživanja u Hrvatskoj koja su koristila ISAAC metodologiju na populaciji učenika starih 12-14 godina.

ISAAC faza	Referenca	Područje	Godina istraživanja	Dob (godine)	Uzorak (N)	Simptomi astme (%)	Simptomi rinitisa (%)	Simptomi dermatitisa (%)
1 i 3	Banac i sur., 2013 ¹³	Primorsko-goranska županija	2001./02.	13-14	2194	8,4	17,5	4,8
			2009./10.		1181	14,0	25,6	7,0
2	Gudelji i sur., 2012 ¹³⁷	Splitsko-dalmatinska županija	Nije prijavljeno	12-14	4027	7,8	-	-
1	Munivrani i sur., 2007 ³²	Međimurska županija	2005.	12-14	3111	5,1	10,9	5,3
	Ovo istraživanje	Cijela Hrvatska	2008./2009.	18-29 (medijan 19)	356	14	28	18

Legenda: Za sve navedene studije osim ovog istraživanja simptomi astme bili su piskanje u prsima u zadnjih 12 mj. od ispunjavanja upitnika; simptomi rinitisa bili su kihanje, curenje ili začepljenje nosa u odsutnosti bolesti poput gripe ili prehlade u zadnjih 12 mj. od ispunjavanja upitnika; simptomi dermatitisa bili su osip sa svrbežom u zadnjih 12. mj. od ispunjavanja upitnika

Pregledom učestalosti simptoma atopijskih bolesti u Europi prema rezultatima treće faze ISAAC istraživanja uočava se da učestalost simptoma atopijskih bolesti dosta varira s obzirom na zemljopisno područje. Tako se učestalost simptoma astme kod adolescenata u dobi 13-14 god. u zemljama sjeverne i istočne Europe kreće od 3 % u Albaniji do 23 % u Rumunjskoj, učestalost simptoma alergijskog rinokonjuktivitisa od 5 % u Gruziji i Latviji do 19 % u Poljskoj, a simptoma ekcema od 2 % u Albaniji do 16 % u Finskoj. Učestalosti variraju i u zemljama zapadne Europe. Nađene učestalosti astmatskih simptoma kod iste dobne skupine kreću se od 8 % u Belgiji do 27 % u Irskoj, simptomi alergijskog rinokonjuktivitisa od 10 % u Portugalu do 17 % u Belgiji te simptomi ekcema od 4 % u Španjolskoj do 11 % u Ujedinjenom Kraljevstvu.¹³⁸ Može se uočiti da su dišni simptomi u ovom istraživanju unutar europskog raspona, a kožni simptomi nešto učestaliji nego u drugim

europskim istraživanjima.

Učestalost pozitivnog SPT-a u našem istraživanju bila je 41% što je u skladu s velikim europskim istraživanjem *European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS) provedenom na odraslim osobama u zapadnoeuropskim zemljama u kojem je prijavljena prevalencija senzibilizacije na uobičajene inhalatorne od 17 do 55 %, s medijanom od 37 %.⁸

6.1.2. Čimbenici osobne osjetljivosti, načina života i okoliša

Za dobivanje pouzdanije procjene povezanosti polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima, simptomima i pokazateljima atopije, u složenoj statističkoj analizi povezanosti smo kontrolirali za čimbenike osobne osjetljivosti, načina života i okoliša koji su sami bili značajno povezani s tim ishodima. Osim analiziranih genetskih polimorfizama, kao čimbenici nezavisno povezani s atopijskim bolestima, simptomima i pokazateljima u ovom istraživanju potvrđeni su spol, pozitivna obiteljska alergološka anamneza, kontinentalno/primorsko prebivalište te kontakt s mačkom i glodavcima u djetinstvu.

U našem istraživanju pozitivna obiteljska alergološka anamneza bila je dosta česta, otprilike trećina ispitanika prijavila je jednu ili više alergijskih bolesti u jednog ili oba roditelja i bila je konzistentni nezavisni rizični čimbenik povezan s atopijskim bolestima i simptomima, tj. značajnu pozitivnu povezanost uočili smo i jednostavnom statističkom usporedbom i složenom statističkom analizom koja je uključivala polimorfizme citokinskih gena i ostale izabrane čimbenike osobne osjetljivosti, načina života i okoliša kao prediktore atopijskih bolesti i simptoma. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je pozitivna obiteljska anamneza alergijskih bolesti među najvažnijim nezavisnim rizičnim čimbenicima osobne osjetljivosti za atopijske bolesti^{139,140} i da pojedina atopijska bolest u roditelja znatno povećava značajno rizik pojave te atopijske bolesti u potomaka.^{141,142} Valja napomenuti da ima istraživanja koja drže da važnost pozitivne alergološke anamneze treba tek potvrditi. U

jednom preglednom radu zaključeno je da pozitivna obiteljska anamneza astme predviđa samo manji dio slučajeva pojave astme, pa bi se stoga napori za olakšavanje bolesti trebali usredotočiti na promjenu čimbenika načina života i okoliša bolesnika.²⁸

Značajan dio ispitanika prvog dijela ovog doktorskog istraživanja prijavio je kontakt s kućnim ljubimcima u trajanju barem godinu dana, u ranom ili kasnom djetinjstvu. Kontakt sa psom bio je najčešći, nešto manje ispitanika prijavilo je kontakt s mačkom dok su ptice i glodavci bili rjeđi izbor kućnog ljubimca. Još nije u potpunosti razjašnjeno je li kontakt sa životinjama zaštitni ili rizični čimbenik za razvoj atopijskih bolesti, simptoma i pokazatelja atopije. Vrsta životinje i životno razdoblje izloženosti, čini se, igraju važnu ulogu jer se većina istraživanja slaže da izloženost u prvim godinama života djeluje zaštitno protiv atopijskih bolesti, a kasnija izloženost ili nema utjecaja, ili je povezana s povećanim rizikom.^{120,121,143,144} U ovom doktorskome istraživanju potvrđen je kontakt s glodavcem u kasnom djetinjstvu (nakon 7. godine života) kao nezavisni rizični čimbenik za pojavu atopijske astme i rinitisa što je uočeno u prijašnjem istraživanju na djelomično istoj skupini ispitanika.¹⁷ U istraživanju iz Irske koje je koristilo ISAAC metodologiju slično je uočena značajna pozitivna povezanost kontakta s glodavcem i astme, kao i teškog sipljenja kod adolescenata u dobi 13-14 godina.¹¹⁹ Nedavno istraživanje pokazalo je da držanje glodavca kao kućnog ljubimca kod djece do 7. godine života povećava rizik senzibilizacije na alergene glodavca.¹⁴⁴ Druga konzistentna povezanost u našem istraživanju bila je rizična povezanost kontakta s mačkom u ranom djetinjstvu s atopijskim dermatitisom i kožnim simptomima. Slična povezanost nije uočena u prijašnjim istraživanjima koja su promatrala kontakt s mačkom u ranom djetinjstvu i pojavu ekcema.^{145,146} Štoviše, neke studije upućuju na to da kontakt s mačkom u prvoj godini života sprječava kasniju senzibilizaciju na alergene mačke u odrasloj dobi.¹⁴⁷ Prethodno istraživanje koje je koristilo djelomično istu skupinu ispitanika pokazalo je da je kontakt s mačkom u ranom djetinjstvu nezavisni čimbenik rizika za pojavu kožnih simptoma, kontakt s mačkom u

kasnom djetinjastu nezavisni čimbenik rizika za pojavu nosnih simptoma, a držanje mačke bilo u ranom bilo u kasnom djetinjstvu, nije bilo povezano s pozitivnim pokazateljima atopije. To upućuje da bi u podlozi ovih povezanosti, osim atopije, mogao biti nespecifični imunološki odgovor na izloženosti mikrobima iz okoliša u kojem obitavaju mačke.¹⁷

Većina ispitanika prvog dijela ovog istraživanja imala je normalne vrijednosti indeksa tjelesne mase. Nismo uočili povezanosti kategorija indeksa tjelesne mase i atopijskih bolesti, simptoma i pokazatelja atopije, moguće zbog male učestalosti osoba s vrijednostima BMI-ja izvan normalne kategorije, no bilo je značajnih povezanosti s parametrima dišne funkcije. Kategorija pothranjenih imala je značajno manje, a kategorija prekomjernog BMI-ja značajno više vrijednosti parametara dišne funkcije FVC i FEV₁ u odnosu na osobe normalnog BMI-ja, što je uočeno i u prijašnjim istraživanjima.^{17,148,149} Istraživanja drugih autora su pokazala da protuupalni citokin adiponektin, čije su razine značajno negativno povezane s količinom masnog tkiva, značajno povećava omjer FEV₁/FVC kod adolescenata.¹⁰⁴ Može se zaključiti da je u analiziranoj dobnoj skupini bolja tjelesna uhranjenost povezana s višim vrijednostima parametara dišne funkcije, izuzimajući pri tome pretile osobe s vrijednostima BMI>30.

U našem istraživanju primijetili smo značajan utjecaj spola na pokazatelje atopije i parametre dišne funkcije, a kojim nismo primijetili povezanost s atopijskim bolestima ili simptomima atopijskih bolesti. Osobe s pozitivnim SPT-om u odnosu na kontrolnu skupinu (ispitanici bez prijavljenih astmatskih, nosnih ili kožnih simptoma s negativnim SPT-om) češće su bile muškarci. Muškarci su također imali značajno više vrijednosti ukupnog IgE i češće vrijednosti iznad graničnih 150 kU/l nego žene. Rezultati se slažu s prijašnjim istraživanjima na hrvatskim ispitanicima u kojima je nađeno da žene imaju značajno veći rizik prisutnosti dišnih i kožnih simptoma od muškaraca, a značajno manji rizik pozitivnog SPT-a.^{13,17} Čini se da je nasljedna podloga za pojavu atopije i simptoma atopijskih bolesti različita i jednim djelom ovisna o spolu te su stoga pokazatelji atopije učestaliji kod muškaraca, ali se

kod žena atopijske bolesti klinički češće manifestiraju.^{38,150} Što se tiče pokazatelja plućne funkcije, muškarci su imali značajno više vrijednosti FVC i FEV₁ te veću učestalost pozitivnog BT-a u odnosu na žene, što je uočeno i u ranijem opsežnijem istraživanju.¹⁷ Razlike u veličini pluća te broju bronhiola kod dječaka i djevojčica te kasniji različit razvoj prsišta uzroci su većeg plućnog kapaciteta i do 25% viših vrijednosti parametara dišne funkcije kod mladića u odnosu na djevojke.¹⁵⁰

Velika većina naših ispitanika prijavila je kontinentalno prebivalište, tj. da su u kontinentalnom dijelu Hrvatske proveli 10 i više godina života. Kontinentalno prebivalište u odnosu na primorsko bilo je značajno češće među ispitanicima s atopijskim rinitisom i nosnim simptomima. Interpretaciju nađene povezanosti s atopijskim rinitisom ograničava naš izbor korištenih inhalacijskih alergena za provođenje SPT-a. Zastupljeniji su bili inhalacijski alergeni kontinentalnog područja u odnosu na primorsko zbog čega se ne mogu isključiti slučajevi lažno negativne dijagnoze atopijskog rinitisa kod ispitanika s primorskim prebivalištem i nosnim simptomima. Istraživanja upućuju na utjecaj kontinentalnih/primorskih klimatskih uvjeta na simptome atopijskih bolesti. U istraživanju u Italiji uočeno je da su astmatski simptomi učestaliji u središnjoj i južnoj Italiji nego sjevernoj Italiji.¹⁵¹ U španjolskom istraživanju po ISAAC metodologiji nađeno je da je učestalost atopijskog ekcema kod djece značajno pozitivno povezana s količinom padalina i relativnom vlažnošću zraka, a značajno negativno povezana s temperaturom zraka i brojem sunčanih sati.¹⁵² U hrvatskim istraživanjima provedenim po ISAAC metodologiji (tablica 23. u prethodnom poglavlju) prijavljena učestalost astmatskih i nosnih simptoma bila je veća u priobalnoj regiji (Primorsko-goranskoj i Splitsko dalmatinskoj županiji), u odnosu na kontinentalnu regiju (Međimurska županija). Klimatski uvjeti u priobalnom području Hrvatske pogoduju rastu i razmnožavanju prašinskih grinja, kao i dužoj sezoni polinacije alergogenih biljaka, što stanovnike hrvatskog priobalnog područja dugotrajnije izlaže višim

koncentracijama najčešćih inhalacijskih alergena u odnosu na kontinentalne dijelove. To je potvrđeno u prijašnjem istraživanju za alergen Der p 1 (alergen grinje *Dermatophagoides pteronyssinus*) čija je prosječna koncentracija bila značajno viša u uzorcima kućne prašine iz primorske Hrvatske u odnosu na kontinentalno područje (4,5 vs 0,85 µg/g prašine), kao i udjel uzoraka kućne prašine s koncentracijama alergena Der p 1 rizičnim za razvoj senzibilizacije (>2 µg/g prašine; 75% vs 27,5%).¹⁵³ Nismo našli povezanost pušenja i gradskog/seoskog prebivališta s atopijskim bolestima, simptomima ili pokazateljima atopije, za razliku od prijašnjih istraživanja koja pokazuju nepovoljne utjecaje pušenja i gradskog prebivališta na te ishode.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

6.3.3. Učestalosti polimorfizama citokinskih gena u uzorku hrvatske populacije

U tablici 24. sažeto su prikazane učestalosti proučavanih polimorfizama citokinskih gena prijavljene u prijašnjim europskim istraživanjima. Polimorfizam TNF- α -308G>A je u europskim istraživanjima, uključujući i Hrvatsku, prisutan u oko 30% ispitanika. U našem istraživanju, učestalost nositelja tog polimorfizma kod ispitanika s atopijskom astmom i ispitanika s atopijskim dermatitisom bila je niža nego u prijašnjim istraživanjima, a učestalost kod ispitanika s atopijskim rinitisom viša nego što je nađeno u prijašnjim europskim istraživanjima. Učestalost kod kontrolnih ispitanika (ispitanika bez atopijskih bolesti, simptoma atopijskih bolesti i negativnog SPT-a) u našem istraživanju bila je podjednaka kao kod kontrolnih ispitanika bez pojedine atopijske bolesti proučavane u prijašnjim europskim istraživanjima. Učestalost nositelja genskog polimorfizma TNF- α -238G>A prema europskim istraživanjima je manja i radi se o relativno rijetkom polimorfizmu prisutnom u oko 10% ispitanika. Među našim ispitanicima ta učestalost od <5% bila je općenito još niža nego učestalosti prijavljene u prijašnjim europskim istraživanjima, kako u ispitanika s pojedinom atopijskom bolešću, tako i među kontrolnim ispitanicima. Učestalost nositelja genskog

polimorfizma IL-10 $-1082G>A$ među ispitanicima u našem istraživanju bila je slična učestalostima u prijašnjim europskim istraživanjima. Taj polimorfizam je prisutan u $>75\%$ ispitanika u svih do sada analiziranih populacija što upućuje da se radi o uobičajenom polimorfizmu u europskoj populaciji uključujući i Hrvatsku. Polimorfizam IL-1 α $-889C>T$ je u europskim istraživanjima, uključujući i ovo istraživanje, najčešće zastupljen u 40 do 50% ispitanika. Učestalost tog polimorfizma kod naših ispitanika s atopijskom astmom bila je nešto veća nego što je nađeno u prijašnjim europskim istraživanjima, a manja kod naših ispitanika s atopijskim dermatitisom (tablica 24).

