

# Budućnost dijagnostike i liječenja astme

## *The Future of Diagnosis and Treatment of Asthma*

**ASJA STIPIĆ MARKOVIĆ**

KB „Sveti Duh”

10000 Zagreb, Sveti Duh 64

**SAŽETAK** Na temelju profila ekspresije različitih gena na epitelnim stanicama bronha u budućnosti će se moći dijagnosticirati molekularni supfenotipovi astme: a) astma s jakim obilježjima Th2-upale, b) astma sa slabim obilježjima Th2-upale, c) astma bez obilježja Th2-upale. Analizom sveukupne ekspresije gena izdvojena su tri patognomonična IL-13-inducibilna gena u obrisku bronhalnog epitela: periostin, regulator kloridnih kanala 1 (CLCA1) i inhibitor serpin peptidaze B, 2. član (SERPINB2) koji mogu poslužiti kao surogatni biljezi Th2-inflamacije. Gen čija se ekspresija najviše razlikuje u astmi s jakim obilježjima Th2-upale i astmi sa slabim obilježjima Th2-upale jest CCL26 (eotaksin 3). Patofiziološki mehanizmi preko IL-25, IL-33 i TSLP (engl. thymic stromal lymphopoietin) nalaze se u podlozi astme bez obilježja Th2-upale koja ima slab odgovor na trenutačno dostupnu antiastmatsku terapiju. Najveća je potreba za određivanjem fenotipa bolesti u populaciji bolesnika s teškom astmom te onih s astmom refraktornom na terapiju. Teška astma mogla bi se dokazivati i određivanjem genskog profila alveolarnih makrofaga iz induciranog sputuma. Prediktor porasta FEV1 nakon primjene anti-IL-13-monoklonskog protutijela jest kombinacija serumskog periostina s frakcijom NO u izdahnutom zraku, FeNO. Kombinacija urinarnog leukotrijena E4 s FeNO, tj. njihov omjer, pokazala se kao dobar biomarker kojim se može predvidjeti učinak terapije u astmi. Urinarni bromotirozin može biti marker kontrole astme i prediktor egzacerbacije astme u djece. Liječenje astme u budućnosti temeljit će se na farmakogenetičkim nalazima. U kliničkoj medicini samo je jedan lijek iz skupine bioloških lijekova (monoklonskih protutijela), omalizumab, blokator serumskog IgE, odobren za primjenu u bolesnika s teškom alergijskom astmom.

**KLJUČNE RIJEČI** astma, Th2-upala, periostin, LTE4, bromotirozin, muskarinski antagonisti, inhalacijski kortikosteroidi, omalizumab

**SUMMARY** The expression profile of various genes in epithelial cells of the bronchi will enable the diagnosis of molecular subphenotypes of asthma: a) asthma with strong features of Th2 inflammation, b) asthma with weak features of Th2 inflammation, and c) asthma without features of Th2 inflammation. The analysis of the overall gene expression gave three pathognomonic genes, i.e. IL-13 inducible genes in bronchial epithelial swab: periostin, chloride channel regulator 1 (CLCA1) and serpin peptidase inhibitor, clade B (SERPINB2), which may serve as surrogate markers of Th2 inflammation. The gene whose expression differs most in asthma with strong features of Th2 inflammation and asthma with weak features of Th2 inflammation is CCL26 (eotaxin-3). Pathophysiological mechanisms, which act via IL-25, IL-33 and TSLP (thymic stromal lymphopoietin), underlie asthma without features of Th2 inflammation and a weak response to the currently available antiasthmatic therapy. The need to identify a phenotype of the disease is the greatest in patients with severe asthma and those with asthma refractory to therapy. Severe asthma could be also diagnosed by determining the genetic profile of alveolar macrophages from induced sputum. The predictor of FEV1 growth after the administration of anti-IL-13 monoclonal antibody is a combination of serum periostin with NO fraction in exhaled air (FeNO). The combination of urinary leukotriene E4 with FeNO, i.e. their ratio, proved to be a good biomarker of therapy efficiency in asthma. Urinary bromotyrosine could be a marker of asthma control and a predictor of asthma exacerbations in children. In the future, the treatment of asthma will be based on pharmacogenetic findings. In clinical medicine, there is only one biosimilar drug, i.e. omalizumab (monoclonal antibody, serum IgE blocker), authorised for use in patients with severe allergic asthma.

**KEY WORDS** asthma, Th-2 inflammation, periostin, LTE4, bromotyrosine, muscarinic antagonists, inhalation corticosteroids, omalizumab



Rasvijetliti patofiziologiju astme, pronaći biljege (biomarkere) za njezinu dijagnostiku te identificirati zahvatna mjesta u imunskoj reakciji na kojima je moguća blokada upale bit će moguće zahvaljujući napretku i novim spoznajama bazične imunologije. Istraživanja na molekularnom i genskom nivou upućuju na to da je poremećaj aktivacije gena ključan u indukciji alergijske bolesti. To potvrđuju i rezultati promjene ekspresije gena nakon specifične imunoterapije (1).

### 1. Dijagnostika sindroma astme

Buduće dijagnostičke mogućnosti u astmi neće biti relevantne i informativne ako samo potvrde kliničke simptome astme, već ako omogućuje utvrđivanje tzv. molekularnog potpisa bronhalnog epitela koji je tipičan za kliničke supfenotipove, što se mogu diferencirati unutar ove heterogene bolesti, koja bi se onda tretirala po principima personalizirane medicine. Tako npr. na temelju profila ekspresije različitih gena na epitelnim stanicama bronha (npr. set gena Th2-upalnog

odgovora) moći će se zaključivati o biološkim funkcijama i intenzitetu Th2-imunosti reakcije koja je odraz lokalne i sistemske alergije (2). Podjelom astme prema molekularnom fenotipu na astmu s jakim obilježjima Th2-upale (engl. Th2 high asthma) i astmu sa slabim obilježjima Th2-upale (engl. Th2 low asthma) u skupini blage i umjereno teške astme, dokazuju se ne samo razlike u patologiji (tzv. remodeliranju i sastavnicama mukusa) već i razlike u odgovoru na primjenu kortikosteroida (3). Ova analiza ekspresije gena na epitelnim i drugim stanicama bronha dopunit će dosadašnje dijagnostičke postupke kojima se dokazuju različite sastavnice astme kao što se primjerice bronhalna opstrukcija dokazuje testovima plućne funkcije u mirovanju i nakon provokacije.

### 1.1. Astma s jakim obilježjima Th2-upale („Th2 high“)

Astma s jakim obilježjima Th2-upale, posredovana citokini- ma IL-4, IL-5 i IL-13, najvažniji je molekularni patofiziološki mehanizam (3) u ovom supfenotipu astme. Blokada citokina Th2-imunosti reakcije ubrzano se istražuje posljednjih godina. Tehnologijom DNA-analize oligonukleotidnim mikročipom (engl. DNA microarray), kao i lančanom reakcijom polimerazom (PCR, engl. polymerase chain reaction), tj. analizom sveukupne ekspresije gena, iz obriska bronhalnog epitela izdvojena su tri patognomonična IL-13-inducibilna gena: periostin, regulator kloridnih kanala 1 (CLCA1) i inhibitor serpin peptidaze B, 2. član (SERPINB2) koji mogu poslužiti kao surogatni biljezi Th2-upale. Drugi geni kojima se mogu diferencirati „Th2 high“ i „Th2 low“ astma jesu: IgE, NO sintaza 2A (NOS2A), histaminski receptor H1, GPR44-receptori na Th2-limfocitima (GPR44, engl. G protein-coupled receptor 44), arahidonat 15-lipoksigenaza (ALOX15) (3, 4). Ekspresija ovih gena izravno je i trajno povezana s lokalnim i sistemskim biljezima upale, osobito eozinofilijom. Osim velikog broja proupalnih citokina i kemokina ekspimirano je nekoliko skupina gena koji su povezani s molekulama uključenim u epitelno-mezenhimalnu komunikaciju te tkivno remodeliranje, zadebljanje bazalne membrane, hiperplaziju glatkih mišića, metaplaziju žlijezda i fibrozu iz porodice Wnt, TGF $\beta$ , PDGF (engl. platelet derived growth factor). Suprotno tomu, zapažena je smanjena regulacija gena za mucin 5B (MUC5B) glikoprotein koji pridonosi elasticitetu i adhezivnim svojstvima sluzi, dok je pojačana regulacija MUC5AC i MUC2. „Th2 high“ astma jasno se izdvaja bronhalnom hiperreaktivnošću, serumskom razinom IgE, eozinofilijom periferne krvi i dišnih putova, subepitelnom fibrozom i ekspresijom gena za mucin u bronhima. U ovome molekularnom fenotipu zapažena je visoko negativna korelacija s CXCR1 i 2-receptorima (na neutrofilima) za vezanje kemokina CXCL6 (granulocitnoga kemotaktičnog proteina), neutrofilnim hematopoetskim faktorom CSF3 (G-CSF), IL-12A i CXCL11, što upućuje na diferencijaciju prema neutrofilnom upalnom fenotipu astme. Molekularni fenotip astme „Th2 high“ tipično ima dobar odgovor na inhalacijske kortikosteroide.

