Povezanost koncentracije limfopoetina strome timusa u serumu s fenotipom astme dječje dobi

Vrsalović, Renata

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:120792

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Renata Vrsalović

Povezanost koncentracije limfopoetina strome timusa u serumu s fenotipom astme dječje dobi

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Renata Vrsalović

Povezanost koncentracije limfopoetina strome timusa u serumu s fenotipom astme dječje dobi

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija iz biomedicinskih znanosti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Klinički dio istraživanja učinjen je u Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu. Mjerenje serumske koncentracije citokina učinjeno je u Univerzitetnoj klinici za plućne bolesti i alergiju Golnik, Golnik, Slovenija.

Etiološka dijagnostika respiratornih virusnih infekcija učinjena je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u sklopu projekta financiranog od Hrvatske zaklade za znanost, IP-2016-06-7556, voditeljice Sunčanice Ljubin Sternak pod naslovom: Novi i zapostavljeni virusni uzročnici infekcija dišnog sustava u vulnerabilnim skupinama bolesnika.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Miroslav Harjaček, dr. med.
doc. dr. sc. Sabina Škrgat, dr. med.

Zahvala

Hvala svima onima koji su svojom podrškom i savjetima doprinijeli izradi ove disertacije.

Iskreno zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Miroslavu Harjačeku, na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju za izradu ovog doktorskog rada.

Hvala djelatnicima Univerzitetne klinike za plućne bolesti i alergiju Golnik, Slovenija, koji su na bilo koji način doprinijeli stvaranju doktorske disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem prof. Peteru Korošecu, idejnom začetniku teme doktorske disertacije, na vođenju, pomoći i savjetima u cjelokupnom postupku nastanka ove disertacije. Hvala mentorici doc. dr. Sabina Škrgat na svoj pomoći pri izradi ove doktorske disertacije.

Prijateljici i kolegici doc. dr. sc. Ivi Mihatov Štefanović i prim. dr. sc. Biserki Čičak zahvalna sam na nesebičnoj pomoći tijekom izrade rada i stalnoj prijateljskoj potpori. Zahvaljujem, također, svim kolegicama i kolegama, kao i svom osoblju Klinike za pedijatriju na iskazanoj podršci i praktičnoj pomoći pri izradi disertacije.
Zahvaljujem prof. dr. sc. Nadi Vrkić na susretljivosti i laboratorijskoj obradi učinjenoj za potrebe ovog rada. Zahvaljujem izv. prof. Sunčanici Ljubin Sternak, koja je omogućila etiološku dijagnostiku respiratornih infekcija.

Prof. Cvijeti Pavlović zahvaljujem na lektoriranju rada.

Također veliko hvala i svim roditeljima i djeci koja su bila uključena u ispitivanje.

Hvala mojim roditeljima koji cijeli život stoje uz mene i uče me pravim vrijednostima.

Ovu disertaciju posvećujem svojoj obitelji, suprugu Tomislavu i djeci Lovri i Jakovu, koji su mi bezuvjetna podrška u svakodnevnom radu i životu. Hvala im za beskrajno dugo strpljenje, podršku i odricanje.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. LIMFOPOETIN STROME TIMUSA 1

1.1.1. Regulacija TSLP-a 1

1.1.2. TSLP i T2 upala 3

1.1.3. Uloga TSLP-a u prirođenom imunitetu i populaciji stanica u astmi 7

1.1.4. Izoforme TSLP-a 8

1.1.5. Povezanost TSLP-a s astmom i alergijskim rinitisom 10

1.1.6. TSLP polimorfizam u astmi 13

1.1.7. TSLP i respiratorni virusi 14

1.1.8. Uloga TSLP-a u egzacerbaciji astme uzrokovanoj respiratornim virusnim infekcijama 15

1.1.9. TSLP i druge bolesti 15

1.1.10. Dosadašnja istraživanja uloge TSLP-a u astmi dječje dobi 17

1.1.11. Potencijalna terapijska korist 19

1.2. ASTMA 22

1.2.1. Epidemiologija 22

1.2.2. Definicija astme 25

1.2.3. Patofiziologija astme 25

1.2.4. Klinička slika 29

1.2.5. Dijagnoza astme 31

1.2.6. Diferencijalna dijagnoza i komorbiditeti 33

1.2.7. Fenotipovi i endotipovi astme 34

1.2.8. Prediktivni indeksi 40

1.2.9. Čimbenici rizika za ranu sipnju i astmu 42

1.2.10. Procjena astme 45

1.2.11. Sveobuhvatan pristup liječenju astme 46
2. HIPOTEZA 48
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 48
4. ISPITANICI I METODE 49
4.1. Ispitanici 49
4.1.1. Test kontrole astme 51
4.1.2. Akutna egzacerbacija astme 51
4.1.3. Kožni ubodni test 52
4.1.4. Mjerenja plućne funkcije 52
4.1.5. Procjena stanja uhranjenosti 53
4.1.6. Laboratorijska mjerenja 53
4.1.7. Statistička analiza 54
4.1.8. Odobrenja i financiranje 55
5. REZULTATI 56
5.1. Ispitanici 56
5.2. Karakteristike ispitivane populacije 57
5.2.1. Obiteljska anamneza 57
5.2.2. Alergijska preosjetljivost 57
5.2.3. Plućna funkcija 62
5.2.4. Test kontrole astme 63
5.2.5. Ispitanici po fenotipu astme 63
5.2.6. Raspodjela ispitanika prema terapiji 64
5.2.7. Pridružene alergijske bolesti 64
5.3. Vrijednosti koncentracija TSLP-a u serumu u ispitivanoj i kontrolnoj skupini 65
5.4. Vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu u tri različita fenotipa astme (alergijska astma, astma inducirana virusnim infekcijama, nealergijska astma) 66

5.5. Povezanost koncentracije TSLP-a u serumu i kontrole astme na osnovi upitnika u djece starije od 4 godine 67

5.6. Povezanost koncentracije TSLP-a u serumu i testa plućne funkcije 69

5.7. Vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme, te u iste djece u mirnoj (asimptomatskoj) fazi bolesti 70

5.7.1. Koncentracija TSLP-a u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme ovisno o PCR nalazu brisa NF na respiratorne viruse 73

5.7.2. Koncentracija TSLP-a u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme ovisno o predmnijevanome okidaču egzacerbacije 74

5.8. Koncentracije TSLP-a u serumu ispitanika s novootkrivenom astmom i ispitanika s prethodno postavljenom dijagnozom astme koja uzimaju protuupalnu terapiju 76

5.8.1. Koncentracije TSLP-a u serumu ispitanika s novootkrivenom astmom i ispitanika s prethodno postavljenom dijagnozom astme ovisno o terapiji 77

5.8.2. Koncentracije TSLP-a u serumu djece s novootkrivenom astmom i djece s prethodno postavljenom dijagnozom astme koja su uzimala kortikosteroidnu terapiju 78

5.9. Vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu ovisno o pridruženim alergijskim bolestima 79

5.10. Analiza TSLP-a 80

6. RASPRAVA 85

6.1. Koncentracije TSLP-a u serumu u mirnoj (asimptomatskoj) fazi bolesti 87

6.1.1. Koncentracije TSLP-a u serumu u tri različita fenotipa astme (alergijska astma, astma inducirana virusnim infekcijama, nealergijska astma) 89

6.1.2. Povezanost koncentracije TSLP-a u serumu i kontrole astme 91

6.1.3. Koncentracija TSLP-a u serumu i protuupalna terapija 93

6.1.4. Astma i komorbiditeti 94

6.2. Koncentracija TSLP-a u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme 95

6.3. Analiza TSLP-a 97

6.3.1. TSLP i plućna funkcija 98

6.3.2. TSLP i ITM 99
6.3.3. TSLP i senzibilizacija 101
6.4. Mogući nedostaci i ograničenja istraživanja 101
6.5. Značaj, kliničke korelacije i polazišta za daljnja istraživanja 102
7. ZAKLJUČCI 107
8. SAŽETAK 108
9. SUMMARY 109
10. LITERATURA 111
11. ŽIVOTOPIS 137

POPIS OZNAKA I KRATICA

AD	atopijski dermatitis
ALSPAC	Avon Longitudinalna studija roditelja i djece (engl. the Avon Longitudinal Study of Parents and Children)
APC	antigen prezentirajuće stanice (engl. antigen presenting cells)
API	astma prediktivni indeks
AR	alergijski rinitis
BAL	bronhoalveolarni lavat
Bcl-xL	difuzni B velikostanični limfom (engl. B-cell lymphoma-extra large)
C-ACT	Upitnik o kontroli astme za djecu (engl. Childhood Asthma Control Test)
CDC	Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. Centers for Disease Control and Prevention)
CI	interval pouzdanosti (engl. confidence interval)
DC	dendritske stanice (engl. dendritic cell)
dsRNA	dvolančana RNA (engl. double-stranded RNA)
EGFR	receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. epidermal growth factor receptor)
ELISA	izoenzimski ELISA test (od engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ERS	Europsko respiratorno društvo (engl. European Respiratory Society)
FeNO	frakcija izdahnutog dušikovog oksida (engl. Fraction of exhaled nitric oxide)
FEV1	forsirani ekspiratorni volumen zraka u prvoj sekundi (engl. Forced expiratory volume in 1 second)
FVC	forsirani vitalni kapacitet (engl. Forced expiratory vital capacity)
GINA	Globalna inicijativa za astmu (engl. Global Initiative for Asthma)

GM-CSF	čimbenik rasta granulocita i makrofaga (engl. granulocyte macrophage colony stimulating factor)
hMPV	humani metapnemovirus (engl. human metapneumovirus)
ICS	inhalacijski kortikosteroid (engl. inhaled corticosteroids)
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IL-7Rα	alfa lanac IL-7 receptora
ILC2	prirođene limfoidne stanice tipa 2 (engl. Type 2 Innate lymphoid cells)
ISAAC	Međunarodno istraživanje o astmi i alergijama u djetinjstvu (engl. International Study of Asthma and Allergies in Childhood)
ITM	indeks tjelesne mase
JAK	Janus kinaza
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
LABA	beta-2 agonist dugog djelovanja (engl. long-acting beta agonist)
lfTSLP	duga izoforma TSLP (engl. long isoform TSLP)
LT	leukotrijen
LTRA	antagonist leukotrijenskih receptora (engl. leukotriene receptor antagonist)
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenima (engl. mitogen-activated protein kinase)
MHC II	molekula klase II glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex class II molecules)
mRNA	glasnička RNA (engl. messenger ribonucleic acid)
NF-κB	nuklearni čimbenik kapa B (engl. nuclear factor kappa B)
NK	prirođenoubilačke stanice (engl. natural killer cells)
NKT	prirođenoubilačke T stanice (engl. natural killer T cells)
OR	omjer izgleda (engl. odds ratio)
OVA	ovalbumin

OX40L	OX40 ligand
PAR-2	proteinazom aktivirani receptor tip 2
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. the polymerase chain reaction)
PEF	vršni ekspiratorni protok zraka (engl. peak expiratory flow)
PIAMA	Prevencija i incidencija astme i alergije na grinje u Nizozemskoj (Dutch Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy)
PRACTALL	alergologija u praksi (engl. Practical allergy)
PRICK	kožni ubodni test
RSV	respiratorni sincicijski virus (engl. Respiratory syncytial virus)
sfTSLP	kratka izoforma TSLP (engl. short isoform TSLP)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. single-nucleotide polymorphism)
SPC	surfaktant protein C
SPINK5	inhibitor serin proteaze Kazal-tip 5 gena (engl. serine protease inhibitor Kazal-type 5)
STAT	signalni transduktor i aktivator transkripcije proteina (engl. signal transducers and activators of transcription)
Th	pomagački limfocit T (engl. T-helper)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze α (engl. Tumor necrosis factor alpha)
Treg	regulacijski limfociti T (engl. Regulatory T cells)
TRPV1	vaniloidni receptor tip 1 (engl. transient receptor potential vanilloid type 1)
TSLP	limfopoetin strome timusa (engl. thymic stromal lymphopoietin)
TSLPR	receptor limfopoetina strome timusa
TSLPRα	alfa lanac TSLP receptora
URECA	Urbano okruženje i dječja astma (engl. Urban Environment and Childhood Asthma)
VEGF	čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. vascular endothelial growth factor)

vs.	nasuprot, prema, za razliku (lat. versus)
γc	zajednički gama lanac citokinskih receptora

1. UVOD

1.1. LIMFOPOETIN STROME TIMUSA

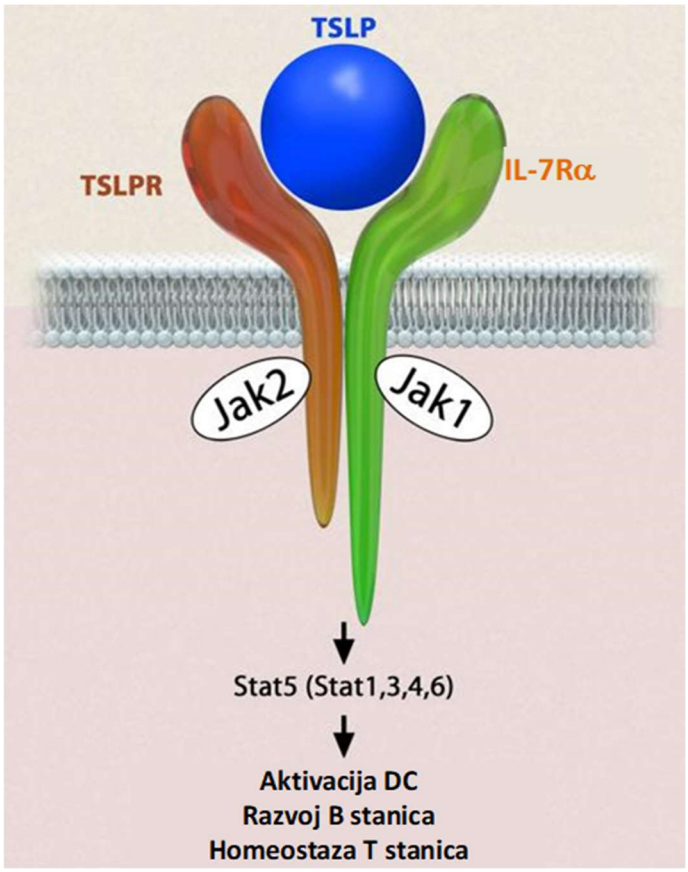
Limfopoetin strome timusa (TSLP, od engl. thymic stromal lymphopoietin) je pleiotropni citokin s četiri uzvojnice koji je blisko povezan s interleukinom 7 (IL-7), članom obitelji citokina interleukina 2 (IL-2).[1] Njegovo ime potječe od činjenice da je 1994. godine izoliran iz supernatanta stanične linije strome mišjeg timusa i prvotno je klasificiran kao molekula koja djeluje kao čimbenik proliferacije i razvoja limfocita B.[2] Humani homolog TSLP-a izoliran je 2000. godine. Stupanj podudarnosti mišjeg i humanog TSLP-a na razini aminokiselina iznosi 43 %, s očuvanim mjestima glikozilacije i cisteinskim ostatcima.[3] Usprkos niskoj homolognosti sekvencija aminokiselina, ljudski i mišji TSLP su funkcionalno slični.[4] TSLP se veže na svoj receptor (TSLPR) kako bi postao biološki aktivan. TSLPR je heterodimerni receptor koji se sastoji od alfa lanca IL-7 receptora (IL-7Rα) i alfa lanca TSLP receptora (TSLPRα), koji je usko povezan sa zajedničkim gama lancem citokinskih receptora (γc) koji se nalazi u IL-2, IL-4, IL-9 i IL-15 receptorskim kompleksima. Sam TSLPR ima nizak afinitet prema TSLP-u, ali vezanjem TSLPR-a s IL-7Rα nastaje mjesto visokog afiniteta vezanja TSLP-a i pokretanja signala (Slika 1.1.).[5] Funkcionalni TSLPR eksprimiraju različite hematopoetske stanične populacije, kao što su T i B stanice, dendritske stanice (DC), prirođenoubilačke stanice (NK), monociti, bazofili, mastociti i eozinofili; ali i neke nehematopoetske stanične linije kao što su epitelne stanice, glatke mišićne stanice dišnog puta, jetra, mozak, skeletni mišići, bubreg, slezena i timus.[6-10]

Kod ljudi TSLP gen se nalazi na kromosomu 5q22.1 pored gena za atopijski citokinski grozd kromosoma 5q31, koji kodira citokine IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13.[11, 12] Kod miševa TSLP gen se nalazi na 18. kromosomu.[5] IL-7Rα se nalazi na genu 5q13, a TSLPRα je kodiran na Xp22.3 i Yp11.3. Nađene su dvije inačice transkripta koje kodiraju različite izoforme tog gena.[13]

1.1.1. Regulacija TSLP-a

Unatoč početnoj identifikaciji TSLP u timusu, TSLP je poglavito izražen na epitelnim stanicama i keratocitima površinskih barijera kao što su koža, crijeva i pluća.[4, 6, 11, 14, 15] Široki spektar podražaja može aktivirati stvaranje TSLP-a. Infektivni uzročnici i njihovi produkti, kao što su

respiratorni virusi, bakterijski peptidoglikani, lipoteikoična kiselina, dvolančana RNA (dsRNA), ali i citokini kao što su IL-4, IL-13, čimbenik tumorske nekroze α (TNF-α, od engl. tumor necrosis factor alpha) i IL-1, te mehanička ozljeda, onečišćenje zraka i alergeni induciraju ekspresiju TSLP-a od strane stanica plućnog parenhima, stanica kože, ali i od stanica nespecifične imunosti (dendritskih stanica, mastocita, bazofila).[16-29]



Slika 1.1. Shematski prikaz TSLPR kompleksa. DC – dendritske stanice. Preuzeto i modificirano uz odobrenje autora iz *Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:851.*[30]

Široki spektar podražaja pokreće i/ili pojačava ekspresiju TSLP-a, u što je uključen velik broj unutarstaničnih signalnih putova. Okidači TSLP-a mogu izvršiti svoju funkciju aktivacijom Toll-like receptora 3,[13] proteinazom aktiviranog receptora tip 2 (PAR-2) i vaniloidnog receptora tipa 1 (TRPV1, od engl. transient receptor potential vanilloid type 1).[22, 31] Virusna dsRNA aktivira Toll-like receptor u respiratornim i ezofagealnim epitelnim stanicama.[13] Proteaze inhalacijskih alergena (kao što su tripsin i papain), npr. iz *Alternariae*, induciraju stvaranje TSLP-a u

epitelnim stanicama dišnog puta ljudi preko PAR-2 G protein-vezanog receptora.[22] TRPV1 je toplinski i ligand ovisan Ca^{2+}-propusni ionski kanal kojega aktiviraju termalni podražaji, intenzivni mirisi, kapsaicin (ljuti sastojak čili paprike), protoni i depolarizacija membrane. TRPV1 je snažno eksprimiran u nociceptornim neuronima dorzalnih korijena ganglija, a nalazi se također i u nesenzornim tkivima kao što su humani epidermalni keratinociti i dišni put. Također može aktivirati oslobađanje TSLP-a iz epitelnih stanica dišnog puta.[31]

Molekularni mehanizmi koji kontroliraju ekspresiju i oslobađanje TSLP-a još uvijek nisu potpuno razjašnjeni. Monogenetske bolesti i mišji modeli pomažu u razumijevanju regulacije transkripcije TSLP-a. Čini se da je transkripcija TSLP-a u određenom stupnju ovisna o Ca^{2+}, nuklearnom čimbeniku aktiviranih T stanica i aktivaciji nuklearnog čimbenika kapa B (NF-κB).[19] U Nethertonovom sindromu, teškoj kožnoj bolesti karakteriziranoj oštećenjima kože kao kod atopijskog dermatitisa, TSLP je prekomjerno eksprimiran. Nethertonov sindrom je posljedica defektne kožne barijere uzrokovane mutacijama u inhibitoru serin proteaze Kazal-tip 5 gena (SPINK5, od engl. serine protease inhibitor Kazal-type 5), koji kodira inhibitor kožnih serinskih proteaza.[32] U SPINK5 „knock-out“ miševa (SPINK5 -/- miševi), odsutnost limfoepitalnog Kazal-tip srodnog inhibitora rezultira neobuzdanom aktivnošću serin proteaze kalikrein 5, koji izravno aktivira proteinazom aktivirani receptor tip 2 i inducira NF-κB posredovanu prekomjernu ekspresiju TSLP-a bez doprinosa stečenog imunosnog sustava.[22, 32] Zanimljivo, u SPINK5 / PAR-2 dvostruko „knock-out“ miševima, TSLP ekspresija je značajno smanjena iako je upala još uvijek prisutna.[33] Razlikuje li se citokinski milje u odsutnosti TSLP-a tek treba utvrditi.

Pokazalo se da aktivacija TSLP receptora šalje signale preko višestrukih signalnih transduktora i aktivatora transkripcije proteina (STAT, od engl. signal transducers and activators of transcription; prenosioci podražaja i aktivatori transkripcije), uključujući STAT 1, STAT 3, STAT 4, STAT 5, STAT 6 i Janus kinaze (JAK) 1 i JAK 2 u CD11c+ DC iz periferne krvi (Slika 1.1).[34]

1.1.2. TSLP i T2 upala

TSLP je hematopoetski čimbenik koji je izvorno pročišćen kao čimbenik stimulacije B stanica jer promiče proliferaciju i diferencijaciju mišjih B stanica. Međutim još uvijek nije definirana uloga TSLP u normalnom razvoju B stanica kao ni uloga TSLP-a na B stanice tijekom alergijskog upalnog odgovora.[35] U posljednjih nekoliko godina smatra se da je glavna uloga TSLP-a, i kod

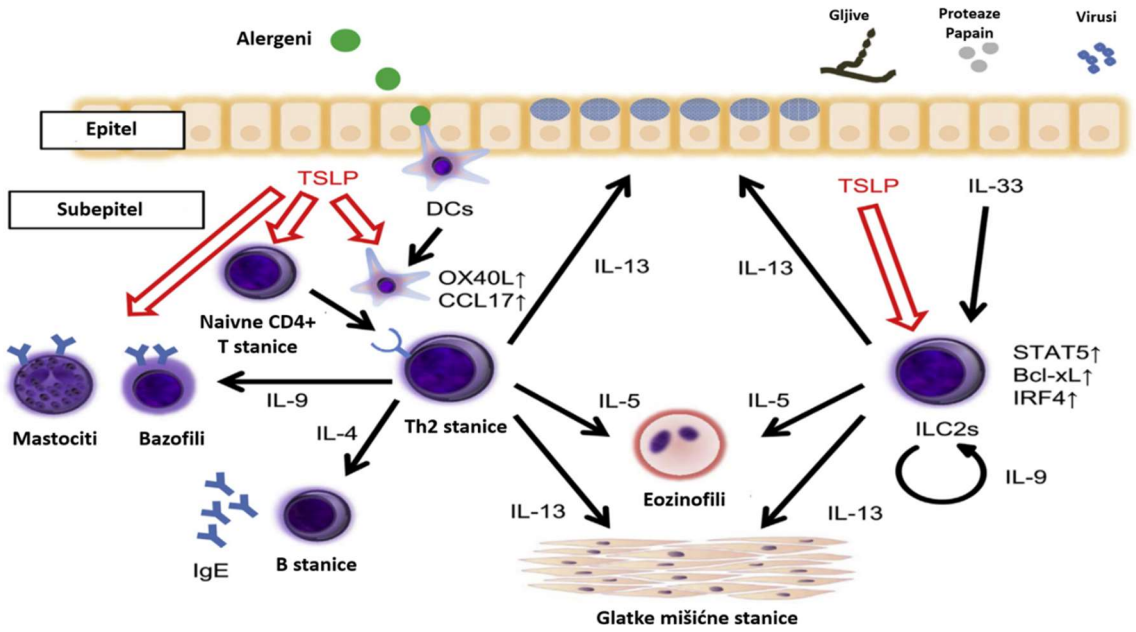
ljudi i kod miševa, reguliranje imunosnog odgovora na površinskim barijerama tako što aktivira nezrele dendritske stanice, mastocite, bazofile, eozinofile i limfocite u smjeru Th2 staničnog odgovora.[4, 36] Kada TSLP-stimulira CD11c+ dendritske stanice na antigen specifični način (npr. u alogenoj kulturi) u odsutnosti IL-12, one eksprimiraju OX40 ligand (OX40L) i time promiču razvoj Th2 diferenciranih stanica.[10, 37] U skladu s ulogom u reguliranju Th2 citokinskog odgovora, TSLP-om aktivirane DC dalje pogoduju Th2 upali tako što polariziraju CRTh2^{+} Th2 efektorske memorijske stanice i koče proizvodnju i/ili održavanje FOXP3^{+} regulacijskih limfocita T (Treg) u alergijskoj upali dišnih putova *in vivo*.[38-40] (Slika 1.2.)

TSLP također može izravno potaknuti razvoj naivnih CD4+ i CD8+ T stanica u Th2 stanice. Naime, aktivacija TSLPR inducira transkripciju IL-4 gena, što opet nadopunjuje TSLPR na CD4+ T stanicama, a to rezultira pozitivnom povratnom spregom.[10, 41, 42] Naivne humane CD8+ T stanice slabo, ako i uopće, eksprimiraju TSLPR; međutim, nakon aktivacije, ekspresija TSLPR je povišena.[43] TSLP stimulacija potiče proizvodnju proteina za preživljavanje Bcl-2 u STAT5 ovisnom načinu i u CD4+ i CD8+ T stanicama.[44, 45]

TSLP ne samo da može potaknuti Th2 stečeni imunosni odgovor, nego se posljednjih nekoliko godina smatra da igra glavnu ulogu u poticanju razvoja Th2 prirođenih imunosnih stanica. Brojne stanice kao na primjer, prirođene limfoidne stanice tip 2 (ILC2, od engl. innate lymphoid cell), mastociti, prirođenoubilačke T stanice (NKT), bazofili i eozinofili, eksprimiraju TSLPR. Te stanice odgovaraju na TSLP povećanom proizvodnjom Th2 citokina, što značajno pridonosi Th2 upali u astmi, atopijskom dermatitisu i eozinofilnom ezofagitisu.[46-48]

TSLP djeluje izravno na NKT stanice potičući stvaranje T2 citokina IL-4 i IL-13.[48] U kulturama fetalne jetre i koštane srži TSLP također potiče razvoj IgM pozitivnih nezrelih B stanica.[44] Povišena sistemska razina TSLP-a može inducirati razvojne promjene u B stanicama, kako u nezrelim pretečama B-stanica u koštanoj srži tako i u zrelim B-stanicama u slezeni. Čini se da je utjecaj TSLP-a na diferencijaciju B-stanica koštane srži izravan, dok su njegovi učinci na zrele B stanice uglavnom neizravni, te zahtijevaju prisutnost Th2 polariziranih CD4+ T stanica i IL-4.[49]

Nakon stimulacije epitelnih stanica, TSLP može izravno aktivirati mastocite i potaknuti ih na oslobađanje različitih proupalnih citokina i kemokina neovisno o imunoglobulinu E (IgE). Mastociti aktivirani IgE-om mogu osloboditi TNF-α, koji može inducirati glatke mišićne stanice na proizvodnju TSLP-a unutar dišnog puta.[50]



Slika 1.2. Uloga TSLP-a u patogenezi astme. Preuzeto i modificirano uz odobrenje autora iz *Nakajima S, Kabata H, Kabashima K, Asano K. Anti-TSLP antibodies: Targeting a master regulator of type 2 immune responses. Allergol Int. 2020;69:200.*[51]

Ljudski bazofili stvaraju, ali i reagiraju na podražaj TSLP-om.[52] Inkubacija ljudskih bazofila s TSLP-om povećava oslobađanje T2-citokina (IL-4, IL-25, IL-13), dovodi do pojačane ekspresije receptora za epitelne citokine (TSLPR, IL-17Rb i ST2L), povećava markere aktivacije bazofila (CD203c ekspresija) i pojačava degranulaciju bazofila i oslobađanje histamina i leukotrijena C4.[53]

In vitro stimulacija pročišćenih eozinofila TSLP-om inducira degranulaciju, što sugerira da eozinofili imaju sposobnost sudjelovanja u TSLP-om potaknutim alergijskim reakcijama.[54] Ljudski eozinofili konstitutivno eksprimiraju funkcionalni kompleks TSLPR. TSLP može stimulirati eozinofile aktivacijom protein kinaze regulirane izvanstaničnim signalom, p38 protein kinaze aktivirane mitogenima (MAPK, od engl. mitogen acivated PK) i aktivacijom signalnog puta ovisnog o NF-κB. TSLP promovira aktivnost i kemotaksiju eozinofila. *In vitro,* ovisno o koncentraciji, TSLP značajno odgađa apoptozu eozinofila, pojačava ekspresiju stanične površine adhezijske molekule CD18 i međustanične adhezijske molekule-1. TSLP također reducira proizvodnju L-selektina, pojačava adheziju eozinofila na fibronektin i inducira oslobađanje upalnog citokina IL-6 i kemokina CXCL8, CXCL1 i CCL2.[55] Prema gore navedenome može se zaključiti da TSLP može značajno inducirati eozinofilnu upalu.

Ponovno izlaganje specifičnim alergenima ili podražajima iz okoliša može uzrokovati stečeni imunosni odgovor. U bolesnika s astmom izloženost alergenima (kao što su pelud, spore plijesni, grinje, dlaka životinja i prašina), virusima ili podražajima iz okoliša može uzrokovati stečeni imunosni odgovor. TSLP-om aktivirane DC koje eksprimiraju OX40L mogu potaknuti naivne CD4+ T stanice na diferencijaciju u upalne T pomagačke stanice tipa 2 (Th2) i ekspanziju alergen specifičnih Th2 memorijskih stanica.[56] Upalne Th2 efektorske stanice također izlučuju citokine IL-4, IL-9 i IL-13, koji pojačavaju IgE, mastocite, proizvodnju sluzi i hiperreaktivnost dišnog puta. U alergen specifičnim Th2 memorijskim stanicama, alergen povezan s glavnim kompleksom tkivne podudarnosti II klase (MHC II, od engl. *major histocompatibility complex class II molecules*) djeluje na receptore na B stanicama i kostimulira interakciju CD40 i CD40L, što rezultira prebacivanjem s IgM na IgE klasu imunoglobulina.[57] To rezultira selektivnom ekspanzijom T limfocita (posebice Th2 tipa), koji luče citokine kodirane na kromosomu 5q31-33, uključujući interleukine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13, čimbenik rasta granulocita i makrofaga (GM-CSF, od engl. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) koji uzrokuje kontrakciju glatkih mišića dišnih putova, vazodilataciju, povećanu vaskularnu permeabilnost i mukoznu sekreciju.[57, 58]

Nedavno je dokazano da prirođene limfoidne stanice tip 2 (ILC2) imaju važnu ulogu u imunosnom odgovoru tip 2. Nekoliko studija se usredotočilo na ulogu TSLP-a na ILC2. Te prirođene stanice, koje su dobri proizvođači T2 citokina, snažno su inducirane TSLP-om. Konkretno, TSLP može povećati ekspresiju IL-4, IL-5 i IL-13 u IL-33-stimuliranim humanim ILC2 pročišćenima iz periferne krvi i nazalnih polipa.[59] Pokazalo se da TSLP također aktivira ILC2 u plućima i koži miševa.[60] Doista, iako je prvotno opisano da ILC2 kao odgovor na IL-33 proizvode visoke razine IL-5 i IL-13, a vrlo niske razine IL-4. Međutim, kada se ILC2 stimuliraju s TSLP i leukotrijenom D4, mogu proizvesti IL-4. To sugerira da ILC2 također može biti značajan izvor IL-4 i stoga bi mogao biti važan u stvaranju odgovarajućeg IL-4 bogatog okruženja koje može razviti Th2 odgovor kada antigen prezentirajuće stanice (APC, od engl. antigen presenting cells) predoče antigen naivnim T stanicama.[59, 61] Također je pokazano da TSLP dodatno pojačava ekspresiju GATA3 u humanim ILC2, a to može biti jedan od mehanizama produkcije Th2 citokina od strane ILC2 induciranih TSLP-om.[59] Aktivirane ILC proizvode velike količine IL-5 i IL-13, te mogu inducirati eozinofilnu upalu u dišnim putovima neovisno o T stanicama.[10] Ozljeda epitela dišnih putova, npr. oksidansima (ozon i drugi iritansi) može dovesti do aktivacije tih stanica, pridonoseći hiperreaktivnosti dišnih putova koja je neovisna o stečenoj

imunosti.[62] U dišnim putovima astmatičara ILC2 ima ranu i ključnu ulogu u upalnom odgovoru tipa 2. Stoga se danas smatra da prirođeni imunitet ima vodeću ulogu u patofiziologiji astme, sa zamršenim međusobnim vezama između prirođene i stečene imunosti. Primarni regulatori imunosti tipa 2 su zajedno Th2 stanice i ILC2, a one izražavaju glavni transkripcijski faktor GATA3 koji upravlja proizvodnjom citokina tipa 2. Stoga je prijedlog da se Th2 visoka upala označava kao upala tipa 2 (ili T2 upala), kako bi obuhvatila i ulogu ostalih imunosnih stanica uključenih u Th2 upalu dišnih putova.[63]

1.1.3. Uloga TSLP-a u prirođenom imunitetu i populaciji stanica u astmi

Prirođene limfoidne stanice tip 2 igraju važnu ulogu u tip 2 upalnom odgovoru u astmi, pogotovo u eozinofilnoj astmi, teškoj astmi i virusima izazvanoj egzacerbaciji astme.[64] Iako sam TSLP ne inducira proizvodnju citokina tip 2 od strane plućnih ILC2, TSLP zajedno s IL-2 i IL-7 podržava preživljavanje ILC2. [65] Nasuprot tome, IL-33 snažno potiče proliferaciju i proizvodnju citokina tip 2 od strane ILC2. Zanimljivo, kombinacija TSLP-a i IL-33 ima sinergistički učinak na mišje i ljudske ILC2, te dovodi do proliferacije i proizvodnje citokina tipa 2.[66, 67] Nadalje, TSLP u ILC2 aktivira anti-apoptotičku molekulu Bcl-xL putem STAT5 puta, a to uzrokuje rezistenciju na kortikosteroide. [68] TSLP također inducira rezistenciju na kortikosteroide u ljudskim ILC2 putem STAT5 i MAP kinaze, sa značajno većim brojem ILC2 u sputumu pacijenata s teškom astmom.[69] Čini se da je TSLP−ILC2 put uključen u patofiziologiju teške astme rezistentne na kortikosteroide. Mnoge druge imunosne stanice također eksprimiraju TSLPR i odgovaraju na TSLP, kao npr. mastociti, eozinofili i NKT stanice.[70] Na primjer, TSLP, IL-1β i TNFα sinergistički aktiviraju ljudske mastocite i induciraju proizvodnju citokina tipa 2, kao što su IL-5, IL-6 i IL-13.[17]

Prema svemu navedenom, TSLP ne samo da može izravno promovirati Th 2 odgovor preko diferencijacije CD4+ T stanica, nego također može utjecati kroz novačenje i aktiviranje prirođenih imunosnih stanica sposobnih za proizvodnju citokina uključenih u Th 2 upalni odgovor.[70, 71]

Gledano u cjelini, različite stanice koje mogu stvarati ili odgovoriti na TSLP pokazuju važnu ulogu ovog citokina u orkestriranju početnog odgovora na ozljedu epitela. Iako je normalna funkcija TSLP-a vjerojatno održavanje homeostaze tipa Th2 na površinskim barijerama,

disregulirana ekspresija TSLP-a može rezultirati razvojem upalnih reakcija tipa 2 što dovodi do alergijske bolesti.[72]

1.1.4. Izoforme TSLP-a

Novija istraživanja su pokazala da kod ljudi postoje dvije izoforme TSLP-a, a one se sastoje od 159 ili 63 aminokiseline.[4, 11, 73, 74] Veći broj istraživanja je usmjeren na otkrivanje uloge tih dviju izoformi u različitim bolestima. Kratka izoforma TSLP (sfTSLP, od engl. short isoform TSLP) je konstitutivna i smatra se da ima protuupalnu i antimikrobnu ulogu, te je važna u održavanju homeostaze; dok je duga izoforma TSLP (lfTSLP, od engl. long isoform TSLP) odgovorna za proupalni odgovor.[74, 75, 76] Nedavna istraživanja su pokazala da obje izoforme TSLP-a pokazuju snažnu antimikrobnu aktivnost, pri čemu je aktivnost sfTSLP jača. Antimikrobna aktivnost primarno je lokalizirana u C-terminalnom dijelu obje izoforme. C-terminalni dio TSLP-a ima penetracijski učinak na bakterijske membrane.

Kako je ljudski sfTSLP konstitutivno eksprimiran na glavnim površinskim barijerama kao što su koža i sluznica, očekuje se da igra važnu ulogu u borbi protiv infekcije i regulaciji upale na tim mjestima. Duga izoforma TSLP-a ima širu ulogu u obrani od infekcije jer sudjeluje u regulaciji različitih imunosnih aktivnosti, ali je također sačuvala i svoje antimikrobne funkcije. Ekspresija TSLP-a u koži, sluznici usne šupljine, žlijezdama slinovnicama i crijevima dio je obrambene barijere koja pomaže u kontroli i komenzalnih i patogenih mikroorganizama.