Tablica 24. Usporedba učestalosti nositelja genskih polimorfizama među ispitanicima našeg početnog istraživanja s učestalostima nositelja prijavljenim u dosadašnjim europskim istraživanjima

	Asthma		Atopijski rinitis		Atopijski dermatitis		Kontrolni ispitanici	
	Naše istraživanje	Prijašnja istraživanja	Naše istraživanje	Prijašnja istraživanja	Naše istraživanje	Prijašnja istraživanja	Naše istraživanje	Prijašnja istraživanja
TNF-α -308G>A	4	33 ⁶¹ -48 ⁷⁰	33	17 ⁹⁰	8	23 ⁹⁴ -39 ¹⁵⁴	29	23 ⁹⁴ -37 ⁷⁰
TNF-α -238G>A	4	3 ⁸²	3	9 ⁹⁰	0	3 ⁹⁴ -9 ⁹³	2	2 ⁹⁰ -14 ¹⁵⁵
IL-10 -1082G>A	80	80 ⁹⁷ -85 ⁸²	90	Nema istraživanja	76	76 ⁹³ -95 ⁹⁴	81	76 ¹⁰¹ -94 ⁸²
IL-1α 889C>T	43	23 ⁸²	37	Nema istraživanja	41	64 ⁹⁴	47	31 ⁸² -58 ^{94,156}

Legenda: Učestalosti nositelja polimorfizma prikazane su kao postotak nositelja polimorfizma među ispitanicima s pojedinom bolešću ili kontrolnim ispitanicima. Brojke u superskriptu označuju broj reference. TNF- α -308G>A i TNF- α -238G>A: genski polimorfizmi u genu za čimbenik nekroze tumora (TNF) α ; IL-10 -1082G>A genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 10; IL-1 α -889C>T genski polimorfizam u genu za interleukin (IL) 1 α . Kontrolni ispitanici: ispitanici bez prisutnosti simptoma astme, nosnih ili kožnih simptoma i negativnog SPT-a u našem istraživanju, ispitanici bez proučavane atopijske bolesti u prijašnjim europskim istraživanjima.

6.1.4. Povezanost polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima, simptomima atopijskih bolesti i pokazateljima atopije

Temeljni cilj ovog doktorskog istraživanja bio je odrediti utječu li genetski polimorfizmi TNF- α -308G>A , TNF- α -238G>A, IL-1 α -889C>T and IL-10 -1082G>A na vjerojatnost prisutnosti atopijskih bolesti, simptoma atopijskih bolesti i pokazatelja atopije. Naši najdosljedniji rezultati pokazuju negativnu povezanost genskog polimorfizma TNF- α -308G>A s atopijskim dermatitisom. Tunegativnu povezanost našli smo i u jednostavnoj statističkoj analizi i u složenoj analizi koja je uzimala u obzir i čimbenike osobne osjetljivosti te načina života i okoliša za koje smo u jednostavnoj analizi utvrdili da su značajno povezani s atopijskim bolestima (spol, kontinentalno/primorsko prebivalište, obiteljska alergološka anamneza, kontakt s mačkom i glodavcem). Povezanosti tog polimorfizma s kožnim poremećajima nađene su i u prijašnjim istraživanjima. U meta analizi Zhuang i sur. (2013)¹⁵⁷ zaključeno je da je genski polimorfizam TNF- α -308G>A značajno negativno povezan sa psorijazom, dok meta analiza Nie i sur. (2015)¹⁵⁸ nije potvrdila povezanost s vitiligom. S druge strane, iritativni upalni poremećaji kože i kontaktna senzibilizacija na kemikalije izgleda da su potpomognuti ovim polimorfizmom. U američkom istraživanju na medicinskim sestrama nađeno je da genski polimorfizam TNF- α -308G>A utječe na odgovor kože na iritaciju, točnije, crvenilo (eritem) nakon opetovane izloženosti iritativnim otopinama detergenta (0,05 i 0,1% otopine natrijevog laurilsulfata) koji je bio jači u ispitanika nositelja genskog polimorfizma TNF- α -308G>A nego u ispitanika divljeg genotipa.¹⁵⁹ Njemačko istraživanje na odraslim ispitanicima pokazalo je da su pojedinci s alergijskim kontaktnim dermatitisom koji su polisenzibilizirani na para-supstituirane arilne spojeve i još barem jedan strukturno nevezan alergen značajno češće nositelji ovog polimorfizma u odnosu na zdrave pojedince bez anamneze ekcema.¹⁶⁰ Slično tome, istraživanjem na odraslim njemačkim i nizozemskim ispitanicima nađeno je da je genski polimorfizam TNF- α -308G>A značajno

češći među ispitanicima s anamnezom alergijskog kontaktnog dermatitisa senzibiliziranim na para-fenilendiamin nego ispitanici bez anamneze alergijskog kontaktnog dermatitisa i bez senzibilizacije na navedeni spoj.¹⁵⁴ Pregledom literature naišli smo na tri studije ranijeg datuma koje su se bavile atopijskim dermatitisom i genskim polimorfizmom TNF- α -308G>A. Dvije od njih, njemačko istraživanje Reich i sur.⁹³ na djeci i odraslima te makedonsko istraživanje Stavrić i sur.⁹⁴ na djeci, nisu pokazale povezanost, a iransko istraživanje istraživača Behniafard i sur. (2012)⁹¹ na djeci slično kao i naše istraživanje uočilo je negativnu povezanost. Podloga negativne povezanosti može ležati u opažanjima da je spontana, nestimulirana, produkcija citokina TNF- α manjkava kod osoba s atopijskim dermatitisom¹⁶¹⁻¹⁶⁴, a za divlji tip genotipa tj. genotip GG na položaju -308 u genu za TNF α , pretpostavlja se da je povezan s niskom proizvodnjom TNF- α .⁹¹ Budući da je u atopijskom dermatitisu dio patogeneze prouzrokovan defektnom produkcijom i aktivnošću TNF- α u koži koju bi dodatno otežala niska produktivnost GG genotipa, u osoba s TNF- α -308G>A polimorfizmom produkcija TNF- α je povoljno stimulirana i manifestacije atopijskog dermatitisa u obliku kožnih simptoma su spriječene. Uočeno je također da je taj polimorfizam pozitivno povezan s razinama TNF- α u serumu, a negativno s razinama TNF- α u nosu.^{60,90} Bilo bi, dakle, vrijedno dalje proučiti povezanost genskog polimorfizma TNF- α -308G>A s razinama TNF- α u koži, respiracijskoj sluznici i krvi atopičara i neatopičara, imajući na umu već spomenute razlike u utjecaju na sistemske razine u serumu i lokalne u nosu kao i općenito smanjenu proizvodnju TNF- α u imunološkim stanicama pacijenata s atopijskim dermatitisom.¹⁶¹⁻¹⁶⁴ Valja napomenuti da je u ovom istraživanju povezanost genskog polimorfizma TNF- α -308 G>A bila jača s kožnim simptomima, tj. povezanost je nađena i jednostavnom i složenom statističkom analizom, a povezanost SPT statusa uočena jednostavnom statističkom analizom nije potvrđena složenom analizom sa SPT statusom kao ishodom uz kontrolu za čimbenike osobne osjetljivosti, načina života i okoliša. To upućuje na

zaključak da utjecaj genskog polimorfizma TNF- α -308 G>A na upalne procese u koži nije nužno vezan samo s upalom posredovanom IgE protutijelima.

Naš rezultat negativne povezanosti genskog polimorfizma TNF- α -308G>A s atopijskom astmom (što je uočeno samo jednostavnom analizom, bez kontrole za čimbenike osobne osjetljivosti i čimbenike načina života i okoliša) u skladu je s manjim brojem prijašnjih istraživanja (Albuquerque 1998, Almomani 2013).^{54,56} Mali broj ispitanika s atopijskom astmom u našem istraživanju (N=26) ograničava pouzdano tumačenje tih rezultata.

Nismo uočili povezanost genskog polimorfizma TNF- α -238G>A s atopijskim bolestima, simptomima ili pokazateljima atopije. S obzirom na mali broj nositelja tog polimorfizma (10 ispitanika) ne možemo razmatrati značaj ovog polimorfizma. Prijašnja istraživanja na ispitanicima bijele rase pokazala su da je genski polimorfizam TNF- α -238G>A povezan s većim rizikom za astmu^{72,82} i alergijski rinitis⁹⁰, dok do sada većinom nisu nađene povezanosti s atopijskim dermatitisom^{93,94} iako ima istraživanja kojima je nađena zaštitnu povezanost.⁹¹ U ovom istraživanju nismo uočili ni značajne povezanosti genskih polimorfizama IL-10 -1082G>A i IL-1 α -889C>T s atopijskim bolestima, simptomima atopijskih bolesti i pokazateljima atopije. Dijelom studija na ispitanicima bijele rase zaključeno je da genski polimorfizam IL-10 -1082G>A nije povezan s astmom^{82,97} dok je drugim studijama nađena ili negativna povezanost⁸⁵, ili pozitivna povezanost.⁹⁸ U prijašnjim istraživanjima nisu nađene povezanosti genskog polimorfizma IL-10 -1082G>A s atopijskim dermatitisom.^{118,119,125,126} Smatra se da genski polimorfizam IL-1 α -889C>T nije povezan s astmom^{72,82}, a za atopijski dermatitis ima suprotnih rezultata, u nekim studijama nije nađena povezanost¹⁰², a u drugima je nađena rizična povezanost.⁹⁴

Što se tiče povezanosti polimorfizama citokinskih gena i pokazatelja plućne funkcije, uočena je značajna negativna povezanost genskog polimorfizma IL-10 -1082G>A i MEF_{50%},

nositelji IL-10 -1082G>A imali su prosječno niže vrijednosti MEF_{50%} u odnosu na nenositelje, što je potvrđeno složenom analizom kontroliranom za spol i obiteljsku alergološku anamnezu. Ta povezanost nije nađena u prijašnjim istraživanjima. Istraživanje Karjainen i sur.⁹⁷ nije našlo značajnu povezanost genskog polimorfizma IL-10 -1082G>A s vrijednostima pokazatelja plućne funkcije FEV₁ i FVC u ukupnom uzorku odraslih ispitanika, tj. astmatičara i kontrolnih ispitanika bez astme ili kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB). Nepovezanost polimorfizma TNF- α -308G>A s pokazateljima plućne funkcije uočena u ovom istraživanju slaže se s rezultatima istraživanja Louis i sur.⁷¹ u kojem je nađeno da astmatičari s težom astmom, definiranom s <60% vrijednostima FEV₁ unutar zadnjih 5 godina, nisu imali različitu učestalost genskog polimorfizma TNF- α -308G>A u odnosu na ispitanike s blažom astmom (>60% FEV₁) kao ni u odnosu na kontrolne ispitanike bez astme. Većina ostalih prijašnjih istraživanja povezanosti pokazatelja plućne funkcije i promatranih polimorfizama citokinskih gena bavila se kroničnom opstruktivnom KOPB-om i genskim polimorfizmom TNF- α -308G>A. Iako postoje istraživanja koja su našla rizičnu povezanost^{165,166}, kao i ona koja su našla zaštitnu povezanost¹⁶⁷, većina istraživanja se slaže da taj polimorfizam nije povezan s prisutnošću KOPB-a, težinom bolesti, brzinom napredovanja bolesti te vrijednostima parametara plućne funkcije.¹⁶⁸⁻¹⁷² U istraživanju Huang i sur.¹⁷³ nađeno je da su ispitanici s kroničnim bronhitisom i patološkim vrijednostima FEV₁ češće bili nositelji genskog polimorfizma TNF- α -308G>A nego zdravi kontrolni ispitanici normalnih vrijednosti pokazatelja plućne funkcije. Zanimljivi su i rezultati istraživanja koja su se bavila profesionalnim bolestima. Kod radnika koji su bili <10 godina izloženi prašini koja nastaje pri žetvi, obradi i skladištenju žitarica godišnje opadanje pokazatelja plućne funkcije FEV₁ bilo je značajno veće kod osoba s TNF- α -308 AA genotipom nego divljim (GG) i heterozigotnim genotipom (GA).¹⁷⁴ U istraživanju na radnicima u tvornici cementa nađeno je da je genski polimorfizam TNF- α -308G>A učestaliji kod radnika sa silikozom nego kod zdravih

radnika.¹⁷⁵ Što se tiče ostalih proučavanih polimorfizama, nije uočena značajna povezanost genskog polimorfizma TNF- α -238 G>A i KOPB-a¹⁶⁸, a nađeno je da ispitanici s idipatskom plućnom fibrozom nositelji genskog polimorfizam IL-1 α -889C>T imali značajno veće vrijednosti vitalnog kapaciteta nego ispitanici divljeg genotipa.¹⁷⁶