### 1.2. Astma sa slabim obilježjima Th2-upale („Th2 low“)

U bolesnika s ovim fenotipom astme također se nalaze znakovni preosjetljivosti na inhalacijske alergene uz pozitivna specifična IgE-antitijela, ali blažeg stupnja. Međutim u sluznici bronha stupanj Th2-upale je slab i nedostatan da pokrene ekspresiju gena i amplifikaciju upale. Gen čija se ekspresija najviše razlikuje u „Th2 high“ i „Th2 low“ astmi jest CCL26 (eotaksin 3) (2). To je kemokin koji se veže za CCR3 i potentni je kemotaktički faktor za eozinofile. Uz IL-4 i IL-13 kemokin CCL26 ključni je biljeg imunosti reakcije posredovane Th2-limfocitima.

Osim navedenih biljega postoji mogućnost da je IL-17 biljeg „Th2 low“ astme jer je u mišjem modelu astme dokazana njegova prisutnost (5, 6).

### 1.3. Astma bez obilježja Th2-upale („non Th2“)

Znatan udio (oko 50%) bolesnika ima bolest bez Th2-obilježja. Bolesnici ispunjavaju kriterije za dijagnozu astme, ali imaju manji stupanj bronhalne hiperreaktivnosti i opstrukcije (7, 8). U mnogih bolesnika s ovim fenotipom razvila se astma u zreloj dobi i nemaju anamnezu alergijskih manifestacija u djetinjstvu (9). Novootkriveni patofiziološki mehanizmi koji idu preko IL-25, IL-33 i TSLP (engl. thymic stromal lymphopoietin) nalaze se u podlozi ovog fenotipa (10) koji ima slab odgovor na trenutačno dostupnu antiasmatičku terapiju. Zapravo, patofiziološki mehanizmi „non Th2“ astme još nisu dovoljno istraženi.

Bolesnici kod kojih postoje vrlo mali ili nikakvi znakovi upale imaju jači intenzitet bronhalne hiperreaktivnosti, ali ona nije posljedica imunosti reakcije (11). Kao mogući geni kandidati za definiranje ovoga molekularnog fenotipa razmatraju se oni vezani uz oštećenja tkiva i reparaciju ozljede, a koji kodiraju komponentu Hedgehogova signalnog puta važnog za mnoge fundamentalne procese u organizmu, odnosno tzv. Hedgehogova interagirajućeg proteina (engl. Hedgehog interacting protein). Osim toga, dizintegrin i metaloproteaza 33 mogući su novi biljezi ovog tipa astme (12, 13). Daljnja je mogućnost da se u „non Th2“ astmi odvija patofiziološki mehanizam preko mastocita uključenih u imunostni odgovor tipa Th1 (14). Iako profil gena iz sputuma pokazuje povećanu regulaciju gena za IL-1 i TNF- $\alpha$ -signalne putove, ovaj nalaz nije korelirao ni s jednim kliničkim fenotipom (15).

### 1.4. Teška astma

Najveća je potreba za određivanjem fenotipa bolesti u populaciji bolesnika s teškom astmom te onih s astmom refraktornom na terapiju (2). Podskupina bolesnika s Th2-upalom koja se ne može kontrolirati steroidima ima perzistentno povišen IL-13 u tkivu bronha (16). Ni skupina „Th2 low“ ne pokazuje dobar odgovor na steroide, što može dovesti do progresije bolesti. Nadalje, pojačana regulacija TNF- $\alpha$  na monocitima periferne krvi također može poslužiti kao biljeg refraktorne astme (17).

U istraživanju podskupina teške astme u okviru Programa za istraživanje teške astme (SARP, engl. Severe Asthma Research Program) u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), teška astma definirana je velikim (major) kriterijima koji uzimaju u obzir upotrebu oralnih steroida ili visoke doze inhalacijskih steroida te malim (minor) kriterijima, koji uzimaju u obzir upotrebu drugih protuupalnih lijekova i kratkodjelujućih bronhodilatatora, broj posjeta hitnoj službi, više od tri epizode sistemskih steroida, trajnu bronhoopstrukciju, pogoršanje nakon redukcije doze steroida i anamnezu gotovo fatalnih događanja. Biljezi bolesti korišteni u ovom projektu bili su: vrijeme pojave astme, okidači astme (infekcije, acetylsalcična kiselina), izlaganje duhanskom dimu, hormonski status, GERB, alergološki pokazatelji, testovi plućne funkcije u mirovanju, reverzibilnost na primjenu bronhodilatatora, upotreba lijekova (kortikosteroidi) i zdravstvenih resursa (18). Ovi su biljezi odabrani nakon 628 inicijalno upotrijebljenih. Kombinacijom navedenih pokazatelja diferencirano je pet klastera teške astme:

- **klaster 1:** astma počinje rano kao alergijska te ima normalnu plućnu funkciju; u terapiji se primjenjuju dva ili nekoliko lijekova, a zdravstveni se resursi minimalno troše.
- **klaster 2:** također počinje rano kao atopijska te ima održanu plućnu funkciju; ima veće potrebe za lijekovima s tri i više lijekova; više koristi zdravstveni sustav.
- **klaster 3:** nalazi se uglavnom u starijih adipoznih žena kod kojih se astma javlja kasnije u životu; obilježena je umjerenom redukcijom FEV1; česta je primjena kortikosteroida za tretman egzacerbacija.
- **klasteri 4 i 5:** astma je obilježena teškim opstruktivnim smetnjama ventilacije s pozitivnim bronhodilatatornim učinkom; klasteri se međusobno razlikuju prema mogućnosti da se održi normalna funkcija pluća te prema vremenu pojave astme, atopijskom statusu i upotrebi kortikosteroida.

Ovako određeni klasteri teške astme mogu poslužiti za daljnje određivanje molekularnih profila i izučavanje patofizioloških mehanizama.

Pojedina istraživanja pokazuju da bi se teška astma mogla dokazivati i određivanjem genskog profila alveolarnih makrofaga iz induciranog sputuma. Dokazana je povećana ekspresija proteina PSMA7 važnog za replikaciju virusa (PSMA7, engl. proteasome subunit alpha type-7), proteina SDC4 u membrani fibroblasta i epitelnih stanica (SDC4, engl. syndecan-4), proteina LMNA koji sudjeluje u održanju stabilnosti jezgre u strukturi kromatina i ekspresiji gena (LMNA, engl. lamin A/C), proteina IFI16 koji ima ulogu u lociranju intracelularne DNA, odnosno glavnog pokazatelja stanice inficirane virusom (IFI16, engl. gamma-interferon-inducible protein Ifi-16), proteina IL10RB koji je potreban za indukciju signalne transdukcije preko IL-10 (IL10RB,

engl. interleukin 10 receptor, beta subunit) i gena DENND1B koji kodira protein DENN/MADD (DENND1B, engl. domain containing 1B). DENND1B-gen već je dokazano aktiviran u dječjoj astmi, a istražuje se njegova uloga u određivanju stupnja bronhoopstrukcije u odraslih (19, 20).

### 1.5. Matriksni protein periostin – novi biomarker astme i eozinofilije

Ekstracelularni matriks (aktivno međustanično tkivo) stabilni je kompleks makromolekula koje okružuju stanice. To je gradivna podloga za stanične migracije, strukturne i zaštitne uloge i izrazitog utjecaja na staničnu fiziologiju. Nedavno opisan matriksni celularni protein periostin djeluje na više integrinskih molekula na površini stanica osiguravajući signal za razvoj i remodeliranje tkiva (21). On je ključni medijator za pojačavanje i održavanje alergijske upale (22, 23). Izlučuju ga fibroblasti potaknuti citokinima IL-4 i IL-13. U koži se veže za integrinski receptor keratinocita stimulirajući ih da luče proupalne citokine, pojačavajući upalu (21). Inhibicija periostina ili blokada njegova receptora prevenira progresiju upale inducirane alergenom. U respiratornom traktu sudjeluje u indukciji plućne fibroze i astme (24-26). Pojačava intenzitet alergijske upale u plućima potičući stvaranje kemokina fibroblasta, produkciju sluzi, mobilizaciju eozinofila i aktivaciju TGF- $\beta$  u epitelnim stanicama bronha (27-30).