Ekspresija TSLP-a u znatnoj mjeri je povezana s upalnim stanjima, a to je posljedica povećane ekspresije lfTSLP.[75] *In vivo*, lfTSLP se pojačano stvara u stanjima kao što su atopijski dermatitis, astma, ulcerozni kolitis i stanjima izloženosti oralne sluznice duhanu bez dima, dok se u zdravom tkivu ne nalazi.[24, 75]

Za razliku od lfTSLP, sfTSLP (mRNA i protein) je prevladavajući oblik TSLP-a, konstitutivno je eksprimiran u zdravim tkivima, kao što su klinički zdrava sluznica usne šupljine, epidermis kože, žlijezde slinovnice i stanice epitela crijeva. U upalnim uvjetima čini se da sfTSLP smanjeno stvara, što je opaženo u bioptatu lezija atopijskog dermatitisa i u crijevima bolesnika s Crohnovom bolešću. Ekspresija proteina sfTSLP identificirana je u crijevima, koži, epitelu usne šupljine i žlijezdama slinovnicama.[75]

U uvjetima ravnoteže, sfTSLP predstavlja homeostatski oblik TSLP-a. Kod upale, lfTSLP je povišen, a sfTSLP smanjen.

lfTSLP je usko povezan s IL-7, s kojim dijeli biološki profil, koji se preklapa, ali nije identičan, a veže se na kompleks heterodimernih receptora koji se sastoji od IL-7Rα i lanca TSLPR.[5, 11] Funkcionalni receptor za lfTSLP eksprimiran je na hematopoetskim i nehematopoetskim staničnim linijama uključujući DC, T stanice, B stanice, NK stanice, monocite, bazofile, eozinofile i epitelne stanice.[4, 6, 9, 17, 36, 47, 55] lfTSLP ima utjecaj na nekoliko imunosnih funkcija, i kao što je već spomenuto, povezan je s imunosnim poremećajima, poput alergijskih bolesti i upalnih bolesti crijeva. Kultura DC-a stimuliranih lfTSLP s alogenim CD4+ T stanicama rezultira stvaranjem upalnih Th2 stanica koje proizvode klasične Th2 citokine uključujući IL-4, IL-5, IL-13, ali za razliku od klasičnih Th2 stanica, ove stanice također proizvode TNF-α, ali ne i IL-10.[24] Ovaj upalni Th2 fenotip induciran je povećanjem ekspresije OX-40 liganda na DC-ima tretiranim s lfTSLP.[24, 37] U bolesnika s atopijskim dermatitisom (AD) protein lfTSLP je pojačano eksprimiran u akutnim i kroničnim lezijama AD, dok nije otkriven u dijelovima kože bez lezija.[24] U nekoliko vrsta epitelnih stanica konstitutivno je eksprimiran sfTSLP. Čini se da sfTSLP djeluje na DC-e tako što inhibira izlučivanje citokina. Kratka izoforma TSLP se ne veže za TSLPR, jer nije sposobna blokirati vezanje lfTSLP na taj receptor. Specifični receptor za sfTSLP trenutno je nepoznat. sfTSLP inducira fosforilaciju p38α kinaze regulirane izvanstaničnim signalima, a ima slabi utjecaj na STAT5 fosforilaciju.[74, 75] Malo toga je poznato o imunoregulacijskom djelovanju sfTSLP. Tijekom upale sfTSLP je smanjen, a to pridonosi pogoršanju lokalne infekcije s obzirom na njegovo antimikrobno djelovanje.

Za odvojeno proučavanje ekspresije dviju izoformi humanog TSLP-a neophodna je upotreba reagensa specifičnog za izoformu. Na razini mRNA, ova se diferencijacija može postići uporabom početnica (engl. primer) specifičnih za izoformu, koje su dizajnirane na temelju jedinstvene mRNA sekvencije dviju izoformi transkripta. Međutim, otkrivanje ekspresije proteina specifičnog za izoformu zahtijeva neizravan pristup. Kako postoji potpuno preklapanje aminokiselinske C-terminalne sekvencije sfTSLP s lfTSLP, protutijela stvorena protiv sfTSLP epitopa prepoznati će obje izoforme, te proizvodnja protutijela specifičnih za sfTSLP nije moguća. S druge strane, moguće je proizvesti protutijela specifična za lfTSLP, bilo imunizacijom s peptidnim sekvencijama koje se nalaze unutar specifične lfTSLP sekvencije, bilo pomoću pronalaženja monoklonskog protutijela koji prepoznaje takve sekvencije. Stoga se, razlikovanje između sfTSLP i lfTSLP mora prevladati usporedbom kombiniranog sadržaja lfTSLP i sfTSLP u uzorcima, koristeći jedno protutijelo koje prepoznaje oba oblika i drugo protutijelo

koje se veže na jedinstvenu sekvenciju lfTSLP. Ovaj pristup koristi se u Western blot metodi i u imunohistologiji.[74, 77]

Uzorak ekspresije dviju humanih izoformi ovisi o lokalizaciji tkiva i stanju bolesti. Budući da je translacija sfTSLP tek nedavno dokumentirana, većina literature u posljednja dva desetljeća usredotočena je samo na lfTSLP.[74] Samo je nekoliko istraživanja ispitalo ekspresiju i funkcije dviju izoformi TSLP-a kod različitih bolesti u ljudi, te su otkrila zanimljive dihotomije u ekspresiji i funkciji dviju izoformi TSLP-a kod različitih upalnih bolesti.[74-76] Potrebna su dodatna ispitivanja da bi se procijenila prisutnost i funkcija dviju izoformi TSLP-a u različitim patološkim stanjima.

1.1.5. Povezanost TSLP-a s astmom i alergijskim rinitisom

Opsežna istraživanja na ljudima i životinjskim modelima podupiru ulogu TSLP u razvoju astme i alergijskog rinitisa (AR).[6, 24] Epitelne stanice, neutrofili, endotelne stanice, makrofazi i mastociti značajni su izvor TSLP-a u bolesnika s astmom.[27] Glatke mišićne stanice dišnih putova eksprimiraju TSLPR, a izlaganje citokinima kao što su TNF-α, IL-13, IL-1β ili iritansima poput dima cigareta, može značajno utjecati na oslobađanje TSLP-a kao i ekspresiju TSLPR na glatkim mišićnim stanicama dišnog puta.[25]

Smatra se da je TSLP odgovoran za preusmjeravanje na Th2 odgovor u astmi, te da pridonosi egzacerbaciji upale dišnih putova izravnom inhibicijom imunosnog odgovora plućnih T regulacijskih stanica. Više studija je pokazalo povezanost između ekspresije TLSP-a, hiperreaktivnosti dišnog puta i ograničenja protoka zraka.[78, 79]

Ying i suradnici prvi su usporedili razinu ekspresije TSLP-a u dišnim putovima astmatičara i zdravih kontrola. Ekspresija TSLP mRNA, Th2 i Th1 privlačećih kemokina i njihovih receptora ispitana je u bioptatima bronha astmatičara i zdravih kontrola koristeći *in situ* hibridizaciju i imunohistokemiju. Broj stanica unutar bronhalnog epitela i submukoze koje eksprimiraju TSLP mRNA, Th2 privlačeći kemokin CCL22 i Th1 privlačeći kemokin CXCL10, kao i broj CD4+ CCR4+ T stanica unutar submukoze bio je značajno viši u ispitanika s astmom u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ekspresija TSLP mRNA u epitelnim makrofazima, kao i u submukoznim endotelnim stanicama i neutrofilima bila je značajno viša u grupi s astmom u odnosu na zdrave kontrole. Pronađena je obrnuta korelacija između forsiranog ekspiratornog volumena zraka u prvoj sekundi (FEV1) i ekspresije TSLP-a, što upućuje na ulogu TSLP-a u patofiziologiji astme i

funkcije pluća.[27] Ying i suradnici proširili su to istraživanje prateći ekspresiju TSLP-a i u drugim bolestima pluća, te su pronašli povećanu ekspresiju TSLP mRNA, CCL17, CCL22 i CXCL10 u bronhoalveolarnom lavatu (BAL) bolesnika s teškom astmom i u bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti (KOPB) u usporedbi sa zdravim osobama.[80] Li i suradnici također su našli značajno povišene koncentracije IL-33, TSLP-a, IL-4, IL-5, IL-13 i IL-12p70 u BAL-u astmatičara u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$). Koncentracije IL-33 i TSLP, ali ne i IL-25, obrnuto su korelirale s funkcijom pluća (FEV1) astmatičara neovisno o terapiji kortikosteroidima. Podaci impliciraju važnu ulogu TSLP-a i IL-33 u patogenezi astme koju karakterizira trajna upala dišnih putova i oslabljena funkcija pluća usprkos intenzivnoj terapiji kortikosteroidima.[79] Ovi rezultati podupiru mišljenje da se ekspresija TSLP mRNA i Th2/Th1 kemokina povećava s težinom bolesti a neovisno o terapiji kortikosteroidima.

Liu i suradnici su nedavno izvijestili da su koncentracije TSLP-a u BAL-u pacijenata s teškom astmom značajno povišene u usporedbi sa zdravim kontrolama, te o ulozi TSLP-a u induciranju rezistencije na kortikosteroide u ILC2s putem MEK i STAT5 posredovanog puta.[67]

Broj mastocita je povećan u endobronhalnim bioptatima astmatičara u usporedbi sa zdravim kontrolama.[81] Nekoliko skupina istraživača je pokazalo da je broj TSLP mRNA+ mastocita značajno veći kod astmatičara u odnosu na zdrave kontrole, a 90 % izmjerenih TSLP+ stanica bronhalne mukoze u stvari su mastociti.[27, 82] Broj TSLP+ mastocita je u pozitivnoj korelaciji s IgE u serumu i hiperreaktivnosti bronha, a to podupire dugogodišnje spoznaje o važnosti uloge mastocita kao ključnih regulatora alergijske astme. Eksperimenti za razjašnjavanje mehanizama bolesti koji koriste mastocite dobivene iz krvi pokazuju da je proizvodnja TSLP-a inducirana križnim povezivanjem FcεRI, a pojačava ju prisutnost IL-4.[82] Razina TSLP-a u BAL-u značajno je veća u bolesnika s astmom u usporedbi sa zdravim kontrolnim skupinama. TSLP je također značajno povišen u epitelu dišnih putova i lamini propriji astmatičara, izraženije kod teških astmatičara, što korelira s težinom opstrukcije protoka zraka. Ekspresija TSLP-a unutar dišnih putova povezana je s jačinom alergijske upale i opstrukcije dišnih putova.[78]

U ljudi, TSLP mRNA eksprimirana je u plućnim fibroblastima, bronhalnom epitelu i glatkim mišićnim stanicama.[24] Slični rezultati opaženi su kod pacijenata s KOPB, što upućuje na to da oštećenje epitela može igrati ulogu u ekspresiji TSLP u plućima oboljelih od astme.[80] Kod bolesnika s AR i nazalnim polipima povećana je ekspresija TSLP u nazalnom epitelu. Kod bolesnika s AR, kao i kod bolesnika s astmom, povećane razine TSLP povezane su s Th2 tipom upale.[83-85]

Provokacija inhalacijskim alergenom u bolesnika sa srednje teškom astmom rezultirala je povećanom ekspresijom alarmina, IL-25, IL-33 i TSLP-a, i u bronhalnom epitelu i u bronhalnoj submukozi.[86]

Nekoliko mišjih modela snažno podupiru važnost TSLP-a u astmi kod ljudi. Kada je TSLP prekomjerno eksprimiran konstitutivno aktiviranim stvaranjem TSLP-a (npr. u surfaktant protein C (SPC) TSLP miševa, gdje je TSLP u plućnom epitelu pod kontrolom SPC promotora) ili je primijenjen intranazalno u kombinaciji s antigenom, miševi razvijaju bolest sličnu astmi povezanu sa značajnom Th2 upalom.[87, 88] CD4+ T stanice, Th2 citokini i antigeni imaju ključnu ulogu u takvim modelima, dok su simptomi bolesti značajno smanjeni u odsutnosti TSLPR ili blokiranjem TSLP aktivnosti protutijelima ili rekombinantnim proteinom TSLPR.[87, 89, 90] Slični rezultati dobiveni su u mišjem modelu s alergijskim rinitisom.[91]

Čini se da TSLP inducira Th2 upalu moduliranjem funkcije dendritskih stanica, poticanjem proizvodnje Th2 citokina iz T stanica i inhibirajući Treg. Primarna meta TSLP u ljudskoj astmi i u mišjim modelima su DC, te se stoga čini da uglavnom utječe na senzibilizacijski stupanj astme. TSLP-om stimulirane DC povećavaju ekspresiju OX40L i proizvodnju Th2 kemokina, kao što su CCL17 i CCL21, što dovodi do razvoja CD4+ Th2 stanica i proizvodnje Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α) iz mastocita.[16, 20, 24, 37, 89, 90] Međutim, TSLP također može utjecati na fazu provokacije alergijske bolesti dišnih putova izravnim induciranjem proizvodnje Th2 citokina CD4+ T stanica.[89- 92] Također, TSLP može značajno onesposobiti razvoj Treg. U modelu alergijske bolesti dišnih putova, TSLP inhibira funkciju Treg i razvoj specifičnih Treg antigena *in vivo*.[40, 93] Taj fenomen može biti posredovan kroz nukleotid vezujuću oligomerizacijsku domenu koja sadrži protein 2 i stimulaciju Nod1, koji induciraju ekspresiju TSLP, OX40L i Th2 citokina i inhibira antigen specifične FOXP3+ T stanice i toleranciju ovalbumina (OVA).[38] Nod stimulacija i drugi okidači ekspresije TSLP-a, kao što su peptidoglikan, lipoteikoična kiselina, dsRNA, respiratorni virusi, duhanski dim, zagađivači zraka i alergeni, najvjerojatnije djeluju preko NF-κB puta.[16, 18, 22, 94] S druge strane, TSLP transkripcija u epitelnim stanicama dišnih putova negativno je regulirana 9-cis-retinoičnom kiselinom putem retinoidnih X receptora u stanicama pluća. Smatra se da povećano oksidativno opterećenje u plućima inducirano duhanskim dimom povećava proizvodnju TSLP-a u bronhalnoj mukozi aktivacijom NF-κB puta.[95] Regulacija TSLP-a je balansiranje između negativnih i pozitivnih signala koji bi mogli utjecati na funkciju Treg.

Dosadašnja istraživanja na eksperimentalnim životinjskim modelima i kod ljudi pokazala su da je TSLP jedan od ključnih citokina koji u astmi pridonosi egzacerbaciji upale dišnih putova.[96] Transgenična ekspresija TSLP u eksperimentalnim mišjim modelima pojačava obilježja astme, uključujući upalu dišnih putova, infiltraciju eozinofila, hiperplaziju epitelnih stanica i akutnu hiperreaktivnost dišnih putova.[87, 97] Pojačano stvaranje TSLP-a u keratinocitima kože miševa također pogoršava simptome astme.[98, 99] U miševa u kojih nedostaje TSLPR izlaganje eksperimentalnom alergenu ne dovodi do razvoja eozinofilne upale dišnih putova.[100]

TSLP također inducira lučenje Th2 citokina iz ljudskih mastocita.[16] U sputumu djece oboljele od astme, te u bioptatu pluća odraslih osoba oboljelih od astme opisana je povišena razina TSLP, koja je korelirala s težinom bolesti.[27, 101] Proupalni citokini kao što su TNF-α i IL-1β, zajedno s IL-4 i IL-13, povećavaju ekspresiju TSLP na epitelnim stanicama dišnih putova i keratinocitima ljudi.[102]

Primarnu proizvodnju TSLP-a u ljudi može potaknuti izloženost određenim infektivnim uzročnicima ili ponavljajućim iritansima iz okoliša, a to dovodi do Th2-posredovanih bolesti. Tako na primjer, uzorci pluća pušača su sadržavali povišene razine TSLP-a u usporedbi s nepušačima čak i u odsutnosti poznate bolesti pluća.[80] Osim toga, stanice plućnog epitela astmatičara proizvode više TSLP-a kao odgovor na dsRNA (virusni analog) stimulaciju u kulturi, što barem djelomično objašnjava zašto pacijenti s astmom imaju veću disfunkciju dišnih putova nakon respiratorne infekcije u usporedbi sa zdravim pojedincima.[103, 124] Nenormalna proizvodnja TSLP-a kao odgovor na ozljedu pluća može utjecati na osjetljivost pojedinca za razvoj alergijskih respiratornih bolesti kao što je astma, ali i na kliničke komplikacije koje nastaju nakon izloženosti pluća nepovoljnim čimbenicima okoliša.[70]

1.1.6. TSLP polimorfizam u astmi

Genetske studije podržavaju ključnu ulogu TSLP-a u alergijskim bolestima dišnih putova. Istraživanja polimorfizma gena za TSLP pokazuju povezanost s alergijskom astmom, alergijskim rinitisom i atopijom u djece i odraslih.[104-108] Više genetskih studija (genomske i pojedinačne studije polimorfizma) pokazalo je višestruke polimorfizme jednog nukleotida (SNP, engl. single nucleotide polymorphism) na TSLP genomskom lokusu povezane s povećanom osjetljivošću za astmu (rs3806933,[109] rs1837253,[110, 111] rs11466749[112]) ili sa zaštitnom ulogom (rs1837253,[113] rs2289276[114]) u različitim etničkim grupama. SNP opisan od Harade i suradnika

u genomskom TSLP lokusu -847C > T (rs3806933) stvara mjesto vezanja proteina koji aktivira transkripcijski čimbenik (aktivacijski protein-1), a on bi mogao potencijalno dovesti do povećane transkripcije TSLP-a.[124]

Također, čini se da polimorfizmi TSLP gena pridonose Th2 polariziranoj imunosti putem pojačanog stvaranja TSLP-a od strane bronhalnih epitelnih stanica nakon respiratornih virusnih infekcija.[109]

1.1.7. TSLP i respiratorni virusi

U mišjim modelima infekcija rinovirusom inducira ekspresiju TSLP-a i IL-33 te o TSLP ovisnu regulaciju OX40L, a sve te tri molekule pridonose razvoju stečenog imunosnog odgovora koji je karakteriziran promjenjivom ravnotežom između supresivnih periferno induciranih Treg stanica i Th2 efektorskih stanica.[115] Ovi rezultati mogu biti uobičajen odgovor i na neke druge respiratorne viruse povezane s alergijskom bolešću. Tako u miševa koji su inicijalno zaraženi u novorođenačkoj dobi, TSLP ekspresija inducirana infekcijom respiratornim sincicijskim virusom (RSV) je važan uzvodni događaj koji kontrolira ekspresiju OX40L, migraciju dendritskih stanica i Th2 polarizaciju.[116]

Eksperimentalne studije koje su uspoređivale TSLP odgovor na RSV infekciju u epitelnim stanicama bronha zdrave djece i djece s astmom pokazale su da kulture stanica astmatičara pokazuju značajno povećanu proizvodnju TSLP-a u usporedbi s kulturama zdravih ispitanika.[117] RSV inducira regulaciju TSLP receptora u epitelnim stanicama humanog dišnog puta, što sugerira moguću ulogu RSV-om inficiranih epitelnih stanica dišnog puta u pokretanju autokrinog / parakrinskog TSLP signalnog kruga, koji bi mogao doprinijeti TSLP-om pokrenutom upalnom odgovoru povezanim s virusnom infekcijom.[118] Mehta i suradnici utvrdili su da eksperimentalna infekcija rinovirusom pojačava TSLP u humanim plućnim epitelnim stanicama, a čini se da je TSLP odgovoran za razvoj imunopatološkog odgovora uzrokovanog rinovirusom.[115] U eksperimentalnim istraživanjima potvrđena je važnost uloge TSLP-a na razvoj imunopatološkog odgovora potaknutog RSV-om i hMPV-om (humanim metapneumovirusom).[117, 119, 120]

U miševa, infekcija hMPV aktivira TSLP put koji pretjerano pojačava upalu dišnih putova i replikaciju virusa.[119] Eksperimentalni modeli upale dišnih putova na miševima pokazali su da uključenost TSLP-a u upalu dišnih putova dovodi do hiperreaktivnosti i remodeliranja dišnih

putova, te pojačanog izlučivanja sluzi. TSLP također može potaknuti nakupljanje upalnih stanica u plućima, kao što su neutrofili i eozinofili.[24]

In vivo studije provedene u male djece pokazale su više razine nazalnog TSLP-a u ispitanika s infekcijom rinovirusom u usporedbi s ispitanicima bez detektabilnog virusa, kako u terminske tako i u prijevremeno rođene djece.[121, 122] Teški virusni bronhiolitis uzrokovan najčešćim respiratornim virusima povezan je s povišenim razinama TSLP, IL-33 i periostina u nazalnim dišnim putovima, a oni su važni u razvoju Th2 odgovora.

Ovi rezultati upućuju na to da bi respiratorni virusi u ranoj životnoj dobi mogli pomaknuti imunosni odgovor prema Th2 smjeru, što je ključno za razvoj astme i alergijskih bolesti.[123] TSLP bi mogao biti karika koja nedostaje između prirođenog antivirusnog epitelnog imuniteta i Th2 imunosnog odgovora karakterističnog za astmu.[121]

1.1.8. Uloga TSLP-a u egzacerbaciji astme uzrokovanoj respiratornim virusnim infekcijama

Respiratorne virusne infekcije glavni su uzrok egzacerbacije astme. Dvolančana RNA, pokazatelj virusne infekcije, povećava ekspresiju TSLP-a u bronhalnim epitelnim stanicama. Bronhalne epitele stanice oboljelih od astme pokazuju više razine TSLP-a kao odgovor na dsRNA nego bronhalne epitelne stanice zdravih kontrola.[124, 125] Respiratorni virusi, kao što su rinovirus, RSV i virus influence, povećavaju proizvodnju citokina epitelnog podrijetla, kao što su IL-33, IL-25 i TSLP. RSV infekcije induciraju ILC2, koji proizvodi IL-13 i uzrokuje prekomjernu ekspresiju mucina, glikoproteina koji pridonosi elasticitetu i adhezivnim svojstvima sluzi. U eksperimentalnom modelu, anti-TSLP protutijelo ili nedostatak TSLP-a u miševima s nedostatkom TSLPR smanjuje broj IL-13+ ILC2 i smanjuje prekomjernu ekspresiju mucina.[126]

1.1.9. TSLP i druge bolesti

Osim s alergijskom astmom,[127, 128] TSLP se povezuje i s drugim alergijskim bolestima (atopijskim dermatitisom,[129] alergijskim rinokonjunktivitisom[130] i eozinofilnim ezofagitisom[131]) kao i drugim imunosno posredovanim bolestima (leukemija,[132-134] solidni tumori,[135 - 137] reumatoidni artritis,[138] psorijaza,[15] celijakija, upalne bolesti crijeva[76]) te infekcijama parazitima[139] i virusima.[115, 120, 121, 140]

Nova i neočekivana funkcija TSLP-a je nađena u indukciji i progresiji različitih tumora, kako solidnih (kao npr. karcinoma dojke, kolona, pankreasa), tako i hematoloških (kao npr. B

stanična akutna limfoblastična leukemija). Također, nađen je protektivni učinak signalizacije TSLP-a na neoplazme kože, što sugerira da je njegova uloga u biologiji tumora ovisna o okružju.[72]

Nekoliko nedavnih istraživanja proširilo je patofiziološki profil TSLP-a. Prvo, pokazalo se da TSLP daje signalnu vezu između epitela kože i stanice neurona koja izaziva svrbež povezan s atopijskim dermatitisom.[141] Drugo, pokazalo se da TSLP pridonosi razvoju psorijaze, široko rasprostranjene autoimune bolesti, regulirajući proizvodnju IL-23 pomoću dendritskih stanica.[15] Treće, TSLP može potaknuti progresiju karcinoma dojke i gušterače, ali može imati i protektivan učinak. Genetska preuređenja i mutacije TSLPR gena (CRLF2) pronađena su u djece oboljele od akutne limfoblastične leukemije.[135, 137, 142, 143] TSLP se također povezuje i s uništenjem bakterija posredovanog neutrofilima kroz interakciju sa sustavom komplementa.[144]

Kod ljudi, atopijski dermatitis je karakteriziran visokom razinom TSLP-a kojeg izlučuju keratinociti u kožnim lezijama.[145] Keratinociti kojima nedostaju retinoidni X receptori proizvode TSLP te induciraju atopijski dermatitis.[146] U bolesnika s alergijskim konjunktivitisom, epitelne stanice konjunktive stvaraju TSLP, koji potom aktivira DC i inducira ekspresiju IL-13 mRNA u mastocitima sinergistički s IL-33 što uzrokuje alergijsku upalu oka. U bolesnika s alergijskim rinitisom, ekspresija TSLP je povećana u sluznici nosa i snažno je povezana s broj eozinofila i težinom kliničkih simptoma.[85] U bolesnika s autoimunim bolestima TSLP može također potaknuti Th1 i Th17 na sekreciju proinflamatornih citokina što pridonosi upali tkiva. TSLP i njegov receptor imaju proupalnu ulogu pojačavajući Th17 stanice i uzrokujući uništavanje tkiva u bolesnika s autoimunim artritisom.[147] Nađeno je da sekrecija TSLP-a od strane tumorskih stanica može smanjiti antitumorsku aktivnost Th1 stanica.[148] Uloga TSLP-a u progresiji tumora još je uvijek kontroverzna.[149, 150]

TSLP je također upleten u fenomen koji se naziva atopijski marš, a koji opisuje povećanu vjerojatnost pojave alergijskog rinitisa i astme kasnije u životu kod pojedinaca s AD.[151] Nekoliko modela inducirane TSLP ekspresije u mišjim keratinocitima rezultiralo je kasnijom alergijskom upalom dišnih putova nakon intranazalne provokacije, što sugerira da TSLP može biti važan čimbenik koji pridonosi progresiji od AD do AR i astme.[98, 152] Dok mnoge od metoda koje se koriste za indukciju TSLP ekspresije rezultiraju umjetno visokim razinama sistemskog

TSLP-a, koje se ne vide u bolesnika s AD, nađeno je da intradermalna primjena TSLP-a aktivira napredovanje od AD do astme u odsutnosti sistemskog TSLP-a.[99] U toj studiji, TSLP nije bio nužan za razvoj upalnog odgovora dišnih putova na provokaciju antigenom. Ovi modeli, kao i pristupi koji omogućuju specifičniju ekspresiju ili deleciju TSLP-a, pomoći će u identificiranju staničnih ciljeva TSLP-a i mehanizama koji su uključeni u napredovanje iz AD u AR i astmu.[70]

1.1.10. Dosadašnja istraživanja uloge TSLP-a u astmi dječje dobi

Postoje i brojni dokazi o ulozi TSLP u odgovoru dišnih putova na alergene iz okoliša, kao i za održavanje eozinofilne upale dišnih putova u osoba s alergijskom astmom.[153] Istraživanje Lee-a i suradnika pokazalo je da *in vitro* kulture epitelnih stanica dišnih putova djece s astmom proizvode značajno više razine TSLP-a nakon infekcije RSV-om od epitelnih stanica zdrave djece.[117]

Do sada objavljena istraživanja uloge serumskog TSLP u djece s astmom pokazala su neujednačene rezultate. Tako je istraživanje Chauhana i suradnika na 65 djece s astmom i 15 kontrola, pokazalo statistički značajno višu koncentraciju TSLP-a u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu, uz slabu negativnu korelaciju između koncentracije TSLP-a i testa kontrole astme, te broja regulacijskih limfocita T.[154] Proučavajući bolesnike s alergijskom astmom, Salter i suradnici našli su da TSLP može, barem djelomično upravljati aktivacijom bazofila tijekom ranog i kasnog odgovora na inhalacijske alergene. Štoviše, sipnja uzrokovana povišenim razinama TSLP-a može biti povezana s Th2 aktivacijom.[53] Međutim, Demehri i suradnici su u kohortnoj studiji URECA (Urbano okruženje i dječja astma, od engl. Urban Environment and Childhood Asthma), koja je uključila 236 djece u dobi do treće godine života, došli do zaključka da detektabilni serumski TSLP nije značajno povezan s AD, senzibilizacijom na alergene, ni s ponavljajućom sipnjom tijekom prve tri godine života. U toj studiji, prisutnost serumskog TSLP u dobi od godine dana, bila je povezana sa smanjenom učestalošću sipnje u djece dobi od 3 godine koja nisu senzibilizirana na inhalacijske alergene ($p < 0,01$). Ti rezultati ukazuju na moguće razlike u patogenezi atopijske i neatopijske sipnje, te ostavljaju otvoreno pitanje uloge prolazno povišenih vrijednosti TSLP tijekom izlaganja alergenima s mogućom ulogom u razvoju atopijskog marša. Također je interesantno da u toj kohorti nije bilo značajne povezanosti između AD i ponavljajuće sipnje.[155] U URECA studiji sipnja je definirana s najmanje dvije epizode sipnje u prve tri godine života od kojih je najmanje jedna epizoda u trećoj godini.

Lin i suradnici proveli su istraživanje na 84 djece (31 dijete s astmom i 53 djece bez astme) u dobi od 2 do 12 godina. Sva djeca s astmom su imala akutnu egzacerbaciju astme i nisu koristili kortikosteroide prethodnih tjedan dana. Djeca su podijeljena u 4 skupine: zdrava djeca (bez alergije i bez astme) − 36 djece, atopičari ali bez astme − 17 djece, neatopičari s astmom − 10 djece i atopičari s astmom − 21 dijete. U toj su studiji nađene značajno više serumske koncentracije TSLP u djece s astmom i alergijom u usporedbi sa zdravom djecom, dok vrijednosti TSLP u djece s astmom ali bez alergije nisu bile statistički značajno više u usporedbi sa zdravom djecom. Nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji TSLP-a u serumu između sljedećih skupina djece: zdravi (bez alergije i bez astme) vs. alergija bez astme, alergija bez astme vs. astma s alergijom, zdravi vs. astma bez alergije, alergije bez astme vs. astma bez alergije i astma bez alergije vs. astma s alergijom. Rezultati su također pokazali da djeca s astmom pokazuju višu ekspresiju TSLPR nego djeca bez astme i alergije, bez obzira imaju li astmu i alergiju ili astmu bez alergije. Nije nađena korelacija između TSLPR i kliničke težine astme, kao ni koncentracije TSLP-a.[156] Međutim, Koussih i suradnici nisu našli povezanost serumskih vrijednosti TSLP-a i alergije i/ili astme u djece. U toj studiji 113 djece u dobi od 10-11 godina je bilo podijeljeno u 4 skupine: alergija s astmom (35), alergija bez astme (16), astma bez alergije (13) i zdrave kontrole (49). Serumska koncentracija TSLP-a nije bila značajno viša u oboljelih od astme s alergijom u usporedbi s atopičarima koji nemaju astmu, astmatičarima bez alergije i zdrave djece ($p > 0,05$). Također u toj studiji nije nađena povezanost između serumske koncentracije TSLP-a i kliničkih parametara astme (FEV1), kao ni povezanost između serumske koncentracije TSLP-a i broja alergija u djece s alergijskom astmom.[157]

Istraživanje Berraiesa i suradnika na 40 djece s dobro kontroliranom astmom pokazalo je značajno veću ekspresija TSLP mRNA u bolesnika s astmom nego kod zdravih kontrola (22 kontrole) [$p = 0,0001$]. Koncentracija TSLP i TNF-α u induciranom sputumu kao i u serumu bila je značajno viša u bolesnika s astmom u usporedbi sa zdravim kontrolama, a njihove razine ovisne o težini astme. Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji TSLP mRNA između blage i srednje teške astme, a ekspresija TSLP mRNA u astmatičara je obrnuto korelirala s FEV1. Stanice sputuma astmatičara su proizvele visoke razine TSLP nakon stimulacije s TNF-om. Povećana proizvodnja TSLP iz stanica sputuma kod bolesnika s astmom je prekinuta dodavanjem rekombinantnog IL-37.[101]

1.1.11. Potencijalna terapijska korist

U životinjskim modelima astme ili alergijskog rinitisa, TSLP protutijela ili protutijela koja inhibiraju TSLPR blokiraju simptome i razvoj CD4+ Th2. Na primjer, u modelu alergijske astme, životinje su senzibilizirane s OVA (ovalbumin) intraperitonealno, a zatim su provocirane OVA aerosolom ili intranazalno tijekom 7 dana. U tom modelu, nakon intranazalne provokacije OVA, TSLP protein je pronađen u BAL-u i u plućima, međutim u odsutnosti TSLPR-a ili blokiranjem aktivnosti TSLP-a protutijelom ili rekombinantnim TSLPR proteinom simptomi bolesti su smanjeni.[87, 89, 90] U mišjem modelu alergijskog rinitisa provociranog ovalbuminom, blokiranje TSLP-a također inhibira razvoj bolesti.[91] U oba modela, blokiranje djelovanja TSLP-a postignuto je inhibicijom sazrijevanja i migracije DC dišnih putova, kao i blokiranjem njihove sposobnosti pokretanja CD4+ T-staničnog odgovora.[158]

Izvješće o liječenju monoklonskim protutijelom usmjerenim protiv TSLPR u makaki majmuna pokazalo je da je blokada TSLP receptora učinkovita u ublažavanju alergijske upale dišnih putova i poboljšava alergenom izazvane promjene plućne funkcije, pružajući ohrabrujuće rezultate u primata.[159]

Potpuno humano anti-TSLP monoklonsko protutijelo, AMG 157, tezepelumab, koje specifično veže humani TSLP, sprječavajući interakciju s vlastitim receptorom, testiran je u skupini odraslih bolesnika sa stabilnom alergijskom astmom. Gauvreau i suradnici su 2014. godine proveli dvostruko slijepu, placebo kontroliranu, randomiziranu studiju, u kojoj je 31 bolesnik s blagom alergijskom astmom intravenozno primao AMG 157 (700 mg) ili placebo svaka 4 tjedna kroz 3 mjeseca. Provokacija alergenom provedena je dva tjedna prije prve doze anti-TSLP protutijela, te 42. i 84. dan tretmana kako bi se procijenio učinak anti-TSLP-a na smanjenje FEV1 tijekom ranog i kasnog astmatskog odgovora, te na pokazatelje upale dišnog puta prije i nakon provokacije alergenom. Najveći pad FEV1 je opažen tijekom kasnog odgovora, bio je 34 % manji u tretiranoj skupini 42. dan ($p = 0,09$), a 45,9 % manji 84. dan ($p = 0,02$) u usporedbi s placebo skupinom. Pacijenti liječeni anti-TSLP monoklonskim imunoglobulinom su imali značajno snižene razine eozinofila u perifernoj krvi i u sputumu, te niže frakcije dušikovog oksida u izdahnutom zraku, i prije i nakon provokacije alergenom. Također je smanjen omjer Th2/Th1 stanica u perifernoj krvi, a to sve sugerira da tezepelumab ublažava kasni astmatski odgovor kroz učinak na Th2 stanice/ILC2.[160] Smanjene bronhokonstrikcije izazvane alergenom i upale dišnih putova s AMG 157, ukazuje na ključnu ulogu TSLP-a u odgovoru epitela dišnih

putova na alergene iz okoliša; međutim, smanjenje markera upale dišnih putova, kao što su eozinofili u krvi i sputumu, te frakcije izdahnutog dušikovog oksida (FeNO), kod ispitanika s umjerenom alergijskom astmom bilo je neočekivano otkriće. To je ukazalo da postoji konstitutivno oslobađanje TSLP-a, vjerojatno iz epitela dišnih putova, što je nužno za održavanje eozinofilne upale dišnih putova i neovisno o udisanju alergena iz okoliša. Blokiranje TSLP-a također može imati negativne posljedice. TSLP je povezan sa Treg funkcijama za koje se zna da potiskuju protuupalni Th2 odgovor. Pokazalo se da anti-OX40L i AMG 157 ne utječu na broj cirkulirajućih Treg nakon provokacije alergenom niti nakon terapije monoklonskim protutijelima.[161]

Iako studija nije utvrdila potencijalni klinički učinak anti-TSLP protutijela, ovi rezultati su u skladu s nalazima na životinjskim modelima i potvrđuju ključnu ulogu TSLP-a u alergijskoj astmi i snažno podržavaju daljnje napore istraživanja uloge TSLP-a i njegovog receptorskog kompleksa u astmi.[87] Budući da je TSLP potentan kemoatraktant za eozinofile, jedan od mehanizama je taj da TSLP protutijelo, smanjujući učinak TSLP-a, može smanjiti eozinofilnu infiltraciju.[55]

Corren i suradnici 2017. godine objavili su rezultate druge faze kliničke studije efikasnosti i sigurnosti tezepelumaba (AMG 157), humanog monoklonskog TSLP protutijela u odraslih bolesnika sa slabo kontroliranom astmom unatoč liječenju kombiniranom terapijom dugodjelujućim beta agonistom i srednjom do visokom dozom inhalacijskog kortikosteroida. U randomiziranom, dvostruko slijepom, placebo kontroliranom ispitivanju, usporedili su tri doze supkutanog tezepelumaba s placebom tijekom razdoblja od 52 tjedna liječenja. Primarna završna točka bila je godišnja stopa egzacerbacije astme u 52. tjednu. Primjena tezepelumaba u dozi od 70 mg svaka 4 tjedna (niska doza; 145 pacijenata), 210 mg svaka 4 tjedna (srednja doza; 145 pacijenata) ili 280 mg svaka 2 tjedna (visoka doza; 146 pacijenata) rezultirala je godišnjim stopama egzacerbacije astme u 52. tjednu od 0,26, 0,19 i 0,22, tim redoslijedom, u usporedbi s 0,67 u placebo skupini (148 pacijenata). Stopa egzacerbacija u pojedinim grupama bolesnika liječenih tezepelumabom je bila niža za 61 % (niska doza), 71 % (srednja doza) i 66 % (visoka doza) u odnosu na stopu u placebo skupini ($p < 0,001$ za sve usporedbe). Slični rezultati zabilježeni su u bolesnika bez obzira na broj eozinofila u krvi pri uključenju u studiju. Forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi u 52. tjednu bio je viši u svim skupinama koje su primale tezepelumab u usporedbi s placebom (razlika 0,12 L s niskom dozom [$p = 0,01$], 0,11 L sa srednjom dozom [$p = 0,02$] i 0,15 L s visokom dozom [$p = 0,002$]). Ukupno je dvoje

pacijenta u grupi sa srednjom dozom, tri u skupini s visokom dozom, i jedan u placebo skupini prekinuo ispitivanje zbog neželjenih događaja. Među bolesnicima liječenim kombinacijom dugodjelujućeg beta-agonista i srednjim do visokim dozama inhalacijskih glukokortikoida, niže stope klinički značajne egzacerbacije astme imala je skupina koja je primala tezepelumab u odnosu na skupinu koje je primala placebo, neovisno o početnoj vrijednosti eozinofila u krvi.[162] Tezepelumab je smanjio broj eozinofila u krvi, razinu FeNO i ukupnu razinu IgE u serumu; promjene u broju eozinofila i razine FeNO nastupile su nakon 4. tjedna, usporedno s promjenama kliničkih točaka. Ovo promjene u razinama biomarkera ukazuju da tezepelumab ima važne učinke na IL-4, IL-5, IL-13 putove i podupire koncept da inhibicija TSLP može imati šire fiziološke učinke od ciljanja pojedinačnih Th2 citokina.