6.2. Studija praćenja

Drugi dio doktorskog istraživanja bilo je praćenje ispitanika tijekom 2012.-2014. godine nakon početnog istraživanja 2008/2009. godine. Utvrdili smo da su tijekom razdoblja praćenja promjene u atopijskom statusu ispitanika bile rijetke, što je donekle očekivano zbog relativno kratkog razdoblja praćenja (4-5 godina). Nakon razdoblja praćenja, atopijska astma pojavila u 1 % praćenih ispitanika, a nestala također u 1 % ispitanika, atopijski rinitis pojavio se u 9 % ispitanika a nestao u 3 %, a atopijski dermatitis pojavio se u 6 % ispitanika a nestao u 1 % ispitanika. Bez ijedne atopijske bolesti u obje faze istraživanja bilo je 72 % ispitanika. Promjene prisutnosti simptoma bile su malo češće, astmatski simptomi pojavili su se u 2 % ispitanika, a nestali u 8 %, nosni simptomi pojavili su se u 14 % ispitanika a nestali u 9 %, kožni simptomi pojavili su se u 13 % ispitanika a nestali u 7 % ispitanika. Bez ijedne skupine simptoma atopijskih bolesti u obje faze istraživanja bilo je 46 % ispitanika. Promjene SPT statusa bile su rijetke, kod 5 % ispitanika došlo je do pojave pozitivnog SPT-a, kod 3 % do povlačenja pozitivnog SPT-a, a 57 % imalo je negativan SPT u oba dijela istraživanja. Na razini uzorka nije bilo značajnih promjena u udjelu ispitanika s pojedinom atopijskom bolešću, atopijskim simptomima ili pozitivnm SPT-om tijekom razdoblja praćenja. Zanimljivo je da kod većine ispitanika (6 od 7 ispitanika) s pojavom atopijskog rinitisa tijekom razdoblja praćenja zabilježen je asimptomatski pozitivan SPT u prvom dijelu istraživanja. Svi ispitanici s pojavom atopijskog rinitisa su u prvom dijelu istraživanja imali pozitivan SPT na prašinske grinje *Dermatophagoides* i/ili *Lepidoglyphus spec.* Kliničko

značenje pozitivnih pokazatelja atopije bez pratećih simptoma atopijskih bolesti je upitno, iako se ta pojava javlja u 8 do 30 % opće populacije ako se promatra senzibilizacija na inhalacijske alergene. Dansko prospektivno istraživanje pratilo je tijekom dvije godine ispoljavanje simptoma alergijskog rinitisa kod asimptomatski senzibiliziranih mladih odraslih osoba. Iako je prijava novih slučajeva atopijskog rinitisa bila veća kod asimptomatskih atopičara nego kod asimptomatskih neatopičara (5 vs. 0 %), ipak je zaključeno da je za predviđanje pojave alergijskog rinitisa korisnost poznavanja atopijskog statusa kroz određivanje specifičnih IgE protutijela niska, zbog niskih pozitivnih prediktivnih vrijednosti (14-27 %) u odnosu na visoke negativne prediktivne vrijednosti (95-100 %) tog dijagnostičkog testa.¹⁷⁷ Pokazalo se da, ovisno o razdoblju praćenja i vrsti alergena, 30-60 % asimptomatski senzibiliziranih pojedinaca s vremenom dobije simptome.¹⁷⁸ U prijašnjem danskom istraživanju nađeno je da je 60 % asimptomatskih odraslih pojedinaca senzibiliziranih na alergene breze unutar 3 godine dobilo simptome polenoze na ove alergene što je potvrđeno specifičnim nazalnim i konjuktivalnim provokativnim testovima.¹⁷⁹ Za ilustraciju utjecaja vrste alergena na ispoljavanje bolesti, nađeno je da je astma prisutna u oko 50 % djece senzibilizirane na alergene grinja kućne prašine, u 44 % djece senzibilizirane na alergene dlake mačke, u 42 % na alergene peludi i u 32 % na alergene plijesni *A. alternata*.¹⁸⁰ Nalaz kožnog testa ubodom može biti koristan za predviđanje rizika pojave atopijske astme i rinitisa kod djece s ekcemom u prve 2 godine života jer je nađeno da su djeca sa atopijskim ekcemom u odnosu na djecu s neatopijskim ekcemom imala značajno povećan rizik za nastanak astme, pogotovo ako su bila jako senzibilizirana na alergene hrane.¹⁸¹ Postoje istraživanja kojima je tražena povezanost supkliničkih znakova atopijskih bolesti s atopijskim statusom. Nađeno je da senzibilizacija na uobičajene inhalacijske alergene u zdravih odraslih nepušača bez simptoma dišnih bolesti ne utječe na vrijednosti izdahnutog dušikovog oksida (FeNO), parametra čije povišene vrijednosti ukazuju na aktivnu upalu u dišnom sustavu, te su značajno

povišene kod ispitanika s klinički manifestnom atopijskom astmom.¹⁸² Međutim, uočeno je i da veličina urtike pri provođenju SPT-a pozitivno korelira s razinama FeNO i da povišene razine FeNO kod asimptomatskih osoba senzibiliziranih na alergene grinja ukazuju na subkliničku upalu dišnih puteva u tih ispitanika.¹⁸³ Postavlja se pitanje trebaju li asimptomatski senzibilizirani pojedinci izbjegavati doticaj s alergenima. Izgleda da je taj pristup učinkovit u sprječavanju pojave simptoma senzibilizacije na opće i profesionalne alergene, no potrebna su daljnja prospektivna intervencijska istraživanja koja bi potvrdila opravdanost izbjegavanja dodira s alergenom kod senzibilizirane osobe kao općenitog pristupa sprječavanja manifestacije atopijskih bolesti.¹⁷⁸ U hrvatskom istraživanju na ispitanicima koji su prošli liječnički pregled prije zaposlenja u farmaceutskoj industriji, utvrđeno je da je oko četvrtina asimptomatskih osoba imala pozitivne pokazatelje atopije i kontaktne senzibilizacije te da je poznavanje atopijskog statusa prilika za sekundarnu prevenciju i bolju dijagnostičku validaciju alergijskih bolesti vezanih uz rad.³⁶ Do sada još nisu rasvijetljeni molekularni mehanizmi koji omogućuju ovu pojavu. Nađeno je da bazofili asimptomatski senzibiliziranih osoba rjeđe i slabije reagiraju otpuštanjem histamina na stimulaciju anti-IgE protutijelima nego bazofili simptomatskih atopičara. Ta nereaktivnost mogla bi biti mehanizam u podlozi asimptomatske senzibilizacije.¹⁸⁴ Nađeno je i da su specifična IgE protutijela prisutna u nosnoj sluznici samo u oko 14 % asimptomatskih atopičara za razliku od 78 % simptomatskih atopičara. To neispoljavanje IgE protutijela u nazalnoj sluznici također bi moglo pridonijeti odsutnosti simptoma.¹⁸⁵ Zanimljivo je da je nađeno da je asimptomatska senzibilizacija češća kod djevojčica i adolescentica u odnosu na dječake i adolescente, a da u odrasloj dobi nema razlike među spolovima što uključuje nerazjašnjenu ulogu spolnih hormona u tom fenomenu.¹⁸⁶

Nismo uočili povezanosti nositeljstva polimorfizama citokinskih gena s promjenom rizika prisutnosti atopijskih bolesti tijekom razdoblja praćenja. Statističkom usporedbom

kategorija ispitanika s pojavom/povlačenjem simptoma atopijskih bolesti i ispitanika koji u razdoblju praćenja nisu imali te simptome također nismo primijetili razliku s obzirom na nositeljstvo polimorfizama citokinskih gena, nepromjenjive čimbenike osobne osjetljivosti (spol, obiteljska alergološka anamneza) te promjenjive čimbenike načina života i okoliša (pušački status, gradsko/seosko prebivalište, kategorije BMI-a, kontakt s kućnim ljubimcima).

Glavno ograničenje naše studije praćenja bile su poteškoće s prikupljanjem ispitanika. Iako je odaziv za potpisivanje informiranog pristanka za sudjelovanje u ovom doktorskom istraživanju bio dobar kod ispitanika s kojima smo uspjeli uspostaviti kontakt (64 % poslanih suglasnosti dobili smo nazad potpisane), zbog promjena telefonskog broja i neodgovaranja na ponavljana zvanja nismo bili u mogućnosti stupiti u kontakt s 241 ispitanikom od 440 ispitanika projekta na kojem se temeljilo ovo doktorsko istraživanje, što se odrazilo u činjenici da se na ponavljanje dijela protokola ili cjelokupnog protokola odazvao samo 121 ispitanik. Osipanje ispitanika tijekom razdoblja praćenja problem je prospektivnih istraživanja jer može dovesti do selekcije ispitanika i pristranih rezultata.^{187,188} Na primjer, u našoj studiji praćenja uočili smo da je pušača bilo značajno manje među ispitanicima studije praćenja u odnosu na one koji se nisu odazvali (29 % vs. 42 %). Kožni simptomi bili su također manje učestali među ispitanicima studije praćenja u odnosu na one koji se nisu odazvali (11 % vs. 21 %). Pregledno istraživanje koje se bavilo procjenom učinkovitosti metoda za zadržavanje ispitanika tijekom razdoblja praćenja našlo je da je poticaj/nagrada za nastavak sudjelovanja najučinkovitija metoda, od novčanih poticaja do darivanja ispitanika. Što je veći poticaj veći je postotak zadržavanja ispitanika. Od ostalih metoda procijenjeno je da se zadržavanje ispitanika u studiji povećava za 12 % u slučaju slanja podsjetnika poštom, 5 % za podsjećanje telefonom i 12 % za ponavljanje upitnika. Ponuda telefonskih intervjua ispitanicima koji se nisu odazvali povećava ukupni odaziv za 3 %.¹⁸⁹ U našoj studiji praćenja odustali smo od regrutiranja ispitanika u slučaju promjene telefonskog broja, u slučaju zadržavanja broja

nakon tri neodgovorena poziva, a u slučaju da je ispitanik odgovorio na telefonski poziv odustali smo nakon tri telefonska podsjetnika na dolazak ili ispunjavanje telefonske ankete. Posljedice osipanja ispitanika tijekom razdoblja praćenja u našem istraživanju su mali udjeli ispitanika s promjenama prisutnosti atopijskih bolesti, simptoma i s promjenama SPT statusa te mali udio ispitanika s promjenom čimbenika načina života i okoliša (tijekom razdoblja praćenja ukupno 2 % ispitanika počelo je pušiti, 7 % prestalo je pušiti, 17 % se udebljalo toliko da je prešlo u višu BMI kategoriju, 12 % smršavilo je i prešlo u nižu kategoriju, 19 % preselilo se u grad, 1 % u selo, 8 % nabavilo je mačku, 9 % psa, 5 % glodavca, a 5 % pticu). Navedeno ograničava pouzdano tumačenje rezultata statističkih analiza koje su uključivale ispitanike s pojavom/nestankom simptoma, a ispitanike s promjenom/nestankom atopijskih bolesti i ispitanike s promjenom atopijskog statusa prikazali smo samo opisno jer su oni bili još manje zastupljeni u ukupnom uzorku nego ispitanici s promjenom simptoma.

Prednost našeg istraživanja u usporedbi sa dosadašnjim studijama je što smo pored povezanosti nositeljstva polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima analizirali i povezanosti čimbenika osobne osjetljivosti i čimbenika načina života i okoliša s atopijskim bolestima. Otkrivene značajne povezanosti tih čimbenika koristili smo u složenoj analizi da bismo dobili točniji odgovor o omjeru rizika nositelja pojedinog polimorfizma za prisutnost atopijske bolesti u odnosu na nenositelje.¹⁹⁰ U budućim istraživanjima bilo bi vrijedno proučiti utjecaj polimorfizama citokinskih gena na nastanak atopijskih bolesti tijekom dužeg razdoblja praćenja od djetinjstva do odrasle dobi uz detaljnu kontrolu za utjecaj čimbenika osobne osjetljivosti, načina života i okoliša.

7. ZAKLJUČCI

1. Istraživanjem u uzorku mlađe odrasle populacije iz Hrvatske utvrđena je učestalost atopijske astme od 7 %, atopijskog rinitisa 18 % i atopijskog dermatitisa 10 %. Učestalost nosnih simptoma bila je 28 %, astmatskih simptoma 14 %, a kožnih simptoma 18 %. Učestalost atopijskih dišnih simptoma u ovom istraživanju je veća nego učestalosti nađene u usporedivim ISAAC istraživanjima iz razdoblja 2001.-2005. na hrvatskim učenicima u dobi od 12-14 godina, dok su slične učestalosti simptoma atopijskih dišnih bolesti nađene u ovom istraživanju i u usporedivom ISAAC istraživanju provedenom u istom razdoblju kao i ovo istraživanje (2008.-2010.) u Primorsko goranskoj županiji. To govori u prilog porasta učestalosti simptoma atopijskih dišnih bolesti u populaciji hrvatskih adolescenata tijekom prvog desetljeća 21. stoljeća.

2. Učestalost analiziranih polimorfizama citokinskih gena je u ovom istraživanju u kontrolnih ispitanika bez atopije bila u skladu s prijašnjim istraživanjima na europskim populacijama. Polimorfizam TNF- α -308G>A je prisutan u oko 30 % ispitanika, a polimorfizam IL-1 α -889C>T u 40-50 % ispitanika europskih studija i ovog istraživanja. Učestalost polimorfizma TNF- α -238 G>A je niska u europskim populacijama, prisutan je u oko 10 % ispitanika, dok je u ovom istraživanju bila ispod 5 %. Učestalost nositelja genskog polimorfizma IL-10 -1082G>A među ispitanicima u našem istraživanju i u prijašnjim europskim istraživanjima je iznad 75 %, što pokazuje da se radi o uobičajenom polimorfizmu u europskoj populaciji uključujući i Hrvatsku.

3. Uz utjecaj odabranih genetskih polimorfizmama, kao čimbenika potencijalno povezanih s atopijskim parametrima, analiziran je i utjecaj čimbenika osobne osjetljivosti, načina života i okoliša kako bi se u složenoj statističkoj analizi dobila pouzdanija procjena povezanosti polimorfizama citokinskih gena s atopijskim bolestima, simptomima i pokazateljima. Kao čimbenici nezavisno povezani s atopijskim bolestima, simptomima i pokazateljima u ovom

istraživanju potvrđeni su spol, pozitivna obiteljska alergološka anamneza, kontinentalno/primorsko prebivalište te kontakt s mačkom i glodavcima u djetinjstvu.