Spoznaje o ulozi periostina kao intrinzičnog medijatora koji amplificira i održava alergijsku upalu te funkcionalnog receptora na koji se veže, upozorile su na još jedno zahvatno mjesto protiv kojeg se može razvijati specifična terapija (31). Vrijednosti periostina periferne krvi određene metodom ELISA značajno pozitivno koreliraju s genskim profilom Th2 i eozinofilnom upalom u bronhima. Nivo serumskog periostina najbolji je pokazatelj eozinofilije u respiratornom traktu kod bolesnika s astmom koja je nekontrolirana unatoč primjeni inhalacijskih steroida. Periostin može poslužiti za odabir bolesnika koji bi bili pogodni za terapiju monoklonskim protutijelima usmjerenima protiv ciljeva u Th2-upalnom odgovoru.

Corren i suradnici pokazali su da je pouzdaniji biomarker, prediktor porasta FEV1 nakon primjene anti-IL-13-monoklonskog protutijela, kombinacija serumskog periostina s frakcijom NO u izdahnutom zraku (FeNO, engl. fraction of exhaled nitrite oxide) (32).

### 1.6. Omjer urinarnog leukotrijena E4 i frakcije NO u izdahnutom zraku - prediktor odgovora na terapiju

Osim kombinacije periostin/FeNO i kombinacija urinarnog leukotrijena E4 (LTE4) s FeNO, tj. njihov omjer, pokazala se kao dobar biomarker kojim se može predvidjeti učinak terapije montelukastom u jednoj podskupini djece s astmom. Djeca s omjerom urinarnog LTE4/FeNO iznad 75. percentile bila su mlađe životne dobi, češće ženskog spola, manje izra-

ženih markera atopije i manjeg stupnja bronhalne hiperreaktivnosti. Omjer LTE4/FeNO može biti koristan biomarker za identificiranje djece koja će postići veći porast FEV1 kao odgovor na terapiju leukotrijenskim antagonistima u usporedbi s porastom nakon primjene inhalacijskih steroida (33).

### 1.7. Prediktori odgovora na inhalacijske kortikosteroide

Klinički odgovor na inhalacijske steroide (IKS), temeljne protuupalne lijekove, varijabilan je. Trenutačno ne postoji biljeg kojim se može predvidjeti kod kojih će bolesnika primjena inhalacijskih steroida dati dobar učinak. Enzim koji posreduje u tom terapijskom odgovoru jest fosfataza dualne specifičnosti (DUSP1, engl. dual specificity phosphatase-1). Jin i suradnici identificirali su u DUSP1 genske varijante rs881152 i rs34507926. Rs881152-genotip značajno je korelirao s pokazateljima kontrole iz dnevnika astme, a nije korelirao s FEV1 (34). Rezultati ove studije mogu pomoći da se u budućnosti nađe metoda identifikacije bolesnika najpogodnijih za liječenje kortikosteroidima.

Značajna farmakogenetička povezanost zapažena je između polimorfizma gena GLCCI1 (engl. glucocorticoid-induced transcript 1 gene) i slabijeg odgovora na inhalacijske steroide (35).

### 1.8. CLCA1 – ključni medijator hipersekrecije sluzi

*Porodica proteina CLCA* (engl. chloride channel accessory) regulira i transport klora i ekspresiju mucina, čime kontrolira proizvodnju sluzi u respiratornom traktu. Humani *CLCA1*-protein ključni je medijator hipersekrecije u astmi (36). Određivanje ekspresije ovoga gena u sluznici usne šupljine pogodna je neinvazivna tehnika za dijagnozu astme i evaluaciju odgovora na primijenjenu terapiju (37).

### 1.9. Urinarni bromotirozin - prediktor egzacerbacije astme

Bromotirozin (BrTyr) marker je oksidacije proteina katalizirane eozinofilima. Wedes i sur. uspoređivali su u skupini od 57-ero djece nivo urinarnog BrTyr sa spirometrijom, FeNO i upitnikom o kontroli astme. Djeca koja su imala visoku razinu bromotirozina u urinu imala su 18 puta veću mogućnost da je astma nekontrolirana. Istodobno, 4 puta je bila veća mogućnost pojave egzacerbacije astme u ovih bolesnika u usporedbi s onima koji su imali nisku razinu BrTyr. Ovi rezultati upućuju na to da urinarni bromotirozin može biti marker kontrole astme i prediktor egzacerbacije astme u djece (38, 39).

### 1.10. Novi načini prikupljanja nazalnih i bronhalnih lavata

Tradicionalni načini prikupljanja nazalnih i bronhalnih lavata tehnički su zahtjevni i teški za bolesnika. Količina otopine koja se aspirira, kao i razrjeđenja varijabilni su, a mnogi proteini u otopini su ispod granice detekcije. To je osobito teško u pedijatriji gdje se i nazalna lavaža smatra invazivnom i teškom za neke skupine bolesnika.

Tzv. nazosorpcija i bronhosorpcija nove su tehnike za ana-

lizu intersticijske tekućine koja oplakuje nazalnu i bronhalnu sluznicu. Posebnim sintetičkim apsorberima uzimaju se uzorci iz bronhalnog lumena i nazalne šupljine za analizu interleukina (40).

## 2.0. Liječenje astme u budućnosti

Liječenje astme u budućnosti temeljit će se na farmakogenetičkim nalazima. Određivanje posebnog, molekularno definiranog profila bolesnika, poslužit će otkrivanju prirodnog tijeka bolesti, rizičnih čimbenika egzacerbacije i gubitka plućne funkcije te odabiru optimalne terapijske strategije. Takvi pristupi liječenju astme osigurat će veću specifičnost, predvidljivost i učinkovitost liječenja.

Sadašnja terapija astme omogućava samo kontrolu simptoma, dok temeljni upalni proces u sluznici bronha perzistira zbog trajne aktivacije strukturalno i funkcionalno defektnog epitela donjih dišnih putova. Ovaj mehanizam naziva se epitelno-mezenhimalna trofička jedinica (EMTU, engl. epithelial-mezenchymal trophic unit), a opisuje mikrookoliš u kojemu je olakšana alergijska senzibilizacija te koji podupire različite tipove upale i stvara predispoziciju u dišnim putovima za ponavljane egzacerbacije, što vodi kroničnim fibrotičnim promjenama, remodeliranju (41, 42).

IKS, zlatni standard u terapiji astme, temeljni su protuupalni lijekovi u kontroli simptoma i smanjenju broja astmatskih napadaja (43, 44). Međutim osim njihove dokazane učinkovitosti postoje ograničenja koja umanjuju njihovu ulogu u terapiji astme. Naime, kao i ostali protuupalni lijekovi u astmi, oni djeluju samo simptomatski, tj. ni nakon dugotrajne primjene ne mijenjaju prirodni tijek bolesti jer se vrlo brzo nakon prekidanja terapije simptomi ponovo pojavljuju. Drugi problem ovog liječenja jest slaba suradljivost bolesnika čak i onih s izraženim simptomima (45). Nadalje, primjena IKS u dječjoj dobi nosi i rizik od zaostajanja u rastu (46-50). IKS ni u najvišim dozama ne mogu kontrolirati astmu u 5-10% bolesnika s teškim stupnjem bolesti (51-53). Sve je više istraživanja koja pokazuju da astmu treba liječiti birajući lijekove prema njezinu fenotipu. Postupno se otkrivaju detalji heterogene naravi astme i prikupljaju dokazi o upalnim fenotipovima, a kod teške astme tipiziraju se tzv. klasteri koji bi omogućili pronalaženje lijekova za inhibiciju posebnog patofiziološkog procesa (54-56). Na temelju definiranih podskupina bolesnika bilo bi moguće birati individualnu terapiju. Među upalnim fenotipovima najbolje je proučen eozinofilni fenotip koji je prisutan u oko 41% bolesnika s astmom, a obilježje mu je dobar odgovor na IKS. U skupini neeozinofilnih fenotipova astme identificirane su tri podskupine: neutrofilni fenotip, miješani upalni fenotip i fenotip s oskudnim granulocitima (engl. paucigranulocytic phenotype). Posebnim fenotipom može se smatrati i refraktorna astma. Obilježena je upalom u distalnim putovima, u alveolama, što se dokazuje visokim koncentracijama alveolarnog NO. Taj tip astme može se kontrolirati samo sistemskim

kortikosteroidima, a često se nalazi u bolesnika koji su umrli od fatalne astme (57-63). Fenotip, za koji je patognomonična intolerancija acetilsalicilne kiseline, jedan je od podtipova sindroma astme (64, 65). Glavno patofiziološko obilježje astme izazvane uzimanjem acetilsalicilne kiseline, tj. pojačana sinteza leukotrijena, posljedica je većeg broja mastocita pozitivnih na enzim LTE4-sintetazu, a otpuštanje leukotrijena nije praćeno njihovom degranulacijom. Intolerancija acetilsalicilne kiseline češća je u bolesnika s težim oblikom astme u kojih se ne postiže dobra kontrola bolesti unatoč trajnoj terapiji visokim dozama antiastmatskih lijekova.