Uočena poboljšanja u kontroli astme u bolesnika koji su primili tezepelumab naglašavaju potencijalnu patogenu ulogu TSLP-a u različitim fenotipovima astme.[163] Nealergijski čimbenici, uključujući duhanski dim, čestice dizela i viruse, pokreću otpuštanje TSLP-a i dovode do aktivacije upalnih odgovora u astmi.[20, 23, 117] Unatoč središnjoj ulozi TSLP-a u regulaciji imunosnog odgovora tipa 2, različite vrste stanica koje su aktivirane ili odgovaraju na TSLP, kao što su mastociti, bazofili, NKT stanice, prirođene limfoidne stanice i neutrofili mogu imati ulogu u upali u astmi i izvan upale tipa 2.[17, 47, 117]

Ovi rezultati imaju važne implikacije, jer ukazuju na to da je konstitutivno otpuštanje TSLP-a, vjerojatno iz epitela dišnih putova, ključno za održavanje upale dišnih putova kod alergijske astme, a također je alergenom izazvano oslobađanje TSLP-a uključeno u promjene u vidu eozinofilije dišnih putova i bronhokonstriktornog odgovora nakon izlaganja alergenu. Rezultati ovih istraživanja podupiru daljnje napore u istraživanju TSLP-a kao terapijskog cilja u liječenju astme.[51, 101, 154, 164]

1.2. ASTMA

Astma je kao bolest davno prepoznata, prvi klinički opis se pripisuje grčkom liječniku Aretaeusu iz Kapadokije, koji je obavljao liječničku službu u Rimu i Aleksandriji u drugom stoljeću poslije Krista. Riječ astma grčkog je podrijetla (ἅσθμα, ásthma), izvedena je iz korijena riječi koja znači puhati i označava disanje s teškoćom ili dahtanje. Tijekom vremena se mijenjao koncept astme, nekada se smatrala jedinstvenom bolesti s varijacijama u kliničkom tijeku i ishodu. Danas, skoro dva tisućljeća nakon prvoga objavljenog opisa, drži se da klinička varijabilnost astme ne znači jedinstvenu bolest, već više njih ujedinjenih nekim zajedničkim kliničkim obilježjima, kao što su povremena sipnja i reverzibilna opstrukcija dišnih putova. To je potkrijepljeno konceptom različitih fenotipova astme, od kojih se svaki može temeljiti na različitim patofiziološkim mehanizmima (endotipovi) i može različito odgovoriti na postupke liječenja.[165]

1.2.1. Epidemiologija

Astma zahvaća oko 358 milijuna ljudi diljem svijeta, te je jedna od najčešćih kroničnih, nezaraznih bolesti.[166] U djece predškolske dobi incidencija astme veća je nego u bilo kojoj drugoj dobnoj skupini. Čak 48 % djece predškolske dobi oboljele od astme imalo je egzacerbaciju bolesti u prethodnoj godini.[167] Sipnja u djece predškolske dobi je također vrlo česta; u Europi i SAD-u oko trećina djece u dobi od prve do šeste godine života u posljednjih šest mjeseci imalo je sipnju,[168] a u prvih 6 godina života gotovo 50 % djece je imalo najmanje jednu epizodu sipnje.[169]

Najopsežnija epidemiološka studija o prevalenciji astme u djece provedena je u sklopu Međunarodnog istraživanja o astmi i alergijama u djetinjstvu (ISAAC, od engl. International Study of Asthma and Allergy in Childhood), koja je uspostavljena 1991. godine kako bi se olakšalo istraživanje astme, alergijskog rinitisa i ekcema promicanjem jednostavne standardizirane metodologije s pisanim upitnicima i video zapisima respiratornih simptoma. Do sada su provedene tri faze istraživanja, ukupno je uključeno gotovo 2 milijuna djece iz 306 centara u 105 država diljem svijeta.[170]

U prvu fazu ISAAC studije, uključeno je 721 601 djece (dobi 6-7 godina) i adolescenata (dobi 13 − 14 godina) iz 156 centara u 56 država tijekom 1994. i 1995. godine. Rezultati su pokazali

da postoji značajna razlika u prevalenciji (i do 15 puta) između država. Najviša prevalencija je zabilježena u državama engleskoga govornog područja, no visoka prevalencija je zabilježena i u nekim centrima Latinske Amerike. Niska prevalencija, niža od 5 %, je zabilježena uglavnom u Aziji i istočnoj i južnoj Europi.[171] Od 2002. do 2003. godine provedena je treća faza ISAAC studije, ona je pratila promjene u prevalenciji astme u 237 centara u 98 država kroz period od najmanje 5 godina. Rezultati pokazuju promjenu prevalencije astme u mlađoj dobnoj skupini u 60 % centara (uglavnom se radi o porastu), dok je promjena prevalencije u adolescenata zabilježena u 77 % centara (no u podjednakom broju je zabilježen porast i pad prevalencije).

Čimbenici koji utječu na razlike u prevalenciji simptoma u većini regija variraju prema područjima. Na primjer, nekoliko centara u Latinskoj Americi ima visoku prevalenciju, sličnu onoj zabilježenoj u centrima u razvijenim zemljama, unatoč velikoj razlici između socioekonomskog statusa i uvjeta života u tim zemljama, a pokazuju blage promjene unutar 7 godina.[172] Čimbenici koji utječu na astmu i alergije mogu na jedan način djelovati u zemljama u razvoju, a na drugi način u razvijenim zemljama, a od značaja može biti i njihova interakcija sa socioekonomskim statusom.

Zanimljivo je da neki centri sa stanovništvom sličnog podrijetla imaju različitu prevalenciju, npr. Portugal i Brazil, Španjolska i zemlje španjolskog govornog područja Latinske Amerike. Veličina i lokacija ovih razlika sugeriraju da su okolišni čimbenici najvjerojatnije objašnjenje globalnih razlika. Međutim, okolišni čimbenici za koje se zna da su važni kod pojedinaca s astmom, kao što su vanjska onečišćenja zraka, grinje i izloženost duhanskom dimu, malo su vjerojatno objašnjenje globalnih razlika.

Postoje velike varijacije u prevalenciji simptoma astme u dječjoj dobi, kreću se od 2,8 % (Indonezija) do 37,6 % (Kostarika) u dobi od 6 − 7 godina, te od 3,4 % (Albanija) do 31,2 % (otok Man) u dobi 13 − 14 godina.[173]

U posljednjih nekoliko desetljeća prevalencija astme kod djece u Hrvatskoj bilježi porast. Prve epidemiološke studije o prevalenciji astme u Hrvatskoj objavljene su 1979. godine, a pokazale su da je učestalost astme u Puli 2,4 %, Istri 1,7 %,[174] a u djece školske dobi u Zagrebu 1,34 %.[175] Unazad dva desetljeća u nekoliko regija Hrvatske (Grad Zagreb, Međimurje, Primorsko-goranska županija, Brodsko-posavska županija) provedena su epidemiološka ispitivanja prevalencije alergijskih bolesti primjenom standardiziranih upitnika (prema protokolu korištenom u ISAAC istraživanju). Dobiveni rezultati pokazali su da se Hrvatska ubraja u

područje s umjerenom prevalencijom astme djece školske dobi; godišnja prevalencija simptoma astme kreće se od 5,11 do 14,3 %.[176-179] Istraživanje Banca i suradnika u Primorsko-goranskoj županiji s razmakom od 8 godina (2001./2002. − 2009./2010.) pokazalo je da je prevalencija astme u adolescenata porasla s 5,2 na 6,9 %, dok je u grupi djece dobi 6 − 7 godina ostala stabilna.[180]

Prevalencija astme je vjerojatno bitno podcijenjena u siromašnim zemljama, gdje nisu dostupni osnovni lijekovi za liječenje astme i pacijenti imaju poteškoće u pristupu zdravstvenoj zaštiti. Postoji više istraživanja koja pokazuju smanjenje razlike prevalencije astme u djece među različitim zemljama tijekom posljednjih desetljeća. Prevalencija astme je stabilna ili se smanjuje u državama zapadne Europe, a značajno raste u zemljama u razvoju kako im životni stil postaje zapadnjački. Rasprostranjenost simptoma astme u Africi, Latinskoj Americi, istočnoj Europi i Aziji i dalje raste.[181-183]

Studije migracija iz zemlje s niskom u zemlje s visokom prevalencijom astme pružaju uvid u važnost čimbenika okoliša. Prevalencija astme u imigranata koja je bila niska u vrijeme dolaska u zemlju domaćina, dužinom boravka u zemlji domaćina postupno raste, a razlika se povećanjem dužine boravka sve više smanjuje.[184]

Osim smanjenja pušenja majke, nema specifične strategije koja je prihvaćena u svrhu primarne prevencije astme u djece ili odraslih.

Prevalencija astme u dječjoj dobi je veća kod dječaka nego kod djevojčica; međutim u odrasloj dobi prevalencija je oko 20 % veća kod žena nego kod muškaraca, a do te promjene dolazi tijekom puberteta. Veća učestalost kod dječaka djelomično je posljedica manjeg promjera dišnih putova u odnosu na veličinu pluća u usporedbi s djevojčicama, što se tijekom adolescencije gubi.[185] Prospektivno istraživanje provedeno nad 19-godišnjacima pokazala je da je 21 % onih koji su imali astmu u dobi od 7 godina ušlo u remisiju, 38 % je imalo povremenu, a 41 % perzistentnu astmu. Remisija je češća u dječaka, a manje vjerojatna kod djevojčica i bolesnika s teškom astmom ili senzibilizacijom na dlaku životinja.[186]

1.2.2. Definicija astme

Astma je heterogena bolest koju karakteriziraju varijabilni respiratorni simptomi i promjenjiva ograničenja protoka zraka. Te značajke mogu biti posljedica različitih temeljnih mehanizama koji su tipično, ali ne i uvijek, povezani s upalom i remodeliranjem dišnih putova.

Međunarodni sporazum o dijagnosticiranju i liječenju astme – Globalna inicijativa za astmu (GINA, od engl. *Global Initiative for Asthma*) definira astmu kao upalnu bolest dišnih putova u kojoj sudjeluju brojne upalne stanice i različiti upalni posrednici. Kronična upala je povezana s hiperreaktibilnošću dišnih putova što se klinički manifestira ponavljajućim napadajima sipnje, zaduhe, pritiska u prsima i kašlja, posebno tijekom noći i/ili pred jutro. Napadaji su obično udruženi sa smanjenom prohodnošću dišnih putova, koja je promjenjiva, najčešće reverzibilna, spontano ili uz pomoć odgovarajućeg liječenja.[187]

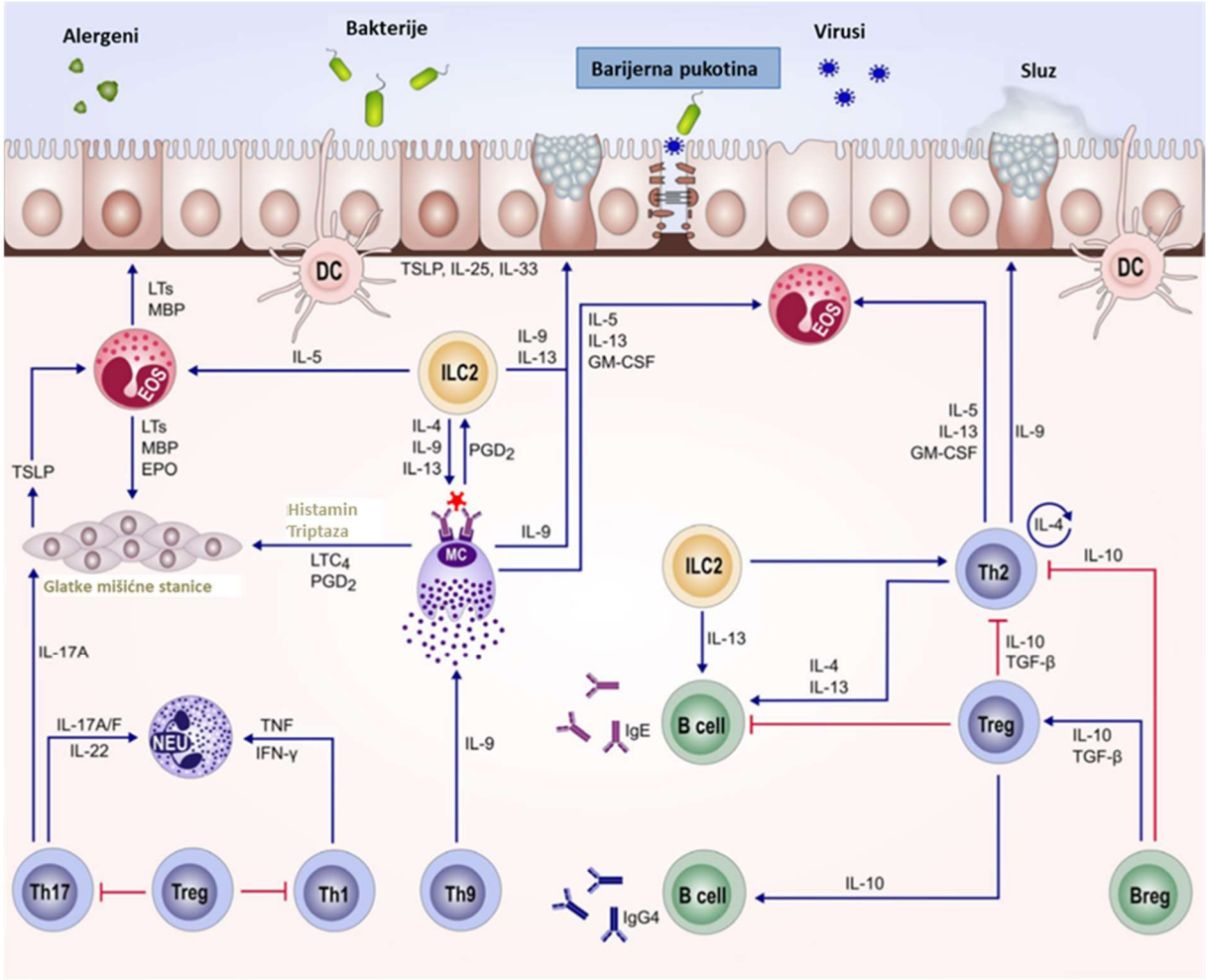
Sipnja je jedan od osnovnih simptoma astme, česta je u djece predškolske dobi i može biti prolazna. U većini anglosaksonske literature umjesto termina astma, u predškolskoj dobi koristi se termin *wheezing* (dahtanje) kako bi se opisali simptomi sipnje i otežanog disanja. Ovakva klinička slika, ukoliko se ponavlja, identična je onom što kod starije djece opisujemo kao astmu.

Za predškolsku djecu, stručnjaci Europskog respiratornog društva (ERS, od engl. European Respiratory Society) preporučili su podjelu na virusima i višestrukim okidačima potaknutu sipnju, te su mišljenja da se termin astma treba koristiti tek nakon navršene 5. godine života kada su dostupne objektivne metode definiranja bolesti.[188] Prema smjernicama PRACTALL (od engl. Practical allergy) Europske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju i Američke akademije za alergije, astmu i imunologiju, u djece mlađe od 2 godine dijagnoza astme može se postaviti ukoliko su u prethodnih 6 mjeseci bile zabilježene 3 ili više reverzibilne bronhoopstrukcije.[189]

1.2.3. Patofiziologija astme

Astma je upalni poremećaj dišnog puta, koji uključuje više upalnih stanica i medijatora koji pridonose karakterističnim kliničkim i patofiziološkim promjenama.[190] Temeljni mehanizmi koji pokreću različite kliničke fenotipove astme, kao i njihov odgovor na terapiju, nisu potpuno razjašnjeni.[181, 191] U posljednjih nekoliko godina došlo je do velikog napretka u razumijevanju

staničnih i molekularnih mehanizama upale i imunosne regulacije kod astme. Utvrđene su dvije glavne podvrste imunosnog odgovora koji izazivaju astmu, a to su tip 2 visok i tip 2 nizak odgovor. Kod većine bolesnika s astmom nalazimo prekomjernu ekspresiju tip 2 upalnih putova (Slika 1.3.).[192, 193]



Slika 1.3. Pregled mehanizama imunosnog odgovora tip 2.

Preuzeto i modificirano uz odobrenje autora iz *Akdis CA, Arkwright PD, Brüggen MC, Busse W, Gadina M, Guttman-Yassky E, et al. Type 2 immunity in the skin and lungs. Allergy. 2020;75:1584.*[192]

DC – dendritske stanice, EOS – eozinofili, NEU – neutrofili, Th – pomagački limfocit T, B cell – B stanice, ILC2 – prirođene limfoidne stanice tip 2, TNF – čimbenik tumorske nekroze, IFN – interferon, EPO – eozinofilna peroksidaza, MBP – glavni bazični protein, LTs – leukotrijeni, LTC4 – leukotrijen C4, PGD2 – prostagladin D2, TGF-β – transformacijski čimbenik rasta β, TSLP – limfopoetin strome timusa, GM-CSF – čimbenik rasta granulocita i makrofaga, Treg – regulacijski limfociti T, Ig – imunoglobulin

Tijekom izazivanja i održavanje alergijskog imunosnog odgovora nastaje specifičan skup citokina tipa 2, u čemu sudjeluju epitelne stanice, dendritske stanice, stanice T, prirođene limfoidne stanice (ILC), eozinofili, mastociti i bazofili. Osnova upale tip 2 je aktivacija Th2 i ILC2 putova. Th2 citokini su IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 i IL-31, a glavni citokini tipa 2 ILC2-a su IL-5, IL-9 i IL-13.[194] Interleukin-4 potiče Th2 staničnu diferencijaciju i izotipsko prekapčanje limfocita B, proliferaciju i diferencijaciju u zrele plazma stanice, a konačni rezultat je stvaranje IgE protutijela specifičnih za alergen koji je pokrenuo reakciju. IL-5 djeluje na aktiviranje, novačenje i preživljavanje eozinofila.[195] Novačenje eozinofila u plućnoj mukozi je posredovano pomoću C-C kemokinskog receptora 3 kemokina i drugih eozinofilnih kemoatraktanata, kao što je prostaglandin D2 koji potiče iz mastocita. IL-9, koji izlučuju Th9 stanice, potiče eozinofilnu upalu, porast mastocita, hipersekreciju sluzi i hiperreaktivnost dišnih putova.[196] IL-13 regulira proliferaciju stanica B koje stvaraju IgE, hipersekreciju sluzi i hiperreaktivnost dišnih putova te otvara čvrste veze između epitelnih stanica površinskih barijera.[197] Epitelne stanice dišnih putova i kože prva su linija obrane od alergena. Nakon oštećenja epitela uzrokovanog alergenima, polutantima (zagađivačima zraka), virusima, bakterijama i toksinima, epitelne stanice oslobađaju alarmine, kao što su IL-25, IL-33 i TSLP.[198] Karakteristike alarmina su u tome što se brzo oslobađaju nakon neprogramirane smrti stanice, što regrutiraju i aktiviraju i prirođene i stečene imunosne stanice i što pomažu u obnavljanju homeostaze.[199] Glavna značajka alarmina podrijetla epitela je u tome što mogu promicati i prirođeni i stečeni krak imunosnog sustava. Alarmini mogu izravno potaknuti proizvodnju citokina tipa 2 u ILC2.[200] IL-33 i TSLP direktno aktiviraju mastocite.[196] TSLP stimulira stanice Th0 i DC na induciranje Th2 sličnog odgovora. TSLP također potiče proliferaciju B stanica.[201]

Glavna uloga T stanica u dišnom putu astmatičara je kontrola upalnog staničnog profila.[57] Dok u klasičnom alergijskom tipu astme prevladava aktivnost Th2 CD4+ limfocita,[295] u različitim podtipovima astme opisana je uloga niza drugih T-stanica, uključujući povezivanje Th1 stanica i Th17 stanica s neutrofilnom astmom.[202, 203] U eozinofilnoj alergijskoj astmi, a potencijalno i u nealergijskoj astmi, do započinjanja T2 tipa imunosnog odgovora dolazi izlučivanjem citokina podrijetla epitelnih stanica: IL-25, IL-33 i TSLP-a.[204] Ti citokini induciraju ILC2s za proizvodnju citokina T2 tipa, kao što su IL-5, IL-9 i IL-13.[205]

Alergijska senzibilizacija zahtijeva interakciju između specijaliziranih antigen prezentirajućih dendritskih stanica dišnog puta i T stanica. Taj mehanizam uključuje obradu alergena u male

peptide i prezentaciju tih procesiranih peptida od strane selektivnog MHC II T staničnim receptorima naivnih T stanica.[57] Djelotvorna signalizacija alergena također zahtijeva kostimulirajuću interakciju između dendritskih i T stanica[206] koja se odvijaju u lokalnom limfoidnom tkivu,[216] što rezultira diferencijacijom stanica T u stanice tipa Th2. Te Th2 T stanice luče proalergijske citokine, kao što su IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 i GM-CSF, što dovodi do odgovora IgE-a, mastocita i eozinofila, što je karakteristično za alergijsku astmu.[207] Mnogi alergeni povezani s astmom − kao što su oni grinja, žohara, životinjskih i gljivičnih izvora − pokazuju enzimska svojstva koja im omogućuju prodiranje epitelne barijere i izravnu interakciju s mukoznim dendritskim stanicama.[208] Za to vrijeme, dendritske stanice koje su bile u stanju mirovanja transformiraju se kako bi izrazile niz stanične adhezije i kostimulacijskih molekula. Te molekule su prepoznate od strane naivnih T stanica, koje djeluju u interakciji s dendritskim stanicama, te stvaraju imunosnu sinapsu koja olakšava prezentaciju alergena.[209] Dok manji broj alergen specifičnih Th2 stanica migrira u folikul B stanica te pokreće prebacivanje klasa imunoglobulina sa IgM na IgE,[210] ostale se sele u sluznicu dišnog puta pod utjecajem kemoatraktanata, kako bi izazvale upalni odgovor T2 tipa i pridruženu koordiniranu sekreciju proalergijskih citokina.[211, 212]

Nakon senzibilizacije, daljnja izloženost dišnih putova alergenu dovode do mastocitima potaknutog ranog tipa bronhokonstriktornog odgovora koji traje 5-90 minuta i uključuje IgE-ovisno otpuštanje histamina, prostaglandina D_2 i leukotrijena C4 (LTC_4), što se kasnije promjeni u LTD_4 i LTE_4.[213] Nakon ranog bronhokonstriktornog odgovora slijedi kasni bronhokonstriktorni odgovori koji se razvija kroz 3 − 12 sati i povezan je s infiltracijom i aktivacijom leukocita (osobito eozinofila), s daljnjom nakupljanjem LTC_4, oslobađanjem Th2 citokina iz mastocita i T stanica, te pojačanog odgovora dišnog puta.[214] Iako su rani i kasni bronhokonstriktorni odgovori detaljno proučavani u ljudskim i životinjskim modelima kako bi raščlanili alergijske mehanizme u astmi, ta dva odgovora ne prate kroničnu perzistirajuću upalu koja se nalazi u većini slučajeva astme, nego su ograničeni na egzacerbacije potaknute izlaganju alergenu.[212, 215]

Međutim, kod nekih bolesnika s astmom ne postoje dokazi o upali tipa 2, pa govorimo o ne-Th2 (ne-tip 2, T2 niskoj) upali povezanoj s IFN γ ili IL-17 izvedenim iz Th1, Th17 stanica ili prirođenih limfoidnih stanica tip 3, s aktiviranjem makrofaga i oslobađanjem neutrofilnih kemokina.[216, 217] Ti različiti obrasci upale uzrokuju heterogenost kliničkih fenotipova astme.

Iako je fokus patofiziologije astme na pozitivnim pokretačima upale, neadekvatna rezolucija upale pojavljuje se kao mogući mehanizam koji bi također mogao biti uključen u astmu. Neuspjeh adekvatnog smanjenja upalnog odgovora može rezultirati produljenim preživljavanjem mastocita i eozinofila kao rezultat citokinske sredine astmatičnog dišnog puta. Osim toga, važna nova paradigma patofiziologije astme je potencijalna uloga lipoksina i resolvina kao posrednika endogene rezolucije upale. Na primjer, lipoksin A_4 može inducirati apoptozu eozinofila i smanjiti aktivnost ILC2 i ubilačkih limfocita, a proizvodnja lipoksina A_4 je smanjena u dišnim putovima astmatičara.[212, 218]

Remodeliranje dišnih putova može se pojaviti već u ranom djetinjstvu, a to upućuje da se ne javlja kao jednostavna posljedica upale.[219] Remodeliranje karakterizira sljedeće: oštećenje epitela i disfunkcija cilija, hiperplazija vrčastih stanica, zadebljanje *lamine reticularis* i retikularne bazalne membrane, [220] povećanje prokrvljenosti, povećanje subepitelnih miofibroblasta i fibroblasta, te povećanje glatke mišićne mase. Glatka mišićna masa dišnih putova najjači je prediktor ograničenja protoka zraka. [221] Te karakteristike remodeliranja dovode do zadebljanja stjenke dišnih putova, suženja lumena i začepljenja sluzi, s posljedičnom obliteracijom malih dišnih putova.[222]

1.2.4. Klinička slika

Simptomi astme nisu specifični, uključuju sipnju, otežano disanje, stezanje u prsnom košu i kašalj. Najkarakterističnije osobine astme odnose se na obrazac javljanja simptoma, uključujući vrstu simptoma, vrijeme, okidač i odgovor na liječenje. Iscrpno uzimanje anamneze je važno za procjenu vjerojatnosti da su respiratorni simptomi posljedica astme, a ne diferencijalne dijagnoze ili komorbiditeti.

Auskultacijom se može čuti ekspiratorna sipnja, ako je ona uvijek odsutna u vrijeme izraženih simptoma, treba razmišljati o diferencijalnim dijagnozama. Fizikalni pregled može otkriti komorbiditete, kao što su alergijski dermatitis i alergijski rinitis kod atopičara, odnosno pretilost i bronhiektazije (kod odraslih osoba).[181]

1.2.4.1. Inicijalna klinička prezentacija astme

Zbog različitih podležećih mehanizama, neki fenotipovi astme mogu se razlikovati u vrijeme početne kliničke prezentacije, dok se drugi teško mogu razlikovati jedni od drugih.[181]

Alergijska astma koja se javlja u djetinjstvu obično je udružena s atopijskim dermatitisom, alergijskim rinitisom ili alergijom na hranu, pozitivnom obiteljskom anamnezom na astmu, te sipnjom ili kašljanjem uz, a ponekad i između, virusnih respiratornih infekcija. U trećine djece sa sipnjom, sipnja perzistira u odraslu dob. Vjerojatnost perzistiranja ili kasnijeg recidiva povećava senzibilizacija na alergene u ranoj dobi, ženski spol i pušenje.[223] Djeca s teškom astmom mogu imati trajno ograničenje protoka zraka u odrasloj dobi ili ubrzani pad plućne funkcije.[224]

Nealergijska astma se može prezentirati u bilo kojoj dobi, uključujući i tijekom virusnih respiratornih infekcija. U djece, nealergijska astma će vjerojatno ući u remisiju ulaskom u pubertet, osobito među dječacima. U odrasloj dobi češća je među ženama, osobito pretilim.[185]

Naporom izazvana bronhoopstrukcija može biti jedini simptom astme, osobito ako se javlja tijekom aerobne vježbe visokog intenziteta ili prilikom izlaganja hladnom suhom zraku ili kloriranom bazenu.[225] Upala dišnih putova nekada se smatrala obveznom značajkom astme, te se izolirana bronhoopstrukcija izazvana naporom razlikovala od astme. Međutim, promjenjivi simptomi i promjenjivo ograničenje protoka zraka kompatibilno je s trenutnom definicijom astme.

Astmu kasnog nastupa karakterizira početak simptoma nakon 12. godine života, no može se javiti i nakon 65. godine, često je neatopična, teže kliničke slike i povezana s bržim padom plućne funkcije, pogotovo u bolesnika s anamnezom pušenja.[226]

Varijanta astme s kašljem (engl. cough-variant asthma) je karakterizirana perzistentnim kašljem kao jedinim ili glavnim simptomom uz hiperreaktivnost dišnog puta. Simptomi su izraženiji po noći. Kod odraslih, izolirani kašalj je češće posljedica neastmatskih uzroka, kao što su gastroezofagealni refluks, disfunkcija gornjeg dišnog puta, postnazalni drip ili eozinofilni bronhitis (kašalj, eozinofilija u sputumu, uredna spirometrija i normoreaktivnost dišnog puta).[227, 228]

Kod dijela bolesnika, astma se inicijalno prezentira akutnom sipnjom tijekom infekcija dišnog sustava. Virusne respiratorne infekcije su čest okidač sipnje u dječjoj dobi, pa su egzacerbacije učestalije u razdobljima visokog izlaganja respiratornim virusima, kao što je rana jesen. Kod nekih bolesnika s alergijskim rinitisom, prva prezentacija astme se javlja tijekom izloženosti visokoj koncentraciji alergena.[229] Akutna prezentacija astme može slijediti početak primjene

oralnih ili okularnih β blokatora.[230] Kod nekih bolesnika može doći do inicijalne prezentacije teškog bronhospazma nakon uzimanja aspirina ili nesteroidnih protuupalnih lijekova. Aspirinom inuduciran bronhospazam je češći kod teške astme (javlja se u 15 % odraslih osoba s teškim astmom, a u 7 % opće populacije), obično mu prethodi alergijski rinitis i nosna polipoza, a rijetko se javlja u dječjoj dobi.[231]

1.2.5. Dijagnoza astme

Ne postoji zlatni standard za dijagnozu astme. Dijagnoza astme u kliničkoj praksi se bazira na karakterističnoj anamnezi, epizodama sipnje, kašlja ili nedostatka zraka i urednim fizikalnim pregledom u intervalima između epizoda sipnje. Klinička definicija se nalazi u svim pedijatrijskim smjernicama, kako u Britanskim smjernicama,[232] tako i u smjernicama Globalne inicijative za astmu.[187] Smjernice naglašavaju potrebu za isključenjem drugih stanja koja mogu uzrokovati sipnju, kašalj i/ili nedostatak zraka, posebno u vrlo male djece, u atipičnim slučajevima, te kod bolesnika bez odgovora na primijenjenu terapiju. Manje česti uzroci sipnje su prirođene anatomske anomalije, aspiracija stranog tijela, druge bolesti pluća (npr. cistična fibroza), te srčane, imunosne i gastrointestinalne bolesti.[233]

Dijagnoza se temelji na vjerojatnosti, a razmatraju se simptomi i varijabilno ograničenje ekspiratornog protoka zraka. Astma je heterogena bolest, a kod nekih oboljelih, jedna ili obje te karakteristike možda nisu prisutne. Mnoge karakteristike simptoma mogu povećati ili smanjiti vjerojatnost da su upravo ti simptomi uzrokovani astmom. Kod djece točna procjena simptoma i djelotvornosti uporabe ß2 agonista može biti teška, jer se većina informacija dobiva od roditelja, koji nisu uvijek sa svojim djetetom i stoga možda nisu svjesni važnosti pojedinih detalja. Za normalni društveni život i tjelesni razvoj djeteta važno je uključivanje u igru, međutim tjelesna aktivnost je i bitan okidač simptoma astme, pa se djeca s astmom često suzdržavaju od naporne igre ili tjelesne aktivnosti kako bi izbjegla simptome. Mnogi roditelji i zdravstveno osoblje toga nisu svjesni. Pažljiv pregled dnevnih aktivnosti djeteta, uključujući i djetetovu spremnost na igru i sudjelovanje u sportu izuzetno je bitno, osobito kada roditelji kao glavni problem primjećuju razdražljivost, umor i promjene raspoloženja djeteta.[181]

Postavljanje dijagnoze astme u djece mlađe od 5 godina posebno je izazovno, budući da se povremeni respiratorni simptomi kao što su sipnja i kašalj javljaju i kod djece koja nemaju astmu, pogotovo u one mlađe od 2. godine.[234]

U djece školske dobi i odraslih osoba, dijagnoza astme je poduprta objektivnim pokazateljima reverzibilne opstrukcije i hiperreaktivnosti dišnih putova u nalazu spirometrije. Dijagnoza astme u mlađe djece, zbog otežanog ispitivanja plućne funkcije, obično se temelji na nizu kliničkih kriterija (simptomima, obiteljskoj anamnezi i kliničkom pregledu) uz isključenje diferencijalnih dijagnoza.[187-189, 232]

Promjenjivo ograničenje ekspiratornog protoka zraka definirano je kao promjena koja je izvan normalnog raspona za zdravog pojedinca i povezana je s omjerom FEV1 i forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) manjeg od predviđenog za dob, spol, tjelesnu visinu i rasnu pripadnost. Varijabilnost ekspiratornog protok zraka može se ispitati na sljedeće načine. Prvo, tzv. reverzibilnost bronhodilatatorom − povećanje FEV1 za više od 12 % i više od 200 mL (djeca > 12 %) 10 − 15 minuta nakon primjene ß2 agonista kratkog djelovanja pokazuje varijacije izvan normalnog raspona. Negativan test ne isključuje astmu. Drugo, provokacijskim testom: direktnim (metakolinom ili histaminom) ili indirektnim (provokacija naporom, inhalacijama manitola ili hipertonične otopine). Test provokacije tjelesnim naporom je često teško ispravno izvesti. Većina djece s astmom izazvanom naporom imat će pozitivan test pod uvjetom postizanja frekvencije srca iznad 180 otkucaja u minuti u posljednje 3 minute 8-minutnog testa.[235] Međutim, negativan test ne isključuje astmu. Razmatraju se kriteriji za pozitivan test provokacije tjelesnim naporom.[236] Globalna inicijativa za astmu predlaže smanjenje FEV1 za više od 10 % očekivane vrijednosti i više od 200 mL u odraslih, tj. za više od 12 % očekivane vrijednosti u djece. U odraslih i u djece kriterij tijekom provokacije lijekovima (metakolin i histamin) je smanjenje FEV1 od najmanje 20 %, odnosno 15 % kod indirektne provokacije (hipertonična otopina, manitol). Indirektna provokacija u djece se rjeđe koristi. Pravilno izvođenje provokacijskog testa je bitno i uključuje dokaz smanjenog omjera FEV1 i FVC, kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati (npr. varijabilni inspirij ili disfunkcija gornjeg dišnog puta). Varijabilnost ekspiratornog protoka zraka može se ispitati i mjerenjem prosječne varijabilnosti vršnog ekspiratornog protoka zraka (PEF, od engl. peak expiratory flow) unutar istog dana izražene kao srednja vrijednost amplitude, dnevna varijabilnosti veća od 13 % (> 10 % kod odraslih) upućuje na pojačanu reaktivnost dišnih puteva.[187] Manje pouzdani testovi su varijabilnosti funkcije pluća od tjedna do tjedna. Na astmu upućuje promjena od 11 − 12 % u odraslih i djece, te razlika u FEV1 veća od 12 % (u odraslih osoba i više od 200 ml) između kontrola, ili nakon 4 tjedna protuupalne terapije.[237]

Za svaki test plućne funkcije vrijedi, što je veća varijabilnost ili što se ona više puta nađe, veća je vjerojatnost astme. Ograničenje protoka zraka ne mora uvijek biti prisutno, a najveća vjerojatnost njegova dokumentiranja je tijekom ili neposredno nakon pojave simptoma. Promjenjivo ograničenje protoka zraka nije dovoljno za dijagnozu astme, ono se može vidjeti i tijekom respiratornih infekcija u osoba koje nemaju astmu, te u KOPB-u. Asimptomatska hiperreaktivnost dišnih putova može se vidjeti i kod zdrave djece i odraslih.[224, 238]

1.2.6. Diferencijalna dijagnoza i komorbiditeti

Potvrda dijagnoze astme zahtijeva isključenje diferencijalnih dijagnoza te traganje za komorbiditetima. Ako se ne dijagnosticiraju ili ne liječe, komorbiditeti mogu utjecati na kvalitetu života i kontrolu astme.[239] Diferencijalno dijagnostički treba misliti na bolesti kao što su cistična fibroza, primarna cilijarna diskinezija, primarne imunodeficijencije, prirođene anomalije traheobronhalnog stabla i aortnog luka, strano tijelo u dišnom putu, bronhiektazije, bronhiolitis obliterans i gastroezofagealnu refluksnu bolest.