4. Rezultati pokazuju konzistentnu negativnu povezanost genskog polimorfizma TNF- α -308G>A s atopijskim dermatitisom i kožnim simptomima, uz kontrolu za čimbenike osobne osjetljivosti te načina života i okoliša od utjecaja na atopijske parametre (spol, kontinentalno/primorsko prebivalište, obiteljska alergološka anamneza, kontakt s mačkom i glodavcem). Podloga te povezanosti može biti u opažanjima da je spontana produkcija citokina TNF- α manjkava kod osoba s atopijskim dermatitisom te polimorfizam TNF- α -308G>A, koji stimulira produkciju TNF- α , povoljno djeluje na simptome atopijskog dermatitisa. Negativna povezanost genskog polimorfizma TNF- α -308G>A sa SPT statusom uočena jednostavnim statističkom analizom nije potvrđena složenom analizom uz kontrolu za čimbenike osobne osjetljivosti, načina života i okoliša. To upućuje da utjecaj genskog polimorfizma TNF- α -308G>A na upalne procese u koži nije nužno vezan samo za atopijsku upalu.

5. Rezultati pokazuju niže vrijednosti MEF_{50%} u nositelja IL-10 -1082G>A polimorfizma u odnosu na nenositelje, uz kontrolu za čimbenike osobne osjetljivosti (spol i obiteljsku alergološku anamnezu). Povezanost ostalih analiziranih citokinskih polimorfizama s parametrima ventilacijske funkcije pluća i bronhodilatatornim testom nije uočena u ovom istraživanju.

6. Tijekom razdoblja praćenja promjene u atopijskom statusu ispitanika bile su rijetke, što je donekle očekivano zbog relativno kratkog razdoblja praćenja (4-5 godina) i slabog odaziva ispitanika na ponavljanje protokola. Na razini uzorka nije bilo značajnih promjena u udjelu ispitanika s pojedinom atopijskom bolešću, atopijskim simptomima ili pozitivnim SPT-om tijekom razdoblja praćenja. Nisu uočene značajne povezanosti nositeljstva polimorfizama citokinskih gena s promjenom rizika prisutnosti atopijskih bolesti tijekom razdoblja praćenja.

Usporedbom kategorija ispitanika s pojavom/povlačenjem simptoma atopijskih bolesti i ispitanika koji u razdoblju praćenja nisu imali te simptome također nisu primijećene značajne razlike s obzirom na nositeljstvo polimorfizama citokinskih gena, nepromjenjive čimbenike osobne osjetljivosti (spol, obiteljska alergološka anamneza) te promjenjive čimbenike načina života i okoliša (pušački status, gradsko/seosko prebivalište, kategorije BMI-a, kontakt s kućnim ljubimcima).

8. KRATKI SADRŽAJ

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti povezanosti polimorfizama u genima za čimbenik nekroze tumora (TNF)- α $-308G>A$ i $-238G>A$, interleukin (IL)-10 $-1082G>A$ te IL-1 α $-889C>T$ s atopijskom astmom, rinitisom i dermatitisom (AD), uz kontrolu utjecaja čimbenika osobne osjetljivosti (spol, BMI, obiteljska alergološka anamneza) te čimbenika načina života i okoliša (pušenje, kontinentalno/primorsko i seosko/gradsko prebivalište, kontakt sa životinjama).

U prvom dijelu istraživanja sudjelovalo je 356 studenata prve godine studija Sveučilišta u Zagrebu kod kojih je provedeno prikupljanje osobnih podataka ispunjavanjem upitnika, ubodni kožni test sa najčešćim inhalacijskim alergenima, mjerenje ukupnog IgE u serumu, spirometrija s bronhodilatatornim testom i genotipizacija. Drugi dio istraživanja bila je studija praćenja ispitanika nakon razdoblja od 4-5 godina (N=121) s potpunim ili djelomičnim ponavljanjem protokola.

Polimorfizam TNF- α $-308G>A$ je bio prisutan u oko 30 %, IL-1 α $-889C>T$ u oko 40%, TNF- α $-238 G>A$ u <5 %, a IL-10 $-1082G>A$ u >75 % ispitanika. Rezultati pokazuju negativnu povezanost polimorfizma TNF- α $-308 G>A$ s AD i kožnim simptomima, uz kontrolu za čimbenike osobne osjetljivosti, načina života i okoliša. Polimorfizam TNF- α $-308 G>A$ stimulira produkciju TNF α , što može povoljno djelovati na simptome AD pri kojemu je produkcija i aktivnost TNF α u koži manjkava. U razdoblju praćenja nisu uočene značajne povezanosti polimorfizama s promjenom rizika za prisutnost atopijskih bolesti, simptoma ili pokazatelja.

9. SUMMARY

ASSOCIATIONS BETWEEN CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS TNFalpha (-308G>A, -238G>A), IL1alpha (-889C>T) AND IL10 (- 1082G>A) AND ATOPIC RESPIRATORY DISEASES

The aim of this research was to assess the associations between polymorphisms in the genes for tumour necrosis factor (TNF)- α -308G>A and -238G>A, interleukin(IL)-10-1082G>A and IL-1 α -889C>T and atopic asthma, rhinitis and dermatitis (AD), with adjustment for confounding personal (gender, BMI, parental history of atopic diseases), lifestyle, and environmental factors (smoking, continental/Mediterranean and urban/rural residency, exposure to pets).

The initial phase included 356 freshmen students from the University of Zagreb who underwent collecting a questionnaire, skin prick testing with common inhalatory allergens, total serum IgE measurement, spirometry with a bronchodilation test, and genotyping. A follow-up study, conducted 4-5 years later, included 121 subjects who repeated the protocol either completely or partially.

TNF- α -308G>A polymorphism was found in around 30%, IL-1 α -889C>T in around 40%, TNF- α -238G>A in <5%, and IL-10 -1082G>A in >75% of subjects. These results point to a negative association between TNF- α -308G>A polymorphism and AD and skin symptoms, adjusted for personal, lifestyle, and environmental factors. TNF- α -308G>A polymorphism stimulates the production of TNF- α , which can be beneficial for the clinical course of AD, since part of AD pathogenesis is related to defective TNF α production and activity in the skin. There were no significant associations between the analysed polymorphisms and time-related changes in the presence of atopic diseases, symptoms, and markers during the follow-up period.

Željka Babić, 2017. g.

10. POPIS LITERATURE

1. Lipozenčić, J. Alergijske i imunosne bolesti. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 3-22.
2. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, i sur. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(5):832-6.
3. Holgate ST. *Allerg.* 4.izd. Edinburgh: Elsevier Saunders; 2012.
4. Rajendra C, Zoratti E, Havstad S, Nicholas C, Wegienka G, Cross MT, i sur. Relationships between total and allergen-specific serum IgE concentrations and lung function in young adults. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012;108(6):429-34.
5. Tan WC, Bourbeau J, Hernandez P, Chapman KR, Cowie R, FitzGerald JM, i sur. Bronchodilator responsiveness and reported respiratory symptoms in an adult population. *PLoS One.* 2013;8(3):e58932.
6. Patrizi A, Pileri A, Bellini F, Raone B, Neri I, Ricci G. Atopic dermatitis and the atopic march: what is new? *J Allergy (Cairo).* 2011;2011:279425.
7. Bantz SK, Zhu Z, Zheng T. The Atopic March: Progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and Asthma. *J Clin Cell Immunol.* 2014;5(2).
8. Bousquet PJ, Chinn S, Janson C, Kogevinas M, Burney P, Jarvis D. Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy.* 2007;62(3):301-9.
9. ISAAC, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, 2016. (Stranice na Internetu) Dostupno na: <http://isaac.auckland.ac.nz/>
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. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2013;41(2):73-85.
11. Pearce N, Ait-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.
12. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004;59(5):469-78.
 13. Macan J, Varnai VM, Maloca I, Kanceljak-Macan B. Increasing trend in atopy markers prevalence in a Croatian adult population between 1985 and 1999. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(12):1756-63.
 14. 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 Asthma*. 2013;50(8):810-4.
 15. Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Sulkowski S, Rutkowski R. Allergic diseases: the price of civilisational progress. *Postepy Dermatol Alergol*. 2014;31(2):77-83.
 16. Ring J, Kramer U, Schafer T, Behrendt H. Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol*. 2001;13(6):701-8.
 17. Sabolić Pipinić I. Međudjelovanje genskog polimorfizma filagrina i načina života kod atopijskih bolesti u mladoj odrasloj populaciji [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2015.
 18. Sabolić Pipinić I, Macan J, Kanceljak-Macan B. Significance of nutrition in respiratory allergic diseases: a review of scientific knowledge. *Periodicum biologorum* 2009;111; 41-49.
 19. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3546-56.
 20. Lambrecht BN, Hammad H. Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity. *Eur J Immunol*. 2013;43:3125–3137.
 21. Padrón-Morales J, García-Solaesa V, IsidoroGarcía M, Hernández-Hernández L, GarcíaSánchez A, Hincapié-López G i sur. Implications of cytokine genes in allergic asthma.

- Allergol Immunopathol (Madr). 2014;42:603–608.
22. Nedoszytko B, Sokołowska-Wojdyło M, Ruckemann-Dziurdzińska K, Roszkiewicz J, Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postepy Dermatol Alergol*. 2014;31:84–91.
23. Virchow JC Jr, Walker C, Hafner D, Kortsik C, Werner P, Matthys H, Kroegel C. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:960–968.
24. Bradding P, Mediawake R, Feather IH, Madden J, Church MK, Holgate ST, Howarth PH. TNF α is localized to nasal mucosal mast cells and is released in acute allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 1995;25:406–415.
25. Junghans V, Gutgesell C, Jung T, Neumann C. Epidermal cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-12 in patients with atopic dermatitis: response to application of house dust mite antigens. *J Invest Dermatol*. 1998;111:1184–1188.
26. Antúnez C, Torres MJ, Mayorga C, Cornejo García JA, Santamaría-Babi LF, Blanca M. Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte-associated antigen T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:559–566.
27. Dunstan JA, Hale J, Breckler L, Lehmann H, Weston S, Richmond P, Prescott SL. Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-10 and interferon-gamma responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1309–1317.
28. Burke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med*. 2003;24(2):160-9.
29. Almqvist C, Worm M, Leynaert B. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence:

- a GA2LEN review. *Allergy*. 2008;63(1):47-57.
30. Banac S, Tomulic KL, Ahel V, Rozmanic V, Simundic N, Zubovic S, i sur. Prevalence of asthma and allergic diseases in Croatian children is increasing: survey study. *Croat Med J*. 2004;45(6):721-6.
31. Kurukulaaratchy RJ, Karmaus W, Arshad SH. Sex and atopy influences on the natural history of rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012;12(1):7-12.
32. Munivrana H, Vorko-Jovic A, Munivrana S, Kursar M, Medlobi-Gluhak M, Vlahek P. The prevalence of allergic diseases among Croatian school children according to the ISAAC Phase One questionnaire. *Med Sci Monit* 2007;13:505-509.
33. Škvorc HM, Plavec D, Munivrana S, Škvorc M, Nogalo B, Turkalj M. Prevalencija simptoma alergijskih bolesti u mlađe školske djece na području međimurske županije (ISAAC faza I). *Liječ Vjesn*. 2014;136(3-4):73-8.
34. Ziyab AH, Raza A, Karmaus W, Tongue N, Zhang H, Matthews S, i sur. Trends in eczema in the first 18 years of life: results from the Isle of Wight 1989 birth cohort study. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(12):1776-84.
35. Munivrana Škvorc H, Plavec D, Munivrana S, Škvorc M, Nogalo B, Turkalj M. Prevalence of and risk factors for the development of atopic dermatitis in schoolchildren aged 12-14 in northwest Croatia. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014;42(2):142-8.
36. Macan J, Kanceljak-Macan B, Milković-Kraus S. Pre-employment Evaluation of Atopy and Contact Sensitisation in the Prevention of Allergy-Related Diseases. *Arh Hig Rada Toksikol* 2002;53:119-24.224.
37. Salam MT, Wenten M, Gilliland FD. Endogenous and exogenous sex steroid hormones and asthma and wheeze in young women. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(5):1001-7.
38. Loza MJ, Foster S, Bleecker ER, Peters SP, Penn RB. Asthma and gender impact accumulation of T cell subtypes. *Respir Res*. 2010;11:103.

39. Holloway JW, Yang IA, Holgate ST. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S81-94.
40. Steinke JW, Rich SS, Borish L. 5. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121Suppl 2:384-7.
41. Portelli MA, Hodge E, Sayers I. Genetic risk factors for the development of allergic disease identified by genome-wide association. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):21-31.
42. van den Oord RA, Sheikh A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2009;339:2433.
43. Ponińska J, Samoliński B, Tomaszewska A i sur. Filaggrin gene defects are independent risk factors for atopic asthma in a Polish population: a study in ECAP cohort. *PLoS One* 2011;6:16933.
44. Greisenegger E, Novak N, Maintz L i sur. Analysis of four prevalent filaggrin mutations (R501X, 2282del4, R2447X and S3247X) in Austrian and German patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24:607-10.
45. Margolis DJ, Apter AJ, Gupta J i sur. The persistence of atopic dermatitis and filaggrin (FLG) mutations in a US longitudinal cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:912-7.
46. Brown SJ, Irvine AD. Atopic eczema and the filaggrin story. *Semin Cutan Med Surg* 2008;27:128-37.
47. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, i sur. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol*. 1998;113(3):401-6.
48. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. 1997;94(7):3195-9.
49. Mekinian A, Tamouza R, Pavy S, Gestermann N, Ittah M, Mariette X, i sur. Functional study of TNF-alpha promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis. *Eur Cytokine Netw.* 2011;22(2):88-102.
50. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24(1):1-8.
51. Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM, i sur. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics.* 2002;54(2):82-6.
52. de Jongh CM, Khrenova L, Kežić S, Rustemeyer T, Verberk MM, John SM. Polymorphisms in the interleukin-1 gene influence the stratum corneum interleukin-1 alpha concentration in uninvolved skin of patients with chronic irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2008;58: 263–268.
53. Kežić S, Visser MJ, Verberk MM. Individual susceptibility to occupational contact dermatitis. *Ind Health* 2009;47:469–478.
54. Albuquerque RV, Hayden CM, Palmer LJ, Laing IA, Rye PJ, Gibson NA, i sur. Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(5):578-84.
55. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988;136:225-44.
56. Almomani B, Hawwa AF, Millership JS, Heaney L, Douglas I, McElnay JC, Shields MD. Can certain genotypes predispose to poor asthma control in children? A pharmacogenetic study of 9 candidate genes in children with difficult asthma. *PLoS One.* 2013;8(4):e60592.
57. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. British guideline on the management of asthma.

Thorax. 2009;63:iv1-iv121.