### 2.1. Istraživanje novih terapijskih mogućnosti

Sva ograničenja suvremene terapije astme razlog su istraživanja novih terapijskih mogućnosti kao što su nove molekule s bronhodilatatornim djelovanjem, novi kortikosteroidi ili monoklonska protutijela koja specifično zahvaćaju u alergijsku kaskadu.

#### 2.1.1. Novi bronhodilatatori

U fazi razvoja je nekoliko novih bronhodilatatora dugog djelovanja, tzv. ultra-LABA (engl. long acting beta agonists): indakaterol, karmoterol, vilanterol i olodaterol. Njihovo je djelovanje dulje od 24 sata, a primjenjuju se jedanput na dan (66-68).

U fazi razvoja je i nekoliko muskarinskih antagonista dugog djelovanja, tzv. LAMA (engl. long acting muscarinic antagonists) za primjenu jedanput na dan. Unatoč tomu što nije lako razviti nove klase bronhodilatatora identificirana je nova klasa iz skupine tzv. agonista gorkih receptora (engl. bitter taste receptors) TAS2R, a to su kinin, klorokin i saharin (69-71).

Farmaceutska industrija radi na razvoju tzv. trojnog inhalera koji sadržava LABU, LAMU i IKS koji bi koristio bolesnicima s teškom astmom (72). Problem kod ovakve fiksne kombinacije lijeka može biti fizikalna interakcija djelatnih tvari koja ometa depoziciju lijekova u plućima. Nemogućnost prilagođavanja doze pojedine djelatne molekule također može stvarati teškoće. Oko 30% bolesnika s astmom koji uz standardnu terapiju imaju poremećaj plućne funkcije nakon dodatka tiotropija pokazuju poboljšanje plućne funkcije. U toj podskupini bolesnika utvrđen je jedan polimorfizam gena za kodirajući muskarinski receptor 1-3 (CHRM1-3, engl. coding muscarinic receptors 1-3) te aleli Arg16Gly i Gln27Glu u genu ADRB2 (engl. adrenoreceptor beta2). Dokazivanje alela Arg16Gly u ADRB2-genu prediktor je dobroga kliničkog odgovora na tiotropij (73).

#### 2.1.2. Novi kortikosteroidi

Razvojnoistraživački rad farmaceutskih tvrtki usmjeren je na pronalaženje sigurnijih kortikosteroida, tj. onih koji imaju smanjenu oralnu bioraspoloživost, smanjenu apsorpciju iz pluća u sistemsku cirkulaciju ili smanjen intenzitet inaktivacije u cirkulaciji.

Svi danas dostupni IKS apsorbiraju se iz pluća u sistemsku cirkulaciju i u višim dozama mogu dovesti do sistemskih reakcija (74-80).

Kratkoročna istraživanja koja su trajala nekoliko mjeseci ili godina pokazala su signifikantno zaostajanje u rastu djece tijekom prve godine (81, 82).

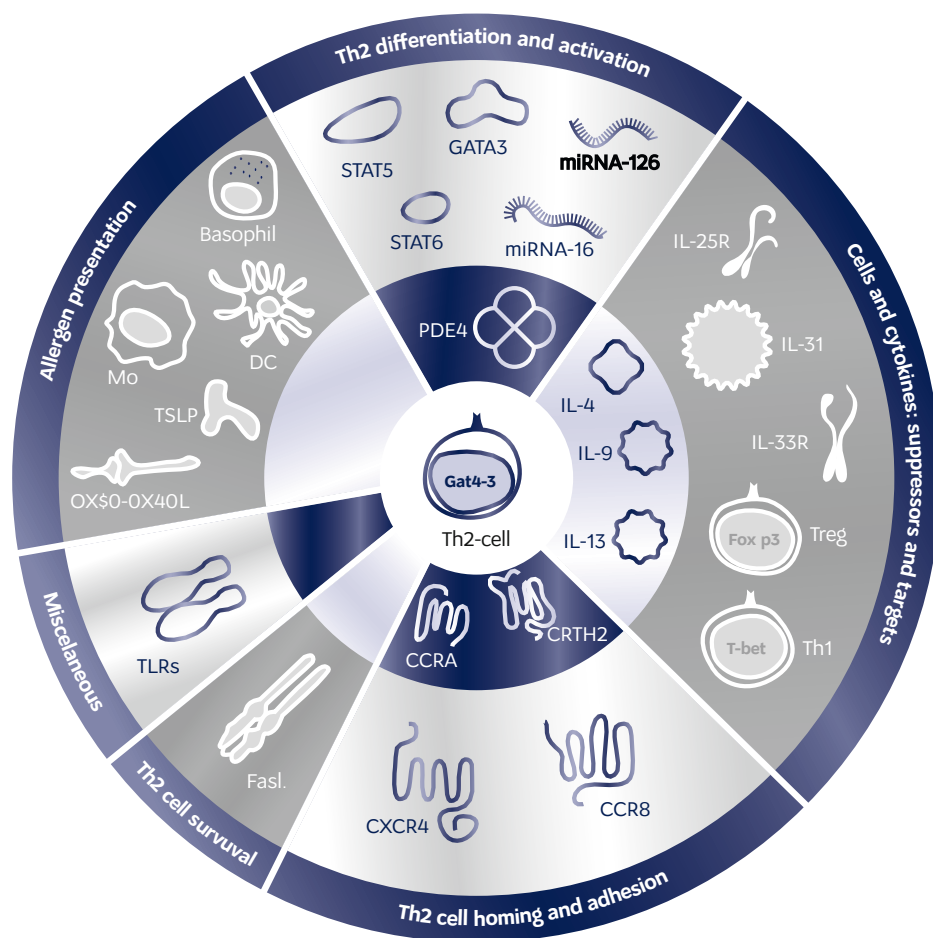
Dugoročna istraživanja koja su pratila djecu do odrasle dobi nisu pokazala odstupanja konačno dosegnute visine u odnosu na nasljednu predispoziciju (visinu roditelja). Međutim rezultati još nedovršenih studija pokazuju da se i 4,8 godina nakon završetka liječenja srednje visokim dozama IKS bilježi statistički značajno zaostajanje u rastu, pogotovo među djecom ženskog spola (83, 84).

Kortikosteroidi postižu svoje učinke regulirajući transkripciju pojedinih gena. Najveći broj njihovih protuupalnih učinaka ostvaruje se djelovanjem na represiju transkripcijskih faktora, što se naziva transrepresija, dok se njihove nuspojave (endokrinološki i metabolički učinci) ostvaruju drugim mehanizmom, transaktivacijom (75, 85). Ova činjenica o dualnom djelovanju kortikosteroida (tzv. disocirani kortikosteroidi) usmjerila je istraživanja prema pokušajima odvajanja protuupalnog mehanizma djelovanja od mehanizma kojim nastaju neželjene nuspojave. Znanstvena su istraživanja pokazala da je sinteza takvih disociranih kortikosteroida, koji imaju bolji sigurnosni profil, moguća. Primjerice, antagonist RU486 ima sposobnost transrepresije veću od transaktivacije kao i neki steroidi koji su u topikalnoj primjeni u astmi (flutikazon propionat i budezonid) (86). I drugi disocirani steroidi kao RU24858 i RU40066 imaju in vivo snažno transrepresivno djelovanje uz malo transaktivacijsko (87), što pokazuje da će biti moguće sintetizirati oralne steroide visokog sigurnosnog profila za liječenje upalnih bolesti.