Najčešći komorbiditeti astme su rinitis i rinosinusitis sa ili bez nazalnih polipa (kod djece rinokonjunktivitis) i često su povezani s nekontroliranom astmom.[240]

Pretilost može uzrokovati dispneju u naporu zbog smanjenog funkcionalnog rezidualnog kapaciteta i ekspiratornog rezervnog volumena. Pretilost kod odraslih, posebice žena, može biti povezana s refraktornom astmom, fenotipom astme s manje eozinofila, a više neutrofila u sputumu.[241]

Opstruktivna apneja u spavanju je česta kod odraslih osoba s astmom, osobito s teškom astmom. Kod djece se javlja rijetko, ali na nju treba misliti kod djece sa slabo kontroliranom astmom kod kojih se javlja umor, razdražljivost i slaba koncentracija, a tegobe su prisutne unatoč redovitom uzimanju terapije.[242]

Gastroezofagealnu refluksnu bolest nalazimo u 25 − 80 % oboljelih od astme. Mehanizmi koji do nje dovode su povećani refluks kiseline tijekom egzacerbacija s hiperinflacijom, mikroaspiracije koje izazivaju neurogenu upalu, te učestala primjena ß2 agonista koji smanjuju tonus ezofagealnog sfinktera. U odraslih, simptomatska (ali ne i asimptomatska) gastroezofagealna refluksna bolest narušava kvalitetu života. Podaci za djecu su oskudni.[243]

1.2.7. Fenotipovi i endotipovi astme

Pojam "fenotip" se koristi kako bi se opisala sva vidljiva svojstva ili osobine organizma, a smatra se da proizlazi iz interakcije genotipa i čimbenika okoliša. Fenotip bolesti se opisuje kliničkim karakteristikama, a može uključivati biokemijske i druge mjerljive varijable, kao i fizičke osobine, bez upućivanja na podležeći patofiziološki mehanizam. Pojam "endotip" se koristi za opisivanje podtipova bolesti na temelju različitih patoloških mehanizama. Klinički fenotip astme može biti potkrijepljen nizom diskretnih endotipova, od kojih svaki vodi do konačnog zajedničkog puta manifestacije bolesti koji je karakterističan za taj određeni fenotip.[244] S druge strane, diskretni endotip, klasificiran prema specifičnom upalnom putu kao što je npr. eozinofilna upala dišnih putova, može postojati u brojnim različitim kliničkim fenotipovima.

Važnost prepoznavanja različitih fenotipova i endotipova astme je dvostruka, važna je kako u prevenciji tako i u liječenju astme. Bolje razumijevanje etiopatoloških mehanizama koji podupiru različite fenotipove bolesti moglo bi otkriti promjenjive čimbenike koji potiču bolest ili utječu na njezin prirodni tijek, te bi omogućilo razvoj primarnih ili sekundarnih preventivnih mjera. Pronalazak patofizioloških puteva na koje se može djelovati lijekovima, a koji se nalaze samo u nekim podtipovima astme, otvara put personalizirane medicine u liječenju astme. Interes za identificiranje fenotipova astme je vidljiv i u eksploziji publikacija na tu temu; ranih 1990-ih godina bilo je manje od 10 publikacija godišnje, a početkom ovog desetljeća bilježi se preko 300 publikacija godišnje.[51]

1.2.7.1. Epidemiološki fenotipovi

Epidemiološkim fenotipom možemo nazvati podskupinu bolesnika klasificiranu na temelju retrospektivnog ispitivanja tijeka bolesti i određenih karakteristika bolesnika s ciljem razjašnjenja patogeneze bolesti i rizičnih čimbenika.

U proteka dva desetljeća posvećeno je mnogo napora u predviđanju rizika trajne astme u školskoj dobi kroz kohortne studije, s ciljem identificiranja različitih fenotipova sipnje u predškolske djece koji zahtijevaju različite strategije liječenja te pravovremenu primjenu terapije. Jedna od prvih klasifikacija, koju su predložili Martinez i suradnici 1999. godine, na temelju tusconske studije, opisala je povezanost između dobi pojave sipnje i ishoda u dobi od 6 godina (remisija ili perzistiranje).[169] Ovisno o epizodama sipnje u dobi od 3 i dobi od 6 godina,

bolesnici su klasificirani u fenotip *prolazne rane sipnje* (barem jedna epizoda sipnje u prve tri godine života, ali ne u dobi od 6 godina)*, sipnje s kasnim početkom* (pojava sipnje između treće i šeste godine života) *i trajne sipnje* (barem jedna epizoda sipnje u prve tri godine života i perzistiranje simptoma u dobi od 6 godina). Djeca s prolaznom ranom sipnjom razviju prve simptome u prve tri godine života, imaju negativnu obiteljsku i/ili atopijsku anamnezu, nižu plućnu funkciju od rođenja i normoreaktivnost u bronhoprovokacijskom testu. Autori navedene studije pretpostavljaju da je smanjena plućna funkcija posljedica strukturnih i funkcionalnih promjena dišnih putova koje su predispozicija za razvoj sipnje.[245] U fenotipu sipnje s kasnim početkom smetnje se javljaju između treće i šeste godine, ali s tendencijom regresije u preadolescenciji.[246] Bolesnici imaju negativnu atopijsku anamnezu, pušenje u trudnoći nije rizični čimbenik, u bronhoprovokacijskom testu ne pokazuju bronhalnu hiperreaktivnost, a plućna funkcija do 11. godine neznatno je slabija od zdrave populacije.[247] Pretpostavlja se da je mehanizam nastanka sipnje promjena regulacije tonusa dišne muskulature. Opstruktivne smetnje u djece s trajnom sipnjom počinju prije treće godine života i nastavljaju se u školsku dob. Osobna i/ili obiteljska atopijska anamneza je pozitivna, a značajnu ulogu igra i alergijska senzibilizacija. Plućna funkcija je pri rođenju slična zdravoj populaciji, počinje padati nakon 6. godine života i ostaje smanjena do 18. godine.[248]

Daljnja evaluacija kohorte dovela je do pročišćavanja fenotipa trajne sipnje:

- Prolazna sipnja rane dobi: počinje u prvoj godini života, nestaje do školske dobi, povezana je sa sniženom funkcijom pluća, pušenjem majke u trudnoći, prisustvom braće i polaženjem kolektiva.[249]
- Neatopični fenotip trajne sipnje: prva epizoda sipnje se javlja u prvoj godini života, epizode sipnje postaju rjeđe u ranoj adolescenciji, te većina djece preraste simptome. Djeca s ovim fenotipom imaju nižu razinu funkcije pluća i pojačanu reaktivnost dišnih putova.[223, 250]
- IgE-povezan i/ili atopijski fenotip trajne sipnje: karakterizira ga sipnja koja obično započinje u drugoj godini života, prevalencija se povećava s dobi i perzistira u kasnoj adolescenciji.[247] Perzistira li ovaj fenotip u odrasloj dobi još nije poznato. Čimbenici rizika povezani s atopijskom sipnjom su pozitivna obiteljska anamneza na atopiju, muški spol, atopijski dermatitis, eozinofilija u 9. mjesecu života (≥ 4 %), rana

senzibilizacija na nutritivne ili inhalacijske alergene i anamneza sipnje uz infekcije donjih dišnih putova.[169, 251, 252]

Nekoliko istraživanja temeljenih na longitudinalnom praćenju bolesnika sa sipnjom pokazalo je slične fenotipove, s blagim varijacijama koje se temelje na vremenu nastanka sipnje. [253-256] Različiti čimbenici rizika povezani s individualnom sipnjom i njihova prognostička vrijednost su opisani, a upućuju na različitu patogenezu sipnje.[257] Tako djeca s trajnom sipnjom imaju bitno lošiju plućnu funkciju u dobi od 3 godine[253] i veći otpor dišnih putova u dobi od 4 godine[258] nego djeca s povremenom sipnjom, dok je atopija povezana s trajnom sipnjom,[247] sipnjom s kasnim početkom[259] i sipnjom sa srednjim početkom,[255] subfenotipom između sipnje ranog i kasnog početka. Istraživanja su dokumentirala povezanost između tih fenotipova sipnje i genetskih varijanti u lokusu 17q21, koji se najčešće povezuje s astmom u djetinjstvu.[260, 261, 262] Varijante u ovoj regiji su snažno povezane s perzistentnom sipnjom, a malo je dokaza o udruženosti s drugim fenotipovima sipnje.[263] Druga studija je pokazala povezanost između genetskih varijanti lokusa 17q21 i rizika od astme nakon 6. godine života, ali samo kod djece koja su imala sipnju povezanu s humanim rinovirusom u ranom djetinjstvu, što sugerira na interakciju okoliša i gena za astmu.[264]

Klasifikacija zasnovana na longitudinalnoj simptomatologiji epidemiološki je korisna jer upućuje na mehanizam bolesti i pomaže u razumijevanju njenog razvoja, a njezin nedostatak je mali klinički značaj jer nisu dostupni dobri biomarkeri ili prediktori koji omogućuju predviđanje koji put će slijediti dijete sa sipnjom. Nekoliko studija je koristilo analizu fenotipova korištenjem osnovnih obilježja, funkcije pluća, hiperreaktivnosti dišnih putova i atopije. [265 , 266] Iako su takve fenotipske klasifikacije atraktivne jer se temelje na karakteristikama bolesnika dostupnima u vrijeme klasifikacije, one nisu prospektivno validirane.

1.2.7.2. Fenotipovi astme temeljeni na simptomima (okidaču bolesti)

U predškolskoj dobi sipnja može biti prolazna, pa je otežana njena dijagnoza i podjela u fenotipove.[51] Prema prijedlogu ERS-a ponavljajuća sipnja u predškolskoj dobi klasificira se ovisno o vrsti okidača pa tako razlikujemo virusima induciranu sipnju, ukoliko su virusne infekcije jedini okidač, ili sipnju potaknutu višestrukim okidačima, ukoliko se simptomi javljaju i izvan virusnih infekcija.[189] Ovakva podjela koristi se u nekim studijama i u školskoj dobi.[267, 268]

Virusima potaknuta sipnja čini oko 2/3 pojave sipnje u predškolske djece i posljedica je intermitentne opstrukcije dišnih putova u bolesnika s prethodno urednom plućnom funkcijom i bez simptoma između perioda sipnje. Najčešći okidač ovog fenotipa sipnje u svim dobnim skupinama je rinovirus.

Sipnja potaknuta višestrukim okidačima obično je povezana s alergijom i manifestira se češće u školskoj dobi, simptomi se javljaju i između perioda pogoršanja, npr. tijekom sna ili su potaknuti tjelesnom aktivnošću, smijehom ili plačem; u bolesnika je često pozitivna obiteljska anamneza na atopiju.[269]

Međutim, virusima potaknuta epizodična sipnja može se s vremenom razviti u sipnju potaknutu višestrukim okidačima i obrnuto.[270] Epizodična virusna sipnja u predškolske djece povezana je s povišenom, normalnom i smanjenom razinom frakcije izdahnutog dušikovog oksida u različitim studijama što sugerira da ovaj oblik sipnje ne mora biti dobro definiran klinički entitet, a da su u podlozi možda različiti upalni fenotipovi. [271-273]

Fenotipske klasifikacije koje su predložile međunarodne pedijatrijske skupine (npr. ERS i PRACTALL), temeljene na vremenu pojavnosti simptoma (povremeni ili perzistentni) i okidačima astme (samo virus, alergeni, napor ili višestruki okidači) preporučuju se radi boljeg podupiranja terapijske odluke.[188, 189] Te klasifikacije se široko koriste u ispitivanjima djelotvornosti terapije. Međutim, čak i u tercijarnoj pedijatrijskoj skrbi uporaba takvih klasifikacija je limitirajuća, kako zbog znatnih razlika među liječnicima, a još više zbog varijacije fenotipa tijekom vremena u istog bolesnika. U čak do 55 % djece fenotip se s vremenom može promijeniti.[274, 275] U ovom trenutku ne postoji pristup liječenju koji bi modificirao tijek bolesti i spriječio razvoj perzistentne sipnje.

1.2.7.3. Endotipovi astme prema tipu upale (eozinofilni, neutrofilni, miješani granulocitni i paucigranulocitni)

Endotipovi astme definirani na temelju prevladavajuće upalne stanice identificirane u donjem dišnom putu (uzorak dobiven induciranim sputumom, endobronhalnom biopsijom ili bronhoalveolarnom lavažom) su: eozinofilna, neutrofilna, mješovita granulocitna (prisutnost i eozinofila i neutrofila) i paucigranulocitna (svega nekoliko upalnih stanica) astma.[276, 277] Zbog ograničenja uzorkovanja dišnih putova u djece, osobito invazivnim postupcima, u ovoj dobnoj skupini podatci su nedostatni.[278]

Eozinofilna upala dišnih putova najčešći je tip prisutan u djetinjstvu.[279] Atopija je prisutna u 50 - 60 % odraslih i djece s astmom,[280] češća je u teškoj astmi kod djece,[281] te kod odraslih s početkom astme u djetinjstvu u odnosu na kasni početak bolesti. U eozinofilnoj astmi s relativno malom dozom inhalacijskog kortikosteroida (ICS) postiže se dobar terapijski odgovor kod djece.[282] U odrasloj dobi može se javiti i nealergijska astma u kojoj prevladavaju eozinofili u uzorku donjeg dišnog puta, i tada se obično radi o teškoj astmi rezistentnoj na visoke doze kortikosteroida.[283] Eozinofilija u dišnim putovima može biti prisutna već i prije početka astme.[284] Uzorak upale je kompleksan i postoje složene interakcije među vrstama stanica pa tako simptomi ne koreliraju uvijek s upalnim zbivanjima. Tako npr. neki adolescenti s astmom u kliničkoj remisiji (bez smetnji i bez terapije) i dalje imaju prisutnu eozinofilnu upalu kao i bolesnici sa simptomatskom astmom.[285]

Neeozinofilna astma opisana je u odraslih i djece, ali je njena etiopatogeneza slabo razumljiva.[281, 286] Neutrofilna astma čini do 25 % simptomatskih odraslih bolesnika s astmom.[286] Alergijski mehanizmi ne moraju biti jedini i/ili odlučujući podležeći čimbenici za razvoj astme. Neeozinofilnu astmu povezanu s neutrofilnom upalom nalazimo ne samo u bolesnika s teškom astmom, već i kod onih s umjerenom i blagom astmom. Mogući okidači ovakve upale u dišnim putovima mogu biti bakterijski endotoksini, onečišćenje zraka, ozon, infekcije virusima i gljivama.[279] Fenotip neutrofilne astme nije uobičajen fenotip dječje astme i nije stabilan s vremenom.[287]

Mehanizmi ovisni o alergiji i neovisni o alergiji koji pokreću eozinofilnu upalu i neeozinofilnu astmu mogu se javiti zajedno, što dovodi do miješane granulocitne upale ili promjene u upalnom profilu tijekom vremena.

Fenotip paucelularne astme definiran je malim brojem eozinofila i neutrofila (< 3 % eozinofila, < 60 % neutrofila) u sputumu djece i odraslih.[288] Fenotip je slabo definiran kod djece predškolske dobi, a mogao bi odgovarati fenotipu sipnje izazvane virusnim infekcijama.[289]

Hiperreaktivnost dišnih putova prisutna je u fenotipovima astme sa ili bez granulocitne upale kod djece i odraslih. U astmi je glatki mišić dišnih putova hiperkontraktilan, kao posljedica

zajedničkog djelovanja aktiviranih mastocita i mehanotransdukcije[a] neovisne o upali dišnih putova.[290]

1.2.7.4. Endotipovi astme prema tipu upale − T2 visoka i T2 niska astma

Astma se ovisno o tipu temeljne upale dišnih putova odnedavno karakterizira kao tip 2 (T2) − visoka astma (astma s jakim obilježjima T2 upale − „T2-high asthma“) i astma s niskim T2 / T2 niska astma (astma sa slabim obilježjima T2 upale − „T2-low asthma“).[291-293]

T2 visoka astma tipično je karakterizirana eozinofilnom upalom, iniciranom "alarminima", kao što su IL-25, IL-33 i TSLP-a, koje izlučuju epitelne stanice bronhalnog stabla nakon podražaja (alergeni, mikrobi, zagađivači), a potom se održavaju oslobađanjem citokina IL-4, IL-5 i IL-13 iz stanica i prirođenog i stečenog imunosnog sustava, uključujući pomagačke limfocite T (Th2), invarijantne stanice T, NK stanice, ezoinofilne/bazofilne progenitorne stanice i prirođene limfoidne stanice tip 2.[294-296] U T2 visokoj astmi, inhalacijski alergeni aktiviraju APC u dišnim putovima, dovodeći do oslobađanja IL-4 i OX40L. To zatim potiče diferencijaciju limfocita T u Th2 stanice, koje zatim proizvode citokine kao što su IL-4, IL-5 i IL-13. Citokini tipa 2 aktivno regrutiraju eozinofile, mastocite i bazofile u dišnim putovima i izravno posreduju u sintezi IgE. Imunoglobulin E vezan za mastocite i bazofile veže antigen i dovodi do oslobađanja histamina, leukotrijena i citokina, a to zatim pridonosi karakterističnim obilježjima patofiziologije astme, poput stvaranja sluzi, subepitelne fibroze, remodeliranju bronha i hiperreaktivnosti dišnog puta.[297, 300] Nedavne studije su istaknule važnost uloge ILC2 u T2 visokoj astmi. ILC2 stanice stimuliraju oslobađanje IL-5 i IL-13 zajedno s Th2 stanicama, ali to čine i kao izravan odgovor na stimulacijske aktivatore i citokine kao što su IL-25, IL-33 i TSLP.[69, 298] T2 visoki endotip astme obično pokazuje dobar odgovor na inhalacijske kortikosteroide. Kako postoje dostupni biomarkeri za njegovu identifikaciju, za ovaj tip astme postoji i ciljana biološka terapija (npr. anti-IgE, anti-IL-5).[299, 300]

U nealergijskoj eozinofilnoj astmi, prirođene limfoidne stanice stvaraju IL-5 i IL-13 kao odgovor na prostaglandin D2 i alarmine podrijetla epitela: IL-33, IL-25 i TSLP, a koji se oslobađaju nakon oštećenja epitela uzrokovanog onečišćenjem zraka i mikroorganizmima.

[a] Mehanotransdukcija je proces pretvaranja mehaničke energije u biokemijske signale, bilo izravno, bilo pomoću električnih signala.

Molekularni putovi T2 niske astme manje su poznati i nedovoljno istraženi, a pokreću je neutrofilni ili rjeđe paucigranulocitni upalni obrazac, koji podržavaju IL-8, IL-17A, IL-2,2 i drugi citokini povezani s T stanicama, kao i citokini podrijetla epitelnih stanica. Endotip T2 niske astme smatra se rijetkim, uglavnom se viđa kod bolesnika s teškom bolešću i pokazuje rezistenciju na terapiju kortikosteroidima.[253, 299]

1.2.8. Prediktivni indeksi

Do sada je predloženo nekoliko različitih fenotipova sipnje, svaki sa svojim ograničenjima. Iako nisu savršeni i ponuđeni su kao metoda predikcije, prediktivni zbroj za astmu je postao povezan, ne samo s fenotipovima, već se koristi i kao dijagnostički kriterij astme u predškolskoj dobi. Međutim, važno je razdvojiti postavljanje trenutne dijagnoze astme od predviđanja remisije. Usklađeno s definicijom astme u školskoj i odrasloj dobi, dijagnozu astme i u predškolskoj dobi, kada god je to moguće, treba postaviti koristeći neinvazivna ispitivanja plućne funkcije uz karakterističnu kliničku sliku. [301] Dijagnostički kriterij ostaje nalaz reverzibilne varijabilne opstrukcije dišnih putova koja se može potvrditi farmakološkim ispitivanjem s inhalacijskim bronhodilatatorima ili kortikosteroidima kao što predlaže GINA.[187] Obzirom na heterogenost sipnje u predškolskoj dobi, najveći napredak u dijagnozi treba napraviti uporabom objektivnih mjerila, bilo postojećih ili onih koje tek treba razviti, a koji će dokumentirati opstrukciju i reverzibilnost opstrukcije dišnih putova mjerenjem plućne funkcije[301] i utvrditi vrstu i jačinu upale dišnih putova (npr. mjerenjem neinvazivnih upalnih markera, uključujući metabolomiku[a]), što bi bilo prihvatljivo i kod male djece.[302] Slično tome, ovi bi se alati trebali primijeniti za utvrđivanje fenotipova povezanih s različitim terapijskim odgovorima i prognozama,[253] i prevladavanja dokumentirane varijabilnosti tijekom vremena kod istog pacijenta.[274, 275]

Na temelju tusconske kohortne skupine, Castro-Rodríguez i suradnici razvili su astma prediktivni indeks (API), kako bi predvidjeli razvoj astme u predškolske djece s ponavljajućom sipnjom. Indeks je pozitivan ako dijete ima više od 3 epizode sipnje u prve tri godine života plus jedan veliki kriterij (atopijski dermatitis ili roditelja s dijagnozom astme) ili dva mala

[a] Metabolomika je nova znanstvena disciplina koja može dati pregled metaboličkog stanja i ukupnih biokemijskih zbivanja u organizmu. Disciplina se koristi u identifikaciji bioloških markera, koji su važni u procesu otkrivanja novih lijekova ili dijagnostičkih postupaka, sve prisutnijih u personaliziranoj medicini.

kriterija (sipnju koja nije vezana uz respiratorne infekcije, alergijski rinitis ili eozinofiliju u perifernoj krvi veću od 4 %). Djeca s pozitivnim indeksom imala su 7 puta veću vjerojatnost aktivne astme u školskoj dobi (osjetljivost 16 %, specifičnost 97 %).[303] Sipnju u djece dobi do 3. godine s malo rizičnih čimbenika za trajnu astmu u školskoj dobi (negativni API) često se naziva kratkotrajnom prolaznom sipnjom, dok se kod onih s pozitivnim API-jem naziva perzistentna astma.

Iz drugih kohorta praćenih od rođenja izvedeni su i drugi prediktivni indeksi, npr. Avon Longitudinalna studija roditelja i djece (ALSPAC, od engl. the Avon Longitudinal Study of Parents and Children) i Prevencija i incidencija astme i alergije na grinje u Nizozemskoj (PIAMA, od engl. Dutch Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy) s ciljem predviđanja hoće li simptomi djeteta zadovoljiti definiciju astme u dobi između 6 i 10 godina.[253, 304-306]

Iako su tzv. astma prediktivni indeksi pomogli u klasifikaciji fenotipova sipnje i doprinijeli boljem razumijevanju epidemiologije sipnje u predškolskoj dobi, oni imaju pet velikih ograničenja vezanih uz terapeutski pristup sipnji u predškolske djece: njihova pozitivna prediktivna vrijednost i osjetljivost su prilično niski, osobito kod djece s ponavljajućom sipnjom;[307, 308] nije provedena neovisna validacija na populacijama različitima od onih na kojima su izvedene;[307, 309] iako se često koriste za odabir bolesnika u terapijskim istraživanjima, postoje kontroverzni pokazatelji odgovora na terapijski pristup ovisno o pozitivnom ili negativnom astma prediktivnom indeksu;[310, 311] iako to nije preporuka, primijećeno je da se djeci s niskim rizikom od trajne astme u školskoj dobi pripisuje manje preventivne terapije, dok se djeci s visokim rizikom preporučuje intenzivnija terapija; i ono što se ne smije zanemariti, postoje dokazi koji sugeriraju da nestanak simptoma ne korelira s odsustvom posljedica.[312]

Povišeni eozinofili u krvi snažni su prediktori razvoja astme.[313] Prospektivna studija na 83 djece praćene nakon hospitalizacije zbog bronhiolitisa pokazala je povećani rizik od astme u predškolskoj i školskoj dobi u djece koja su imala eozinofiliju 4 − 6 tjedana nakon infekcije RSV-om u dojenačkoj dobi.[314] Anderson i suradnici analizirali su neinvazivne biomarkere za predviđanje astme kod 244 djece i otkrili da su broj eozinofila ≥ 300 stanica/µL i senzibilizacija na inhalacijski alergen u dobi od dvije godine povezani s povećanim rizikom od astme u dobi od šest godina.[315] Poznati su i drugi indeksi s donekle različitim kriterijima i svi imaju relativno dobru negativnu prediktivnu vrijednost, ali pozitivna je tek nešto veća od 50 %.[316] Nedavno

objavljena pregledna studija pokazala je da su atopija u obitelji, atopijski dermatitis i alergijski rinitis u bolesnika, sipnja izvan epizoda virusnih infekcija dišnih putova, teške epizode sipnje, alergijska senzibilizacija, eozinofilija i povišen FeNO rizični čimbenici za perzistiranje epizoda sipnje i u školskoj dobi.[317]

1.2.9. Čimbenici rizika za ranu sipnju i astmu

1.2.9.1. Genetski utjecaji i prenatalni okoliš

Heterogenost sipnje u predškolskog dobi je definirana jedinstvenom interakcijom između djetetove genetske karte i prenatalnih i postnatalnih čimbenika okoliša. Postoji sve više dokaza da geni kodiraju potencijalni raspon fenotipova koji se mogu razviti kao odgovor na mnoge okidače iz okoliša. Napredak tehnologije korištenjem sekvenciranja cijelog genoma ili analize gena kandidata identificirao je nekoliko uobičajenih genetskih varijanti povezanih s astmom.[318] Međutim, većina tih varijanti nije potvrđena u drugim istraživanjima. Jedina iznimka je lokus 17q21, koji sadrži ORMDL3 i GSDMB gene, a on je najdosljednije replicirani genetski čimbenik rizika za astmu u djetinjstvu,[260, 262, 319] ali ne i u odrasloj dobi.[320] Studije su dokumentirale veći utjecaj ovog lokusa među djecom izloženom duhanskom dimu u ranom životu[321] i u djece s respiratornim infekcijama u ranoj dobi,[264, 322] što sugerira interakciju gena i okoliša. Iako je identifikacija tih genetskih čimbenika rizika dala novi uvid u patogenezu astme, same varijante se tiču samo malog dijela nasljednosti astme.[323] Dakle, drugi čimbenici (npr. gen-gen ili gen-okoliš interakcija) jasno imaju važnu ulogu putem epistatičkih [a] ili epigenetskih mehanizama.[b]

Pušenje majke je povezano s ranom prolaznom sipnjom (sipnja prisutna u dobi od 3 godine, ali odsutna u dobi od 6 godina). Nasuprot tome, sipnja s kasnim početkom (bez sipnje u dobi od 3 godina, ali sipnja u dobi od 6 godina) povezana je s majčinom astmom, muškim spolom i rano nastupajućim rinitisom, dok se trajna sipnja (sipnja prisutna i u dobi od 3 godine i u dobi od 6 godina) povezana s astmom u majke, učestalošću sipnje, dijagnozom astme u djeteta i

[a] Epistaza je interakcija između gena na dva ili više lokusa, pri čemu se izraženi fenotip razlikuje od onog koji bi se očekivao kad bi lokusi bili eksprimirani zasebno. Epistatski geni svojom prisutnošću suprimiraju učinak gena s drugog lokusa.

[b] Epigenetski mehanizmi su promjene ekspresije gena koja je rezultat nestrukturalnih promjena gena (metilacija DNA, modifikacija histona i RNA interferencija). Epigenetičke promjene su potrebne za normalan razvoj i zdravlje, no mogu biti odgovorne za mnoge bolesti. Epigenetičke preinake mogu nastati kao posljedica djelovanja okolišnih čimbenika.

atopijom.[169] Zanimljivo, žene s teškom i nekontroliranom astmom tijekom trudnoće imaju 27 % veću vjerojatnosti da će roditi dijete kod kojeg će se postaviti dijagnoza astme prije 12. godine života, nego majke s blagom, umjerenom ili teškom astmom čija je astma bila dobro kontrolirana.[324] Ako kontrola i težina astme tijekom trudnoće utječu na incidenciju astme u potomaka, moglo bi se pretpostaviti da također utječu na dugoročnu kontrolu astme i tijek bolesti u potomaka s astmom ili atopijom, no ova tvrdnja nije potvrđena.[233] Nalazi prospektivne kohortne studije u Perthu, Australija, pokazali su smanjenu plućnu funkciju u dobi od mjesec dana i perzistirajuću hiperreaktivnost dišnih putova u dobi od 12 mjeseci u znatno većem broju djece s trajnom astmom u dobi od 11 godina nego u zdravih vršnjaka.[248] Astma u dobi od 18 godina bila je povezana s hiperreaktivnošću dišnih putova u 6., 12. i 18. godini života, ali ne i tijekom prve godine života. Porast hiperreaktivnosti dišnih putova i njena povezanost s astmom u dobi od 18 godina uspostavljena je između prve i šeste godine života.[325] Istraživači prospektivne kohortne studije iz Copenhagena na 411 djece koja su imala rizik za astmu pronašli su značajno smanjenje protoka zraka u dobi od mjesec dana u djece koja će kasnije u dobi od 7 godina razviti astmu.[326] Dvije su glavne hipoteze za smanjenu plućnu funkciju u ranom djetinjstvu i pojavu simptoma astme u predškolskoj dobi: genetska predispozicija i čimbenici povezani s trudnoćom (npr. nekontrolirana majčina astma, pušenje ili korištenje lijekova u trudnoći), a one bi mogle utjecati ne samo na incidenciju bolesti, nego i na napredovanje bolesti kroz djetinjstvo.[327]

1.2.9.2. Postnatalno okruženje

Iz opservacijskih studija je proizašlo nekoliko čimbenika rizika povezanih sa sipnjom u predškolskoj dobi, no potrebne su daljnje studije za utvrđivanje podležećih mehanizama. Ti čimbenici su brzi prirast tjelesne težine u prve dvije godine života,[328] okolišni čimbenici kao što su duhanski dim,[329] zagađenje zraka prometom i endotoksini,[330-333] primjena paracetamola,[334] pohađanje vrtića, te prisutnost starije braća i sestara u obitelji.[329, 335, 336] Pohađanje vrtića te starija braća i sestre povećavaju izloženost respiratornim virusima. Dojenje djeluje protektivno.[328] Iako ovi okolišni čimbenici utječu na rizik razvoja sipnje u predškolskoj dobi, oni nisu nužno čimbenici rizika za razvoj astme. Dva su čimbenika rizika povezana s kasnijim razvojem astme, a to su izloženost respiratornim virusnim infekcijama i brzi prirast tjelesne mase u ranom djetinjstvu.

Nekoliko istraživanja podupire hipotezu višestrukog udarca, u kojem respiratorne virusne infekcije u periodu povećane osjetljivosti u ranom djetinjstvu, u kombinaciji s atopijskom senzibilizacijom, mogu igrati ključni ulogu u patogenezi astme.[337, 338] Ostaje dvojbeno radi li se o uzročnoj vezi ili razotkrivanju genetske osjetljivosti. Do 50 % djece imat će barem jednu epizodu sipnje uz virusnu infekciju donjeg respiratornog trakta prije školske dobi, najčešće uzrokovanu rinovirusom ili RSV-om.[169] Nekoliko studija je pokazalo povezanost između ranih infekcija rinovirusom ili RSV-om i povećanim rizikom od astme u školskoj dobi, posebno kod dojenčadi s pozitivnom obiteljskom anamnezom atopije.[339 - 342] Iako je većina tih studija usmjerena na astmu u školskoj dobi, Lemanske i suradnici su izvijestili da je sipnja uz infekciju rinovirusom u prvoj godini života najjači prediktor sipnje u trećoj godini života (omjer izgleda [OR, od engl. odds ratio] 6,6).[340] Dob javljanja prve sipnje mogla bi imati prognostičku vrijednost pri utvrđivanju rizika od astme, jer je infekcija rinovirusom ili RSV-om u prvoj godini života bila povezana s osobito visokim rizikom za astmu u dobi od 6 godina u skupini djece s visokim rizikom od atopije (OR 31,7, 6,5 i 2,5 za infekcije rinovirusom u trećoj, drugoj i prvoj godina života).[343] Nekoliko je koncepata predloženo za objašnjenje uloge virusnih infekcija u nastanku astme. Infekcija rinovirusom povisuje medijatore remodeliranja dišnih putova *in vitro*, kao što su VEGF[344] (čimbenik rasta vaskularnog endotela, od engl. vascular endothelial growth factor) i EGFR[345] (receptor epidermalnog čimbenika rasta, od engl. epidermal growth factor receptor), te regulira gene povezane s interferonom i remodeliranjem dišnih putova, sugerirajući da rano oštećenje pluća tijekom osjetljive predškolske dobi može dovesti do dugoročnih posljedica.[346] Kao najvjerojatniji uzrok predložene su promjene prirođenog i stečenog imunosnog odgovora na virus.[347] Otkriće interakcije između prirođenog imuniteta epitela i stečenog alergijskog odgovora pokazuju nove potencijalne veze između rinovirusa i astme. Osobito je zanimljiv limfopoetin strome timusa (TSLP), koji se smatra ‘‘glavnim Th2 citokinom’’, jer aktivacijom antigen prezentirajućih stanica potiče diferencijaciju naivnih T0 stanica u Th2 limfocite.[6]

Ulogu bakterijskih respiratornih infekcija, povezanih s epizodama akutne sipnje kao determinante dugoročne prognoze još je potrebno istražiti.[348]

Osim izloženosti virusima, čimbenici domaćina kao što su alergijska senzibilizacija u ranom djetinjstvu[349] i nedostatci u odgovoru interferona[350] mogu promijeniti rizik za razvoj astme u

osjetljivih pojedinaca. Može li rano liječenje modificirati ovu povezanost tek se treba istražiti.[233, 351]

Više studija je pokazalo da je ubrzani prirast tjelesne mase (ali ne i rast u duljinu) u prve dvije godine života povezan sa simptomima astme u predškolskoj dobi. U velikoj nizozemskoj studiji, studiji generacije R (prospektivna kohortna studija trudnica i njihovih potomaka), prirast tjelesne mase od rođenja do 3 mjeseca života je bio pozitivno povezan s rizikom od sipnje, kratkoće daha i upornog lučenja sluzi u prve 4 godine života, neovisno o obrascu rasta fetusa.[328] Istražitelji druge nizozemske kohorte našli su povezanost između brzog povećanja tjelesne mase u prva tri mjeseca života i smanjenog FEV1 u dobi od 5 godina, neovisno o porođajnoj težini.[352] Ta otkrića potkrjepljuju i druge studije.[353, 354] Mehanizmi na kojima se temelji ta povezanost nisu potpuno jasni. Brzo nakupljanje masnog tkiva može biti povezano s povećanjem razine citokina povezanih s pretilosti (adipokina), što može dovesti do kroničnog stanja upale.[355, 356] Ovo upalno stanje može imati negativan utjecaj na rast pluća i razvoj imunosnog sustava, te može doprinijeti razvoju astme.[357]

1.2.10. Procjena astme

Za razliku od mnogih drugih kroničnih bolesti, kod astme ne postoje objektivni pokazatelji težine bolesti. Upala je prisutna čak i u takozvanoj blagoj povremenoj astmi, dok se teški simptomi i egzacerbacije astme javljaju kod nekih bolesnika unatoč supresiji upale.[358]

Kontrola simptoma astme može se brzo procijeniti upitnicima kao što je Test kontrole astme (odrasli ili dječji) koji se koristi na kontrolnim pregledima.[359]

Iako učestali simptomi povećavaju rizik egzacerbacije, procjena kontrole simptoma nije dovoljna za procjenu kontrole bolesti. Neovisno o simptomima, nekoliko drugih čimbenika su značajni prediktori rizika egzacerbacije u odraslih i djece, a to su: prekomjerna uporaba β2 agonista kratkog djelovanja, neredovito uzimanje inhalacijskog kortikosteroida (nije propisan, loša tehnika korištenja inhalera ili neadekvatna suradljivost), slaba funkcija pluća (odrasle osobe), izloženost duhanskom dimu (aktivno ili pasivno), izloženost alergenu, alergija na hranu, infekcije gornjih dišnih putova (pogotovo tijekom izloženosti alergenu), psihološki i socioekonomski problemi, obiteljski ili školski problemi, komorbiditeti kao što su rinosinusitis, pretilost ili eozinofilija u krvi ili sputumu. Rizične čimbenike i komorbiditete treba iznova procjenjivati barem jedanput godišnje.[224]

1.2.11. Sveobuhvatan pristup liječenju astme

Primarni cilj liječenja astme je postizanje kontrole simptoma i podležeće upale dišnih putova, s ciljem smanjenja rizika egzacerbacija i nuspojava povezanih s lijekovima, te sprječavanja remodeliranja pluća tijekom rasta, a zatim i kasnije u životu.[187]

Liječenje astme pretpostavlja individualizirani pristup, koji uključuje edukaciju o samokontroli bolesti, pisani plan postupanja u egzacerbaciji i poduku adekvatnog korištenja inhalera (kod djece to uključuje roditelje i skrbnike), liječenje komorbiditeta i promjenjivih čimbenika rizika, nefarmakološko (npr. izbjegavanje izloženosti duhanskom dimu, gubitak težine kod pretilih, prepoznavanje i izbjegavanje okidača) i farmakološko liječenje. Odabir odgovarajućeg liječenja ovisi o težini bolesti (povremena astma, blaga, umjerena i teška trajna astma), stupnju reverzibilnosti opstrukcije, aktivnosti bolesti (egzacerbacije povezane s virusnim infekcijama, izloženosti alergenima ili tjelovježbom) i dobi prvih simptoma (dojenačka, dječja ili odrasla dob). Farmakološko liječenje treba titrirati do minimalne učinkovite doze za svakog bolesnika. Razlikujemo dvije skupine lijekova: simptomatski lijekovi (engl. relievers), kojima se liječi akutni napadaj bronhoopstrukcije i osnovni lijekovi (engl. controllers) koji djeluju na alergijsku upalu u dišnim putovima i sprječavaju egzacerbacije bolesti. Simptomatski lijekovi su beta2-agonisti kratkog djelovanja – salbutamol, teofilinski preparati i antikolinergici. Najčešće primjenjivani simptomatski lijek je salbutamol. Osnovni lijekovi su inhalacijski kortikosteroidi (ICS, od engl. inhaled corticosteroids), antagonisti leukotrijenskih receptora (LTRA, od engl. leukotriene receptor antagonist) i beta2-agonisti dugog djelovanja (LABA, od engl. long-acting beta agonist). Preporučuje se primjena lijekova u inhalacijskom obliku, putem zračnih komorica, koje za primjenu u male djece imaju i masku. Tako lijek brže dopire na željeno mjesto - u donje dišne putove, gdje je i njegovo djelovanje najpotrebnije.