58. El Bahlawan L, Christensen M, Binaei S, Murphy C, Zhang Q, Quasney M. Lack of association between the tumor necrosis factor- α regulatory region genetic polymorphisms associated with elevated tumor necrosis factor- α levels and children with asthma. *Chest* 2003;123:374S–375S.
59. Beghé B, Padoan M, Moss CT, Barton SJ, Holloway JW, Holgate ST, Howell WM, Mapp CE. Lack of association of HLA class I genes and TNF α -308 polymorphism in toluene diisocyanate-induced asthma. *Allergy*. 2004;59:61–64.
60. Bilollikar H, Nam AR, Rosenthal M, Davies JC, Henderson DC, Balfour-Lynn IM. Tumour necrosis factor gene polymorphisms and childhood wheezing. *Eur Respir J*. 2005;26:637–646.
61. Bucková D, Hollá LI, Vasků A, Znojil V, Vácha J. Lack of association between atopic asthma and the tumor necrosis factor alpha-308 gene polymorphism in a Czech population. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2002;12(3):192-7.
62. Castro-Giner F, Kogevinas M, Imboden M, de Cid R, Jarvis D, Machler M, i sur. Joint effect of obesity and TNFA variability on asthma: two international cohort studies. *Eur Respir J*. 2009;33(5):1003-9.
63. Castro-Giner F, Kogevinas M, Machler M, de Cid R, Van Steen K, Imboden M, i sur. TNFA - 308G>A in two international population-based cohorts and risk of asthma. *Eur Respir J*. 2008;32(2):350-61.
64. Chagani T, Pare PD, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Behbehani NA, i sur. Prevalence of tumor necrosis factor-alpha and angiotensin converting enzyme polymorphisms in mild/moderate and fatal/near-fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):278-82.
65. Cherkashina II, Nikulina SI, Logvinenko NI, Voevoda MI, Maksimov VN, Liberdovskaia ED. [The specific features of TNF-alpha gene polymorphism in asthmatic patients and their relatives]. *Tuberk Biolezn Legkih*. 2009;(8):51-6.

66. Kamali-Sarvestani E, Ghayomi MA, Nekoe A. Association of TNF-alpha -308 G/A and IL-4 -589 C/T gene promoter polymorphisms with asthma susceptibility in the south of Iran. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(6):361-6.
67. National Institutes of Health. Global initiative for asthma. *Natl Heart Lung Blood Inst Publ*. No. 95-3659. Bethesda, MD: NHLBI 1995;6.
68. Lee YL, McConnell R, Berhane K, Gilliland FD. Ambient ozone modifies the effect of tumor necrosis factor G-308A on bronchitic symptoms among children with asthma. *Allergy*. 2009;64(9):1342-8.
69. Li YF, Gauderman WJ, Avol E, Dubeau L, Gilliland FD. Associations of tumor necrosis factor G-308A with childhood asthma and wheezing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(9):970-6.
70. Li Kam Wa TC, Mansur AH, Britton J, Williams G, Pavord I, Richards K, i sur. Association between - 308 tumour necrosis factor promoter polymorphism and bronchial hyperreactivity in asthma. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(9):1204-8.
71. Louis R, Leyder E, Malaise M, Bartsch P, Louis E. Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor alpha-308 polymorphism gene. *Eur Respir J*. 2000;16(4):604-8.
72. Mahdavian SA, Rezaei N, Moradi B, Dorkhosh S, Amirzargar AA, Movahedi M. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Iranian patients with asthma. *J Clin Immunol*. 2009;29(1):57-62.
73. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma- Summary Report 2007.1. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:S94-138.
74. Malerba G, Trabetti E, Patuzzo C, Lauciello MC, Galavotti R, Pescolliderungg L i sur. Candidate genes and a genome-wide search in Italian families with atopic asthmatic children. *Clin Exp Allergy*. 1999;29 Suppl 4:27-30.

75. Melén E, Nyberg F, Lindgren CM, Berglind N, Zucchelli M, Nordling E i sur. Interactions between glutathione S-transferase P1, tumor necrosis factor, and traffic-related air pollution for development of childhood allergic disease. *Environ Health Perspect.* 2008;116(8):1077-84.
76. Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet.* 1997;6(4):551-4.
77. Moffatt MF, James A, Ryan G, Musk AW, Cookson WO. Extended tumour necrosis factor/HLA-DR haplotypes and asthma in an Australian population sample. *Thorax.* 1999;54(9):757-61.
78. Munthe-Kaas MC, Carlsen KL, Carlsen KH, Egeland T, Haland G, Devulapalli CS, i sur. HLA Dr-Dq haplotypes and the TNFA-308 polymorphism: associations with asthma and allergy. *Allergy.* 2007;62(9):991-8.
79. 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. *Eur Respir J.* 1995;8(3):483-91.
80. Tölgyesi G, Keszei M, Ungvári I, Nagy A, Falus A, Szalai C. Involvement of TNFalpha - 308A promoter polymorphism in the development of asthma in children infected with *Chlamydomphila pneumoniae*. *Pediatr Res.* 2006;60(5):543-8.
81. Trabetti E, Patuzzo C, Malerba G, Galavotti R, Martinati LC, Boner AL, i sur. Association of a lymphotoxin alpha gene polymorphism and atopy in Italian families. *J Med Genet.* 1999;36(4):323-5.
82. Trajkov D, Petlichkovski A, Efinanska-Mladenovska O, Hristomanova S, Djulejic E, Kirijas M, i sur. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in Roma from the Republic of Macedonia. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2012;11(4):282-93.
83. National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health. Guidelines for the

- diagnosis and management of asthma. USA, Washington DC: Government Printing Office, 1997.
84. Winchester EC, Millwood IY, Rand L, Penny MA, Kessling AM. Association of the TNF-alpha-308 (G-->A) polymorphism with self-reported history of childhood asthma. *Hum Genet.* 2000;107(6):591-6.
85. Zedan M, Settin A, Farag MK, El-Bayoumi M, El Regal ME, El Baz R, i sur. Gene polymorphisms of tumor necrosis factor alpha-308 and interleukin-10-1082 among asthmatic Egyptian children. *Allergy Asthma Proc.* 2008;29(3):268-73.
86. Zhang Y, Zhang J, Tian C, Xiao Y, He C, Li X, i sur. The -308 G/A polymorphism in TNF-alpha gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis. *J Clin Immunol.* 2011;31(2):174-85.
87. Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T i sur. An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. *J Hum Genet.* 2006;51(8):677-85.
88. Gao J, Shan G, Sun B, Thompson PJ, Gao X. Association between polymorphism of tumour necrosis factor alpha-308 gene promoter and asthma: a meta-analysis. *Thorax.* 2006;61(6):466-71.
89. Melén E, Himes BE, Brehm JM, Boutaoui N, Klanderma B, Sylvia JS, Lasky-Su J. Analyses of shared genetic factors between asthma and obesity in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(3):631-7.e1-8.
90. Krasznai M, Szaniszló K, Kraxner H, Vargha E, Kovacs M, Borocz Z, i sur. Association of TLR-4 and TNF-alpha polymorphisms with clinical symptoms and cytokine levels in patients with allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268(4):561-7.
91. Behniafard N, Gharagozlou M, Farhadi E, Khaledi M, Sotoudeh S, Darabi B, i sur. TNF-alpha single nucleotide polymorphisms in atopic dermatitis. *Eur Cytokine Netw.* 2012;23(4):163-5.
92. Williams HC, Burney PG, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Hunter JJ i sur. The U.K. Working

- Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1994;131(3):383-96.
93. Reich K, Westphal G, König IR, Mossner R, Schupp P, Gutgesell C, i sur. Cytokine gene polymorphisms in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2003;148(6):1237-41.
94. Stavrić K, Peova S, Trajkov D, Spiroski M. Gene polymorphisms of 22 cytokines in Macedonian children with atopic dermatitis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2012;11(1):37-50.
95. Castro J, Tellería JJ, Linares P, Blanco-Quirós A. J Investig Allergol Clin Immunol. Increased TNFA*2, but not TNFB*1, allele frequency in Spanish atopic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2000;10(3):149-54.
96. Hussein PY, Zahran F, Ashour Wahba A, Ahmad AS, Ibrahiem MM, Shalaby SM i sur. Interleukin 10 receptor alpha subunit (IL-10RA) gene polymorphism and IL-10 serum levels in Egyptian atopic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010;20(1):20-6.
97. Karjalainen J, Hulkkonen J, Nieminen MM, Huhtala H, Aromaa A, Klaukka T, i sur. Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating immunoglobulin E in adult asthma. *Clin Exp Allergy.* 2003;33(1):78-83.
98. Movahedi M, Mahdavian SA, Rezaei N, Moradi B, Dorkhosh S, Amirzargar AA. IL-10, TGF-beta, IL-2, IL-12, and IFN-gamma cytokine gene polymorphisms in asthma. *J Asthma.* 2008;45(9):790-4.
99. Hyun MH, Lee CH, Kang MH, Park BK, Lee YH. Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis *PLoS One.* 2013;8(1):e53758.
100. Lacy K, Archer C, Wood N, Bidwell J. Association between a common IL10 distal promoter haplotype and IgE production in individuals with atopic dermatitis. *Int J Immunogenet.* 2009;36:213–216.

101. Lesiak A, Zakrzewski M, Przybyłowska K, Rogowski-Tylman M, Wozniacka A, Narbutt J. Atopic dermatitis patients carrying G allele in –1082 G/A IL-10 polymorphism are predisposed to higher serum concentration of IL-10. *Arch Med Sci.* 2014;10:1239–1243.
102. Behniafard N, Gharagozlou M, Sotoudeh S, Farhadi E, Khaledi M, Moghaddam ZG i sur. Association of single nucleotide polymorphisms of interleukin-1 family with atopic dermatitis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2014;42(3):212-5.
103. Noal RB, Menezes AM, Macedo SE, Dumith SC. Childhood body mass index and risk of asthma in adolescence: a systematic review. *Obes Rev.* 2011;12(2):93-104.
104. Kattan M, Kumar R, Bloomberg GR, Mitchell HE, Calatroni A, Gergen PJ, i sur. Asthma control, adiposity, and adipokines among inner-city adolescents. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(3):584-92.
105. Guerra S, Wright AL, Morgan WJ, Sherrill DL, Holberg CJ, Martinez FD. Persistence of asthma symptoms during adolescence: role of obesity and age at the onset of puberty. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(1):78-85.
106. Kwon HL, Ortiz B, Swaner R, Shoemaker K, Jean-Louis B, Northridge ME, i sur. Childhood asthma and extreme values of body mass index: the Harlem Children's Zone Asthma Initiative. *J Urban Health.* 2006;83(3):421-33.
107. Carlsten C, Melen E. Air pollution, genetics, and allergy: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012;12(5):455-60.
108. Stapleton M, Howard-Thompson A, George C, Hoover RM, Self TH. Smoking and asthma. *J Am Board Fam Med.* 2011;24(3):313-22.
109. Weinmayr G, Romeo E, De Sario M, Weiland SK, Forastiere F. Short-term effects of PM10 and NO2 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.
110. 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):e18574.
111. Crinnion WJ. Do environmental toxicants contribute to allergy and asthma? *Altern Med Rev*. 2012;17(1):6-18.
112. Gehring U, Wijga AH, Brauer M, Fischer P, de Jongste JC, Kerkhof M, i sur. Traffic-related air pollution and the development of asthma and allergies during the first 8 years of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(6):596-603.
113. Lee YL, Shaw CK, Su HJ, Lai JS, Ko YC, Huang SL, i sur. Climate, traffic-related air pollutants and allergic rhinitis prevalence in middle-school children in Taiwan. *Eur Respir J*. 2003;21(6):964-70.
114. Nordling E, Berglind N, Melen E, Emenius G, Hallberg J, Nyberg F, i sur. Traffic-related air pollution and childhood respiratory symptoms, function and allergies. *Epidemiology*. 2008;19(3):401-8.
115. Morgenstern V, Zutavern A, Cyrys J, Brockow I, Koletzko S, Kramer U, i sur. Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(12):1331-7.
116. Lindgren A, Bjork J, Stroh E, Jakobsson K. Adult asthma and traffic exposure at residential address, workplace address, and self-reported daily time outdoor in traffic: A two-stage case-control study. *BMC Public Health*. 2010;10:716.
117. Lawson JA, Dosman JA, Rennie DC, Beach J, Newman SC, Senthilselvan A. The association between endotoxin and lung function among children and adolescents living in a rural area. *Can Respir J*. 2011;18(6):e89-94.
118. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, i sur. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 2011;364(8):701-9.