U mišjem modelu pokazan je protuupalni učinak supstancije A na glukokortikoidni receptor (GR) koji je transkripcijski faktor za kortikosteroidne lijekove. Supstancija A, kao disocirani kortikosteroid (ne djeluje na transaktivaciju), ne inducira MAPK fosfatazu 1, za razliku od deksametazona. Ova supstancija aktivira GR potičući samo njegovu transrepresivnu funkciju kojom inhibira Th2-upalu, suprimirajući translokaciju STAT6 koja je izazvana citokinom IL-4 (88, 89). Druge molekule sa svojstvima disociranih steroida kao npr. ZK 245186 i BOL-303242-X u fazi su ispitivanja (90, 91).

#### 2.1.3. Inhibitori NF-κB

Mnogi učinci kortikosteroida posredovani su preko transkripcijskog faktora NF-κB (92, 93) pa se istražuju mogućnosti njegove inhibicije. Ta inhibicija ne smije biti dugotrajna jer NF-κB ima važnu ulogu u imunosnoj obrani, a njegov manjak ima za posljedicu povećanu sklonost infekcijama (93). Inhalacijska primjena međutim ima znatno manju sposobnost inhibicije pa će biti značajno sigurnija. Gliotok-



**SLIKA 1.** STANIČNA I MOLEKULARNA ZAHVATNA MJESTA U IMUNOSNOJ REAKCIJI NA KOJIMA JE MOGUĆE POSTIĆI INHIBICIJU MEMORIJSKIH TH2-LIMFOCITA U ALERGIJSKOJ ASTMI. ZAHVATNA MJESTA U KRUGU S ISPREKIDANOM CRTOM VEĆ SU TESTIRANA U KLINIČKIM UVJETIMA, A LIJEKOVI USMJERENI NA CILJEVE IZVAN TOG KRUGA JOŠ SU U PRETKLINIČKOJ FAZI ISPITIVANJA. SLIKA PREUZETA IZ ČASOPISA RESPIRATORY RESEARCH 2011;12:114 UZ ODOBRENJE AUTORA (96).

sin, prirodni derivat iz *Aspergillus* potentan je i specifičan NF- $\kappa$ B-inhibitor. Interleukin 10 također ima isti inhibički učinak, što je dokazano u liječenju Crohnove bolesti rezistentne na kortikosteroidnu terapiju (94). Djelovanje NF- $\kappa$ B može se blokirati i inhibicijom specifičnih enzima kao što je ligaza ubikvitina važna za njegovu konjugaciju (95).

#### 2.1.4. Lijekovi koji djeluju u Th2-fenotipu astme

Među mnogim fenotipovima astme koji se diferenciraju posljednjih godina jasno se izdvaja Th2-podvrsta. Patofiziološki proces u tom obliku astme može se blokirati eliminacijom CD4<sup>+</sup> limfocita Th2-fenotipa, što rezultira inhibicijom alergijske kaskade koja se neprestano obnavlja u respiratornoj sluznici (96). Lijekovi koji ciljaju pojedina zahvatna mjesta jesu npr. inhibitori citokina Th2-stanica (interleukina IL-4, IL-5 i IL-13) i antagonisti kemoatraktantne receptorske molekule na površini Th2-stanica (CRTH2, engl. chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on helper T cells) te mnogi drugi koji se tek istražuju. Tu veliku skupinu potencijalnih lijekova za Th2-astmu i mjesto njihova zahvata u aktivaciji i proliferaciji Th2-limfocita sistematično su slikom prikazali Bošnjak i sur. (slika 1).

##### 2.1.4.1. Biološki lijekovi u Th2-astmi

U kliničkoj medicini samo je jedan lijek iz skupine bioloških lijekova (monoklonskih protutijela), omalizumab, blokator

serumskog IgE, odobren za primjenu u bolesnika s teškom alergijskom astmom. Analiza više studija na oko 3400 bolesnika pokazala je sigurnost i učinkovitost primjene omalizumaba u teških astmatičara s atopijom, koji imaju simptome astme unatoč maksimalnim dozama primijenjene najbolje konvencionalne terapije (97-100v). Mnoga monoklonska protutijela u fazi su istraživanja (tablica 1).

Terapija monoklonskim protutijelima protiv IL-4 i fragmentom topljivog receptora za IL-4 nije imala učinka u bolesnika s astmom, ali je primjena IL-4-mutantnog proteina, koji se veže za  $\alpha$ -jedinicu receptora za IL-4, dovela do poboljšanja plućne funkcije i smanjenja NO u izdahnutom zraku (101). Zamjenom samo jedne aminokiseline u humanom IL-4 dobio je antagonist visokog afiniteta, mutein IL-4/Y124D. Patentno je zaštićen (102 i 103).

IL-13 je pleotropni citokin koji u nekih bolesnika s nekontroliranom astmom nije inhibiran inhalacijskim steroidima. IL-13 potiče epitelne stanice bronha da luče velike količine periostina u matriks u bazalnim slojevima gdje djeluje na fibroblaste pridonoseći procesima remodeliranja (104, 105). CAT-354 (tralokinumab)/IMA-638/QAX576 humanizirana su IgG-monoklonska protutijela koja se vežu za različite epitope na IL-13. IMA-638-monoklonsko protutijelo reduciralo je i rani i kasni astmatski odgovor u provokativnom testu s alergenom (106, 107). Lebrikizumab je IgG4-humanizirano monoklonsko protutijelo koje se specifično veže za IL-13

TABLICA 1. BIOLOŠKI LIJEKOVI U TH2-ASTMI

VRSTA LIJEKOVA	MEHANIZAM DJELOVANJA	KLINIČKI UČINCI
<b>Anti-IgE</b>		
<b>omalizumab</b>	monoklonsko protutijelo protiv IgE; spušta nivo IgE; down-regulira IgE-receptore.	Rodrigo i sur.: analiza 8 ispitivanja na 3429 bolesnika: smanjenje egzacerbacija, doza kortikosteroida i hospitalizacija, poboljšanje kvalitete života u add-on terapiji. Bez poboljšanja plućne funkcije (97).
<b>MODULACIJA CITOKINA, PERIOSTINA I RECEPTORA</b>		
<b>ALTRAKINCEPT</b>	fragment topljivog IL-4-receptora; neutralizira IL-4	Adcock i sur.: bez učinka u velikome kliničkom pokusu faze 3 (99)
<b>PASKOLIZUMAB</b>	monoklonsko protutijelo protiv IL-4	Hart i sur.: faza 2 ispitivanja prekinuta zbog neučinkovitosti (100)
<b>PITRAKINRA INHALACIJSKI</b>	IL-4-mutant protein, veže α-jed. IL-4-receptora i IL-13	Wenzel i sur.: inhalacije poboljšavaju plućnu funkciju i smanjuju NO (studija faze 2a) (101)
<b>CAT-354 / IMA- 638/ QAX576</b>	monoklonska protutijela protiv IL-13	Dimov i sur. (106): dokazana učinkovitost u fazi 2 kliničkih studija
<b>TRALOKINUMAB</b>		Piper E i sur. (107)
<b>LEBRIKIZUMAB</b>	Produkcija periostina inducirana je s IL-13; on pridonosi remodeliranju u astmi	Poboljšanje plućne funkcije u bolesnika s visokom razinom periostina. Bez učinka kod niskog periostina (108 )
<b>MEPOLIZUMAB</b>	monoklonska protutijela protiv IL-5.	Haldar i sur. (109), Nair i sur. (110): manje egzacerbacija astme, bolja kvaliteta života, manja potreba za prednizonom kod teške, refraktorne, eozinofilne astme
<b>RESLIZUMAB</b>		Leckie i sur. (111), Castro i sur. (112)
<b>DAKLIZUMAB</b>	monoklonsko protutijelo protiv IL-2.	Busse i sur. (113): 115 bolesnika ovisnih o IKS tijekom 12 tj. pokušaj sniženja doze IKS-a. Bolji FEV1, manje simptoma i primjene SABE
<b>ANTI-IL-9</b>	monoklonsko protutijelo protiv IL-9 (MEDI 563)	Smanjuje infiltraciju mastocitima (122)
<b>BLOKATOR CRTH2</b>	CRTH2 je receptor za PGD2 eksprimiran na površini Th2-limfocita	Reducira kasnu astmatsku reakciju u bronhalnoj provokaciji alergenom za 25%. Reducira eozinofile u sputumu (115).

i inhibira njegove funkcije. Periostin u serumu poslužio je kao surogatni marker za aktivnost interleukina 13. Primjena lebrikizumaba dovela je do poboljšanja plućne funkcije u bolesnika s povišenom razinom periostina u krvi za razliku od skupine koja je imala niski periostin u krvi (108).