Posljednjih godina se primjenjuju monoklonska protutijela kao protuupalna terapija u teškoj astmi, primjerice omalizumab (anti-IgE monoklonsko protutijelo), mepolizumab i reslizumab (anti IL-5), benralizumab (anti IL-5Rα), lebrikizumab i tralokinumab (anti IL-13), dupilumab (anti IL-4Rα).[293]

Usklađivanje liječenja temelji se na ciklusu procjene i ponovne procjene kontrole simptoma svakog bolesnika, čimbenika rizika, komorbiditeta, nuspojava, te zadovoljstva bolesnika ili roditelja. Partnerski odnos bolesnika/roditelja i liječnika u određivanju terapije povezan je s

boljim ishodom liječenja.[360] Edukacija bolesnika s astmom uključuje samokontrolu, pisani akcijski plan za pogoršanje astme tako da bolesnici (ili skrbnici) znaju prepoznati i terapijski odgovoriti na pogoršanje astme, te redovite kliničke kontrole. Dobra edukacija bolesnika je povezana sa smanjenjem potrebe za hitnom zdravstvenom skrbi, smanjenjem noćnog buđenja i izostanaka s nastave ili posla.[361, 362]

Neophodan je edukacija uporabe inhalera i zračnih komorica s demonstracijom od strane liječnika ili medicinske sestre , jer je pogrešna tehnika uzimanja terapije često povezana s povećanim rizikom od egzacerbacija. Redovito ponavljanje treninga uporabe inhalera vodi boljoj kontroli astme.[363]

Zaključno, možemo reći da nema optimalne terapije za liječenje sipnje u ranom djetinjstvu. Patofiziologija je slabo razumljiva i vjerojatno su važni i drugi čimbenici osim upale dišnog puta. Iako su studije provedene u odraslih bolesnika pokazale da pojedine podskupine bolesnika, vodeći se određenim upalnim biljezima i tipom upale, bolje odgovaraju na određenu terapiju, u dječjoj dobi liječenje je još uvijek bazirano na učestalosti i težini simptoma.

Određivanje fenotipova obično nije korisno u planiranju liječenja većine bolesnika s blagom do umjerenom astmom koji su dobro kontrolirani niskom dozom ICS. Nije poznato je li razlog tome što je blaga bolest uniformna kategorija ili zato što ICS imaju višestruke učinke. Iznimka je astma potaknuta tjelesnim naporom, koja može biti vezana uz proizvodnju cisteinil leukotrijena, te može bolje odgovoriti na terapiju antagonistima leukotrijenskih receptora nego na ICS.[364] Strategija liječenja bazirana na normalizaciji broja eozinofila u sputumu učinkovita je kod teške astme, ali bez učinka u bolesnika s blagom bolešću.[365]

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da je serumska koncentracija TSLP u djece oboljele od astme veća od koncentracije TSLP u zdrave populacije, te da postoji razlika u koncentraciji TSLP među različitim fenotipovima astme u djece.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ:

Cilj ovog istraživanja jest utvrditi povezanost serumske koncentracije TSLP s astmom dječje dobi.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. usporediti vrijednost TSLP u serumu u tri različita fenotipa astme u djece s dobrom kontrolom astme:
    a) astmom i alergijskom senzibilizacijom
    b) astmom bez alergijske senzibilizacije
    c) astmom induciranom virusnim infekcijama
2. ispitati povezanost koncentracije TSLP u serumu i kontrole astme na osnovu upitnika u djece starije od 4 godine
3. ispitati razliku u koncentraciji TSLP u serumu tijekom akutne egzacerbacije, te u iste djece u mirnoj (asimptomatskoj) fazi bolesti
4. ispitati razliku koncentracije serumskog TSLP u djece s novootkrivenom astmom i djece s prethodno postavljenom dijagnozom astme koja uzimaju protuupalnu terapiju duže od mjesec dana

4. ISPITANICI I METODE

U ovo presječno istraživanje uključeno je 307 djece u dobi od 1 do 13 godina, 23 ispitanika pratilo se prospektivno. Svi ispitanici uključeni u istraživanje su pacijenti Klinike za pedijatriju KBC Sestre milosrdnice, 207 djece čine bolesnici Alergološko pulmološke ambulante ili Zavoda za endokrinologiju, dijabetes, pulmologiju i alergologiju Klinike za pedijatriju koji imaju dijagnosticiranu astmu, a 100 djece koja nemaju astmu čini kontrolnu skupinu.

Istraživanje je provedeno u razdoblju od lipnja 2017. godine do lipnja 2019. godine, u skladu s etičkim načelima uz sudjelovanje doktoranda u svim fazama istraživanja od prikupljanja i obrađivanja uzoraka do obrade dobivenih podataka.

Ispitanici su uključeni u studiju nakon dobivanja informiranog pristanka od njihovih roditelja/skrbnika (u djece školske dobi i od samih ispitanika) u kojem je naglašeno da je sudjelovanje u istraživanju dobrovoljno. Istraživači su poduzeli sve mjere zaštite tajnosti podataka sudionika u svim fazama istraživanja. Rezultati su korišteni poštujući načelo anonimnosti.

4.1. Ispitanici

Kriteriji uključivanja ispitanika s astmom:

- dijagnoza astme prema smjernicama Globalne inicijative za astmu (Global Initiative for Asthma 2017, GINA)[187] koje uključuju osobnu i obiteljsku anamnezu, fizikalni pregled bolesnika, mjerenje plućne funkcije spirometrijom u djece starije od 5 godina, kožni ubodni test (PRICK test) na inhalacijske alergene, laboratorijske pretrage (koncentracija ukupnih i specifičnih IgE protutijela u serumu te broj eozinofilnih granulocita u krvi).

Isključujući kriterij:

- postojanje dokazane bakterijske infekcije ili druge teške/ili kronične bolesti (npr. dijabetes melitus, neoplastična bolest, autoimuna bolest, aktivni atopijski dermatitis (prisustvo promjena po koži), eozinofilni ezofagitis).

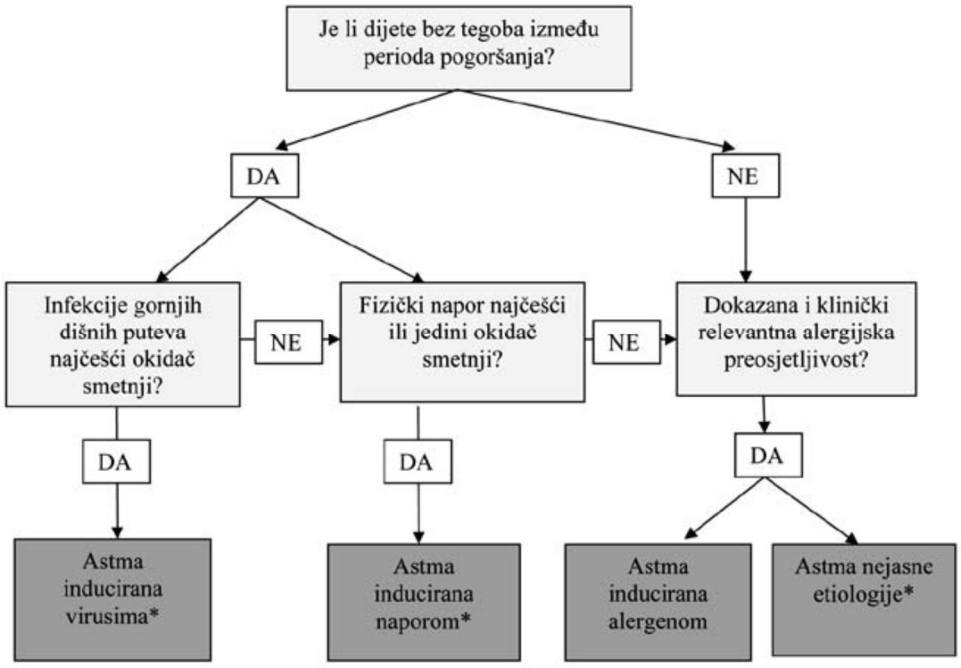
U kontrolnu skupinu (100 ispitanika) uključena su djeca liječena u Klinici za pedijatriju i Poliklinici zbog neuroloških bolesti i psihogenih bolova u trbuhu.

Kriteriji uključivanja u kontrolnu skupinu ispitanika su:

- negativan heteroanamnestički odgovor o pojavljivanju bronhoopstrukcija (piskanja, sipnje, otežanog disanja), alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa,
- nepostojanje druge teške i/ili kronične bolesti (npr. dijabetes melitus, neoplastična bolest, autoimuna bolest, eozinofilni ezofagitis).

Prema PRACTALL smjernicama ispitanici su podijeljeni u fenotipove:

- alergijska astma
- astma izazvana virusnim infekcijama
- nealergijska astma.[189] (Vidi Slika 4.1.)



Slika 4.1. Fenotipovi astme u djece prema okidaču prema PRACTALL smjernicama. *djeca mogu imati atopiju. Preuzeto i modificirano iz *Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, et al. European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. Allergy. 2008;63:9.*[189]

Alergijska senzibilizacija definirana je kao prisutnost barem jednoga od sljedećeg:

1. pozitivan kožni test na jedan ili više inhalacijskih alergena (urtika ≥ 3 mm od negativne kontrole)

2. pozitivan specifični IgE na jedan ili više inhalacijskih alergena (≥ 0,35 KIU/L).

Kod djece kod koje je alergološka obrada (kožni test i/ili spIgE) učinjena unazad godinu dana od uključivanja u istraživanje alergološka obrada se nije ponavljala, a kod ostale djece obrada je učinjena prilikom uključivanja u istraživanje.

Prikupljanje podataka, tj. uključivanje ispitanika trajalo je dvije godine. Planirana obrada učinjena je tijekom redovitih ambulantnih kontrola djece s astmom ili za vrijeme akutne hospitalizacije zbog egzacerbacije, a uključivala je vađenje uzoraka krvi za TSLP uz druge standardne pretrage. Kod većeg dijela ispitanika vađenje krvi se provodilo jednom u sklopu redovite kontrole bolesti, a kod manje kohorte ispitanika parni uzorak krvi je uzet na kontrolnom pregledu nakon hospitalizacije u razmaku većem od mjesec dana.

4.1.1. Test kontrole astme

Težina i kontrola simptoma astme procijenjena je kliničkim pregledom, spirometrijom (u djece starije od 5 godina) i upotrebom upitnika kontrole astme u djece starije od 4 godine. Test kontrole astme koristi se za mjerenje kontrole simptoma u oboljelih od astme, a numerički rezultat pruža pomoć u procjeni kontrole astme. Za djecu u dobi 4 − 11 godina koristio se Upitnik o kontroli astme za djecu (Childhood Asthma Control Test, C-ACT). C-ACT se sastoji od sedam pitanja (učestalost simptoma izazvanih tjelesnom aktivnošću, učestalost kašlja i noćnih simptoma; broj bodova 0 − 27), od kojih na prva četiri odgovara dijete, a na zadnja tri odgovara roditelj. Prema podacima iz literature, bodovni zbroj od 19 i manje otkriva nekontroliranu astmu u zadnja 4 tjedna.[359, 366]

4.1.2. Akutna egzacerbacija astme

Akutnom egzacerbacijom astme smatra se ono pogoršanje astme koje zahtijeva hospitalizaciju i/ili terapiju peroralnim ili parenteralnim kortikosteroidima.

4.1.3. Kožni ubodni test

Kožno ubodno testiranje (PRICK test) na set inhalacijskih alergena (*Dermatophagoides pteronyssinus*, dlaka mačke, dlaka psa, peludi trava, stabala, ambrozije) provedeno je standardiziranim pripravcima (Stallergen, Francuska ili Diater, Španjolska) prema preporučenim smjernicama.[367] Histamin (0,1 %) i fiziološka otopina korišteni su kao pozitivna i negativna kontrola. Bolesnici nisu uzimali antihistaminike tjedan dana prije testiranja. Pozitivnim rezultatom kožnog testa smatrali smo promjer urtike na određeni alergen 3 mm veći od negativne kontrole.

4.1.4. Mjerenja plućne funkcije

Testovi plućne funkcije mjereni su u djece s astmom starije od 5 godine spirometrom (Jaeger, Hoechberg, Njemačka) prema preporučenim smjernicama Američkog torakalnog društva (ATS, engl. The American Thoracic Society) i ERS-a. Mjereni su: FVC − forsirani vitalni kapacitet; FEV1 − forsirani volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi; FEV1% prediktivnog, PEF − vršni ekspiratorni protok zraka; MEF75 − maksimalni protok zraka u izdahu pri 75 % FVC-a; MEF50 − maksimalni protok zraka u izdahu pri 50 % FVC-a; MEF25 − maksimalni protok zraka u izdahu pri 25 % FVC-a. Prvi korak je uključivao brzi i potpuni udah od funkcionalnog rezidualnog kapaciteta do ukupnog plućnog kapaciteta. Nakon 1 do 2 sekunde slijedio je pokušaj izvođenja FVC (snažno i brzo izdahne zrak i potom izdiše sav zrak iz pluća do rezidualnog volumena). Mjerenje je završeno kada krivulja protok-volumen nije pokazivala promjene u volumenu (≤ 0.025 L) u jednoj sekundi, a ispitanik je pokušao izdisati tijekom ≥ 6 sekundi, odnosno za djecu do 12 godina prihvatljivo je izdisanje > 3 sekunde. Test je ponavljan sve dok nisu dobivena tri tehnički ispravna FVC-a ili do 8 pokušaja (dvije najviše vrijednosti FVC-a i/ili FEV-a 1 su bile unutar 0,150 L − varijabilnost od 5 %). Najviše zabilježene vrijednosti dinamičkih i statičkih plućnih volumena unijete su u bazu podataka. Pri izračunu predviđenih vrijednosti za svakog ispitanika (ovisno o visini, dobi i spolu u bijeloj rasi) korištene su jednadžbe objavljene prema referenci Millera i suradnika, a zabilježene su i vrijednosti udjela dobivenih mjerenjem u odnosu na one predviđenih vrijednosti (%).[301, 368, 369]

4.1.5. Procjena stanja uhranjenosti

Indeks tjelesne mase (ITM) najčešće je korišten kriterij za procjenu stupnja uhranjenosti. Računa se kao omjer tjelesne mase izražene u kilogramima i kvadrata tjelesne visine izražene u metrima. U djece i adolescenata procjena stanja uhranjenosti vrši se usporedbom vrijednosti ITM pojedinog djeteta s vrijednošću ITM zdrave djece iste dobi i spola, temeljem položaja na centilnoj krivulji ili preporučenih graničnih vrijednosti. U ovom istraživanju koristili smo referentne vrijednosti za procjenu stanja uhranjenosti u djece Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC, od engl. Centers for Disease Control and Prevention). Ispitanike nakon navršene druge godine života smo na osnovi ITM izraženog u centilima koristeći CDC grafikone rasta specifične za dob i spol podijelili u 4 skupine: normalna tjelesna težina (ITM između 5. − 85. centile), prekomjerna tjelesna težina (ITM između 85. − 95. centile), pretilost (ITM ≥ 95. centile), pothranjenost (ITM < 5. centile).[370]

4.1.6. Laboratorijska mjerenja

U uzorcima periferne krvi dobivenim venepunkcijom analizirani su sljedeći parametri: kompletna krvna slika, diferencijalna krvna slika (DKS), eozinofilni kationski protein (ECP, od engl. eosinophil cationic protein), ukupni IgE, specifični IgE (spIgE na *D. pteronyssinus* − d1, spIgE na klupčastu oštricu, livadnu vlasulju, ljulj, livadnu mačicu, livadnu vlasnjaču − gx1, spIgE na johu, brezu, lijesku, hrast, vrbu − tx9, spIgE na ambroziju − w1).

DKS je određena morfološkom analizom krvnog razmaza. Koncentracija ukupnog IgE, ECP i specifičnog IgE u serumu određivana je kvantitativno, metodom ImmunoCAP (Phadia AB, Uppsala, Švedska) na aparatu UniCAP 100, fluoro-enzim-imunokemijskom metodom (FEIA, Fluoro Enzyme Immuno Assay).

4.1.6.1. Human TSLP ELISA Kit (abcam, ab155444)

Svim ispitanicima uzeto je 4 mL periferne krvi u epruvetu bez dodataka. Uzorci periferne krvi centrifugirani su brzinom od 3000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je serum pohranjen u kriotube na -20 °C. U uzorcima seruma bolesnika i kontrola TSLP se mjerio kvantitativno s Human TSLP ELISA Kit (abcam, ab155444). Laboratorijska analiza mjerenja koncentracije TSLP-a učinjena je u Univerzitetnoj klinici za plućne bolesti i

alergiju Golnik, Golnik, Slovenija. ELISA test (od engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; izoenzimski ELISA test) procedura provedena je prema uputama proizvođača kitova.

TSLP human ELISA kit (Abcam) je dizajniran za kvantitativno mjerenje humanog TSLP-a u serumu, plazmi i kulturi stanica supernatanta.

Ovaj test koristi protutijelo specifično za humani TSLP koje prekriva mikrotitracijsku pliticu s 96 jažica. Standardi i uzorci se pipetiraju u jažice, TSLP prisutan u uzorku veže se za jažice imobilizirajućim protutijelom. Jažice se ispiru, a potom se dodaje biotinilirano humano anti-TSLP protutijelo. Nakon ispiranja nevezanih biotiniliranih protutijela, HRP-konjugirani streptavidin se pipetira u jažice. Jažice se ponovno ispiru, a otopina 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin supstrata se dodaje u jažice i razvije se boja proporcionalno s količinom vezanog TSLP-a. Dodatkom stop otopine mijenja se boja iz plave u žutu. Kvantitativno određivanje koncentracije antigena ili protutijela provodi se mjerenjem intenziteta apsorbancije produkta obojene reakcije koji nastaje interakcijom enzima i dodanog supstrata koristeći spektrofotometrijski ELISA čitač s apsorpcijskim filtrom od 450 nm. Minimalna detektirajuća doza TSLP-a je manja od 3 pg/ml.

4.1.7. Statistička analiza

Pohrana podataka i priprema za statističku analizu učinjena je u programu Excel 2019 programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Obrada podataka učinjena je u programu za statističku obradu GraphPad Prism (verzija 8.0.1) za Windows, GraphPad Software, San Diego, California, SAD.

Za sve analizirane varijable učinjena je deskriptivna statistika. Provjerena je normalnost raspodjele dobivenih podataka. Usporedba dviju neovisnih grupa učinjena je korištenjem Studentovog t-testa ili Mann-Whitney-evog testa, ovisno o raspodjeli i uvjetu homogenosti varijanci. Usporedba dviju ovisnih grupa učinjena je korištenjem t-testa za povezane uzorke. Za usporedbu mjerenih varijabli u više skupina primijenjen je ANOVA ili Kruskal-Wallisov test. Povezanost između različitih parametara određivana je računanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije kad su uvjeti bili zadovoljeni (normalna distribucija barem jedne varijable) ili Spearmanovog koeficijenta korelacije u suprotnom slučaju.

Statistička značajnost za sve testove je $p < 0,05$. Varijable su opisane medijanom i interkvartilnim rasponom u slučaju odstupanja od normalne distribucije ili kao aritmetička sredina i standardna devijacija u slučaju normalne distribucije.

Kako TSLP podaci nisu normalno raspoređeni, a imajući neke podatke o distribuciji TSLP u skupinama, koriseći metodu „bootstrap“ (5 − 200 sudionika u uzorku, povećanje za 5 osoba po uzorku, 1000 ponavljanja u svakoj veličini uzorka) za procjenu testa snage (razina značajnosti od 0,05) u odnosu na broj sudionika u uzorku, test snage > 80 % za otkrivanje razlike između skupina je postignut s 35 sudionika u svakom uzorku.

4.1.8. Odobrenja i financiranje

Istraživanje je provedeno na dva radilišta: uključivanje ispitanika u istraživanje, uzimanje uzoraka i rutinska laboratorijska obrada u Klinici za pedijatriju KBC Sestre milosrdnice, a mjerenje serumske koncentracije TSLP-a u Univerzitetnoj klinici za plućne bolesti i alergiju Golnik, Golnik, Slovenija.

4.1.8.1. Odobrenja

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Etičko povjerenstvo KBC Sestre milosrdnice i Etičko povjerenstvo Univerzitetne klinike za plućne bolesti i alergiju Golnik. Da bi dijete sudjelovalo u istraživanju, barem jedan od roditelja ili zakonskih skrbnika trebao je potpisati informirani pristanak. Informirani pristanak prilagođen dječjoj dobi također su potpisala i djeca starija od 8 godina.

4.1.8.2. Financiranje

Mjerenje serumske koncentracije TSLP-a u Univerzitetnoj klinici za plućne bolesti i alergiju Golnik je izrađeno u okviru znanstveno-istraživačkog projekta ARRS − Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, P3-0360 Celostna obravnava alergijskih bolezni in astme v Sloveniji: od epidemiologije do genetike, voditelj projekta prof. dr. Mitja Košnik.

Etiološka dijagnostika respiratornih virusnih infekcija učinjena je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u sklopu projekta financiranog od Hrvatske zaklade za znanost, IP-2016-06-7556, voditeljice Sunčanice Ljubin Sternak pod naslovom: Novi i zapostavljeni virusni uzročnici infekcija dišnog sustava u vulnerabilnim skupinama bolesnika.

5. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 307 djece s potpisanim informiranim pristankom roditelja ili skrbnika, a koji su zadovoljili kriterije za uključenje u pojedine skupine. Informirani pristanak su potpisali i ispitanici stariji od 8 godina. U skupini ispitanika s astmom bilo je 207, a u kontrolnoj skupini 100 ispitanika. U 25 ispitanika s astmom određen je TSLP u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme, a u 23 ispitanika je određen i kontrolni uzorak TSLP-a u mirnoj fazi bolesti.

5.1. Ispitanici

Tablica 5.1. Deskriptivni podaci ispitanika

	Djeca s astmom	**Kontrolna skupina djece**
Broj ispitanika	207	100
DOB /godine/		
aritmetička sredina ± SD, 95%CI	6,3 ± 3,5, (5,8 − 6,8)	7,4 ± 3,4 (6,7 − 8)
Medijan (interkvartilni raspon)	6 (3 − 9)	8 (5 − 10)
SPOL Dječaci N (%)	132 (63,8 %)	55 (55 %)
Djevojčice N (%)	75 (36,2 %)	45 (45 %)

SD – standardna devijacija, CI – interval pouzdanosti

Karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje prikazane su u Tablica 5.1. U istraživanju je sudjelovalo 207 djece s astmom, 132 (63,8 %) dječaka i 75 (36,2 %) djevojčica u dobi od 1 − 13 godina prosječne (±SD) dobi 6,3 ± 3,5 godine. U kontrolnoj skupini je uključeno 100 djece, 55

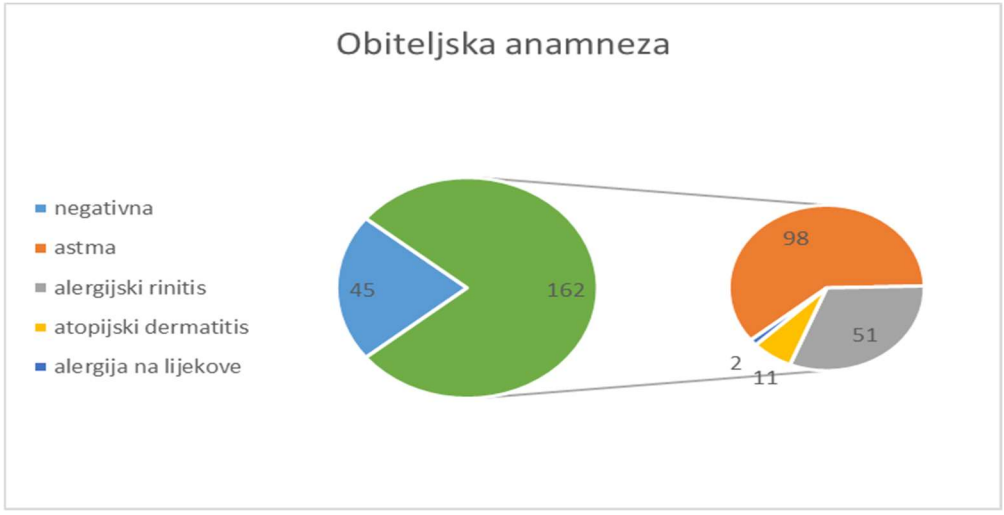
(55 %) dječaka i 45 (45 %) djevojčica u dobi od 1 – 14 godina prosječne (±SD) dobi 7,4 ± 3,4 godine.

5.2. Karakteristike ispitivane populacije

Prije prikaza samih rezultata istraživanja, analizirali smo podatke o obiteljskoj anamnezi; podatke o postojanju senzibilizacije na inhalacijske alergene; podatke o plućnoj funkciji; podatke o testu kontrole astme u djece starije od 4 godine; podatke o fenotipu astme; podatke o prethodno postavljenoj dijagnozi astmi i profilaktičkoj terapiji; kao i podatke o pridruženim alergijskim bolestima (AD, AR i oralni alergijski sindrom).

5.2.1. Obiteljska anamneza

Od 207 ispitanika s astmom pozitivnu obiteljsku anamnezu na atopiju je imalo 162 ispitanika (78,3 %), od toga 98 (60,5 %) ispitanika je imalo pozitivnu obiteljsku anamnezu na astmu, 51 (31,5 %) na alergijski rinitis, 11 (6,8 %) na atopijski dermatitis, a 2 (1,2 %) na alergiju na lijekove (Slika 5.1.).



Slika 5.1. Obiteljska anamneza na atopiju (N = 207)

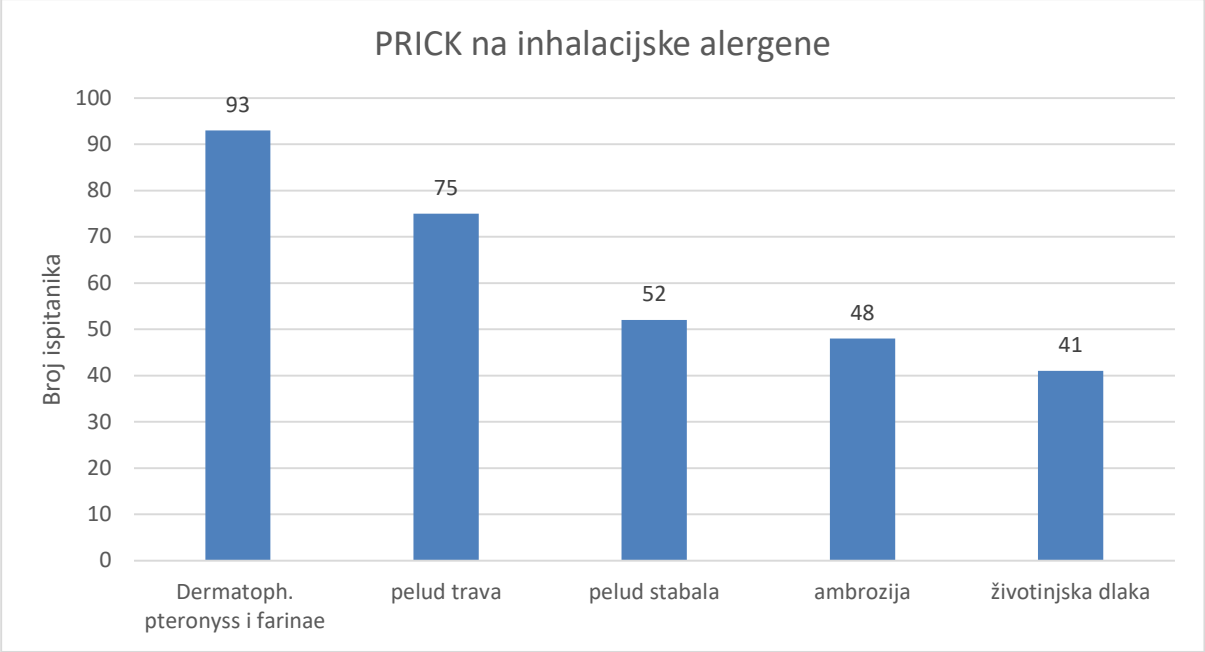
5.2.2. Alergijska preosjetljivost

Svih 207 ispitanika s astmom učinilo je kožni ubodni test na inhalacijske alergene.

Kod 133 (64,3 %) ispitanika s astmom nađena je senzibilizacija (PRICK test i/ili specifični IgE) na jedan ili više alergena iz standardne palete inhalacijskih alergena (*Dermatophagoides*

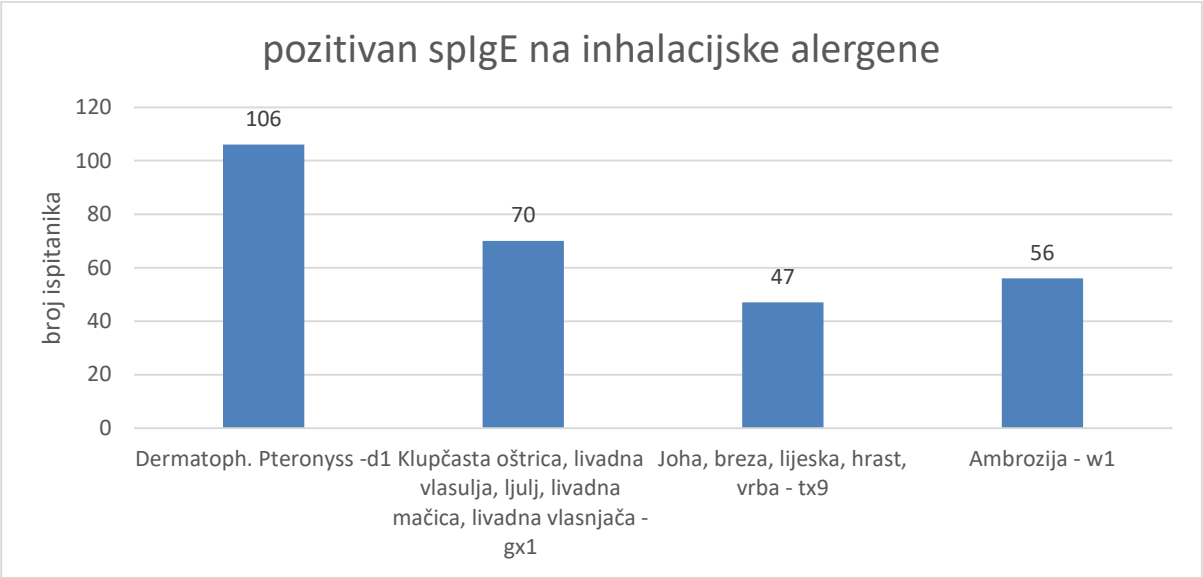
pteronyssinus, dlaka mačke, dlaka psa, peludi trava, stabala, ambrozije), kod 74 (35,8 %) ispitanika nismo dokazali senzibilizaciju ni na jedan specifični inhalacijski alergen iz standardne palete.

U 129 (62 %) ispitanika kožni ubodni test na inhalacijske alergene je bio pozitivan na barem jedan inhalacijski alergen. Od ukupnog broja ispitanika, 93 (44,9 %) je imalo pozitivan PRICK test na *Dermatophagoides pteronyssinus*, 75 (36,2 %) na pelud trava, 52 (25,1 %) na pelud stabala, 48 (23,2 %) na ambroziju i 41 (19,8 %) na životinjsku dlaku (Slika 5.2.)