119. Yarnell JW, Stevenson MR, MacMahon J, Shields M, McCrum EE, Patterson CC, i sur. Smoking, atopy and certain furry pets are major determinants of respiratory symptoms in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Study (Ireland). *Clin Exp Allergy*. 2003;33(1):96-100.
120. Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I, Charpin D, Kauffmann F. Allergy markers in adults in relation to the timing of pet exposure: the EGEA study. *Allergy*. 2003;58(11):1136-43.
121. Apelberg BJ, Aoki Y, Jaakkola JJ. Systematic review: Exposure to pets and risk of asthma and asthma-like symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(3):455-60.
122. Bornehag CG, 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.
123. Pelucchi C, Galeone C, Bach JF, La Vecchia C, Chatenoud L. Pet exposure and risk of atopic dermatitis at the pediatric age: a meta-analysis of birth cohort studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):616-22.e7.
124. Brunekreef B, Von Mutius E, Wong G, Odhiambo J, Garcia-Marcos L, Foliaki S. Exposure to cats and dogs, and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema. *Epidemiology*. 2012;23(5):742-50.
125. Alm B, Aberg N, Erdes L, Mollborg P, Pettersson R, Norvenius SG, i sur. Early introduction of fish decreases the risk of eczema in infants. *Arch Dis Child*. 2009;94(1):11-5.
126. Yang IA, Holz O, Jörres RA, Magnussen H, Barton SJ, Rodríguez S i sur. Association of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and ozone-induced change in lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(2):171-6.
127. Wu CC, Chen RF, Kuo HC. Different implications of paternal and maternal atopy for perinatal IgE production and asthma development. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:132142.
128. Sabolić Pipinić I, Varnai VM, Turk R, Breljak D, Kežić S, Macan J. Low frequency of filaggrin null mutations in Croatia and their relation with allergic diseases. *Int J*

- Immunogenet. 2013;40(3):192-8.
129. Helgesson G, Dillner J, Carlson J, Bartram CR, Hansson MG. Ethical framework for previously collected biobank samples. *Nat Biotechnol.* 2007;25:973–976.
130. McGuire AL, Beskow LM. Informed consent in genomics and genetic research. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11:361–381.
131. Dreborg S, Frew A. Position paper - Allergen standardization and skin tests. *Allergy.* 1993;48(14 Suppl S):49-82.
132. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, i sur. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy.* 2012;67:18–24.
133. 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.
134. Aberer W, Kränke B. Measurement of IgE antibodies using liquid allergens--an inter-method and inter-laboratory quality assessment. *Wien Klin Wochenschr* 2002;114(21-22):929-37.
135. Landeck L, Visser M, Kežić S, John SM. Impact of tumour necrosis factor- α polymorphisms on irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 2012;66:221–227.
136. Landeck L, Visser M, Kežić S, John SM. IL1A –889 C/T gene polymorphism in irritant contact dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27:1040–1043.
137. Gudelj I, Mrkić Kobal I, Munivrana Škvorc H, Miše K, Vrbica Z, Plavec D, Tudorić N. Intraregional differences in asthma prevalence and risk factors for asthma among adolescents in Split-Dalmatia County, Croatia. *Med Sci Monit.* 2012;18(4):PH43-50.
138. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H; ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat

- multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368(9537):733-43.
- 139.Lee YL, Hsiue TR, Lee CH, Su HJ, Guo YL. Home exposures, parental atopy, and occurrence of asthma symptoms in adulthood in southern Taiwan. *Chest*. 2006;129(2):300-8.
- 140.Sultesz M, Katona G, Hirschberg A, Galffy G. Prevalence and risk factors for allergic rhinitis in primary schoolchildren in Budapest. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2010;74(5):503-9.
- 141.Wang TN, Chao YY, Wang TH, Chen CJ, Ko YC. Familial risk of asthma among adolescents and their relatives in Taiwan. *J Asthma*. 2001;38(6):485-94.
- 142.Dold S, Wjst M, von Mutius E, Reitmeir P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child*. 1992;67(8):1018-22.
- 143.Ronmark E, Perzanowski M, Platts-Mills T, Lundback B. Four-year incidence of allergic sensitization among schoolchildren in a community where allergy to cat and dog dominates sensitization: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Study Group. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(4):747-54.
- 144.Collin SM, Granell R, Westgarth C, Murray J, Paul E, Sterne JA, i sur. Pet ownership is associated with increased risk of non-atopic asthma and reduced risk of atopy in childhood: findings from a UK birth cohort. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):200-10.
- 145.Fretzayas A, Kotzia D, Moustaki M. Controversial role of pets in the development of atopy in children. *World J Pediatr*. 2013;9(2):112-9.
- 146.Biagini Myers JM, Wang N, LeMasters GK, Bernstein DI, Epstein TG, Lindsey MA, i sur. Genetic and environmental risk factors for childhood eczema development and allergic sensitization in the CCAAPS cohort. *J Invest Dermatol*. 2010;130(2):430-7.
- 147.Wegienka G, Johnson CC, Havstad S, Ownby DR, Nicholas C, Zoratti EM. Lifetime dog and cat exposure and dog- and cat-specific sensitization at age 18 years. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(7):979-86.

- 148.Schwartz JD, Katz SA, Fegley RW, Tockman MS. Analysis of spirometric data from a national sample of healthy 6- to 24-year-olds (NHANES II). *Am Rev Respir Dis.* 1988;138(6):1405-14.
- 149.Pistelli R, Brancato G, Forastiere F, Michelozzi P, Corbo GM, Agabiti N, i sur. Population values of lung volumes and flows in children: effect of sex, body mass and respiratory conditions. *Eur Respir J.* 1992;5(4):463-70.
- 150.Postma DS. Gender differences in asthma development and progression. *Gend Med.* 2007;4 Suppl B:S133-46.
- 151.Zanolin ME, Pattaro C, Corsico A, Bugiani M, Carrozzi L, Casali L, i sur. The role of climate on the geographic variability of asthma, allergic rhinitis and respiratory symptoms: results from the Italian study of asthma in young adults. *Allergy.* 2004;59(3):306-14.
- 152.Suarez-Varela MM, Garcia-Marcos Alvarez L, Kogan MD, Gonzalez AL, Gimeno AM, Aguinaga Ontoso I, i sur. Climate and prevalence of atopic eczema in 6- to 7-year-old school children in Spain. ISAAC phase III. *Int J Biometeorol.* 2008;52(8):833-40.
- 153.Macan J, Kanceljak B, Plavec D, Milković-Kraus S. Differences in mite fauna between the continental and Mediterranean climates of Croatia: microscopy and Dustscreen test findings. *Allergy.* 2003;58(8):780-783.
- 154.Blomeke B, Brans R, Dickel H, Bruckner T, Erdmann S, Heesen M, i sur. Association between TNFA-308 G/A polymorphism and sensitization to para-phenylenediamine: a case-control study. *Allergy.* 2009;64(2):279-83.
- 155.Uboldi de Capei MU, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtoni ES. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *Eur J Immunogenet.* 2003;30:5–10.
- 156.Hulkkonen J, Laippala P, Hurme M. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1b plasma levels in healthy individuals. *Eur*

Cytokine Netw. 2000;11:251–255.

157. Zhuang L, Ma W, Cai D, Zhong H, Sun Q. Associations between tumor necrosis factor- α polymorphisms and risk of psoriasis: a metaanalysis. *PLoS One*. 2013;8:e68827.
158. Nie G, Qi JH, Huang CW, Yang T, Shi N, Chen YJ. Meta-analysis of the TNF- α –308G/A polymorphism and vitiligo risk. *Genet Mol Res* 2015;14:17296–17304.
159. Davis JA, Visscher MO, Wickett RR, Hoath SB. Influence of tumour necrosis factor- α polymorphism-308 and atopy on irritant contact dermatitis in healthcare workers. *Contact Dermatitis*. 2010;63:320–332.
160. Westphal GA, Schnuch A, Moessner R, König IR, Kranke B, Hallier E, i sur. Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 2003;48:93–98.
161. Hasannejad H, Takahashi R, Kimishima M, Hayakawa K, Shiohara T. Selective impairment of Toll-like receptor 2-mediated proinflammatory cytokine production by monocytes from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:69–75.
162. Lebre MC, van Capel TM, Bos JD, Knol EF, Kapsenberg ML, de Jong EC. Aberrant function of peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;22:969–976.
163. Takahashi T, Sasaki Y, Hama K, Furue M, Ishibashi Y. Production of IL-4, IL-2, IFN- γ , and TNF- α by peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 1992;3:172–180.
164. Jeong CW, Ahn KS, Rho NK, Park YD, Lee DY, Lee JH, Lee ES, Yang JM. Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1717–1724.
165. Chen YC, Liu SF, Chin CH, Wu CC, Chen CJ, Chang HW, i sur. Association of tumor necrosis factor-alpha-863C/A gene polymorphism with chronic obstructive pulmonary

disease. *Lung*. 2010;188(4):339-47.

166. Sakao S, Tatsumi K, Igari H, Shino Y, Shirasawa H, Kuriyama T. Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):420-2.
167. Tarigan AP, Syafiuddin T, Yunus F, Suradi. Association of Tumor Necrosis Factor Alpha and Lymphotoxin Alpha Gene Polymorphisms with the Presence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Acta Med Indones*. 2015;47(4):283-90
168. Higham MA, Pride NB, Alikhan A, Morrell NW. Tumour necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2000;15(2):281-4.
169. Ruse CE, Hill MC, Tobin M, Neale N, Connolly MJ, Parker SG, et al. Tumour necrosis factor gene complex polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2007;101(2):340-4.
170. Tanaka G, Sandford AJ, Burkett K, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, et al. Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms and lung function in smokers. *Eur Respir J*. 2007;29(1):34-41.
171. Ozdogan N, Tutar N, Demir R, Saatci C, Kanbay A, Buyukoglan H. Is TNF-alpha gene polymorphism related to pulmonary functions and prognosis as determined by FEV1, BMI, COPD exacerbation and hospitalization in patients with smoking-related COPD in a Turkish population? *Rev Port Pneumol*. 2014;20(6):305-10.
172. Sandford AJ, Chagani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):469-73.
173. Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic

- bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(5):1436-9.
174. Pahwa P, Nakagawa K, Koehncke N, McDuffie HH. Effects of polymorphic variations in tumor necrosis factor alpha and occupational exposure to grain dust on longitudinal decline in pulmonary function. *J Agromedicine.* 2009;14(2):215-21.
175. Kurniawidjaja LM. Silicosis and its progress influenced by genetic variation on TNF-alpha locus- 308, TNF-alpha and IL-10 cytokine on cement factory workers in Indonesia. *Pak J Biol Sci.* 2014;17(3):419-23.
176. Vasakova M, Striz I, Slavcev A, Jandova S, Dutka J, Terl M i sur. Correlation of IL-1alpha and IL-4 gene polymorphisms and clinical parameters in idiopathic pulmonary fibrosis. *Scand J Immunol.* 2007;65(3):265-70.
177. Bodtger U, Assing K, Poulsen LK. A prospective, clinical study on asymptomatic sensitisation and development of allergic rhinitis: high negative predictive value of allergological testing. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;155(3):289-96.
178. Bodtger U. Prognostic value of asymptomatic skin sensitization to aeroallergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4(1):5-10.
179. Bodtger U, Poulsen LK, Malling HJ. Asymptomatic skin sensitization to birch predicts later development of birch pollen allergy in adults: a 3-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(1):149-54.
180. Arshad SH, Tariq SM, Matthews S, Hakim E. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years: a whole population birth cohort study. *Pediatrics.* 2001;108(2):E33.
181. Lowe AJ, Hosking CS, Bennett CM, Carlin JB, Abramson MJ, Hill DJ, i sur. Skin prick test can identify eczematous infants at risk of asthma and allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2007;37(11):1624-31.

182. Rouhos A, Kainu A, Karjalainen J, Lindqvist A, Piirila P, Sarna S, i sur. Atopic sensitization to common allergens without symptoms or signs of airway disorders does not increase exhaled nitric oxide. *Clin Respir J*. 2008;2(3):141-8.
183. Moody A, Fergusson W, Wells A, Bartley J, Kolbe J. Increased nitric oxide production in the respiratory tract in asymptomatic pacific islanders: an association with skin prick reactivity to house dust mite. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(5):895-9.
184. Jensen BM, Assing K, Hummelshoj L, Glue C, Skov PS, Poulsen LK. Are basophil histamine release and high affinity IgE receptor expression involved in asymptomatic skin sensitization? *Allergy*. 2006;61(3):303-10.
185. Fuiano N, Fusilli S, Passalacqua G, Incorvaia C. Allergen-specific immunoglobulin E in the skin and nasal mucosa of symptomatic and asymptomatic children sensitized to aeroallergens. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(5):425-30.
186. Dor-Wojnarowska A, Liebhart J, Miecielica J, Rabski M, Fal A, Samolinski B, i sur. The Impact of Sex and Age on the Prevalence of Clinically Relevant Sensitization and Asymptomatic Sensitization in the General Population. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016.
187. McGlashan TH, Carpenter WT Jr, Bartko JJ. Issues of design and methodology in long-term followup studies. *Schizophr Bull*. 1988;14(4):569-74. Review.
188. Michie S, Marteau T. Non-response bias in prospective studies of patients and health care professionals. *Int J Soc Res Methodol*. 1999;2(3):203-212.
189. Booker CL, Harding S, Benzeval M. A systematic review of the effect of retention methods in population-based cohort studies. *BMC Public Health*. 2011;11:249.
190. Babić Ž, Sabolić Pipinić I, Varnai VM, Kežić S, Macan J. Associations of TNF α -308G>A, TNF α -238G>A, IL-1 α -889C>T and IL-10 -1082G>A Genetic Polymorphisms with Atopic

Diseases: Asthma, Rhinitis and Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;169(4):231-40.

11. KRATKA BIOGRAFIJA

Željka Babić rođena je 13.4.1987. u Zagrebu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završila je u Kutini. Studirala je farmaciju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, diplomirala je 2011. Iste godine zaposlila se kao znanstveni novak u Jedinici za medicine rada i okoliša Instituta za medicinska istraživanja i medicine rada (IMI) u Zagrebu gdje radi do danas. Uz znanstvene obveze sudjeluje u stručnom radu Centra za kontrolu otrovanja IMI-ja. Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2012.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Babić Ž, Sabolić Pipinić I, Varnai VM, Kežić S, Macan J. Associations of TNF α -308G>A, TNF α -238G>A, IL-1 α -889C>T and IL-10 -1082G>A Genetic Polymorphisms with Atopic Diseases: Asthma, Rhinitis and Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;169(4):231-40.
2. Samardžić T, Varnai VM, Bakotić M, Babić Ž, Brans R, Cvijetić Avdagić S, Štampar Šmaguc D, Kovačević I, Macan J. Skin health and safety at work in Croatian hairdressing apprentices. *Contact Dermatitis.* 2016;75(1):25-31.
3. Babić Ž, Tariba B, Kovačić J, Pizent A, Varnai VM, Macan J. Relevance of serum copper elevation induced by oral contraceptives: a meta-analysis. *Contraception.* 2013;87(6):790-800.
4. Babić Z, Crkvenčić M, Rajić Z, Mikecin AM, Kralj M, Balzarini J, Petrova M, Vanderleyden J, Zorc B. New sorafenib derivatives: synthesis, antiproliferative activity against tumour cell lines and antimetabolic evaluation. *Molecules.* 2012;17(1):1124-37.

Druge vrste radova:

1. Kovačić J, Babić Ž, Turk R. Report of the Poison Control Centre for the period from 1 January to 31 December 2014. *Arh Hig Rada Toksikol* 2015;66:91-95.
2. Kovačić J, Babić Ž, Turk R. Report of the Poison Control Centre for the period from 1 January to 31 December 2013. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014;65:133-138.
3. Varnai VM, Babić Ž, Turk R. Report of the Poison Control Centre for the period from 1 January to 31 December 2012. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013;64:183-188.

4. Babić Ž, Kovačić J, Varnai VM, Turk R. Report of the Poison Control Centre for the period from 1 January to 31 December 2011. Arh Hig Rada Toksikol 2012;63:101-106.