Unatoč ulozi koju ima TNF- $\alpha$  u teškoj astmi primjena inhibitora TNF- $\alpha$  nije dovela do kliničkog poboljšanja bolesnika. Studija anti-TNF- $\alpha$  monoklonskim protutijelom golimumabom prekinuta je zbog brojnih teških infekcija i solidnih neoplazmi u usporedbi s bolesnicima koji su dobivali placebo. Primjena pet intravenskih tretmana mepolizumaba u eozinofilnoj astmi ovisnoj o steroidima omogućila je snižavanje doze prednizona, smanjenje broja egzacerbacija te smanjenje broja eozinofila u krvi i sputumu (109-112).

Daklizumab je humanizirano monoklonsko antitijelo klase IgG1 protiv IL-2-receptora alfa-lanca (CD25) aktiviranih limfocita. U odraslih s umjerenom i teškom astmom primjenjivan je daklizumab intravenski svaka 2 tjedna tijekom 12 tjedana. Rezultati su pokazali poboljšanje plućne funkcije i uspostavu kontrole astme u bolesnika koji na primjenu samo IKS-a nisu mogli postići kontrolu (113).

### 2.1.5. Blokatori metaboličkih putova arahidonske kiseline

CRTH2 je receptor prostaglandina D2 (PGD2) na površini Th2-limfocita i eozinofila. Ovaj receptor posreduje pri kemotaksiji limfocita i eozinofila koja je izazvana prostaglandinom D. Prostaglandin D2 je glavni prostaglandin ciklooksigenznog puta u mastocitima. PGD2 je potentan alergijski upalni medijator i zbog toga je ciljna molekula protualergijskih lijekova (114). Singh i suradnici ispitivali su učinkovitost peroralnog OC000459, antagonista receptora PGD2. Nakon 16 dana terapije analizirane su rana i kasna alergijska reakcija u provokativnome bronhalnom testu sa specifičnim alergenom. Intenzitet kasne reakcije bio je za 25,4% manji u

skupini koja je dobivala antagonist PGD2 u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također je jedan dan nakon bronhalne provokacije bio manji broj eozinofila u sputumu, dok je pad broja eozinofila u perifernoj krvi zabilježen nakon tjedan dana. Međutim OC000459 nije inhibirao ranu alergijsku reakciju (115). Antagonist receptora PGD2, selektivni oralni lijek, ispituje se i pod nazivom AZD1981 (116).

Inhibitori enzima 5-lipooksigenaze (5-LO) i protein koji aktivira 5-LO (engl. 5 lipoxygenase activating protein – FLAP) kao što je GSK-2190915 (FLAP-inhibitor) djeluju ne samo na cistenilne leukotrijene već i sprječavaju stvaranje LTB4, što može biti korisno u neutrofilnoj astmi (116). Inhibiraju i ranu i kasnu astmatsku reakciju u provokativnom testu s inhalacijskim alergenom. Također smanjuju broj eozinofila i LTB4 u sputumu.

### 2.1.6. Drugi protuupalni lijekovi

Inhibitori fosfodiesteraze 4 (PDE 4) imaju imunomodulatorno djelovanje. Za liječenje teže astme potrebne su više doze koje se ne mogu primijeniti zbog izraženih gastrointestinalnih nuspojava (117, 118). Inhalacijski oblici lijeka mogu poboljšati ove nedostatke i njihov terapijski indeks (119).

Inhibitori proteinskih kinaza, kao što je npr. P38 proteinska kinaza aktivirana mitogenom (MAPK) u fazi su istraživanja (120).

U fazi istraživanja su i monoklonska protutijela protiv IL-9 (MEDI-528) (121).

### 2.1.7. Plekonaril za egzacerbaciju astme nakon infekcije rinovirusima

Plekonaril u nazalnom spreju antiviralni je lijek koji sprječava virus da se veže za receptor na ljudskoj stanici. Tako sprječava virus da ucijepi svoj genski materijal u stanicu i da se replicira. Lijek je još u fazi ispitivanja (121).

## ZAKLJUČAK

Veliki je učinak farmakogenomike u budućoj terapiji astme. Gensko testiranje bit će jednostavno dostupno u obliku kućnih testova i planovi liječenja astme bazirat će se na tim nalazima. Međutim danas još nedostaju mnoge informacije o ulozi pojedinih gena u alergijskoj reakciji i patofiziologiji astme. Od lijekova koji će biti na raspolaganju u budućnosti najveću vjerojatnost primjene u klinici imaju biološki lijekovi koji

blokiraju protuupalne citokine,  $\beta$ -agonisti dugog djelovanja, inhalacijski kortikosteroidi te lijekovi koji blokiraju komponente metaboličkog puta arahidonske kiseline kao što je FLAP inhibitor i antagonist receptora CRTH2.

Ipak, najuzbudljiviji rezultati iz područja astme očekuju se iz studija o prevenciji. Potencijalne preventivne strategije identificirane su epidemiološkim studijama, ali je randomiziranim kliničkim pokusima potrebno utvrditi jesu li one učinkovite.