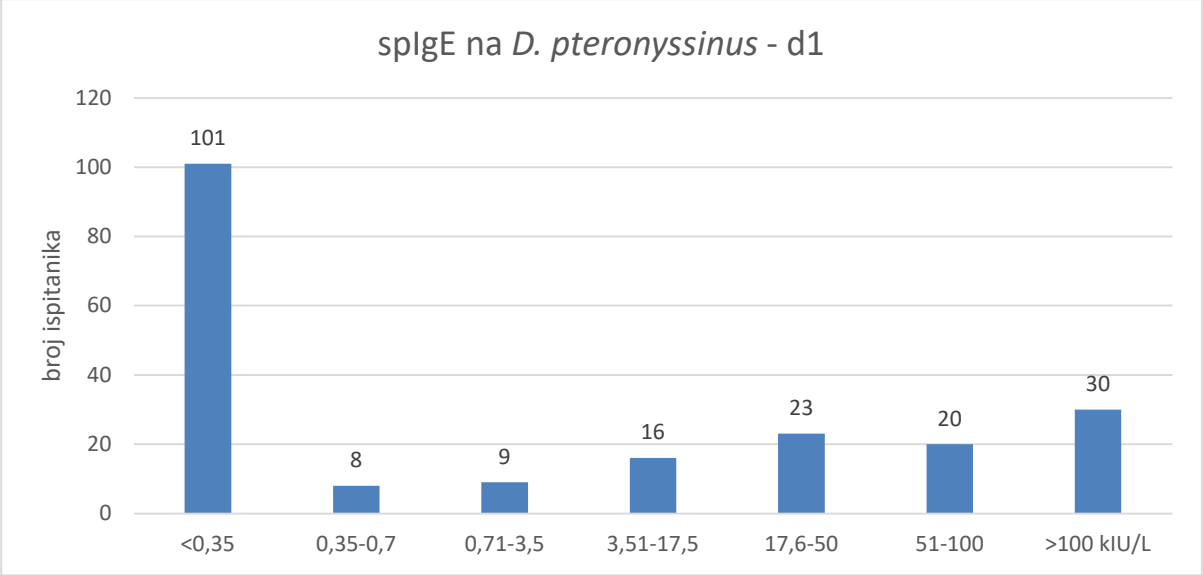


Slika 5.2. Učestalost pozitivnog PRICK testa na inhalacijske alergene (N = 207)

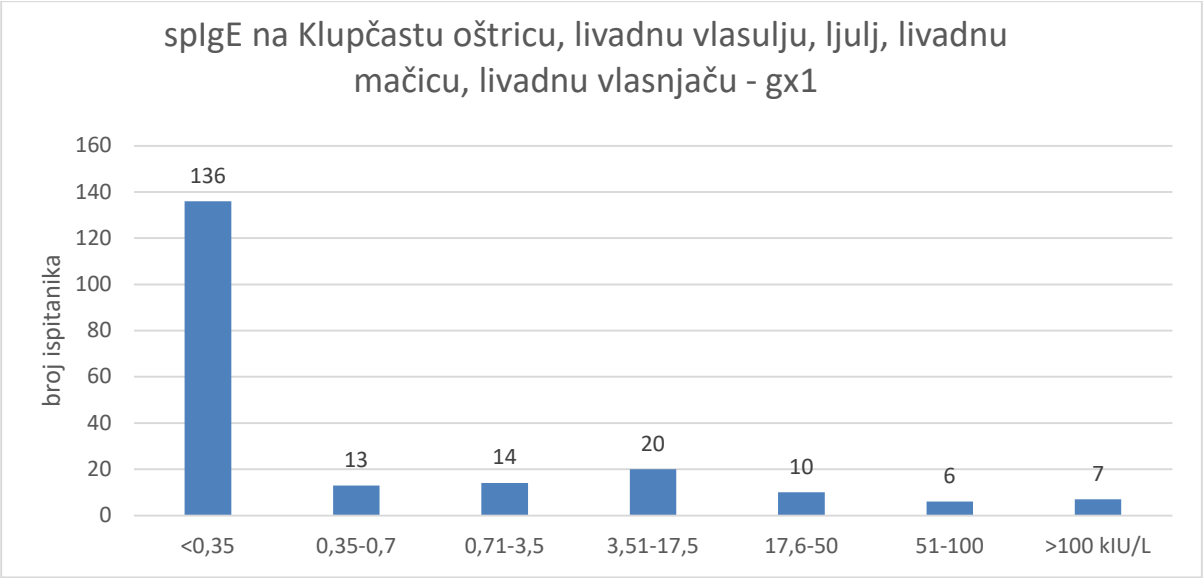
Također su ispitanici s astmom učinili i spIgE na standardnu paletu inhalacijskih alergena (spIgE na *Dermatophagoides pteronyssinus* − d1, spIgE na klupčastu oštricu, livadnu vlasulju, ljulj, livadnu mačicu, livadnu vlasnjaču − gx1, spIgE na johu, brezu, lijesku, hrast, vrbu − tx9, spIgE na ambroziju − w1). Od 207 ispitanika pozitivan nalaz spIgE na *Dermatophagoides pteronyssinus* je imalo 106 ispitanika (51,2 %), od 206 ispitanika pozitivan nalaz spIgE na pelud trava je imalo 70 (34 %) ispitanika, a od 205 ispitanika pozitivan spIgE na ambroziju je imalo 56 (27,3 %), a na pelud stabala 47 (22,9 %) ispitanika (Tablica 5.3.). Na slikama koje slijede prikazana je raspodjela ispitanika prema razini spIgE na *Dermatophagoides pteronyssinus* (Slika 5.4.), pelud trava (Slika 5.5.), pelud stabala (Slika 5.6.) i ambroziju (Slika 5.7.).



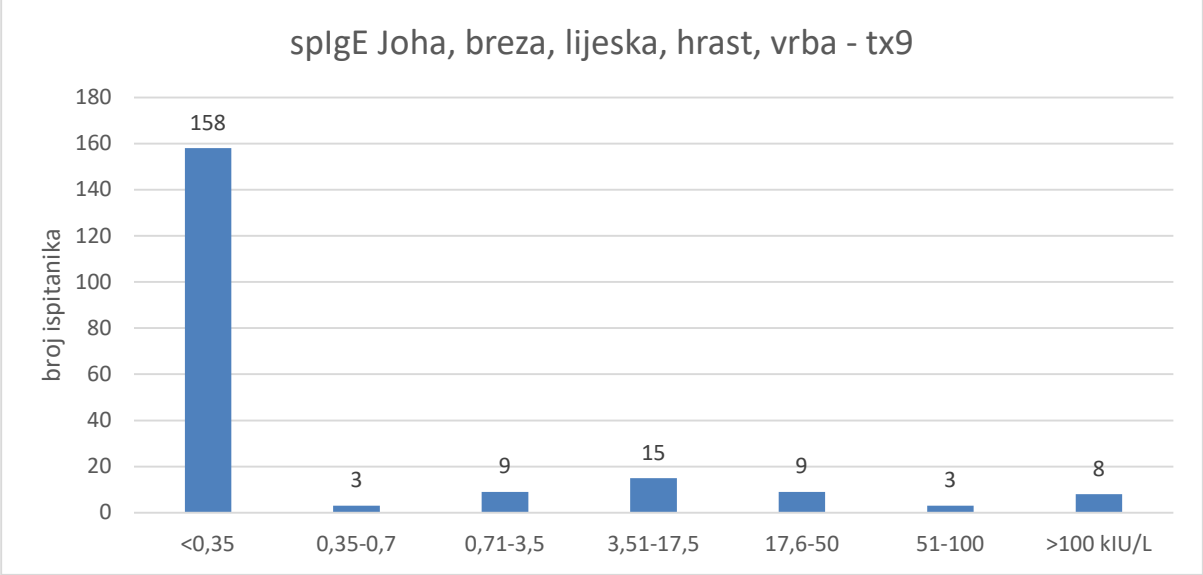
Slika 5.3. Učestalost pozitivnog spIgE na inhalacijske alergene



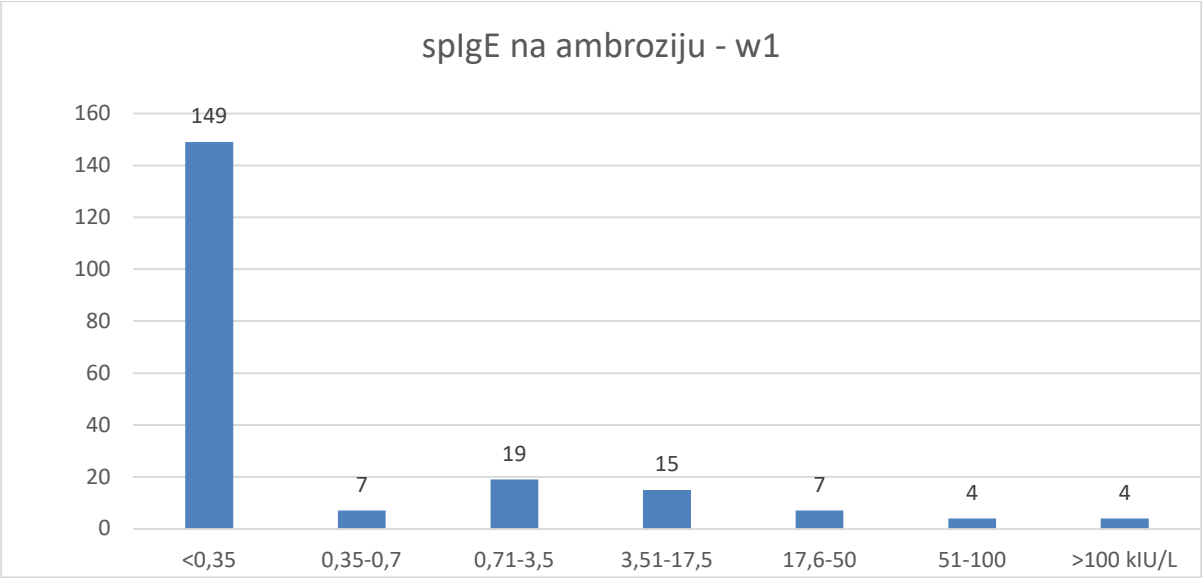
Slika 5.4. Raspodjela bolesnika prema nalazu spIgE na *D. pteronyssinus* – d1



Slika 5.5. Raspodjela bolesnika prema nalazu spIgE na klupčastu oštricu, livadnu vlasulju, ljulj, livadnu mačicu, livadnu vlasnjaču – gx1

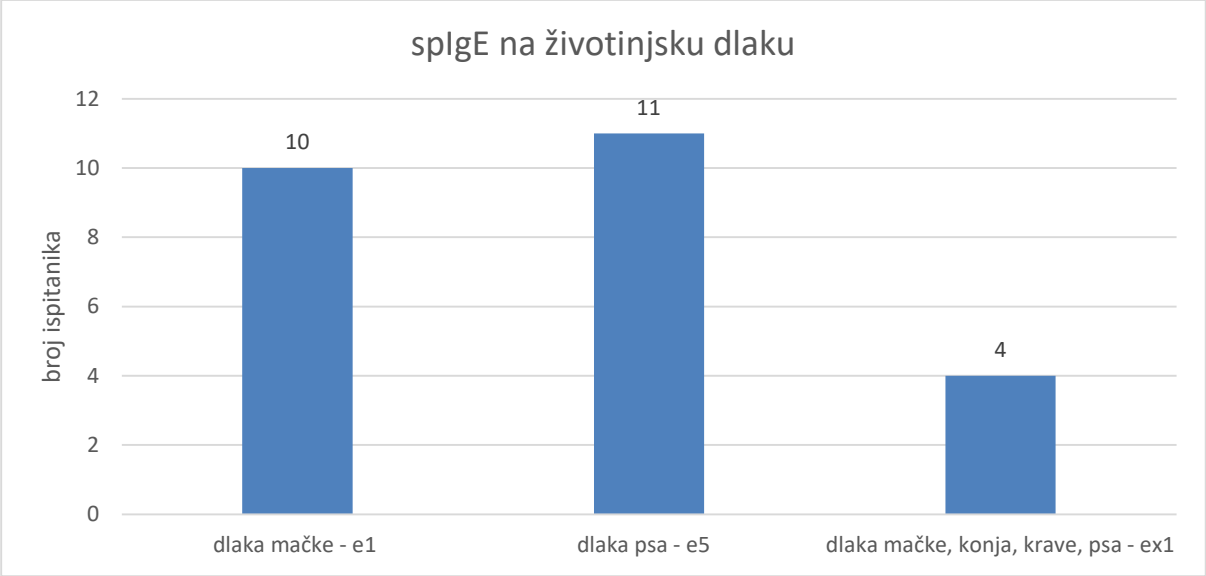


Slika 5.6. Raspodjela bolesnika prema nalazu spIgE na johu, brezu, lijesku, hrast, vrbu – tx9



Slika 5.7. Raspodjela bolesnika prema nalazu spIgE na ambroziju − w1

U 32 ispitanika učinjen je i spIgE na životinjsku dlaku (mačka − e1, pas − e5, dlaka mačke, konja, krave, psa − ex1). U 16 ispitanika učinjen je spIgE na dlaku mačke (10 je imalo spIgE > 0,35 KIU/L, a 6 spIgE < 0,35 KIU/L), u 18 ispitanika na dlaku psa (11 je imalo spIgE > 0,35 KIU/L, a 7 spIgE < 0,35 KIU/L), u 10 ispitanika spIgE na dlaku mačke, konja, krave, psa (4 je imalo spIgE > 0,35 KIU/L, a 6 spIgE < 0,35 KIU/L) (Slika 5.8.).



Slika 5.8. Učestalost pozitivnog spIgE na životinjsku dlaku (N = 16, 18, 10)

5.2.3. Plućna funkcija

Među ispitanicima s astmom 128 ih je učinilo spirometriju, a 31 impulsnu oscilometriju. Impulsna oscilometrija učinjena je u djece predškolske dobi kod kojih zbog slabe suradljivosti nije bilo moguće učiniti spirometriju. Dodatno je u 125 ispitanika učinjen i bronhodilatacijski test salbutamolom, a u 108 ispitanika i frakcija dušikovog oksida u izdahnutom zraku (FeNO). Urednu spirometriju imalo je 95 (74,2 %) ispitanika, a opstruktivne smetnje ventilacije 33 (25,8 %) ispitanika.

U spirometriji 122 (95 %) ispitanika imalo je uredan FEV1 (≥ 80 %), a 6 (5 %) ispitanika je imalo blagi stupanj opstrukcije (FEV1 = 60 − 79 %), 96 (75 %) ispitanika imalo je uredan MEF50 (≥ 80 %), blagi stupanj opstrukcije na razini malih dišnih puteva (MEF50 = 60 − 79 %) imalo je 25 (19,5 %) ispitanika, srednji stupanj (MEF50 = 40 − 59 %) 6 (4,7 %) ispitanika, a teški stupanj opstrukcije na razini malih dišnih puteva (MEF50 < 40 %) 1 (0,008 %) ispitanik.

Od 23 ispitanika koji su učinili impulsnu oscilometriju, uredan nalaz (otpor pri 5 Hz (R5) < 150 % predviđenog, otpor pri 20 Hz (R20) < 150 % predviđenog i reaktansa (X5) > -0,2 kPa/L/s) imalo je 8 (25,8 %) ispitanika, a 23 (74,2 %) ispitanika imalo je opstruktivne smetnje ventilacije (R5 ≥ 150 % predviđenog i/ili R20 ≥ 150 % predviđenog i/ili X5 ≤ -0,2 kPa/L/s).

Bronhodilatacijski test salbutamolom u spirometriji učinilo je 125 ispitanika, u 70 (56 %) je bio negativan, a u 55 (44 %) ispitanika pozitivan. Bronhodilatacijski test salbutamolom je u 7 (5,6 %) ispitanika bio pozitivan samo na razini velikih dišnih puteva (porast FEV1 > 12%), u 27 (21,6 %) pozitivan samo na razini malih dišnih puteva (porast MEF 50 > 20%), a u 21 (16,8 %) ispitanika pozitivan i na razini malih i na razini velikih dišnih puteva (porast FEV1 > 12% i MEF 50 > 20%). Bronhodilatacijski test salbutamolom učinilo je i 20 ispitanika u impulsnoj oscilometriji, u 15 (75 %) ispitanika je bio pozitivan (smanjenje R5 ili R20 ≥ 20%), a u 5 (25 %) negativan.

Frakcija dušikovog oksida u izdahnutom zraku učinjena je u 108 ispitanika, kretala se je u rasponu od 1 – 85 ppb, medijan 10 ppb, interkvartilni raspon 6 – 26,5 ppb. U 73 ispitanika izmjerena je vrijednost < 20 ppb, a u 35 ispitanika > 20 ppb.

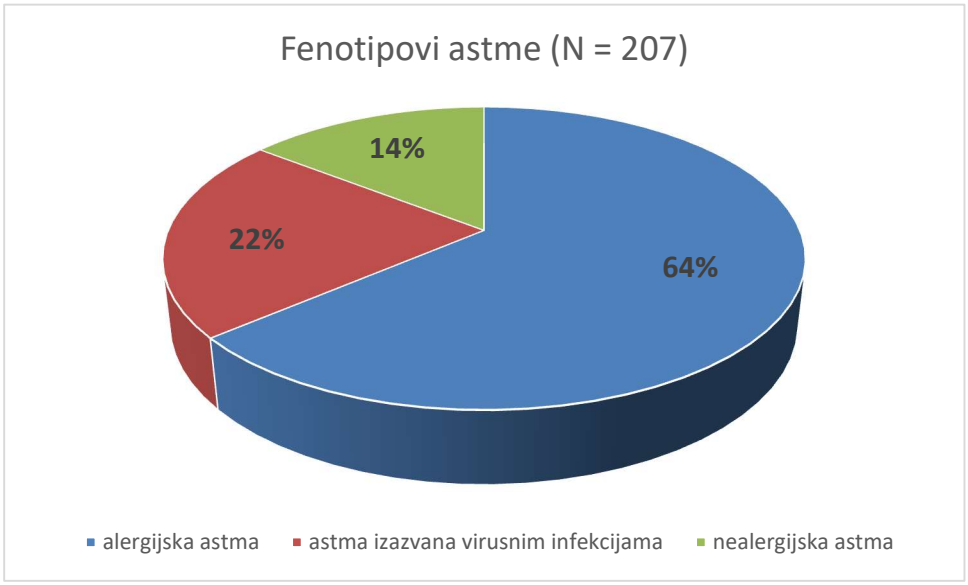
5.2.4. Test kontrole astme

Upitnik o kontroli astme za djecu (Childhood Asthma Control Test, C-ACT) ispunilo je 146 ispitanika starijih od 4 godine. Bodovni zbroj od 19 i niže u ovom istraživanju imalo je 23 (23/146, 15,8 %) ispitanika, a taj zbroj ukazuje na nekontroliranu astmu u prethodna 4 tjedna. Bodovni zbroj od 20 i više imalo je 123 (84,2 %) ispitanika, a taj zbroj ukazuje na dobru kontrolu astme u prethodna 4 tjedna.

5.2.5. Ispitanici po fenotipu astme

Djeca s astmom su prema smjernicama podijeljeni u fenotipove: 132 (63,8 %) djece s alergijskom astmom, 45 (21,7 %) djece s astmom izazvanom virusnim infekcijama i 30 (14,5 %) djece s nealergijskom astmom. (Slika 5.9.)

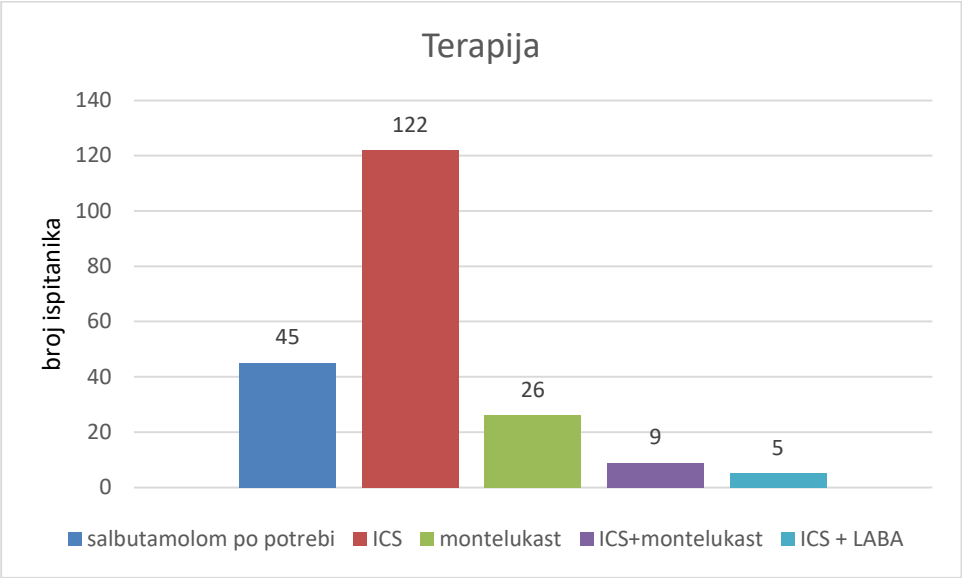
U 162 (78,3 %) ispitanika dijagnoza astme bila je postavljena i prije uključivanja u istraživanje, te su uzimali profilaktičku terapiju duže od mjesec dana.



Slika 5.9. Raspodjela ispitanika prema fenotipu. (N = 207)

5.2.6. Raspodjela ispitanika prema terapiji

U trenutku uzimanja uzorka krvi za analizu TSLP-a 45 (21,7 %) ispitanika je bilo na terapiji salbutamolom po potrebi, 122 (58,9 %) ispitanika je bilo na terapiji inhalacijskim kortikosteroidom (ICS), 26 (12,6 %) na terapiji montelukastom (LTRA), 9 (4,4 %) na kombinacijskoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom i montelukastom (ICS + LTRA), 5 (2,4 %) ispitanika bilo je na kombinacijskoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom i dugodjelujućim beta-2 agonistom (ICS + LABA) (Slika 5.10.).



Slika 5.10. Raspodjela ispitanika prema terapiji (N = 207)

5.2.7. Pridružene alergijske bolesti

U ovom istraživanju uočeno je da je 80 (38,7 %) djece od ukupnoga broja ispitanika s astmom (N=207) imalo pridružene simptome alergijskog rinitisa. Atopijski dermatitis tijekom djetinjstva imalo je 74 (35,8 %) ispitanika, od čega 68 (32,9 %) ispitanika u ranijem djetinjstvu, a recidive atopijskog dermatitisa u posljednjih 12 mjeseci imalo je 6 (2,9 %) ispitanika. U trenutku uključivanja u istraživanje u svih je ispitanika atopijski dermatitis bio u remisiji.

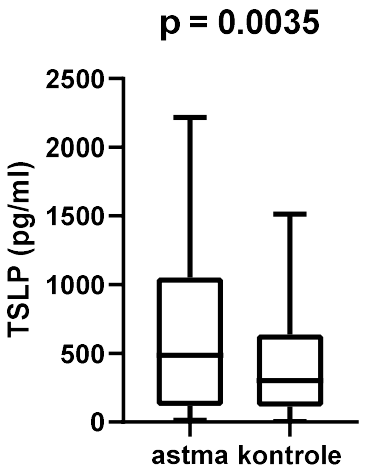
Simptome alergijskog rinitisa ili atopijskog dermatitisa uz astmu tijekom djetinjstva imalo je 122 (58,9 %) ispitanika, a 32 (15,5 %) ispitanika imalo je simptome i alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa. Oralni alergijski sindrom imala su 3 (1,5 %) ispitanika s astmom.

5.3. Vrijednosti koncentracija TSLP-a u serumu u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Koncentracija TSLP-a u serumu značajno je veća (p = 0.0035, Mann Whitney test) u grupi djece oboljele od astme (medijan, interkvartilni raspon; 486 pg/ml, 117-1053 pg/ml) u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika (medijan, interkvartilni raspon; 302,5 pg/ml, 114,5-639,5 pg/ml) (Slika 5.11.). Tablica 5.2. prikazuje izmjerene koncentracije TSLP-a u serumu.

Tablica 5.2. Vrijednosti koncentracije TSLP-a (pg/ml) u serumu u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

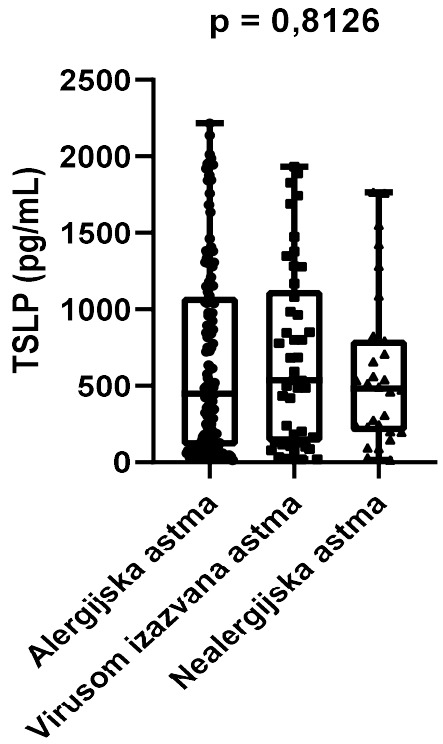
	N	Min.	Max.	Medijan	Aritmetička sredina	SD
Astma	207	14	2216	486	653	592,5
Kontrolna skupina	100	4	1514	302,5	391,7	334,4



Slika 5.11. Koncentracija TSLP-a u serumu djece oboljele od astme i u kontrolnoj skupini

5.4. Vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu u tri različita fenotipa astme (alergijska astma, astma inducirana virusnim infekcijama, nealergijska astma)

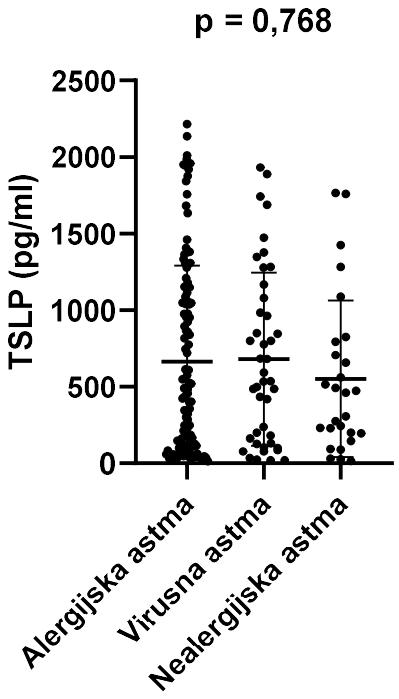
Ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,8126, Kruskal-Wallisov test) u koncentraciji TSLP-a u serumu između tri različita fenotipa astme; alergijske astme (medijan, interkvartilni raspon; 449,5 pg/ml, 104,8−1079 pg/ml), astme inducirane virusnim infekcijama (medijan, interkvartilni raspon; 536 pg/ml, 131−1124 pg/ml) i nealergijske astme (medijan, interkvartilni raspon; 482,5 pg/ml, 199,3−802 pg/ml) (Slika 5.12.).



Slika 5.12. Koncentracije TSLP-a u serumu u tri različita fenotipa astme: alergijska astma (N = 132), astma inducirana virusnim infekcijama (N = 45) i nealergijska astma (N = 30)

Također ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,7680, Kruskal-Wallisov test) u koncentraciji TSLP-a u serumu u djece s dobrom kontrolom astme prema ACT upitniku, između tri različita fenotipa astme: alergijska astma (medijan, interkvartilni raspon; 449,5 pg/ml, 102,8−1094 pg/ml), astme inducirane virusnim infekcijama (medijan, interkvartilni raspon;

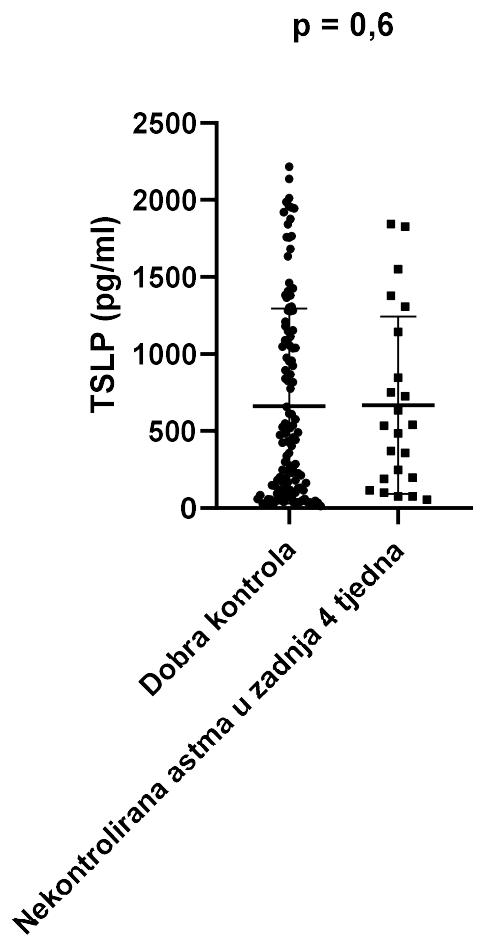
536 pg/ml, 133−1080 pg/ml) i nealergijske astme (medijan, interkvartilni raspon; 461 pg/ml, 197−794 pg/ml) (Slika 5.13.)



Slika 5.13. Koncentracije TSLP-a u serumu u djece s dobrom kontrolom astme ovisno o fenotipu astme: alergijska astma (N = 114), astma inducirana virusnim infekcijama (N = 43) i nealergijska astma (N = 27)

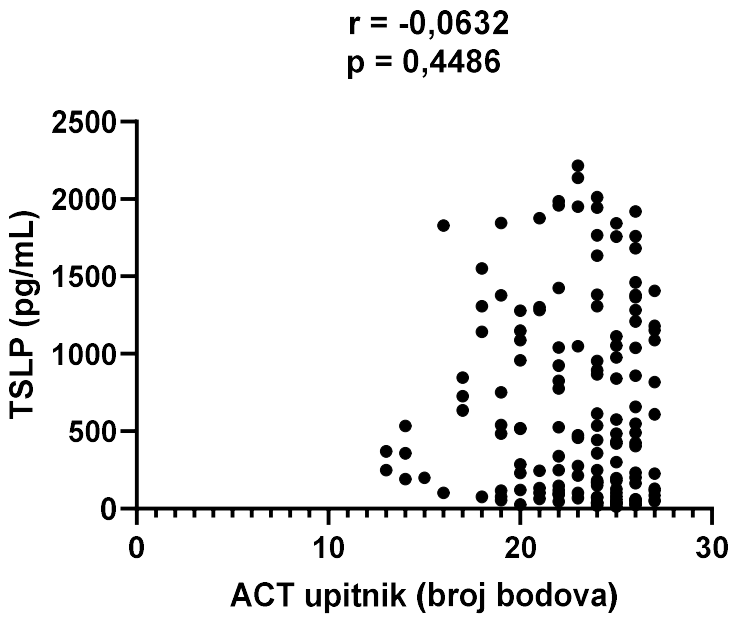
5.5. Povezanost koncentracije TSLP-a u serumu i kontrole astme na osnovi upitnika u djece starije od 4 godine

Ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,6055, Mann Whitney test) u koncentraciji TSLP-a u serumu između djece s dobro kontroliranom (medijan, interkvartilni raspon; 442 pg/ml, 116−1113 pg/ml) i nekontroliranom astmom u prethodna 4 tjedna na temelju podataka dobivenih ACT upitnikom u djece starije od 4 godine (medijan, interkvartilni raspon; 535 pg/ml, 190−1143 pg/ml) (Slika 5.14.).



Slika 5.14. Serumske koncentracije TSLP-a prema bodovnom zbroju ACT upitnika (N = 123, 23)

U 146 djece starije od 4 godine kod kojih je učinjen test kontrole astme nije nađena korelacija između koncentracije TSLP-a u serumu (Spearmanova korelacija; r = -0,0632, p = 0,4486; Slika 5.15.)



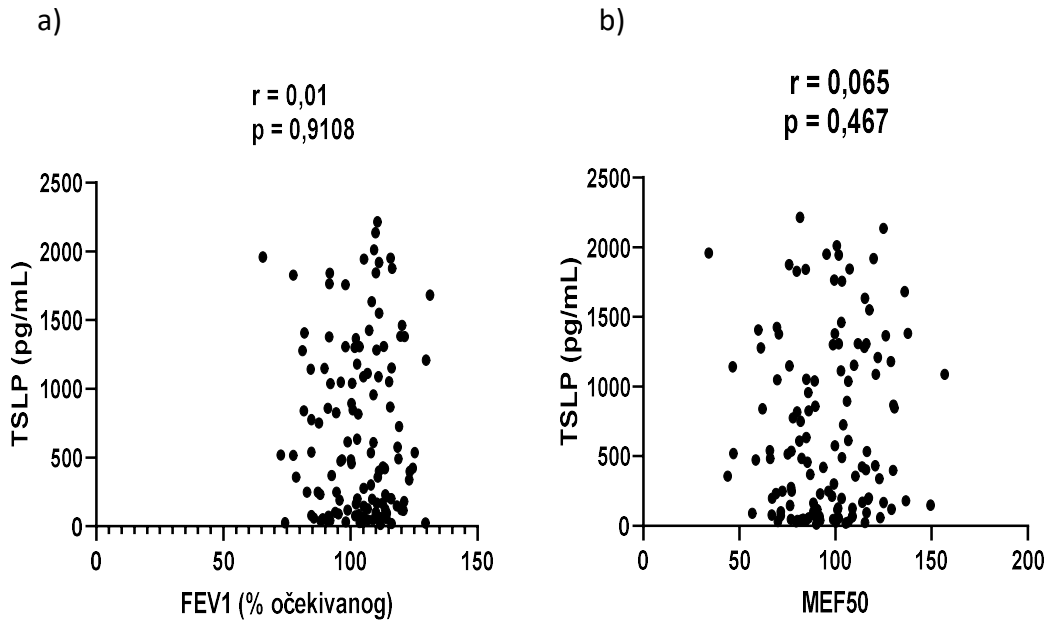
Slika 5.15. Korelacija koncentracije TSLP-a u serumu i testa kontrole astme (N = 146)

5.6. Povezanost koncentracije TSLP-a u serumu i testa plućne funkcije

Ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,932, Mann Whitney test) u koncentraciji TSLP-a u serumu između djece s urednom spirometrijom (medijan, interkvartilni raspon; 457 pg/ml, 117−1180 pg/ml) i opstruktivnim smetnjama ventilacije u spirometriji (medijan, interkvartilni raspon; 484 pg/ml, 124,5−1146 pg/ml).

Također ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,4962, Mann Whitney test) u koncentraciji TSLP-a u serumu između djece s negativnim (medijan, interkvartilni raspon; 513 pg/ml, 118,8−1303 pg/ml) i pozitivnim bronhoprovokacijskim testom salbutamolom u spirometriji (medijan, interkvartilni raspon; 419 pg/ml, 116−1053 pg/ml).

Nije nađena korelacija između koncentracije TSLP-a u serumu i FEV1 (Pearsonova korelacija; r = 0,01, p = 0,9108), niti između koncentracije TSLP i MEF50 (Pearsonova korelacija; r = 0,065, p = 0,467); Slika 5.16.



Slika 5.16. Korelacija koncentracije TSLP-a u serumu i plućne funkcije a) FEV1 % očekivanog, b) MEF50 % očekivanog; (N = 128)

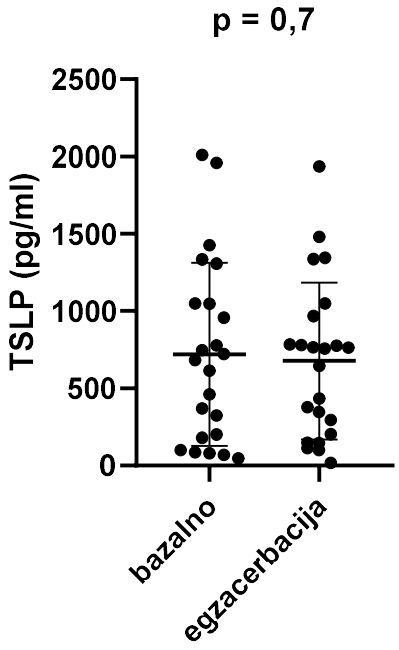
5.7. Vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme, te u iste djece u mirnoj (asimptomatskoj) fazi bolesti

U 25 ispitanika s astmom određen je TSLP u akutnoj egzacerbaciji astme, u njih 23 TSLP je određen i u mirnoj (asimptomatskoj) fazi bolesti, te su ti bolesnici uključeni u daljnje analize. Ispitanici su prikazani u Tablica 5.3. Nije bilo statistički značajne razlike između serumske koncentracije TSLP-a (p = 0,6785, t-test za povezane uzorke) u vrijeme egzacerbacije astme (aritmetička sredina, SD; 677,1 pg/ml, 507,4 pg/ml) u usporedbi s mirnom fazom bolesti naših ispitanika (aritmetička sredina, SD; 719,7 pg/ml, 591,2 pg/ml) (Slika 5.17.). Zatim smo analizirali koncentracije TSLP-a u asimptomatskoj fazi bolesti i u akutnoj egzacerbaciji astme za svakog ispitanika pojedinačno (Slika 5.18.), te promjene koncentracije TSLP-a između vrijednosti u asimptomatskoj fazi bolesti i u akutnoj egzacerbaciji izražene u postotku (Slika 5.19.).