Usmeno priopćenje na skupovima s međunarodnom recenzijom:

Priopćenje “Skin health and safety at work in Croatian hairdressing and beautician apprentices” prezentirano na kongresu “Occupational and Environmental Exposure of Skin to Chemicals (OEESC)”, 19.-21.9.2016, Manchester, UK.

PRILOG 1. PREGLED LITERATURNIH PODATAKA

Pregled istraživanja povezanosti genskog polimorfizma TNF- α -308 G>A i atopijskih bolesti

Istraživanje (prvi autor, godina)	Bolest	Opis bolesti	Kontrolni ispitanici	Dob ispitanika (ukupno ili bolesnici/kontrola)	Broj bolesnika/kontrolnih ispitanika	Kontrolirani čimbenici osobne osjetljivosti, načina života i okoliša	Povezanost genskog polimorfizma TNF-α -308 G>A s bolešću
Albuquerque i sur., 1998⁵⁴	Atopijska astma	Teška simptomatska astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju ATS kriterija ⁵⁵ . Atopija definirana pozitivnim SPT-om (>2 mm) na bar jedan inhalacijski alergen.	Bez osobne ili obiteljske amamneze astme, ekcema ili peludne groznice.	6-12 god. / 6-12 god.	74/50	Dob, spol, pušački status roditelja	Smanjen rizik atopijske astme
Almomani i sur., 2013⁵⁶	Astma	Teška astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju BTS smjernica ⁵⁷ .	Ispitanici s blagom do umjerenom astmom temeljem BTS smjernica	1-16 god./ 2-16 god.	112/68	-	Smanjen rizik astme
El Bahlawan i sur., 2003⁵⁸	Astma	Nije opisano	Nije prijavljeno	Djeca	38/231	-	Bez povezanosti s astmom
Beghe i sur., 2004⁵⁹	Astma vezana uz rad	Astma dijagnosticirana od strane liječnika, astmatski simptomi se javljaju nakon izloženosti toluen diizocijanatu (TDI-u). Atopija definirana pozitivnim SPT-om na uobičajene inhalacijske alergene	Asimptomatski ispitanici izloženi TDI-u	45,3±1,0 god./ 38,1 ± 1,6 god.	142/50	Trajanje izloženosti TDI-u, početak simptoma, dob, pušački status	Bez povezanosti s astmom vezanom uz rad
Bilolikar i sur., 2005⁶⁰	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika.	Bez astme	2-17 god. / 8-12 god.	115/156	-	Povećan rizik astme
Bučkova i sur., 2002⁶¹	Atopijska astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju ATS	Bez simptoma atopijskih, plućnih ili	26±12 god./	151/155	-	Bez povezanosti s atopijskom

		kriterija ⁵⁵ . Atopija definirana pozitivnim SPT-om (≥ 3 mm) i/ili povišenim specifičnim IgE $>0,35$ kU/l na barem jedan inhalacijski alergen.	kožnih bolesti i bez obiteljske anamneze astme i atopije	32,8 \pm 11,0 god.			astmom
Castro-Giner i sur., 2009⁶²	Astma	Astma definirana na temelju upitnika. Atopija definirana pozitivnim SPT-om na barem jedan inhalacijski alergen.	Bez simptoma atopijskih, plućnih ili kožnih bolesti i bez obiteljske anamneze astme i atopije.	36.3 \pm 8.8 god./ 36.5 \pm 8.9 god.	558/ 8588	Država/područje istraživanja, spol, dob, pušački status	Povećan rizik neatopijske astme, bez povezanosti s atopijskom astmom
Castro-Giner i sur., 2008⁶³	Astma	Astma definirana na temelju upitnika. Atopija definirana pozitivnim SPT-om na barem jedan inhalacijski alergen.	Bez simptoma atopijskih, plućnih ili kožnih bolesti i bez obiteljske anamneze astme i atopije.	18-60 god.	572/9781	Država/područje istraživanja, spol, dob, pušački status, BMI	Povećan rizik astme, bez povezanosti s atopijskim statusom
Chagani i sur., 1999⁶⁴	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika, težina procijenjena na temelju vrijednosti plućnih parametara, propisane terapije i dotadašnjih hospitalizacija	Bez astme i atopije, bez osobne ili obiteljske anamneze astme ili alergija	<50 god.	251/43	-	Povećan rizik teške/smrtno astme i umjerene astme, bez povezanosti s blagom astmom.
Cherkashina i sur., 2009⁶⁵	Astma	-	-	-	89/258	-	Bez povezanosti s astmom
Kamali-Sarvestani i sur., 2007⁶⁶	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju GINA smjernica ⁶⁷ .	Zdravi neastmatičari normalnih spirometrijskih parametara bez osobne ili obiteljske anamneze astme i alergijskih bolesti.	15-79 god./ odrasli	203/113	Spol	Bez povezanosti s astmom
Lee i sur., 2009⁶⁸	Astma	Astma definirana na temelju upitnika.	Bez astme	8 -12 god.	548/3009	Spol, dob, rasa, pasivno pušenje, prebivalište, razina ozona u zraku na	Povećan rizik za astmu kod djece izložene niskim razinama ozona,

						mjestu prebivališta (prosjeak dnevnih mjerenja 1994-1996. god.)	bez povezanosti kod djece izložene visokim razinama ozona
Li i sur., 2006 ⁶⁹	Astma, sipljenje	Astma i sipljenje definirani na temelju upitnika.	Kontrola za astmu: ispitanici bez astme, kontrola za sipljenje: ispitanici bez sipljenja.	8-18 god.	Astma: 551 /3064 Sipljenje: 1222/2285	Gestacijska dob, težina nakon rođenja, rasa, školovanje roditelja, pokrivenost zdravstvenim osiguranjem, pušački status majke u trudnoći, pasivno pušenje u trudnoći, obiteljska anamneza astme i alergija, razine ozona u zraku na mjestu prebivališta (prosjeak dnevnih mjerenja 1995. god.)	Povećan rizik astme bez obzira na razinu ozona, povećan rizik sipljenja kod djece izložene niskim razinama ozona, bez povezanosti kod djece izložene visokim razinama ozona
Li Kam Wa i sur., 1999 ⁷⁰	Bronhalna hiper-reaktivnost, atopija	Bronhalna hiper-reaktivnost (BHR) na metakolin, atopija definirana pozitivnim SPT na barem jedan inhalacijski alergen	Ispritanici bez BHR i atopije	18-70 god.	314 (BHR), 319 (atopičari)/201 (kontrola)	-	Bez povezanosti s BHR i atopijom
Louis i sur., 2000 ⁷¹	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju simptoma, povijesti bolesti, bronhalne hiper-reaktivnosti i pozitivnog BT-a. Atopija definirana pozitivnim SPT (≥ 3 mm) na barem jedan	Zdravstveni djelatnici ili darivatelji krvi bez anamneze astme.	17-74 god. /19-58 god.	95/98	-	Bez povezanosti s astmom.

		inhalacijski alergen.					
Mahdaviani i sur., 2009⁷²	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju NAEPP smjernica ⁷³ .	Zdravi darivatelji krvi	1,5-33 god./ nije prijavljeno	60/140	-	Povećan rizik astme
Malerba i sur., 1999⁷⁴	Atopijska astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju ATS kriterija ⁵⁵ . Atopija definirana pozitivnim SPT-om na barem jedan inhalacijski alergen i/ili povišenim vrijednostima ukupinog IgE	Ispitanici bez atopijske astme	Djeca i odrasli	Ukupno 1083, neprijavljen točan broj bolesnika i kontrola	-	Bez povezanosti s atopijskom astmom
Melen i sur., 2008⁷⁵	Astma	Astma i epizode sipljenja definirane na temelju upitnika. Senzibilizacija definirana povišenim vrijednostima specifičnih IgE $\geq 0,35$ kU/l na inhalacijske i nutritivne alergene.	Ispitanici bez sipljenja i astme.	4 god. / 4 god.	542 / 542	Spol, izloženost NOx iz prometa, mjesto stanovanja, socioekonomski status, obiteljska anamneza alergijskih bolesti, pušenje tijekom trudnoće, pasivno pušenje nakon rođenja, godina izgradnje prebivališta, vlaga ili plijesan u domu u vrijeme rođenja	Povećan rizik astme, sipljenja i senzibilizacije
Moffat i sur., 1997⁷⁶	Astma	Astma definirana na temelju upitnika.	Bez astme	5–51 god.	92/318	-	Smanjen rizik astme
Moffat i sur., 1999⁷⁷	Astma	Astma definirana na temelju upitnika.	Bez astme	5–55 god.	179/825	Dob, spol, pušački status	Povećan rizik astme
Munthe-Kaas i sur., 2007⁷⁸	Astma	Astma definirana ispunjavanjem dva od tri kriterija: -prijava simptoma astme	Bez astme	8-13 god.	268/630	-	Povećan rizik nealergijske astme, bez povezanosti s alergijskom

		putem ISAAC upitnika ⁷⁹ -astma dijagnosticirana od strane liječnika -korištenje lijekova za astmu Alergijska senzibilizacija definirana pozitivnim SPT-om (≥ 3 mm) na barem jedan inhalacijski ili nutritivni alergen					astmom i SPT statusom
Tolgyesi i sur., 2006 ⁸⁰	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju GINA smjerica ⁶⁷ . Atopija definirana pozitivnim SPT-om (>3 mm) ili povišenim vrijednostima ukupnog ili specifičnih IgE ($>0,35$ kU/l) na barem jedan inhalacijski ili nutritivni alergen	Pacijenti s blagim muskuloskeletnim poremećajima regrutirani s ortopedskog odjela	3–18 god.	144/174	Dob, spol, protutijela na <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Povećan rizik astme uz prisutnost protutijela na <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
Trabetti i sur., 1999 ⁸¹	Atopijska astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju ATS kriterija ⁵⁵ . Atopija definirana pozitivnim SPT-om na barem jedan inhalacijski alergen ili povišenim ukupnim IgE.	Ispitanici bez astme	Djeca i odrasli	221/176	-	Bez povezanosti s astmom i atopijskim statusom
Trajkov i sur., 2008 ⁸²	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju NIH kriterija ⁸³ .	Ispitanici bez astme i obiteljske anamneze astme	37-59 god./ 37-59 god.	74/301	Dob, spol	Bez povezanosti s astmom
Winchester i sur., 2000 ⁸⁴	Astma	Astma u djetinjstvu definirana na temelju upitnika.	Bez osobne ili obiteljske anamneze astme	Odrasli	20/416	Spol (sve ispitanice su žene)	Povećan rizik astme
Zedan i sur., 2008 ⁸⁵	Alergijska astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju GINA smjernica ⁶⁷ . Alergija	Zdravi dobrovoljci bez obiteljske anamneze astme	2- 13 god./ adolescenti	69/98	Pasivno pušenje, spol, obiteljska anamneza astme	Smanjen rizik astme

		utvrđena kožnim testiranjem i mjerenjem specifičnih IgE					
Zhang i sur., 2011⁸⁶ meta-analiza	Astma	Kriteriji uključivanja bili su: -studije slučajeva i kontrola -određivanje povezanosti polimorfizma TNF- α -308G>A s rizikom astme -genotipovi kontrolnih skupina studija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži	-	Djeca i odrasli	Studije na bijelcima, ukupno: 736/1098	Rasa, dob	Bez povezanosti s astmom kod bijelaca
Aoki i sur., 2006⁸⁷ meta analiza	Astma	Kriteriji uključivanja bili su: -studije slučajeva i kontrola -ispitanici asmaticari -genotipizacija polimorfizma TNF- α -308G>A -prijavljenje frekvencije genotipova	-	Djeca i odrasli	Studije na bijelcima, ukupno: 374/818	Rasa	Povećan rizik astme kod bijelaca
Gao i sur., 2006⁸⁸ meta analiza	Astma	Kriteriji uključivanja studija s TNF- α -308G>A bili su: -studije slučajeva i kontrola -promatrani ishod astma	-	Djeca i odrasli	Ukupno: 2409/3266	-	Povećan rizik astme
Melen i sur., 2010⁸⁹ GWAS	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika	Bez astme	5-12 god.	359/846	-	Bez povezanosti
Krasnai i sur., 2011⁹⁰	Alergijski rinitis	Alergijski rinitis dijagnosticiran od strane liječnika u trajanju najmanje 4 godine, pozitivan SPT na pelud ambrozije	Zdravi ispitanici bez alergije i bez pozitivne obiteljske alergološke anamneze	35,91 \pm 1,40 god./ 36,40 \pm 7,11 god.	66/161	-	Smanjen rizik alergijskog rinitisa
Behniafard i sur., 2012⁹¹	Atopijski dermatitis	Umjeren do teški atopijski dermatitis dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanifin i Rajka ⁹²	Zdravi ispitanici bez atopije	Djeca starija od 6 mj..	89/137	-	Smanjen rizik atopijskog dermatitisa
Reich i sur., 2003⁹³	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju Hanifin i	Zdravi darivatelji krvi bez osobne ili	6–63 god./ 18–82 god.	94/214	-	Bez povezanosti s atopijskim