## LITERATURA

- PEVEC B, RADULOVIC PEVEC M, STIPIC MARKOVIC A i sur. House dust mite-specific immunotherapy alters the basal expression of T regulatory and FcεRI pathway genes. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;159:287-96.
- CHOY DF, MODREK B, ABBAS AR i sur. Gene Expression Patterns of Th2 Inflammation and Intercellular Communication in Asthmatic Airways. *J Immunol* 2011;186:1861-9.
- WOODRUFF PG, MODREK B, CHOY DF i sur. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:95-105.
- CHU HW, BALZAR S, WESTCOT JY i sur. Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. *Clin. Exp Allergy* 2002;32:1558-65.
- AL-RAMLI W, PREFONTAINE D, CHOUIALI F i sur. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1185-7.
- McKINLEY L, ALCORN JF, PETERSON A i sur. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 2008;181:4089-97.
- BERRY M, MORGAN A, SHAW DE i sur. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax* 2007;62:1043-9.
- WENZEL SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012;18:716-25.
- MARTIN PE, MATHESON MC, GURRIN L i sur. Childhood eczema and rhinitis predict atopic but not nonatopic adult asthma: a prospective cohort study over 4 decades. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1473-9.
- KIM HY, DeKRUYFF RH, UMETSU DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2010;11:577-84.
- CORREN J, BUSSE W, MELTZER EO i sur. A randomized, controlled, phase 2 study of AMG 317, an IL-4/α antagonist, in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:788-96.
- LI X, HOWARD TD, MOORE WC i sur. Importance of hedgehog interacting protein and other lung function genes in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1457-65.
- Van DIEMEN CC, POSTMA DS, VONK JM i sur. A disintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:329-33.
- YU M, ECKART MR, MORGAN AA i sur. Identification of an IFN-γ/mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest* 2011;121:3133-43.
- BAINES KJ, SIMPSON JL, WOOD LG i sur. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:153-60.
- SAHA SK, BERRY MA, PARKER D i sur. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:685-91.
- BERRY MA, HARGADON B, SHELLEY M i sur. Evidence of a role of tumor necrosis factor-α in refractory asthma. *N Engl J Med* 2006;354:697-708.
- MOORE WC, MEYERS DA, WENZEL SE. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:315-23.
- GOMEZ JL, PEREZ MF, MITCHELL A i sur. Airway Macrophage Expression Signatures Associated With Severe Airflow Obstruction In Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:A4540.
- SLEIMAN PM, FLORY J, IMIELINSKI M i sur. Variants of DENND1B associated with asthma in children. *N Engl J Med* 2010;362:36-44.
- MASUOKA M, SHIRAIISHI H, OHTA S i sur. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest* 2012;122:2590-600.
- SIDHU SS, YUAN S, INNES AL i sur. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-β activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14170-5.
- GORDON ED, SIDHU SS, WANG ZE i sur. A protective role for periostin and TGF-β in IgE mediated allergy and airway hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 2012;42:144-55.
- HAYASHI N, YOSHIMOTO T, IZUHARA K i sur. T helper 1 cells stimulated with hand IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN-γ and IL-13 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14765-70.
- TAKAYAMA G, ARIMA K, KANAJI T i sur. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:98-104.
- UCHIDA M, SHIRAIISHI H, OHTA S i sur. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46:677-86.
- BLANCHARD C, MINGLER MK, McBRIDE M i sur. Periostin facilitates eosinophil tissue infiltration in allergic lung and esophageal responses. *Mucosal Immunol* 2008;1:289-96.
- QASEEM AS, SONAR S, MAHAJAN L i sur. Linking surfactant protein SP-D and IL-13: implications in asthma and allergy. *Mol Immunol* 2013;54:98-107. doi: 10.1016/j.molimm.2012.10.039.
- SEHRA S, YAO W, NGUYEN ET i sur. Periostin regulates goblet cell metaplasia in a model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2011;186:4959-66.
- LOPEZ-GUISA JM, POWERS C, FILE D i sur. Airway epithelial cells from asthmatic children differentially express proremodeling factors. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:990-7.e6.
- ARRON JR, JIA GQ, ERICKSON RW i sur. Periostin Is A Systemic Biomarker Of Eosinophilic Airway Inflammation In Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:A4455.
- CORREN J, LEMANSKE RF, HANANIA NA i sur. Lebrikizumab Treatment in Adults with Asthma. *N Engl J Med* 2011;365:1088-98.
- RABINOVITCH N, GRABER NJ, CHINCHILLI VM i sur. Urinary leukotriene E4/exhaled nitric oxide ratio and montelukast response in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:545-51.
- JIN Y, HU D, PETERSON EL i sur. Dual-specificity phosphatase 1 as a pharmacogenetic modifier of inhaled steroid response among asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:618-25.
- TANTISIRA KG, LASKY-SU J, HARADA M i sur. Genomewide Association Between GLCCI1 and Response to Glucocorticoid Therapy in Asthma. *N Engl J Med* 2011;365:1173-83.
- YURTSEVER Z, SALA-RABANAL M, RANDOLPH DT i sur. Self-cleavage of human CLCA1 by a novel internal metalloprotease domain controls calcium-activated chloride channel activation. *J Biol Chem* 2012;287:42138-49.
- VYHLIDAL CA, K RIFFEL AK, DAI H i sur. Detecting gene expression in buccal mucosa in subjects with asthma versus subjects without asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24:138-43.
- WEDES SH, WU W, COMHAIR SA i sur. Urinary Bromotyrosine Measures Asthma Control and Predicts Asthma Exacerbations in Children. *J Pediatr* 2011;159:248-55.
- WEDES SH, KHATRI SB, ZHANG R i sur. Noninvasive markers of airway inflammation in asthma. *Clin Transl Sci* 2009;2:112-7.
- JACKSON D, TRUJILLO-TORRALBO MB, SHAMJI B i sur. Nasal and bronchial levels of Th2 cytokines correlate during a virus induced asthma exacerbation. *ERS Annual Congress, Amsterdam 2011*. Dostupno na; [https://www.ersnetsecure.org/public/prg\\_congres.abstract?ww\\_i\\_presentation=59697](https://www.ersnetsecure.org/public/prg_congres.abstract?ww_i_presentation=59697). Datum pristupa: 2. 5. 2013.

41. LAMBRECHT BN, HAMMAD H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 2012;18:684-92.
42. HOGATE ST. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of severe asthma. *Eur Respir Mon* 2011;51:200-207.
43. HAAHTELA T, JARVIEN M, KAVA T i sur. Comparison of a beta2 agonist, terbutaline, with an inhaled corticosteroid, budesonide, in newly detected asthma. *N Engl J Med* 1991;325:388-92.
44. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group. *N Engl J Med* 2000;343:1054-63.
45. SIMONS FE. A comparison of beclomethasone, salmeterol, and placebo in children with asthma. Canadian Beclomethasone Dipropionate-Salmeterol Xinafoate Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1659-56.
46. MARTINEZ FD, CHINCHILLI VM, MORGAN WJ i sur. Use of beclomethasone dipropionate as rescue treatment for children with mild persistent asthma (TREXA): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2011;377:650-7.
47. VERBERNE AA, FROST C, DUIVERMAN EJ i sur. Addition of salmeterol versus doubling the dose of beclomethasone in children with asthma-The Dutch Asthma Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:213-9.
48. GUILBERT TW, MORGAN WJ, ZEIGER RS i sur. Long term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *N Engl J Med* 2006;354:1985-97.
49. STRUNK RC, STERNBERG AL, SZEFLER SJ i sur. Long-Term Budesonide or Nedocromil Treatment, Once Discontinued, Does Not Alter the Course of Mild to Moderate Asthma in Children and Adolescents. *J Pediatr* 2009;154:682-7.
50. PEDERSEN S. Do Inhaled Corticosteroids Inhibit Growth in Children? *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:521-35.
51. BARNES PJ, ADCOCK IM. Steroid resistance in asthma. *QJM* 1995;88:455-68.
52. BARNES PJ, GREENING AP, CROMPTON GK. Glucocorticoid resistance in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:125-40.
53. SZEFLER SJ, LEUNG DY. Glucocorticoid-resistant asthma: pathogenesis and clinical implications for management. *Eur Respir J* 1997;10:1640-7.
54. STIPIĆ MARKOVIĆ A. Fenotipovi astme i poremećaj homeostaze imunološkog sustava. *Acta Med Croatica* 2011;65:129-35.
55. STIPIĆ MARKOVIĆ A. Clusters of severe asthma. Book of abstracts. Thorax congress, Zagreb, 2012.
56. MOORE WC, MEYERS DA, WENZEL SE i sur. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181: 315-23.
57. SUTHERLAND RE, GOLEVA E, STRAND M i sur. Body mass and glucocorticoid response in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:682-7.
58. STIPIĆ MARKOVIĆ A. Inflammatory subphenotypes in asthma syndrome. Zbirka sažetaka 1. hrvatskog rinološkog kongresa, Zagreb, 2010;74.
59. SZEFLER SJ. Defining asthma phenotypes: focusing the picture. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:939-40.
60. FAJT ML, WENZEL SE. Asthma phenotypes in adults and clinical implications. *Exp Rev Respir Med* 2009;3:607-25.
61. GIBSON PG. Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. *Clin Respir J* 2009;3:198-206.
62. FAHY JV. Identifying clinical phenotypes of asthma: steps in the right direction. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181: 296-7.
63. TAUBE C, BUHL R. Does phenotyping asthma help to improve differential treatment? *Dtsch Med Wochenschr* 2010;135:468-73.
64. STIPIĆ-MARKOVIĆ A, PEVEC B, RADULOVIĆ-PEVEC M. Aspirinska astma. U: Pavlov N, Čulić S, Miše K, ur. *Alergijske bolesti*. Split: KBC Split, 2010;104-12. *Medicus* 2013;22(1):57-67
65. RADULOVIĆ PEVEC M. Patofiziološki mehanizmi aspirinom prouzročene astme u ljudi. (Magistarski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, 2009, str. 68
66. CHOWDHURY BA, SEYMOUR SM, MICHELE TM i sur. The Risks and Benefits of Indacaterol – The FDA's Review. *N Engl J Med* 2011;365:2247-9.
67. CAZZOLA M, CALZETTA L, MATERA MG.  $\beta_2$ -adrenoceptor agonists: current and future direction. *Br J Pharmacol* 2011;163:4-17.
68. CAZZOLA M, SEGRETI A, MATERA MG. Novel bronchodilators in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:6-12.
69. DESHPANDE DA, ROBINETT KS, WANG WCH i sur. Bronchodilator activity of bitter tastants in human tissue. *Nature Medicine* 2011;17:776-778 doi:10.1038/nm0711-776b.
70. BELVISI MG, DALE N, BIRRELL MA i sur. Bronchodilator activity of bitter tastants in human tissue. *Nat Med* 2011;17:776.
71. DESHPANDE DA, WANG WCH, McILMOYLE EL i sur. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med* 2010;16:1299-304.
72. ZERVAS E, BRIGHTLING C, GAGA M. Severe asthma. Current and future treatments. *Pneumon*, 2011;24:402-13.
73. PARK HW, YANG MS, PARK CS i sur. Additive role of tiotropium in severe asthmatics and Arg16Gly in ADRB2 as a potential marker to predict response. *Allergy* 2009;64:778-83.
74. BARNES PJ. Inhaled Corticosteroids. *Pharmaceuticals* 2010;3:514-540.
75. BARNES PJ. Corticosteroid Therapy for Asthma. *Pulmao RJ* 2012;21:53-59.
76. ANTHRACOPOULOS MB, PRIFTIS KN, RUSSELL G. Safety of Inhaled Corticosteroids. Why the variation in systemic adverse effects? *Curr Pediatr Rev* 2008;4:198-215.
77. DERENDORF H, NAVE R, DROLLMANN A i sur. Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma. *Eur Respir J* 2006;28:1042-50.
78. DENNE C, VOGL-VOSWINCKEL AE, GRUEBL A i sur. Adrenal crisis caused by inhaled fluticasone in an adolescent with cystic fibrosis and advanced hepatopathy: a case report. *Case Rep Pulmonol* 2012;2012:913574
79. LOKE YK, CAVALLAZZI R, SINGH S. Risk of fractures with inhaled corticosteroids in COPD: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *Thorax* 2011;66:699-708.
80. VERBERNE AA, FROST C, DUIVERMAN EJ i sur. Addition of salmeterol versus doubling the dose of beclomethasone in children with asthma. The Dutch Asthma Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:213-9.
81. GUILBERT TW, MAUGER DT, ALLEN DB i sur. Growth of preschool children at high risk for asthma 2 years after discontinuation of fluticasone. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:956-63.e1-7.
82. ADAMS N, LASSERSON TJ, CATES CJ, JONES PW. Fluticasone versus beclomethasone or budesonide for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD002310.
83. WOLTERS OD, WALTERS EG. Short-term lower leg growth in 5- to 11-year-old asthmatic children using beclomethasone dipropionate inhalers with chlorofluorocarbon or hydrofluoroalkane propellants: a 9-week, open-label, randomized, crossover, noninferiority study. *Clin Ther* 2011 Aug;33(8):1069-76.
84. BARNES PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:557-72.
85. ADCOCK IM, BARNES PJ. Ligand-induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) transrepression and transactivation. *Biochem Soc Trans* 1996;24:267S.
86. VAYSSIERE BM, DUPONT S, CHOQUART A i sur. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol* 1997;11:1245-55.
87. BARNES PJ, KARIN M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-71.