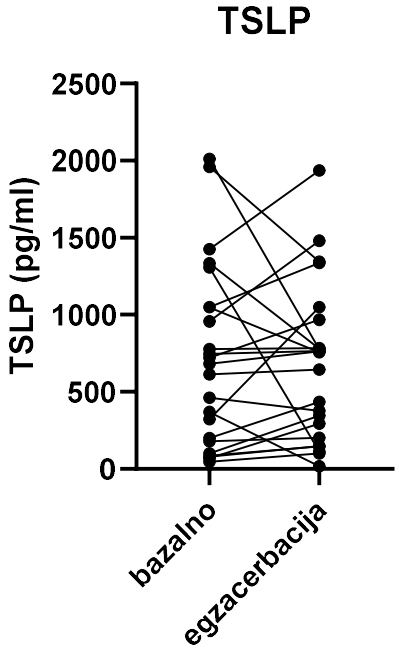
Tablica 5.3. Ispitanici kod kojih je učinjen uzorak seruma i u mirnoj fazi bolesti i u akutnoj egzacerbaciji astme

N	TSLP pg/ml asimptomatska faza	TSLP pg/ml egzacerbacija	Promjena TSLP-a u %	Fenotip astme	Uzrok egzacerbacije - klinički	PCR brisa NF
1	721	968	34,2%	1	1	0
2	46	101	121,1%	1	1	0
3	613	644	5,0%	1	1	Rinovirus
4	1050	1337	27,3%	1	1	0
5	1959	1345	-31,3%	1	1	0
6	80	149	86,7%	1	2	0
7	369	17	-95,5%	1	1	0
8	201	434	115,9%	2	2	Adenovirus, Rinovirus
9	324	1049	224,2%	1	3	0
10	958	1481	54,5%	1	1	0
11	87	146	67,4%	2	2	Koronavirus 229E/NL63, Rinovirus
12	1425	1936	35,8%	3	2	0
13	461	379	-17,9%	3	2	0
14	70	295	321,4%	1	1	negativan
15	180	204	13,3%	1	1	0
16	1334	780	-41,5%	1	2	Parainfluenca tip 2, RSV tip B, Rinovirus
17	682	764	12,0%	2	2	Rinovirus
18	778	785	0,9%	2	2	0
19	2012	777	-61,4%	1	1	0
20	1307	113	-91,4%	1	1	Rinovirus
21	747	766	2,5%	1	2	Adenovirus, Enterovirus
22	102	346	239,2%	2	2	negativan
23	1046	757	-27,6%	1	2	Rinovirus

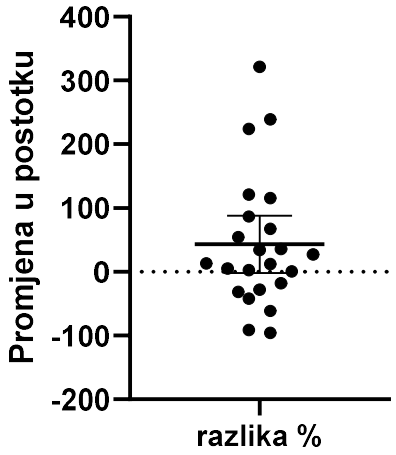
Legenda:
Fenotip astme: 1 − alergijska astma, 2 − astma izazvana virusnim infekcijama, 3 − nealergijska astma
Uzrok egzacerbacije - klinički: 1 − alergija, 2 – virus, 3 – alergija i virus
0 − nije učinjeno



Slika 5.17. Koncentracije TSLP-a u serumu u asimptomatskoj fazi bolesti i u akutnoj egzacerbaciji astme (N = 23)



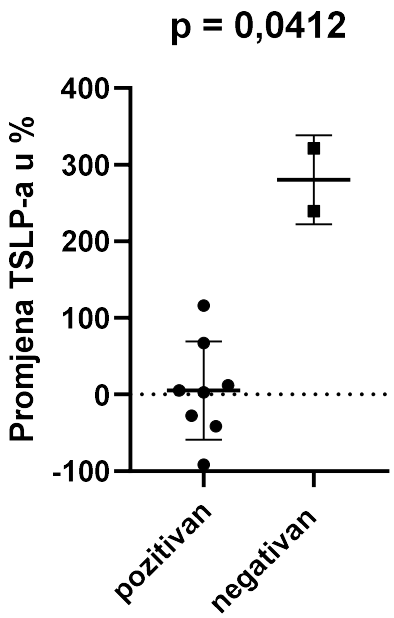
Slika 5.18. Serumske koncentracije TSLP-a u asimptomatskoj fazi bolesti i u akutnoj egzacerbaciji astme za svakog ispitanika pojedinačno (N = 23)



Slika 5.19. Promjena koncentracije TSLP-a između asimptomatske faze i akutne egzacerbacije astme izražene u postotku (N = 23)

5.7.1. Koncentracija TSLP-a u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme ovisno o PCR nalazu brisa NF na respiratorne viruse

U 10 ispitanika u akutnoj egzacerbaciji bolesti učinjen je i bris NF na petnaest respiratornih virusa multiplex PCR metodom (za detekciju slijedećih virusa: adenovirus, koronaviruse 229E/NL63 i OC43, viruse parainfluence tipa 1, 2, 3 i 4, viruse influence tipa A i tipa B, respiratorni sincicijski virus tipa A i tipa B, metapneumovirus, bokavirus, rinovirus i enterovirus). U 4 ispitanika iz brisa NF izoliran je jedan virus (rinovirus), koinfekcija dvama virusima nađena je u 3 ispitanika (adenovirus i rinovirus; adenovirus i enterovirus; koronavirus 229E/NL63 i rinovirus), u 1 ispitanika nađena je koinfekcija s tri virusa (parainflenca tip 2, RSV tip B i rinovirus), a u 2 ispitanika bris je bio negativan.



Slika 5.20. Promjena TSLP-a u postotku ovisno o nalazu PCR-a brisa NF na respiratorne viruse (N = 10)

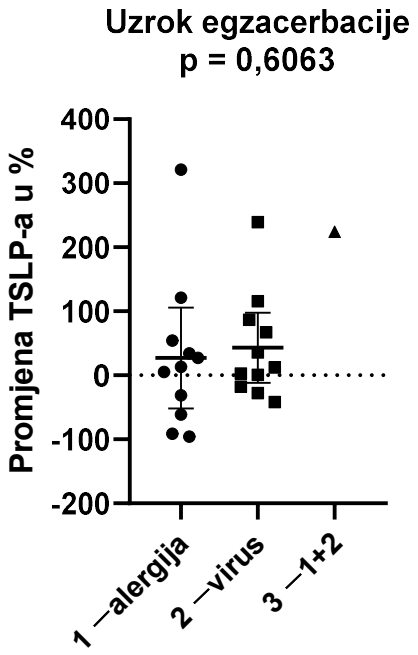
Nađena je statistički značajna promjena serumske koncentracije TSLP-a (p = 0,0412, Welchov t-test) u ispitanika s negativnim brisom NF (medijan, interkvartilni raspon; +280,3 %, +239 do 321,4 %) u usporedbi s pozitivnim PCR nalazom brisa NF na neki od respiratornih virusa (medijan, interkvartilni raspon; +3,78 %, -38,05 do 53,53 %) (Slika 5.20.).

5.7.2. Koncentracija TSLP-a u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme ovisno o predmnijevanome okidaču egzacerbacije

Ispitanici u akutnoj egzacerbaciji astme su potom na temelju anamneze i kliničke slike podijeljeni u tri skupine prema klinički predmnijevanome okidaču egzacerbacije (alergen, virus, oboje) (Tablica 5.4.). U trećoj skupini je bio samo jedan ispitanik pa on nije uključen u daljnju analizu. Nije bilo statistički značajne razlike između promjene serumske koncentracije TSLP-a (p = 0,6063, Mann Whitney test) kod alergenom (medijan, interkvartilni raspon; 13,3 %, -61,4 do 54,5 %) u usporedbi s virusom inducirane egzacerbacije bolesti (medijan, interkvartilni raspon; 12 %, -17,9 do 86,67 %) (Slika 5.21.).

Tablica 5.4. Promjene koncentracije TSLP-a u serumu, izražena u postotku, prema klinički predmnijevanome okidaču egzacerbacije

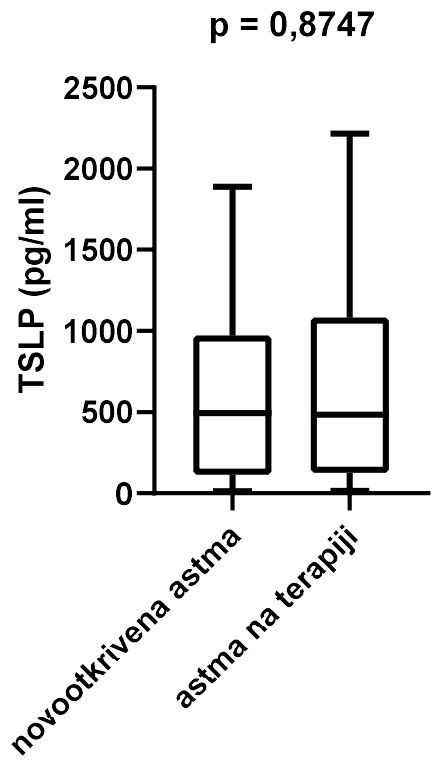
Uzrok egzacerbacije	alergija	virus	alergija i virus
broj ispitanika	11	11	1
Minimum	-95,52	-41,53	224,2
25%	-61,38	-17,91	224,2
Medijan	13,33	12,02	224,2
75%	54,49	86,67	224,2
Maximum	321,4	239,2	224,2



Slika 5.21. Promjene serumske koncentracije TSLP-a u postotcima ovisno o klinički predmnijevanom okidaču egzacerbacije (N = 23)

5.8. Koncentracije TSLP-a u serumu ispitanika s novootkrivenom astmom i ispitanika s prethodno postavljenom dijagnozom astme koja uzimaju protuupalnu terapiju

Ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,8747, Mann Whitney test) u koncentraciji TSLP-a u serumu između ispitanika s novootkrivenom astmom (koji nisu uzimali protuupalnu terapiju) (medijan, interkvartilni raspon; 495 pg/ml, 115,5−971,5 pg/ml) i ispitanika s prethodno postavljenom dijagnozom astme koja uzimaju protuupalnu terapiju duže od mjesec dana (ICS, LTRA, ICS+LTRA, ICS+LABA) (medijan, interkvartilni raspon; 485 pg/ml, 126−1082 pg/ml) (Slika 5.22.).



Slika 5.22. Koncentracija TSLP-a u serumu u ispitanika s novootkrivenom astmom (N = 45) i ispitanika s prethodno postavljenom dijagnozom astme (N = 162) koja uzimaju protuupalnu terapiju

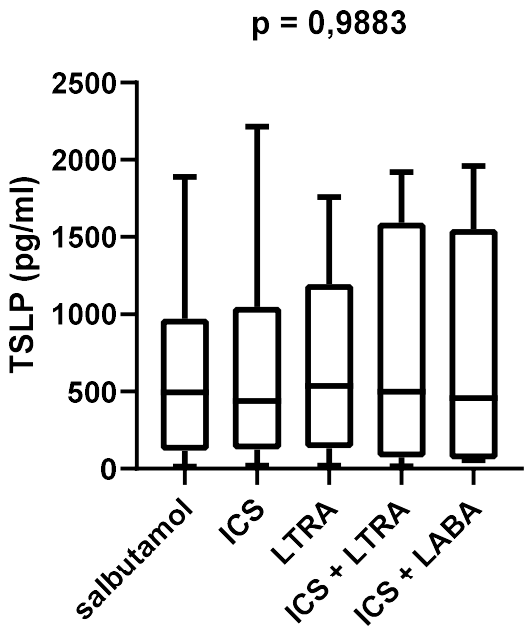
5.8.1. Koncentracije TSLP-a u serumu ispitanika s novootkrivenom astmom i ispitanika s prethodno postavljenom dijagnozom astme ovisno o terapiji

Ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,9883, Kruskal-Wallisov test) u koncentraciji TSLP-a u serumu između ispitanika na terapiji salbutamolom po potrebi, inhalacijskim kortikosteroidom (ICS), montelukastom (LTRA), na kombinacijskoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom i montelukastom (ICS + LTRA), na kombinacijskoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom i dugodjelujućim beta-2 agonistom (ICS + LABA) (Tablica 5.5., Slika 5.23.).

Tablica 5.5. Koncentracije TSLP-a u serumu ovisno o vrsti terapije (salbutamol po potrebi, ICS, LTRA, ICS + LTRA, ICS + LABA)

	salbutamol	ICS	LTRA	ICS + LTRA	ICS + LABA
Broj ispitanika	45	122	26	9	5
Minimum	14,00	20,00	19,00	15,00	55,00
Maximum	1888	2216	1760	1919	1959
Medijan	495,0	438,0	535,5	500,0	457,0
Interkvartilni raspon	115,5 − 971,5	125 − 1047	132 − 1196	73 − 1592	62,5 − 1551

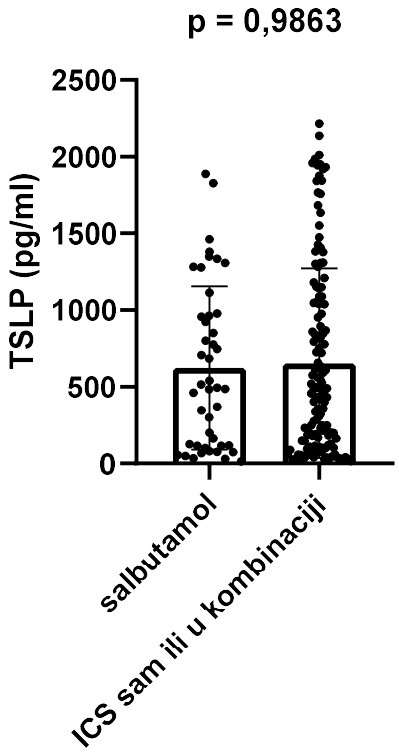
ICS – inhalacijski kortikosteroid, LTRA – montelukast, LABA - dugodjelujući beta-2 agonist



Slika 5.23. Koncentracije TSLP-a u serumu ovisno o terapiji (N = 207)

5.8.2. Koncentracije TSLP-a u serumu djece s novootkrivenom astmom i djece s prethodno postavljenom dijagnozom astme koja su uzimala kortikosteroidnu terapiju

Ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,9863, Mann Whitney test) u koncentraciji TSLP-a u serumu između djece s novootkrivenom astmom (medijan, interkvartilni raspon; 495 pg/ml, 115,5−971,5 pg/ml) i djece s prethodno postavljenom dijagnozom astme koja su uzimala kortikosteroidnu terapiju (inhalacijski kortikosteroid sam ili u kombinaciji s LTRA ili LABA) (medijan, interkvartilni raspon; 449,5 pg/ml, 117−1052 pg/ml) (Slika 5.24.).



Slika 5.24. Koncentracije TSLP-a u serumu ispitanika bez protuupalne terapije (N = 45) i ispitanika na terapiji inhalacijskim kortikosteroidom (N = 136)

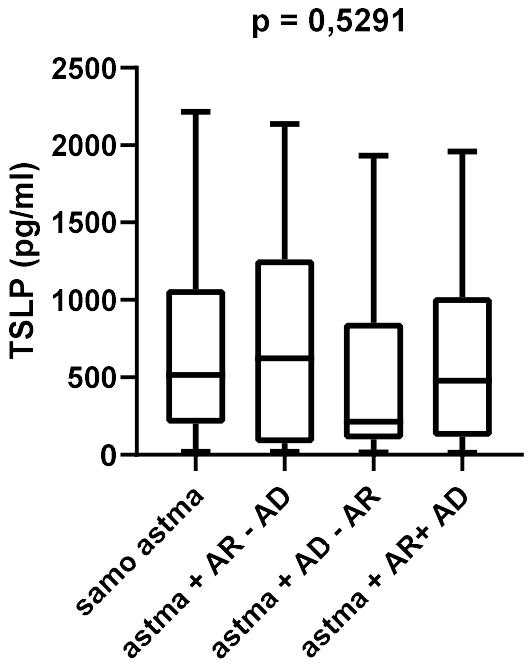
5.9. Vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu ovisno o pridruženim alergijskim bolestima

Ne postoji statistički značajna razlika (p = 0,5291, Kruskal-Wallisov test) u koncentraciji TSLP-a u serumu između ispitanika koji imaju astmu bez pridruženih atopijskih bolesti; koji imaju astmu i AR, a nemaju AD; koji imaju astmu i AD, a nemaju AR; i ispitanika koji imaju i astmu i AR i AD) (Tablica 5.6., Slika 5.25.).

Tablica 5.6. Koncentracija TSLP-a u serumu ispitanika ovisno o pridruženim atopijskim bolestima

	samo astma	astma + AR - AD	astma + AD - AR	astma + AR+ AD
Broj ispitanika	85	48	42	32
Minimum	19,00	20,00	15,00	14,00
Maksimum	2216	2136	1932	1959
Medijan	516,0	623,0	213,0	478,5
Interkvartilni raspon	200 − 1069	75,5 − 1262	102 − 852,3	117,8 − 1018

AR – alergijski rinitis, AD – atopijski dermatitis



Slika 5.25. Vrijednosti TSLP-a u ispitanika s astmom +/- AD +/- AR (N = 207)

5.10. Analiza TSLP-a

Zbog velike raspršenosti izmjerene vrijednosti TSLP-a (Tablica 5.2.), ispitanike oboljele od astme smo s obzirom na kvartile podijelili u tri skupine. Prvu kvartilnu skupinu (Q1) činili su ispitanici s rasponom TSLP između 14−116 pg/mL, drugu kvartilnu skupinu (Q2) 117−1053 pg/mL, a treću kvartilnu skupinu (Q3) s rasponom od 1054−2216 pg/mL.

Nismo našli statistički značajnu razliku između kvartilnih skupina ovisno o dobi (p = 0,3016, Kruskal-Wallisov test), spolu (p = 0,6938, Hi-kvadrat test), prethodnoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom (p = 0,9785, Hi-kvadrat test), stupnju kontrole astme prema ACT upitniku (p = 0,9191, Hi-kvadrat test), pozitivnom kožnom ubodnom testu na inhalacijske alergene (p = 0,3187, Hi-kvadrat test), kožnom ubodnom testu na *Dermatophagoides pteronyssinus* (p = 0,4895, Hi-kvadrat test), kožnom ubodnom testu na pelud trava (p = 0,4941, Hi-kvadrat test), kožnom ubodnom testu na pelud stabala (p = 0,1648, Hi-kvadrat test), kožnom ubodnom testu na ambroziju (p = 0,4774, Hi-kvadrat test). Ti rezultati nisu grafički prikazani.

Nije bilo statistički značajne razlike između kvartilnih skupina ovisno o tri različita fenotipa astme (p = 0,5967, Hi-kvadrat test), dokazanoj senzibilizaciji na barem jedan inhalacijski ili nutritivni alergen (p = 0,1750, Hi-kvadrat test), nalazu spirometrije FEV1 (p = 0,9030, Hi-kvadrat test), MEF50 (p = 0,8024, Hi-kvadrat test), bronhodilatacijskom testu salbutamolom (p = 0,5029, Hi-kvadrat test), vrijednosti NO u izdahnutom zraku (p = 0,3946, Kruskal-Wallisov test), obiteljskoj anamnezi na atopiju (p = 0,9436, Hi-kvadrat test), niti prema podatku o pušenju roditelja (p = 0,4122, Hi-kvadrat test). Ti rezultati nisu grafički prikazani.

Također nije bilo statistički značajne razlike između kvartilnih skupina ovisno o pridruženom alergijskom rinitisu (p = 0,5810, Hi-kvadrat test) ili atopijskom dermatitisu (p = 0,2310, Hi-kvadrat test). Ti rezultati nisu grafički prikazani.

Nije bilo statistički značajne razlike između kvartilnih skupina prema vrijednosti ukIgE (p = 0,8167, Kruskal-Wallisov test), ECP (p = 0,1623, Kruskal-Wallisov test), spIgE na *Dermatophagoides pteronyssinus* (p = 0,3594, Kruskal-Wallisov test), spIgE na ambroziju (p = 0,7477, Kruskal-Wallisov test), spIgE na pelud stabala (p = 0,5502, Kruskal-Wallisov test), spIgE na pelud trava (p = 0,8555, Kruskal-Wallisov test), spIgE na dlaku mačke (p = 0,5341, Kruskal-Wallisov test), spIgE na dlaku psa (p = 0,4312, Kruskal-Wallisov test), spIgE na kikiriki (p = 0,3405, Kruskal-Wallisov test), o vrijednosti leukocita (p = 0,0837, Kruskal-Wallisov test), neutrofila (p = 0,6031, ANOVA), kao ni o relativnom (p = 0,9895, Kruskal-Wallisov test) niti apsolutnom broju eozinofila (p = 0,7349, Kruskal-Wallisov test). Ti rezultati nisu grafički prikazani.

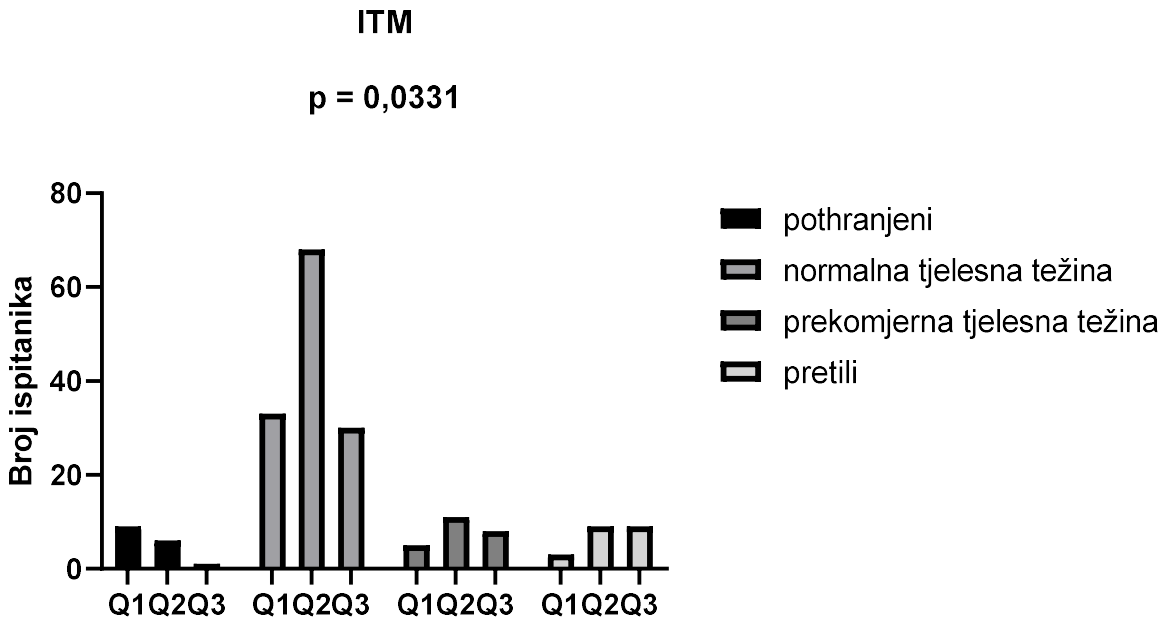
Nađena je statistički značajna razlike između kvartilnih skupina ovisno o uhranjenosti u djece nakon navršene 2 godine starosti (p = 0,0331, Hi-kvadrat test) (Tablica 5.7., Slika 5.26.).

U skupini djece s najvišim vrijednostima TSLP-a (Q3) bilo je značajno više djece prekomjerne tjelesne težine i pretilih.

Tablica 5.7. Raspodjela ispitanika starijih od dvije godine po kvartilnim skupinama ovisno o procijeni stanja uhranjenosti − normalna tjelesna težina (ITM između 5. − 85. centile), prekomjerna tjelesna težina (ITM između 85. − 95. centile), pretilost (ITM ≥ 95. centile), pothranjenost (ITM < 5. centile). (N = 192)

	pothranjeni	**normalne TT**	**prekomjerne TT**	**pretili**	**ukupno**
Q1	9 (18 %)	33 (66 %)	5 (10 %)	3 (6 %)	50
Q2	6 (6,38 %)	68 (72,34 %)	11 (11,7 %)	9 (9,57 %)	94
Q3	1 (2,08 %)	30 (62,5 %)	8 (16,67 %)	9 (18,75 %)	48
Ukupno	16 (8,3 %)	131 (68,2 %)	24 (12,5 %)	21 (10,9 %)	192

TT − tjelesna težina, ITM − indeks tjelesne mase



Slika 5.26. Raspodjela ispitanika po kvartilnim skupinama ovisno o procijeni stanja uhranjenosti. (N = 192)

Učinjen je i test korelacije između koncentracije TSLP u serumu i svih izmjerenih varijabli (dob izražena u godinama, dob izražena u mjesecima, tjelesna visina, tjelesna masa, zbroj bodova u ACT upitniku, ukIgE, ECP, spIgE na *D. pteronyssinus*, spIgE na ambroziju, spIgE na pelud stabala (joha, breza, lijeska, hrast, vrba), spIgE na pelud trava (klupčasta oštrica, livadna vlasulja, ljulj, livadna mačica, livadna vlasnjača), broj leukocita u krvi ($x10^9$/L), postotak eozinofilnih granulocita u krvi, postotak neutrofilnih granulocita u krvi, FeNO, parametre funkcije pluća (FVC %, FEV1 %, MEF50 %), promjene u bronhodilatacijskom testu salbutamolom (FEV1, MEF50)). Nije nađena korelacija između koncentracije TSLP-a u serumu i niti jedne mjerene varijable (vidi Tablica 5.8. i Tablica 5.9.), za sve mjerene korelacije koncentracije TSLP u serumu sa drugim varijablama izmjeren je $p > 0,05$.

Tablica 5.8. Pearsonov korelacijski koeficijent (r) za korelacije između mjerenih varijabli

	TSLP (pg/mL)
FVC %	0,01
FEV1 %	0,01
MEF50 %	0,06
Neutrofili u krvi (%)	-0,06

Tablica 5.9. Spearmanov korelacijski koeficijent (r) za korelacije između mjerenih varijabli

	TSLP (pg/mL)
Dob (god)	0,00
Dob (mjeseci)	-0,01
ACT upitnik	-0,06
Ventolinski test FEV1 +%	0,03
Ventolinski test MEF50 +%	0,03
FeNO	-0,02
Visina	0,02
Težina	0,04
ukIgE	-0,02
ECP	0,09
spIgE *D. pteronyssinus*	-0,05
spIgE ambrozija	-0,04
spIgE drveće	-0,05
spIgE trave	0,03
Leukociti u krvi (x10^9/L)	-0,07
Eozinofili u krvi (%)	0,01

6. RASPRAVA

Astma dječje dobi veliki je izazov za kliničare, kako zbog poteškoća pri postavljanju dijagnoze, tako i u pogledu prognoze i praćenja bolesti. U 21. stoljeću, heterogenost astme u djetinjstvu karakterizirana je s više različitih fenotipova i endotipova povezanih s različitim patofiziološkim putevima koji još nisu sasvim razjašnjeni. Bolje razumijevanje etiologije i mehanizma bolesti dovest će do optimalnijeg liječenja uključujući ciljano personalizirano liječenje.[371]

Upalni biomarker koji bi dao dodatne informacije o ovim nepoznanicama predstavljao bi ogromnu korist u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Međutim, još uvijek ne postoji optimalni upalni biomarker na temelju kojega se može postaviti dijagnoza, odrediti terapija ili procijeniti tijek bolesti. Mjerenje T2 upale u dječjoj astmi danas se postiže određivanjem razine ukupnog IgE, serumskog eozinofilnog kationskog proteina, eozinofila u krvi, te razine NO u izdahnutom zraku. To nam može pomoći u postavljanju dijagnoze astme, osobito u dojenčadi i male djece kod kojih je testove plućne funkcije teško izvesti.[372] Kombinacija biomarkera za atopiju, poput senzibilizacije na alergene mjerene kožnim ubodnim testom i/ili specifičnim IgE, ukupnim IgE, FeNO i eozinofilijom u krvi povezuje se s rizikom razvoja astme u školskoj dobi.[313, 373] Ti markeri mogu biti i korisni markeri težine astme dječje dobi. Prema pregledu literature, svi do sada poznati biomarkeri su ograničenog ili za sada još nejasnog značenja za postavljanje dijagnoze astme u djece. Izolirano mjerenje jednog biomarkera u tom smislu nije dovoljno. Kombinacija tih biomarkera, zajedno s dobrom anamnezom i testovima plućne funkcije, poboljšava dijagnozu, određivanje fenotipa i praćenje djeteta s astmom. Publikacije o dječjoj astmi pokazuju kontroverzne rezultate. Do danas ne postoji definitivni biomarker koji bi olakšao prepoznavanje djece s visokorizičnim fenotipovima koja će kasnije razviti tešku trajnu astmu.[374]

Astma je upalna bolest dišnih putova posredovana pomagačkim T2 stanicama. Brojna istraživanja ispituju ulogu TSLP kao glavnog regulatora imunosnog odgovora tipa 2. TSLP proizveden od strane epitelnih stanica površinskih barijera, kao što su koža, pluća i crijeva, aktivira TSLP receptor koji eksprimiraju dendritske stanice, te pokreće imunosni odgovor posredovan T2 stanicama.[375] Odnedavno se TSLP drži ključnim citokinom koji pokreće dendritski imunosni odgovor posredovan T2 stanicama.[41]

Unatoč do sada objavljenim istraživanjima, još uvijek je relativno malo podataka o koncentraciji TSLP-a u serumu pacijenata s astmom u kliničkim uvjetima, osobito u dječjoj dobi, nepoznato je kako je ekspresija TSLP povezana s drugim biomarkerima astme, s težinom bolesti ili fenotipom astme. Također nije poznat ni njegov klinički značaj. Ovim istraživanjem pokušali smo donekle odgovoriti na neka od tih pitanja.

Definiciju i dijagnozu astme preporučio je Međunarodni sporazum o dijagnosticiranju i liječenju astme, GINA, čijih smjernica smo se pridržavali u ovom istraživanju. Poznato je da se astma u dječjoj dobi prezentira različitim kliničkim slikama i tipovima upale te da odgovor na terapiju nije jednak u svih bolesnika. Prema smjernicama, tri ili više reverzibilne bronhoopstrukcije tijekom šest mjeseci mogu se smatrati astmom,[187] no, prema nekim autorima, sigurnu dijagnozu astme moguće je postaviti tek nakon navršene 5. godine života kada su dostupne objektivne metode definiranja bolesti.[188]

U naše je istraživanje uključeno 207 djece s astmom, a kontrolnu skupinu čini 100 zdrave djece. Analiza rezultata ovog istraživanja pokazala je više dječaka (64%) među djecom s astmom, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima koji pokazuju veću prevalenciju astme kod dječaka u prvom desetljeću života. Veća učestalost astme kod dječaka djelomično je posljedica manjeg promjera dišnih putova u odnosu na veličinu pluća u usporedbi s djevojčicama, te češće atopije u dječaka. Poslije puberteta ove razlike se gube, te je učestalost astme nakon puberteta jednaka kod muškog i ženskog spola sve do 40. godine, a nakon toga učestalost je veća u žena.[185, 376]

Dodatnom analizom koncentracije TSLP-a u našem istraživanju, nije pronađena razliku u koncentraciji TSLP-a između kvartilnih skupina ovisno o dobi ($p = 0,3$), niti je pronađena korelacija između koncentracije TSLP-a u serumu i dobi izražene u godinama ($r = -0,0008$) ili mjesecima ($r = -0,0078$). Prema dostupnim podacima iz literature ne opisuju se razlike u koncentraciji TSLP-a ovisno o dobi.[79, 129]

U grupi naših bolesnika, preosjetljivost na barem jedan testirani alergen zabilježena je u 64% ispitanika. Najčešći pozitivan inhalacijski alergen je grinja (*Dermatophagoides pteronyssinus*). Na drugom mjestu po učestalosti kod naših ispitanika slijedi pelud trava. Zanimljivo, u kožnom ubodnom testiranju potom slijedi pelud stabala i ambrozije, dok prema nalazu specifičnog IgE slijede ambrozija pa pelud stabala.

I druge studije u kojim je analizirana senzibilizacija na inhalacijske alergene kod djece s astmom pokazale su da su djeca s astmom najčešće senzibilizirana na grinje. Preosjetljivost na druge inhalacijske alergene bila je slična našim rezultatima ispitivanja, a određena odstupanja u pogledu zastupljenosti mogu se najvećim dijelom objasniti razlikama u pogledu klimatskih zona u kojima su ispitivanja vršena.[377]

Pozitivna obiteljska anamneza za astmu i druge alergijske bolesti rizični je faktor za astmu i perzistentnu sipnju u djece koja u predškolskoj dobi imaju ponavljajuće epizode sipnje.

Analiza obiteljske anamneze ispitanika u našem istraživanju pokazuje visok postotak pozitivne obiteljske anamneze na atopiju. Čak 78,3 % ispitanika imalo je pozitivnu obiteljsku anamnezu na atopiju (astma, alergijski rinitis, atopijski dermatitis i/ili alergija na lijekove), dok je 60,5 % ispitanika imalo pozitivnu obiteljsku anamnezu na astmu, 31,5 % na alergijski rinitis, 6,8 % na atopijski dermatitis, a 1,2 % na alergiju na lijekove.

6.1. Koncentracije TSLP-a u serumu u mirnoj (asimptomatskoj) fazi bolesti

Teorijska, potencijalna uloga TSLP-a, citokina epitelnog podrijetla, u regulaciji protoka zraka u dišnim putovima i u pokretanju i podržavanju upale T2 tipa kod astme *in vivo* sugerirana je u brojnim dosadašnjim studijama na životinjskim modelima i kod ljudi; no, nije nam poznato niti jedno sustavno proučavanja njihove ekspresije paralelno u serumu djece koja boluju od astme u "stvarnom životu".

U našem istraživanju analizirali smo vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu relativno velike kohorte djece uzrasta od 1 do 13 godina s astmom, različite težine bolesti i na različitoj terapiji, te u kontrolnoj skupini zdrave djece. U svih ispitanika nađena je detektabilna razina TSLP-a u serumu. Istraživanje je pokazalo statistički značajno veću koncentraciju TSLP-a u serumu djece s astmom u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom ($p < 0,005$, Slika 5.11.).

Slične rezultate, ali na stanicama bronhalnog epitela i submukoze prvi su prikazali Ying i suradnici, koji su našli povećane razine TSLP-a u bronhalnim epitelnim stanicama odraslih astmatičara.[27] Li i suradnici također su našli značajno povišene koncentracije TSLP-a, IL-33, IL-4, IL-5, IL-13 i IL-12p70 u bronhoalveolarnom lavatu astmatičara.[67] U istraživanju Berraiesa i suradnika sva djeca s astmom su imala značajno više vrijednosti TSLP-a u induciranom sputumu i serumu u usporedbi sa zdravim kontrolama. U tom istraživanju nije bilo statistički

značajne razlike u ekspresiji TSLP mRNA između blage i srednje teške astme (p = 0,2), a ekspresija TSLP mRNA u astmatičara je obrnuto korelirala s FEV1. Povećana razina TSLP-a i TNF-α opažena u induciranom sputumu korelirala je s težinom bolesti.[101]

Do sada objavljena istraživanja uloge serumskog TSLP u djece s astmom pokazala su neujednačene rezultate. Rezultate slične našima prikazali su i Chauhan i suradnici. U njihovom istraživanju, djeca s astmom imala su višu koncentraciju TSLP-a i IL-33 u plazmi u usporedbi s kontrolnom skupinom. Chauhan i suradnici su izvijestili o postojanju slabe negativne korelacije između koncentracije TSLP-a i testa kontrole astme ($r = -0.14$, $p > 0.05$), te broja regulacijskih T limfocita ($r = -0.23$, $p = 0.07$), no ta korelacija nije statistički značajna.[154]

Suprotno rezultatima našega i prethodno opisanih istraživanja, Koussih i suradnici nisu našli statistički značajnu razliku u koncentraciji TSLP-a u serumu između djece oboljele od astme i zdravih kontrola. U tom istraživanju, kao i u našem, koncentracija TSLP-a u serumu nije bila značajno viša u oboljelih od astme s alergijom u usporedbi s astmatičarima bez alergije, također nije nađena povezanost između serumske koncentracije TSLP-a i kliničkih parametara kontrole astme (FEV1), kao niti povezanost između serumske koncentracije TSLP-a i broja pozitivnih alergena u djece s alergijskom astmom.[157]

Demehri i suradnici su u prospektivnoj kohortnoj URECA studiji pratili 236 djece od rođenja do treće godine života, mjeren je serumski TSLP u trenutku poroda (krv iz pupkovine), te potom u 1., 2. i 3. godini života. Ni u jednom uzorku krvi pupkovine nije detektirana mjerljiva razina TSLP-a. Rezultati istraživanja su pokazali da detektabilni serumski TSLP nije značajno povezan s atopijskim dermatitisom, senzibilizacijom na alergene, niti ponavljajućom sipnjom tijekom prve tri godine života. U toj studiji ponavljajuća sipnja je definirana s najmanje dvije epizode sipnje u prve tri godine života od kojih je najmanje jedna epizoda u trećoj godini života, a važno je i napomenuti da u istraživanju nije mjerena koncentracija nego samo prisutnost ili odsustnost serumskog TSLP-a. Prisustnost serumskog TSLP u dobi od godine dana bilo je povezano sa smanjenom učestalošću sipnje u dobi od 3 godine ($p < 0,01$) u djece koja nisu senzibilizirana na inhalacijske alergene. Autori smatraju da ti rezultati ukazuju na moguće razlike u patogenezi atopijske i neatopijske sipnje, te ostavljaju otvoreno pitanje uloge prolazno povišenih vrijednosti TSLP-a tijekom izlaganja alergenima s mogućom ulogom u razvoju atopijskog marša. Također je interesantno da u toj kohorti nije bilo značajne povezanosti između atopijskog dermatitisa i ponavljajuće sipnje. Autori su ostavili otvoreno

pitanje mogućeg javljanja pozitivne korelacije između razine TSLP u plazmi i astme u kasnijem životu.[155]

6.1.1. Koncentracije TSLP-a u serumu u tri različita fenotipa astme (alergijska astma, astma inducirana virusnim infekcijama, nealergijska astma)

U našem istraživanju nije bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u koncentraciji TSLP-a u serumu između tri različita fenotipa astme (alergijske astme, astme inducirane virusnim infekcijama i nealergijske astme), kako ni između svih bolesnika s astmom (Slika 5.12.) tako ni među onima s dobrom kontrolom bolesti (Slika 5.13.).

U ovom istraživanju podjela kliničkog fenotipa, preuzeta je iz smjernica PRACTALL,[189] te su djeca s astmom prema smjernicama podijeljena u fenotipove: 132 (63,8 %) djece klasificirano je kao alergijska astma, 45 (21,7 %) djece kao astma potaknuta virusnim infekcijama i 30 (14,5 %) djece kao nealergijska astma.