		Rajka kriterija ⁹²	obiteljske anamneze atopijskih bolesti				dermatitisom
Stavrić i sur., 2012⁹⁴	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanafin i Rajka ⁹²	Zdravi ispitanici bez obiteljske anamneze atopije	6 mj. -5 god.	67/301	Dob, spol	Bez povezanosti s atopijskim dermatitisom
Castro i sur., 2000⁹⁵	Atopija	-	-	-	65/60	-	Povećan rizik atopije
Pregled istraživanja povezanosti genskog polimorfizma TNF-α -238 G>A i atopijskih bolesti							
Istraživanje (prvi autor i sur., godina)	Bolest	Definicija bolesti	Kontrolni ispitanici	Dob ispitanika (ukupno ili bolesnici/kontrola)	Broj bolesnika/kontrolnih ispitanika	Kontrolirani čimbenici osobne osjetljivosti, načina života i okoliša	Povezanost genskog polimorfizma TNF-α -238 G>A s bolešću
Mahdavian i sur., 2009⁷²	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju NAEPP smjernica ⁷³	Zdravi darivatelji krvi	1,5-33 god./ nije prijavljeno	60/140	-	Povećan rizik astme
Trajkov i sur., 2008⁸²	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju NIH kriterija ⁸³ .	Ispitanici bez astme i obiteljske anamneze astme	37-59 god./ 37-59 god.	74/301	Dob, spol	Povećan rizik astme
Krasnai i sur., 2011⁹⁰	Alergijski rinitis	Alergijski rinitis dijagnosticiran od strane liječnika u trajanju najmanje 4 godine, pozitivan SPT na pelud ambrozije	Zdravi ispitanici bez alergije i bez pozitivne obiteljske alergološke anamneze	35,91 \pm 1,40 god./ 36,40 \pm 7,11 god.	66/161	-	Povećan rizik alergijskog rinitisa
Behniafard i sur., 2012⁹¹	Atopijski dermatitis	Umjeren do teški atopijski dermatitis dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanafin i Rajka ⁹²	Zdravi ispitanici bez atopije	Djeca starija od 6 mj..	89/137	-	Smanjen rizik atopijskog dermatitisa
Reich i sur., 2003⁹³	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanafin i Rajka ⁹²	Zdravi darivatelji krvi bez osobne ili obiteljske anamneze atopijskih bolesti	6-63 god./ 18-82 god.	94/214	-	Bez povezanosti s atopijskim dermatitisom
Stavrić i sur., 2012⁹⁴	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija	Zdravi ispitanici bez obiteljske anamneze	6 mj. -5 god.	67/301	Dob, spol	Bez povezanosti s atopijskim

		po Hanifin i Rajka ⁹²	atopije				dermatitsom
Pregled istraživanja povezanosti genskog polimorfizma IL10 -1082G>A i atopijskih bolesti							
Istraživanje (prvi autor i sur., godina)	Bolest	Definicija bolesti	Kontrolni ispitanici	Dob ispitanika (ukupno ili bolesnici/kontrola)	Broj bolesnika/kontrolnih ispitanika	Kontrolirani čimbenici osobne osjetljivosti, načina života i okoliša	Povezanost genskog polimorfizma IL-10 -1082 G>A s bolešću
Hussein i sur., 2010⁹⁶	Atopijska i neatopijska astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju ATS kriterija ⁵⁵ . Atopija definirana pozitivnim SPT-om (≥ 3 mm) na barem jedan inhalacijski alergen.	Pacijenti bez atopijskih ili respiracijskih poremećaja, normalnog ukupnog IgE, plućnih parametara i bez bronhalne hiperreaktivnosti	8,6 ± 2,5 (atopijska astma), 8,7 ± 3 (neatopijska astma) / 10,5 ± 2,3 (kontrola)	110 (atopijska astma), 110 (neatopijska astma) / 110 (kontrola)	-	Povećan rizik atopijske i neatopijske astme
Karjalainen i sur., 2003⁹⁷	Astma	Trajna astma dijagnosticirana od strane liječnika.	Ispitanici bez astme ili kronične opstruktivne plućne bolesti izabrani iz opće populacije preko nacionalnog registra	59±11 god./ 60±11 god.	245/405	Dob, spol, prebivalište	Bez povezanosti s astmom
Movahedi i sur., 2008⁹⁸	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju NAEPF smjernica ⁷³ .	Zdravi dobrovoljni davatelji krvi	Djeca/nije prijavljeno	60/140	Dob, spol	Povećan rizik astme
Zedan i sur., 2008⁸⁵	Alergijska astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju GINA smjernica ⁶⁷ . Alergija utvrđena kožnim testiranjem i mjerenjem specifičnog IgE	Zdravi dobrovoljci bez obiteljske anamneze astme	2- 13 god./ adolescenti	69/98	Pasivno pušenje, spol, obiteljska anamneza astme	Smanjen rizik alergijske astme
Trajkov i sur., 2008⁸²	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju	Ispitanici bez astme i obiteljske anamneze	37-59 god./ 37-59 god.	74/301	Dob, spol	Bez povezanosti s astmom

		NIH kriterija ⁸³ .	astme				
Hyun 2013⁹⁹ meta analiza	Astma	Kriteriji za uključivanje bili su: -studije slučajeva i kontrola -izvorna istraživanja -mogućnost izračuna omjera rizika	-	Djeca i odrasli	Ukupno 2215 / 2170	-	Povećan rizik astme
Lacy i sur., 2009¹⁰⁰	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanifin i Rajka ⁹²	Zdravi ispitanici bez anamneze atopijskih bolesti	20–69/ 24–63	46/40	-	Bez povezanosti s atopijskim dermatitisom
Lesiak i sur., 2014¹⁰¹	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju po Hanifin i Rajka ⁹²	Zdravi ispitanici	Prosjek 11 god.	76/60	Dob, spol	Bez povezanosti s atopijskim dermatitisom
Reich i sur., 2003⁹³	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanifin i Rajka ⁹²	Zdravi darivatelji krvi bez osobne ili obiteljske anamneze atopijskih bolesti	6–63 god./ 18–82 god.	94/214	-	Bez povezanosti s atopijskim dermatitisom
Stavrić i sur., 2012⁹⁴	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanifin i Rajka ⁹²	Zdravi ispitanici bez obiteljske anamneze atopije	6 mj.. -5 god.	67/301	Dob, spol	Bez povezanosti s atopijskim dermatitisom
Pregled istraživanja povezanosti genskog polimorfizma IL-1α –889 C>T i atopijskih bolesti							
Istraživanje (prvi autor i sur., godina)	Bolest	Definicija bolesti	Kontrolni ispitanici	Dob ispitanika (ukupno ili bolesnici/kontrola)	Broj bolesnika/kontrolnih ispitanika	Kontrolirani čimbenici osobne osjetljivosti, načina života i okoliša	Povezanost genskog polimorfizma IL-10 –1082 G>A s bolešću
Mahdavian i sur., 2009⁷²	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju NAEPP smjernica ⁷³ .	Zdravi darivatelji krvi	1,5-33 god./ nije prijavljeno	60/140	-	Bez povezanosti s astmom
Trajkov i sur., 2008⁸²	Astma	Astma dijagnosticirana od strane liječnika na temelju NIH kriterija ⁸³ .	Ispitanici bez astme i obiteljske anamneze astme	37-59 god./ 37-59 god.	74/301	Dob, spol	Bez povezanosti s astmom

Behniafard i sur., 2012¹⁰²	Atopijski dermatitis	Atopijski dermatitis dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanifin i Rajka ⁹² .	Zdravi ispitanici bez atopije	Djeca/nije prijavljeno	89/140	-	Bez povezanosti s atopijskim dermatitisom
Stavrić i sur., 2012⁹⁴	Atopijski dermatitis	Dijagnosticiran od strane liječnika na temelju kriterija po Hanifin i Rajka ⁹² .	Zdravi ispitanici bez obiteljske anamneze atopije	6 mj. -5 god.	67/301	Dob, spol	Bez povezanosti s atopijskim dermatitisom

Legenda: SPT:kožni test ubodom; ATS:American Thoracic Society; BTS:British Thoracic Society; GINA: Global Initiative for Asthma; NAEPP:National Asthma Education and Prevention program, USA; ISAAC: International Study of Asthma and Allergies in Childhood; NIH: National Institutes of Health, USA.

PRILOG 2. UPITNIK O ZDRAVSTVENOM STANJU I NAČINU ŽIVOTA

OPĆI PODACI

Fakultet: _____

ID

Datum pregleda: _____

Prezime i ime: _____

STANOVANJE:

I. SADAŠNJE PREBIVALIŠTE

Adresa: _____

Telefon: _____

1) Živate u : u gradu na selu

2) Koliko dugo? _____

3) Stanujete u:

obiteljskoj kući broj soba _____ broj osoba _____ broj pušača _____

stambenoj zgradi broj soba _____ broj osoba _____ broj pušača _____

drugdje: _____ broj soba _____ broj osoba _____ broj pušača _____

4) Stan prozračujete: prirodno klima uređajima

drugo _____

5) Grijanje u stanu je :

centralno centralno etažno peć na kruto gorivo peć na plin

peć na struju drugo _____

6) Štednjak za kuhanje je na: plin struju kruto gorivo

7) Spavate na krevetu sa:

sintetskom posteljinom pernatom posteljinom vunenom posteljinom

pamučnom posteljinom

8) Je li stan vlažan? NE DA

ZDRAVSTVENI UPITNIK

1. SADAŠNJE TEGOBE (OD ZADNJEG PREGLEDA)

Da li ste sada bolesni **DA NE**
(navesti bolest)_____

Da li sada uzimate lijekove **DA NE**
(koje)_____

Slijedeća 4 pitanja odnose se na alergijske tegobe dišnog sustava i kože

2. TEGOBE S OČIMA (nevezano uz prehladu/naprezanje)

	Od zadnjeg pregleda		U zadnjih 12 mj.	
	DA	NE	DA	NE
Svrbež očiju				
Suzenje očiju	DA	NE	DA	NE
Crvenilo očiju	DA	NE	DA	NE

3. TEGOBE S NOSOM (nevezano uz prehladu ili gripu)

	Od zadnjeg pregleda		U zadnjih 12 mj.	
	DA	NE	DA	NE
Otežano disanje	DA	NE	DA	NE
Iscjedak	DA	NE	DA	NE
Kihanje	DA	NE	DA	NE
Svrbež	DA	NE	DA	NE

4. TEGOBE U PRSIMA (PLUĆIMA) (nevezano uz prehladu/upalu pluća)

	Od zadnjeg pregleda		U zadnjih 12 mj.	
	DA	NE	DA	NE
Kašalj suhi	DA	NE	DA	NE
Stezanje u prsima	DA	NE	DA	NE
Sipljenje u prsima	DA	NE	DA	NE
Otežano disanje (mirov.)	DA	NE	DA	NE
Otežano disanje (napor)	DA	NE	DA	NE

5. TEGOBE S KOŽOM (nevezano uz bakt./virusne/gljivične upale)

	Od zadnjeg pregleda		*Lokalizacija	U zadnjih 12 mj		*Lokalizacija
	DA	NE		DA	NE	
Svrbež						
Crvenilo	DA	NE		DA	NE	
Osip	DA	NE		DA	NE	
Ekcem	DA	NE		DA	NE	
Koprivnjača	DA	NE		DA	NE	

¹vodeni mjehurići koji svrbe, pucanje kože

*Navedite na kojim dijelovima tijela su se pojavile promjene

6. DOSADAŠNJE TEGOBE

6.1. Da li ste imali?

	Od zadnjeg pregleda		U zadnjih 12 mj		Utvrдио <u>liječnik</u>	
	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Upala sinusa	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Upala pluća	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Astma	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Peludna hunjavica	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Kožne alergije	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Preosjetljivost na hranu	DA	NE	DA	NE	DA	NE
<i>Koju?</i>	_____	_____	_____	_____	DA	NE
	_____	_____	_____	_____	DA	NE
	_____	_____	_____	_____	DA	NE
Preosjetljivost na lijekove	DA	NE	DA	NE	DA	NE
<i>Koje?</i>	_____	_____	_____	_____	DA	NE
	_____	_____	_____	_____	DA	NE
	_____	_____	_____	_____	DA	NE
Preosjetljivost na ubod insekata	DA	NE	DA	NE	DA	NE
<i>Kojeg?</i>	_____	_____	_____	_____		
	_____	_____	_____	_____		

1 alkoholno piće=3 dcl piva ili 1 dcl vina ili 0,3 dcl žestokog pića

TJELESNA AKTIVNOST

9.3.1. Kako ocjenjujete osobnu tjelesnu aktivnost?

- izuzetno dobra uglavnom zadovoljavajuća osrednja
 ne baš zadovoljavajuća loša jako loša

9.3.2. U zadnjih godinu dana koliko prosječno sati na dan provodite u slijedećim aktivnostima: (molimo staviti križić)

Aktivnosti	nikad	manje od 1	1-2	3-4	5-6	7-10	11 i više
Sjedenje u prijevoznom sredstvu (tramvaj i sl.)							
Sjedenje na poslu/u školi							
Sjedenje pred TV/kompjuterom (u slobodno vrijeme)							
Sjedenje prilikom obroka							
Druge sjedeće aktivnosti (čitanje, igranje karata, učenje)							

9.3.3. U zadnjih godinu dana koliko prosječno sati na tjedan provodite u slijedećim aktivnostima: (molimo staviti križić)

Aktivnosti	nikad	½-1	2-3	4-6	7-10	11-20	21-30	31 i više
Vrlo naporni sportovi (npr. đogiranje, biciklizam prirodi, tenis, aerobik i sl.)								
Vrlo teški poslovi (npr. nošenje namještaja, dizanje utega ili drugog teškog tereta i sl.)								
Umjerene aktivnosti (npr. kućni poslovi, brzi hod, golf, kuglanje, vrtlarstvo, vožnja bicikla i sl.)								

9.3.4. U zadnjih godinu dana koliko prosječno puta na tjedan se bavite teškim aktivnostima u toj mjeri da se znojite ?

- nikad 2 puta 4 puta 6 puta
 1 puta 3 puta 5 puta 7 i više put

9.4. Da li se bavite nekim hobijem? DA NE

Kojim? _____

SAMO ZA ŽENE:

1. Kako ocjenjujete svoje menstrualne cikluse:

(a) urednim (b) uglavnom urednim (c) neredovitima (d) uglavnom neredovitima

2. Da li ste ikad zatrudnjeli ? **Da** **Ne**

- Ako *Da*:

- Kako je završila Vaša prva trudnoća?

(a) rodili ste živo i zdravo dijete (b) nešto drugo

- S koliko godina ste prvi puta rodili ? _____

3. Da li ste ikad koristili hormonalna kontraceptivna sredstva (radi kontracepcije/medicinskih razloga) ?

(a) Ne (b) Da, i sad ih koristim (c) Da, ali ne više

- Ako *Da*:

- Koju _____

- Koliko dugo ste ih koristili ?

(a) manje od godinu dana (e) 10-14 godina

(b) 1-2 godina (f) 15-19 godina

(c) 3-5 godina (g) 20 i više godina

(d) 6-9 godina

- Koliko godina ste imali kad ste ih počeli koristiti?

(a) manje od 15 (e) 26-30

(b) 15-17 (f) 31-35

(c) 18-20 (g) više od 36

(d) 21-25

FIZIKALNI PREGLED

Krvni tlak: _____ / _____ mmHg

Visina: _____

Puls: _____

Težina: _____

Ždrijelo:

Pluća:

Srce:

Koža:

Ostalo:

**PRILOG 3. OBJAVLJENI RADOVI VEZANI UZ TEMU
DISERTACIJE**