88. REBER LL, DAUBEUF F, PLANTINGA M i sur. A dissociated glucocorticoid receptor modulator reduces airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2012;188:3478-87.
89. LIBERMAN AC, ANTUNICA-NOGUEROL M, FERRAZ-de-PAULA V i sur. Compound A, a dissociated glucocorticoid receptor modulator, inhibits T-bet (Th1) and induces GATA-3 (Th2) activity in immune cells. *PLoS One* 2012;7:e35155.
90. SCHÄCKE H, ZOLLNER TM, DÖCKE WD i sur. Characterization of ZK 245186, a novel, selective glucocorticoid receptor agonist for the topical treatment of inflammatory skin diseases. *Br J Pharmacol* 2009;158:1088-103.
91. ZHANG J, CAVET M, VANDER MEID KR i sur. BOL-303242-X, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, with full anti-inflammatory properties in human ocular cells. *Mol Vis* 2009;15:2606-16.
92. BARNES PJ, ADCOCK IM. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:46-50.
93. SHA WC, LIOU HC, TUOMANEN EI i sur. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kB leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995;80:321-30.
94. Van DEVENTER SJ, ELSON CO, FEDORAK RN. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. *Crohn's Disease Study Group. Gastroenterology* 1997;113:383-9.
95. PAHL HL, KRAUSS B, SCHULTZE-OSTHOFF K i sur. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Exp Med* 1996;183:1829-40.
96. BOSNJAK B, STELZMUELLER B, ERB KJ i sur. Treatment of allergic asthma: Modulation of Th2 cells and their responses. *Respiratory Research* 2011;12:114.
97. RODRIGO GJ, NEFFEN H, CASTRO-RODRIGUEZ JA. Efficacy and safety of subcutaneous omalizumab vs placebo as add-on therapy to corticosteroids for children and adults with asthma: a systematic review. *Chest* 2011;139:28-35.
98. PELAIA G, GALLELLI L, RENDA T i sur. Update on optimal use of omalizumab in management of asthma. *J Asthma Allergy* 2011;4:49-59.
99. ADCOCK IM, CARAMORI G, CHUNG KF. New targets for drug development in asthma. *Lancet* 2008;372:1073-87.
100. HART TK, BLACKBURN MN, BRIGHAM-BURKE M i sur. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. *Clin Exp Immunol* 2002;130:93-100.
101. WENZEL S, WILBRAHAM D, FULLER R. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet* 2007;370:1422-31.
102. KRUSE N, TONY HP, SEBALD W. Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement. *The EMBO J* 1992;11:3237-44.
103. Modified IL-4 mutein receptor antagonist (patent). Dostupno na: <http://www.ipaustralia.com.au/applicant/aerovance-inc/patents/AU2008322569/>. Datum pristupa: 2. 5. 2013.
104. INGRAM JL, KRAFT M. IL-13 in asthma and allergic disease: Asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:829-42.
105. GAUVREAU GM, BOULET LP, COCKCROFT DW i sur. Effects of Interleukin-13 Blockade on Allergen-induced Airway Responses in Mild Atopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1007-14.
106. PIPER E, BRIGHTLING C, NIVEN R i sur. A phase II placebo-controlled study of tralokinumab in moderate-to-severe asthma. *Eur Respir J* 2013;41:330-8.
107. DIMOV VV, CASALE TB. Immunomodulators for Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010;2:228-34.
108. THOMSON NC, PATEL M, SMITH AD. Lebrikizumab in the personalized management of asthma. *Biologics* 2012;6:329-35.
109. HALDAR P, BRIGHTLING CE, HARGADON B i sur. Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med* 2009;360:973-84.
110. NAIR P, PIZZICHINI MM, KJARSGAARD M i sur. Mepolizumab for Prednisone-Dependent Asthma with Sputum Eosinophilia. *N Engl J Med* 2009;360:985-93.
111. LECKIE MJ, BRINKE A, KHAN J i sur. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356:2144-8.
112. CASTRO M, MATHUR S, HARGREAVE F i sur. Reslizumab for Poorly Controlled, Eosinophilic Asthma A Randomized, Placebo-controlled Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:1125-32.
113. BUSSE WW, ISRAEL E, NELSON HS i sur. Daclizumab improves asthma control in patients with moderate to severe persistent asthma: a randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1002-8.
114. NAGAI H. Prostaglandin as a target molecule for pharmacotherapy of allergic inflammatory diseases. *Allergol Int* 2008;57:187-96.
115. SINGH D, CADDEN P, HUNTER M i sur. Inhibition of the asthmatic allergen challenge response by the CRTH2 antagonist OC000459. *ERJ* 2013;41:46-52.
116. SCHMIDT J, BELL F, AKAM E i sur. Biochemical and pharmacological characterization of AZD1981, an orally available selective DP2 antagonist in clinical development for asthma. *Br J Pharmacol* 2013;168:1626-38.
117. BATEMAN ED, IZQUIERDO JL, HARNEST U i sur. Efficacy and safety of roflumilast in the treatment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:679-86.
118. BOUSQUET J, AUBIER M, SASTRE J i sur. Comparison of roflumilast, an oral anti-inflammatory, with beclomethasone dipropionate in the treatment of persistent asthma. *Allergy* 2006;61:72-8.
119. SINGH D, PETAVY F, MacDONALD A i sur. The inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 reduces allergen challenge responses in asthma. *Resp Res* 2010;11:26.
120. BHAVSAR P, KHORASANI N, HEW M i sur. Effect of p38 MAPK inhibition on corticosteroid suppression of cytokine release in severe asthma. *Eur Respir J* 2010;35:750-6.
121. BOLLMEIER SG. New Therapies in Asthma. U: *Pulmonary and Preventive Care, ACCP*, 2013:1-3. Dostupno na: [http://www.accp.com/docs/bookstore/acsap/a13b1\\_m1ch.pdf](http://www.accp.com/docs/bookstore/acsap/a13b1_m1ch.pdf). Datum pristupa: 2. 5. 2013.



**ADRESA ZA DOPISIVANJE:**

Prof. dr. sc. Asja Stipić Marković, dr. med.  
 KB „Sveti Duh”  
 10000 Zagreb, Sveti Duh 64

**PRIMLJENO/RECEIVED:**

17. 3. 2013.  
 March 17, 2013

**PRIHVAĆENO/ACCEPTED:**

14. 5. 2013.  
 May 14, 2013