Ponavljajuća sipnja u predškolskoj dobi najčešće se klasificira prema okidačima. Razlikujemo virusima potaknutu sipnju (ukoliko su virusne infekcije jedini okidač) ili sipnju potaknutu mnogostrukim okidačima (ako se simptomi javljaju i izvan virusnih infekcija).[188] Virusima potaknuta sipnja češća je u djece predškolske dobi i posljedica je intermitentne opstrukcije dišnih putova u bolesnika s prethodno urednom plućnom funkcijom i bez simptoma između perioda sipnje. U školskoj dobi sipnja je najčešće potaknuta mnogostrukim okidačima, povezana je s alergijom, često je pozitivna obiteljska atopijska anamneza, a simptomi se javljaju i između perioda pogoršanja. Identifikacija fenotipova ključna je za postavljanje dijagnoze, primjenu terapije, te pomaže u razjašnjenju mehanizama bolest.[187, 188] Međutim, virusima potaknuta epizodična sipnja može se s vremenom razviti u sipnju potaknutu višestrukim okidačima i obrnuto.[270] Do promjene fenotipa tijekom vremena dolazi u čak 55 % djece.[274, 275]

Fenotipovi astme mogu se dijeliti i prema tipu upale. Eozinofilna upala dišnih putova najčešći je tip prisutan u djetinjstvu.[279] Atopija je prisutna u 50 – 60 % odraslih i djece s astmom,[280] češća je u teškoj astmi kod djece.[281] Alergijski mehanizmi ne moraju biti jedini i/ili odlučujući podležeći čimbenici za razvoj astme. Neeozinofilnu astmu povezanu s neutrofilnom upalom nalazimo ne samo u bolesnika s teškom astmom, već i kod onih s umjerenom i blagom

astmom. Okidači ovakve upale u dišnim putovima mogu biti različiti, kao npr. bakterijski endotoksini, onečišćenje zraka, ozon, infekcije virusima i gljivama.[279]

Novija podjela kliničkog fenotipa astme ovisno o tipu temeljne upale dišnih putova razlikuje T2 visoku i T2 nisku astmu. Imunosni odgovor tip 2 uključuje Th2 stanice, B stanice koje stvaraju IgE, ILC2 i malu frakciju IL-4 stvarajućih NK i NKT stanica, bazofila, eozinofila, mastocita i njihovih citokina. Postoji složena mreža između citokina tipa 2 (IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13) koje uglavnom izlučuju stanice imunosnog tipa 2 i alarmina (TSLP, IL-33 i IL-25) koje oslobađaju stanice tkiva, uglavnom epitelne stanice kao odgovor na široki raspon okolišnih podražaja. Sljedeći alergijsku senzibilizaciju i posljedičnu stimulaciju dendritskih stanica u prisutnosti koaktivatora kao što je TSLP podrijetla epitela, Th2 stanice stvaraju IL-5, IL-4 i IL-13.[291-293]

U nealergijskoj eozinofilnoj astmi, prirođene limfoidne stanice stvaraju IL-5 i IL-13 kao odgovor na prostaglandin D2 i alarmine podrijetla epitela (IL-33, IL-25 i TSLP).

Gledano u cjelini, različite stanice koje mogu stvarati ili odgovoriti na TSLP pokazuju važnu ulogu ovog citokina u orkestriranju početnog odgovora na ozljedu epitela. Iako je normalna funkcija TSLP-a vjerojatno održavanje homeostaze tipa T2 na površinskim barijerama, disregulirana ekspresija TSLP-a može rezultirati razvojem upalnih reakcija tipa 2 što dovodi do alergijskih bolesti.[72]

U studiji Lina i suradnika značajno više serumske koncentracije TSLP nađene su u djece u akutnoj egzacerbaciji astme u usporedbi sa zdravom djecom, dok vrijednosti TSLP u djece s astmom, ali bez alergije nisu bile statistički značajno više u usporedbi sa zdravom djecom. Također, u tom istraživanju nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji TSLP-a u serumu između sljedećih skupina djece: zdravi (bez alergije i bez astme) vs. alergija bez astme, alergija bez astme vs. astma s alergijom, zdravi vs. astma bez alergije, alergije bez astme vs. astma bez alergije i astma bez alergije vs. astma s alergijom.[156] Liu i suradnici također nisu našli razlike u koncentraciji TSLP-a između oboljelih od astme s alergijom i bez alergije.[67]

Kada uzmemo u obzir rezultate našeg i dosadašnjih istraživanja drugih autora, dolazimo do pretpostavke o mogućem ekvivalentnom, nespecifičnom TSLP odgovoru bez obzira na okidač astme.

6.1.2. Povezanost koncentracije TSLP-a u serumu i kontrole astme

Nismo našli statistički značajnu povezanost između koncentracije TSLP u serumu i kontrole astme na osnovu upitnika u djece starije od 4 godine (p = 0,6). Nađena je neznatna negativna korelacija između koncentracije TSLP-a u serumu i broja bodova u testu kontrole astme (Spearmanova korelacija; r = -0,0632, p = 0,4486).

Smjernice za liječenje astme predlažu brojne objektivne metode za procjenu kontrole bolesti no u svakodnevnoj praksi najčešće se upotrebljavaju standardizirani upitnici, upitnici kvalitete života, spirometrijska mjerenja i mjerenje izdahnutog NO-a. Kombinacija objektivnih pokazatelja kontrole bolesti razlikuje se od smjernica do smjernica, a primijećeno je i često neslaganje između pojedinih parametara kontrole bolesti.[378] U dječjoj dobi dobivanje objektivnih mjerenja uvelike otežava i specifičnost same populacije (lošija suradnja bolesnika pri izvođenju pretraga, te invazivnost pretraga kao značajni etički problem). Astma je kronična upalna bolest te se danas smatra da je praćenje upalnih zbivanja u dišnim putovima presudno za procjenu kontrole i liječenje astme. Tradicionalni pokazatelji kontrole astme (simptomi i spirometrija) slabo odražavaju upalna zbivanja u ciljnom organu[187, 379] zbog čega znanstvenici intenzivno tragaju za novim idealnim biomarkerom lokalne upale u dišnim putovima koji bi zadovoljio sve karakteristike idealnog pokazatelja kontrole bolesti u specifičnoj populaciji: visoka osjetljivost, specifičnost i dijagnostička točnost, potreba za minimalnom suradnjom bolesnika, minimalna invazivnost, minimalni rizik komplikacija, ponovljivost, niska interferencija s egzogenim i endogenim čimbenicima, te niski troškovi.[380] Usprkos intenzivnom traganju za idealnim biomarkerom lokalne upale u dišnim putovima, idealan pokazatelj kontrole astme u djece još nije identificiran. Na kontrolnim pregledima, za brzu procjenu kontrole simptoma astme najčešće se koristi standardizirani upitnik – Upitnik o kontroli astme za dječju ili odraslu dob.[359]

U našem istraživanju, ispitanici stariji od 4 godine, zajedno s roditeljima, ispunili su Upitnik o kontroli astme za djecu (Childhood Asthma Control Test, C-ACT), kako bi se utvrdio stupanj kontrole astme. C-ACT se sastoji od sedam pitanja (učestalost simptoma izazvanih tjelesnom aktivnošću, učestalost kašlja i noćnih simptoma) od kojih na prva četiri odgovara dijete, a na zadnja tri odgovara roditelj. Mogući zbroj bodova je od 0 do 27, a zbroj manji od 20 ukazuje na nekontroliranu astmu u prethodna 4 tjedna.[359, 366] Prema rezultatima C-ACT-a,

nekontroliranu astmu u prethodna 4 tjedna u našem istraživanju imalo je 23 (15,8 %) od 146 ispitanika.

Rezultati našeg istraživanja potvrđuju hipotezu da je serumska koncentracija TSLP-a u djece oboljele od astme veća od koncentracije TSLP-a u zdrave populacije. Međutim nije potvrđena pretpostavka da postoji razlika u koncentraciji TSLP-a među različitim fenotipovima astme u djece, niti je nađena statistički značajna povezanost koncentracije TSLP-a u serumu i broja bodova u testu kontrole astme.

Proučavajući rezultate dostupnih istraživanja, nameće se pitanje, postoji li razlika, te kakva je korelacija između koncentracije TSLP-a u serumu i u bronhalnom stablu. U tri istraživanja na odraslim ispitanicima, mjerene su koncentracije u istih ispitanika u serumu i lokalne koncentracije u dišnom putu (kondenzat izdaha, odnosno sputum). Istraživanja Glücka i suradnika pokazalo je da oboljeli od astme imaju značajno više vrijednosti TSLP-a u kondenzatu izdaha nego zdrava skupina. U tom istraživanju nije nađena korelacija između koncentracije TSLP u kondenzatu izdaha i koncentracije u serumu. Također, kao ni u našem istraživanju, nije nađena korelacija između serumske koncentracije TSLP-a i FEV1 ili ukupnog IgE. Na osnovu tih rezultata, Glück i suradnici su došli do zaključka kako koncentracija TSLP-a u kondenzatu izdaha nije u korelaciji s koncentracijom u serumu, a to sugerira da je lokalna epitelna reakcija neovisna o sistemskoj reakciji.[381]

Uspoređujući izmjerene koncentracije TSLP-a u serumu u našem i u drugim istraživanjima, uočili smo velike razlike između izmjerenih vrijednosti. Razlog za to mogu biti različiti komercijalni ELISA kitovi koji je korišteni u različitim istraživanjima. Górska i suradnici su usporedili koncentracije TSLP-a izmjerene s dva različita ELISA kita u serumu, induciranom sputumu i izdahnutom kondenzatu daha kod odraslih bolesnika s astmom, KOPB-om i u kontrolnoj skupini, te su zaključili da koncentracija TSLP-a jako ovisi o ELISA kitu korištenom za mjerenje. Usporedba rezultata dobivenih različitim testovima može dovesti do pogrešnih zaključaka. Autori tog istraživanja, također su zaključili da se koncentracija TSLP-a u sputumu čini pouzdanijim procjeniteljem astme nego koncentracija TSLP-a u serumu.[382] U recentnom istraživanju iste skupine autora izmjerene koncentracije TSLP-a u serumu bile su dvostruko više od vrijednosti izmjerenih u sputumu. Iako su apsolutne koncentracije TSLP-a bile veće u bolesnika s astmom u usporedbi s kontrolnom skupinom, nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji TSLP-a u serumu između bolesnika s astmom i zdravih kontrola.

Nasuprot tome, statistički značajno više razine TSLP-a izmjerene su u sputumu astmatičara u usporedbi s zdravim kontrolama. Također je zanimljivo da u tom istraživanju u kontrolnoj skupini nije bilo detektabilne koncentracije TSLP-a u sputumu, za razlike od razine u serumu, i ekspresije TSLP mRNA u sputumu.[383]

Značajno više vrijednosti TSLP-a u serumu ispitanika s astmom u našem istraživanju u odnosu na zdrave ispitanike u skladu je s prethodno iznesenim stavovima i potvrđuju proupalni utjecaj TSLP-a u Th2 posredovanoj upali vjerojatno putem uloge alarmina.

Ako uzmemo u obzir prethodno navedeno, ostaje otvoreno pitanje važnosti mjerenja TSLP-a u sputumu, te o mogućoj ulozi koncentracije TSLP-a u sputumu kao potencijalnog biomarkera astme.

6.1.3. Koncentracija TSLP-a u serumu i protuupalna terapija

Pregledom dostupne literature nisu zabilježena istraživanja utjecaja ICS-a, a ni ostalih osnovnih lijekova za kontrolu astme na koncentracije TSLP-a u serumu.

U našem istraživanju 45 (21,7 %) ispitanika s astmom bilo je na terapiji salbutamolom po potrebi, 122 (58,9 %) ispitanika je bilo na terapiji inhalacijskim kortikosteroidom (ICS), 26 (12,6 %) na terapiji montelukastom (LTRA), 9 (4,4 %) na kombinacijskoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom i montelukastom (ICS + LTRA), 5 (2,4 %) ispitanika bilo je na kombinacijskoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom i dugodjelujućim beta-2 agonistom (ICS + LABA). Nije bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u koncentraciji TSLP-a u serumu djece ovisno o vrsti terapije, niti je bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u koncentraciji TSLP-a u serumu između ispitanika koji nisu uzimali protuupalnu terapiju i ispitanika na protuupalnoj terapiji. Također nije bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u koncentraciji TSLP-a u serumu između djece s novootkrivenom astmom i djece s prethodno postavljenom dijagnozom astme koja su uzimala kontinuiranu kortikosteroidnu terapiju (inhalacijski kortikosteroid sam ili u kombinaciji s LTRA ili LABA) u periodu dužem od mjesec dana.

Inhalacijski kortikosteroidi su danas lijek prvog izbora u liječenju svih fenotipova astme i predstavljaju nesumnjivo najefikasniji lijek za kontrolu simptoma, smanjenje upale dišnog puta, poboljšanje kvalitete života, plućne funkcije i smanjenja hiperreaktivnosti bronhalnog stabla. Smanjenje upale dovodi do smanjenja simptoma astme. Navedene učinke ostvaruju na

različite načine, ICS djeluje na staničnu komponentu upale tako što suprimira stvaranje kemotaktičnih medijatora i adhezijskih molekula, smanjuje stvaranje brojnih citokina i kemokina. Odnos i utjecaj ICS-a na TSLP nije razjašnjen. Dosadašnja ispitivanja na kulturama stanica su ukazala na ulogu TSLP-a u nastanku kortikosteroidne rezistencije. Naime, ispitivanje provedeno od Kabate i suradnika ukazuju da jedan od potencijalnih mehanizama kortikosteroidne rezistencije koji se može javiti kod T2 posredovane upale dišnih putova može nastati uslijed utjecaja TSLP-a na ILC2, u kojoj TSLP aktivira anti-apoptotičku molekulu Bcl-xL putem STAT5 puta.[68]

Iz rezultata našeg istraživanja možemo zaključiti da serumska koncentracija TSLP-a ne ovisi o uzimanju terapije, niti ovisi o vrsti osnovne terapije koju bolesnik s astmom uzima. Također možemo zaključiti da kontinuirana terapija ICS-om ne utječe na koncentraciju TSLP-a u serumu, jer nema statistički značajne razlike u koncentraciji TSLP između ispitanika na terapiji salbutamolom i ispitanika na terapiji ICS-om (sam ili u kombinaciji s LTRA ili LABA). Indirektno iz naših rezulatata se može zaključiti da koncentracija TSLP-a u serumu ne ovisi o težini bolesti, jer djeca na kombiniranoj terapiji, koja se primijenjuje kao stupanj više kod loše kontrole bolesti, nisu imala više vrijednosti TSLP-a od djece bez terapije ili one koja uzimaju monoterapiju.

Naše zapažanje je kompatibilno s rezultatima Lia i suradnika, koji su zaključili da je stvaranje IL-33 i TSLP relativno neosjetljivo na inhibiciju kortikosteroidima u astmi u usporedbi s onim nizvodnih citokina tipa Th2 IL-4, IL-5 i IL-13, odnosno da ICS i oralni kortikosteroidi ne inhibiraju alarmine. U tom istraživanju koncentracija TSLP-a je mjerena u BAL-u. [79]

6.1.4. Astma i komorbiditeti

U našem istraživanju je analizirana pojava alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa u djece s astmom. Pridružene simptome alergijskog rinitisa tijekom djetinjstva od ukupnog broja ispitanika s astmom imalo je 80 (38,7%) ispitanika. Atopijski dermatitis tijekom djetinjstva imalo je 74 (35,8 %) ispitanika, od čega 68 (32,9 %) ispitanika u ranijem djetinjstvu, a recidive atopijskog dermatitisa u posljednjih 12 mjeseci imalo je 6 (2,9 %) ispitanika. Simptome astme, alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa tijekom djetinjstva imalo je 32 (15,5 %) ispitanika, što ukazuje na zajednički patofiziolološki proces u djece s atopijom.

Istraživanja provedena na velikom broju bolesnika pokazuju da je atopijski dermatitisi u dojenačkom periodu prisutan kod 9,1 % oboljelih od alergijske astme. Podaci iz literature potvrđuju da je atopijski dermatitis u dojenačkoj dobi rizični čimbenik za nastanak alergijske astme u kasnijem djetinjstvu, što je u skladu s hipotezom atopijskog marša.[384]

Kod naših ispitanika koji imaju astmu bez pridruženih atopijskih bolesti i onih koji imaju astmu i AR, a nemaju AD; koji imaju astmu i AD, a nemaju AR; i ispitanika koji imaju i astmu i AR i AD, nismo našli statistički značajnu razliku ($p = 0,5291$) u koncentraciji TSLP-a u serumu. Svakako, treba uzeti u obzir da su sva djeca s atopijskim dermatitisom u trenutku uzimanja uzorka bila u remisiji AD (urednog kliničkog statusa kože).

6.2. Koncentracija TSLP-a u serumu u akutnoj egzacerbaciji astme

Uvidom u literaturu nije nađeno da je netko prije nas uspoređivao promjene koncentracije TSLP-a u serumu u istog bolesnika između asimptomatske faze bolesti i egzacerbacije astme.

Dosadašnja istraživanja na eksperimentalnim životinjskim modelima i kod ljudi pokazala su da je TSLP jedan od ključnih citokina koji u astmi pridonosi egzacerbaciji upale dišnih putova.[96] Transgenična ekspresija TSLP-a u eksperimentalnim mišjim modelima pojačava obilježja astme, uključujući upalu dišnih putova, infiltraciju eozinofila, hiperplaziju epitelnih stanica i akutnu hiperreaktivnost dišnih putova.[87, 97]

U našem istraživanju, u kohortnoj skupini ispitanika (23 ispitanika) usporedili smo koncentracije TSLP-a u serumu tijekom akutne egzacerbacije astme te u iste djece u mirnoj fazi bolesti. Nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji TSLP-a u serumu ($p > 0,05$) u akutnoj egzacerbaciji astme u usporedbi s uzorkom uzetim u mirnoj fazi bolesti. Zatim smo analizirali promjenu koncentracije TSLP-a između vrijednosti u asimptomatskoj fazi bolesti i u akutnoj egzacerbaciji izrežene u postotku za svakog ispitanika posebno. Raspon promjene koncentracije TSLP-a se kretao od -95,5 % do + 321,4 %.

U 10 ispitanika u akutnoj egzacerbaciji astme uzet je i bris NF na petnaest respiratornih virusa multiplex PCR metodom. Kako se rutinski ne provodi testiranje na prisutnost respiratornih virusa u dišnim putovima za vrijeme epizoda sipnje, uzorak uzetih briseva je relativno mali. Zanimljivo, porast serumske koncentracije TSLP-a bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) u u ispitanika s negativnim PCR brisom NF u usporedbi s pozitivnim nalazom PCR brisa NF na neki

od respiratornih virusa. Kod dva bolesnika kod kojih u brisu NF nije izoliran ni jedan od 15 virusa porast TSLP je bio značajan (+239% i +321%) u odnosu na vrijednosti TSLP-a u tih bolesnika u asimptomatskoj fazi bolesti. Iz tih rezultata bi se moglo zaključiti da pri alergenom iduciranim egzacerbacijama dolazi do jačeg porasta TSLP-a nego pri virusnim. Međutim, kada smo svih 23 ispitanika na temelju anamneze i kliničke slike podijelili u skupine prema klinički predmnijevanome okidaču egzacerbacije (alergen, virus, oboje), nije bilo statistički značajne razlike između promjene serumske koncentracije TSLP-a ($p > 0,05$) između alergenom i virusom inducirane egzacerbacije astme. Nedostatak ovog djela istraživanja je da se radi o malom broju ispitanika kojima je uzet bris NF na respiratorne viruse multiplex PCR metodom, a od kojih su svega dva bolesnika imala negativan nalaz brisa NF. No kako je ta razlika upečatljiva, trebalo bi je ispitati dodatnim istraživanjem na većem broju ispitanika.

TSLP je identificiran kao glavni okidač alergije upale kod mišjih modela i važan je citokin u razvoju alergijske astme.[88] Eksperimentalna ispitivanja koja su uspoređivala TSLP odgovor na RSV infekciju u bronhalnim epitelnim stanicama zdrave i astmatične djece pokazala su da kulture astmatičara pokazuju značajan porast proizvodnje TSLP u usporedbi s kulturama zdravih ispitanika.[117] I druga eksperimentalna istraživanja potvrdila su važnost uloge TSLP-a u razvoju imunopatološkog odgovora potaknutog RSV-om, rinovirusom i hMPV-om.[115, 119, 120] Infekcija rinovirusom u djece s respiratornom infekcijom dobi ≤ 3 godine, povezana je s višom koncentracijom TSLP-a i Th2 citokina (IL-4, IL-13) u aspiratu nazofarinksa nego u djece bez detektabilnog virusa.[121]

U istraživanju García-García i suradnika, bolesnici s bronhiolitisom i pozitivnim brisom NF na RSV i rinovirus pokazali su se značajno veće koncentracije TSLP-a u nazofaringealnom aspiratu u usporedbi s bolesnicima s negativnim brisom NF na ove viruse. Kada su uspoređene grupe inficirane samo s RSV, samo s rinovirusom i grupa s dvojnom infekcijom (RSV + rinovirus), utvrđene su značajne razlike između 3 skupine. Razine TSLP-a u nazofaringealnom aspiratu kod koinfekcije RSV-om i rinovirusom bile su značajno više nego kod pojedinačnih infekcija RSV-om ili rinovirusom. Sva novorođenčad zaražena rinovirusom, a s pozitivnom detekcijom TSLP-a prezentirala su se s virusnom koinfekcijom, uglavnom RSV-om, dok niti jedan bolesnik samo s rinovirusnom infekcijom nije imao detektabilan TSLP u nazofaringealnom aspiratu.[123]

Respiratorne virusne infekcije glavni su uzrok egzacerbacije astme. Bronhalne epitele stanice oboljelih od astme pokazuju više razine TSLP-a kao odgovor na dsRNA nego bronhalne epitelne

stanice zdravih kontrola.[124, 125] Respiratorni virusi, kao što su rinovirus, RSV i virus influence, povećavaju proizvodnju citokina epitelnog podrijetla, kao što su IL-33, IL-25 i TSLP. RSV infekcije induciraju ILC2, koji proizvodi IL-13 i uzrokuje prekomjernu ekspresiju mucina. U eksperimentalnom modelu, anti-TSLP protutijelo smanjuje broj IL-13+ ILC2 i smanjuje prekomjernu ekspresiju mucina. [126]

Osim respiratornih virusa, široki spektar podražaja može aktivirati stvaranje TSLP-a. Bakterijski peptidoglikani, lipoteikoična kiselina, citokini (IL-4, IL-13, TNF-α, i IL-1), ali i mehanička ozljeda, onečišćenje zraka i alergeni induciraju ekspresiju TSLP-a od strane epitelnih stanica dišnog puta i kože, ali i od strane stanica nespecifične imunosti (dendritskih stanica, mastocita, bazofila).[16,17,21,24,26]

No ako uzmemo u obzir i druge pokazatelje upalnih zbivanja tijekom akutne egzacerbacije, možda nam oni pomognu u objašnjenju tako velikih razlika u promjeni koncentracije TSLP-a. Tako je npr. epizodična virusna sipnja u predškolske djece povezana s povišenom, normalnom i smanjenom razinom frakcije izdahnutog dušikovog oksida u različitim studijama, a to sugerira da taj oblik sipnje ne mora biti dobro definiran klinički entitet, te da su u podlozi možda različiti upalni fenotipovi.[271-273]

Koliko je vremena potrebno od podražaja, odgovora epitelnih stanica, povećane proizvodnje TSLP-a i daljnjega slijeda imunopatološkog zbivanja nije nam poznato. Također, ponovno se nameće pitanje o eventualnom postojanju razlike između koncentracije TSLP-a u dišnom putu i serumu. Mogući nedostatak našeg istraživanja je različito vrijeme uzimanja uzorka seruma za mjerenje TSLP-a u odnosu na početak egzacerbacije. No postoji li razlika u promjeni koncentracije TSLP-a u dišnom putu tijekom virusom ili alergenom potaknute egzacerbacije u oboljelih od astme, te postoji li razlika ovisno o vrsti virusa, tek treba ustvrditi.

6.3. Analiza TSLP-a

Zbog velike raspršenosti izmjerene vrijednosti TSLP-a u serumu, ispitanike oboljele od astme smo s obzirom na koncentraciju TSLP-a podijelili u tri skupine: prvu kvartilnu skupinu (Q1) činili su ispitanici s rasponom TSLP između 14–116 pg/mL, drugu kvartilnu skupinu (Q2) 117–1053 pg/mL, a treću kvartilnu skupinu (Q3) s rasponom od 1054–2216 pg/mL.

Kao ni u istraživanju Lia i suradnika, ni mi u našem istraživanju nismo otkrili povezanost koncentracije TSLP-a sa spolom ispitanika.[79]

6.3.1. TSLP i plućna funkcija

Među našim ispitanicima s astmom 128 ih je učinilo spirometriju, a 31 impulsnu oscilometriju. Opstruktivne smetnje ventilacije u spirometriji imalo je 33 (25,8 %) ispitanika. U spirometriji 122 (95 %) ispitanika imalo je uredan FEV1 (≥ 80 %), a 6 (5 %) ispitanika je imalo blagi stupanj opstrukcije (FEV1 = 60 – 79 %). Ako gledamo male dišne putove, 96 (75 %) ispitanika imalo je uredan MEF50 (≥ 80 %), blagi stupanj opstrukcije na razini malih dišnih putova (MEF50 = 60 – 79 %) imalo je 25 (19,5 %) ispitanika, srednji stupanj (MEF50 = 40 – 59 %) 6 (4,7 %) ispitanika, a teški stupanj opstrukcije na razini malih dišnih putova (MEF50 < 40 %) 1 (0,008 %) ispitanik.

Od 23 ispitanika koji su učinili impulsnu oscilometriju, 23 (74,2 %) ispitanika imalo je opstruktivne smetnje ventilacije.

Jedna od glavnih karakteristika astme je reverzibilna bronhoopstrukcija, a ona se može objektivizirati spirometrijskim mjerenjem. U našem istraživanju bronhodilatacijski test salbutamolom u spirometriji učinilo je 125 ispitanika, a u 55 (44 %) ispitanika je bio pozitivan. Bronhodilatacijski test salbutamolom je u 7 (5,6 %) ispitanika bio pozitivan samo na razini velikih dišnih putova, u 27 (21,6 %) pozitivan samo na razini malih dišnih putova, a u 21 (16,8 %) ispitanika pozitivan i na razini velikih i na razini malih dišnih putova. Bronhodilatacijski test salbutamolom učinilo je i 20 ispitanika u impulsnoj oscilometriji, u 15 (75 %) ispitanika je bio pozitivan.

U našem istraživanju nismo našli statistički značajnu razliku ($p = 0,932$) u koncentraciji TSLP-a u serumu između djece s urednom spirometrijom i onom s opstruktivnim smetnjama ventilacije. Također ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji TSLP-a u serumu između djece s negativnim i pozitivnim bronhoprovokacijskim testom salbutamolom u spirometriji. Nije nađena povezanost između koncentracije TSLP-a u serumu i FEV1 ($r = 0,01$, $p = 0,9108$) niti između koncentracije TSLP i MEF50 ($r = 0,06$, $p = 0,467$).

Analizirajući koncentracije TSLP-a u sputumu ili BAL-u, nađena je obrnuta korelacija s funkcijom pluća. Tako, u istraživanju Lia i suradnika, koncentracija TSLP-a u BAL-u obrnuto je korelirala s funkcijom pluća (FEV1) u astmatičara neovisno o terapiji kortikosteroidima (r = -

0.565, p < 0.0001),[79] a u istraživanju Berraiesa i suradnika ekspresija TSLP mRNA u induciranom sputumu djece s astmom je obrnuto korelirala s FEV1.[101]

Međutim, u istraživanjima Glücka i Koussiha, koji su kao i mi analizirali koncentraciju TSLP-a u serumu, nije nađena povezanost između serumske koncentracije TSLP-a i FEV1.[157, 381]

Iz gore navedenoga možemo zaključiti da koncentraciji TSLP-a u serumu nije dobar pokazatelj plućne funkcije (FEV1, MEF50), niti pokazatelj hiperreaktivnosti bronhalnog stabla.

U nama dostupnim rezultatima istraživanjima kao pokazatelj funkcije pluća korišten je FEV1. Nisu pronađene studije u kojima je ispitivan odnos između koncentracije TSLP-a i drugih parametera plućne funkcije praćenih u našoj studiji, kao što su MEF50 ili reaktivnost dišnog puta u bronhodilatacijskom testu salbutamolom.

6.3.2. TSLP i ITM

Za procjenu stupnja uhranjenosti koristili smo indeks tjelesne mase (ITM). Ispitanike nakon navršene druge godine života, na osnovi ITM izraženog u centilima, koristeći CDC grafikone rasta specifične za dob i spol, temeljem položaja na centilnoj krivulji podijelili smo u 4 skupine: normalna tjelesna težina (ITM između 5. – 85. centile), prekomjerna tjelesna težina (ITM između 85. – 95. centile), pretilost (ITM ≥ 95. centile), pothranjenost (ITM < 5. centile).[370] U našem istraživanju, od ukupnog broja djece starije od dvije godine i oboljele od astme, većina njih (68,2 %) je bila normalno uhranjena, 10,9 % pretila, 12,5 % prekomjerne tjelesne težine, a 8,3 % pothranjena. Analizirajući izmjerene koncentracije TSLP-a, nađena je statistički značajna razlika između kvartilnih skupina ovisno o uhranjenosti u djece (p = 0,0331, Hi-kvadrat test). Od 16 pothranjene djece, 9 djece je imalo vrijednosti TSLP-a u prvoj kvartilnoj skupini, a samo jedno pothranjeno dijete je imao vrijednost TSLP-a u trećoj kvartilnoj skupini. Iz toga bi se moglo zaključiti da pothranjena djeca imaju niže, a deblja djeca više vrijednosti TSLP-a u serumu.

Pretilost je čimbenik rizika za astmu kako u dječjoj tako i u odrasloj dobi. Sa značajnim porastom prevalencije pretilosti, sve je važnije razumijevanje ovog fenotipa. Iako se više puta pokazalo da pretilost povećava prevalenciju astme, točan uzročni odnos tek treba utvrditi. Mnogi mehanizmi se istražuju kako bi se pronašla povezanost astme s pretilošću, uključujući mehaničke, hormonalne i upalne čimbenike[385, 386] Epidemiološke studije provedene kod djece

pokazala su jasnu povezanost između pretilosti i težine astme, kao i povezanost između pretilosti i poremećaja plućne funkcije. Mehaničke, imunosne, hormonske i upalne karakteristike pretilosti, kao i tip pretilosti utječu na osobine i perzistiranje astme.[387]

Pretilost je već neko vrijeme prepoznata kao kronično upalno stanje niskog stupnja. Citokini, kemokini i drugi upalni medijatori oslobođeni iz masnog tkiva kolektivno se nazivaju adipokini. Ti pokretači upale, kao što su IL-6, TNF-α i VEGF, mogu potencijalno ući u krvotok i pridonijeti razvoju astme ili pogoršanju već postojeće astme, te smanjiti odgovor na konvencionalno liječenje. Razmatra se i uloga oksidativnog stresa zbog pretilosti u astmi povezanoj s pretilošću, ali ova veza nije u potpunosti razjašnjena.[388] Različiti autori su raspravljali o hormonalnoj osnovi astme povezane s pretilošću. Leptin, hormon sitosti koji se oslobađa iz masnog tkiva, povišen je kod pretilih osoba i ima proupalno djelovanje.[389] Leptin je sposoban regulirati proliferaciju i aktivaciju T stanica, regrutiranje makrofaga i poticanje angiogeneze. Leptin ima potencijalnu teorijsku ulogu u imunosnoj modulaciji kao podupiratelj upale dišnih putova.[388] Međutim, druge studije nisu potvrdile značajnu ulogu leptina.[390, 391] Odrasli pretili astmatičari često razvijaju imunosni odgovor koji je različit od klasičnog T2 alergijskog odgovora, a karakteriziran je nižim razinama IgE u serumu i manjim brojem eozinofila u sputumu.[388] Iako mehanizmi koji su u osnovi ove asocijacije još nisu u potpunosti razjašnjeni, sugerira se da upala povezana s pretilošću potiče razvoj karakterističnih kliničkih fenotipova koji su uočeni u pretilih astmatičara.[392]

Pregledom dostupne literature nisu zabilježena istraživanja utjecaja ITM na koncentraciju TSLP-a u serumu. U samo jednom recentnom *in vitro* istraživanju, analiziran je utjecaj pretilosti na ekspresiju TSLP mRNA u kulturi epitelnih stanica nosa u ispitanika s astmom, KOPB i u kontrolnoj skupini, te u tom istraživanju nije nađena povezanost.[393]

Istraživanje na eksperimentalnim mišjim modelima je pokazalo da pretilost utječe na alergijsku upalu dišnih putova putem mehanizama koji uključuju priljev mastocita i oslobađanje TSLP i IL-25, što je pogodovalo odgođenom imunosnom odgovoru s pojačanim Th1, Th2 i Th17 odgovorom. U ovom scenariju, intenzivni miješani upalni priliv granulocita, klasično aktivirano nakupljanje makrofaga i intenzivno stvaranje sluzi mogu pridonijeti refraktornom terapijskom odgovoru i pogoršati stupanj težine astme.[394] Unatoč očitom odnosu adipokina i astme povezane s pretilošću, specifični biomarker za taj fenotip nije izdiferenciran.[395] To je vjerojatno zbog činjenice što su točni mehanizmi koji rezultiraju bolešću

slabo razumljivi i najvjerojatnije višefaktorski. Nadamo se da će buduće studije dublje definirati povezanost pretilosti i astme, te će dati vrijedne biomarkere za dijagnozu i liječenje te složene povezanosti. Kakva je uloga TSLP u tome tek se treba ustvrditi.

Nismo našli statistički značajnu razliku između kvartilnih skupina ovisno o dobi, spolu, stupnju kontrole astme prema ACT upitniku, prethodnoj terapiji inhalacijskim kortikosteroidom, tri različita fenotipa astme, nalazu spirometrije – FEV1, MEF50, bronhodilatacijskom testu salbutamolom, vrijednosti NO u izdahnutom zraku.

6.3.3. TSLP i senzibilizacija

Nije bilo statistički značajne razlike između kvartilnih skupina ovisno o dokazanoj senzibilizaciji na barem jedan inhalacijski alergen (pozitivnom kožnom ubodnom testu na inhalacijske alergene, kožnom ubodnom testu na *Dermatophagoides pteronyssinus,* pelud trava, pelud stabala, ambroziju).

Nije bilo statistički značajne razlike između kvartilnih skupina prema vrijednosti ukIgE, ECP, spIgE na *Dermatophagoides pteronyssinus*, spIgE na ambroziju, spIgE na pelud stabala, spIgE na pelud trava, spIgE na dlaku mačke, spIgE na dlaku psa, spIgE na kikiriki, o vrijednosti leukocita, neutrofila kao ni o relativnom niti apsolutnom broju eozinofila.

Također nije bilo statistički značajne razlike između kvartilnih skupina ovisno o obiteljskoj anamnezi na atopiju, pridruženom alergijskom rinitisu ili atopijskom dermatitisu, kao niti prema podatku o izloženosti duhanskom dimu.

6.4. Mogući nedostaci i ograničenja istraživanja

Kao nedostatak istraživanja mogao bi se navesti mali broj ispitanika u akutnoj egzacerbaciji astme kojima je uzet uzorak seruma, te bris NF na respiratorne viruse multiplex PCR metodom. Mogući nedostatak tog dijela istraživanje je i različito vrijeme uzimanja uzorka seruma u odnosu na početak egzacerbacije astme.

Također, mogući nedostatak je eventualna izloženost čimbeniku okoliša (alergenu, virusu ili onečišćenju zraka) u trenutku uzimanja uzorka seruma, a koji bi mogao utjecati na koncentraciju TSLP-a u serumu.

Djeca iz kontrolne skupine su bila starija od djece s astmom.

Djeca su u kontrolnu skupinu ispitanika uključena na temelju anamnestičkih podataka dobivenih od roditelja, a možda bi veću težinu imali eventualno objektivniji pokazatelji (npr. uvid u medicinski karton, dijagnostički postupci).

Kao što je u uvodu navedeno postoje dvije izoforme TSLP-a, no ne postoje komercijalno dostupni kitovi za njihovo određivanje. U našem istraživanju mjerili smo ukupni TSLP, a rezultati istraživanja bi možda bili drugačiji da su određivane izoforme TSLP-a.

6.5. Značaj, kliničke korelacije i polazišta za daljnja istraživanja

Kod ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem nije dokazano postojanje jasne korelacije između koncentracije TSLP-a u serumu i vrijednosti ukupnog IgE u serumu, eozinofilnih granulocita periferne krvi, ECP, specifičnog IgE na *D. pteronyssinus*, specifičnog IgE na ambroziju, specifičnog IgE na pelud drveća, specifičnog IgE na pelud trava, leukocita u krvi, neutrofila u krvi, nalaza spirometrija (FVC %, FEV1 %, MEF50 %, bronhodilatacijskog testa salbutamolom FEV1 +%, bronhodilatacijskog testa salbutamolom MEF50 +%), FeNO, zbroja u ACT upitniku, dobi, visine, niti težine.

Kako se u našem istraživanju nije našla povezanost između koncentracije TSLP-a i testa kontrole astme, spirometrijskih mjerenja niti mjerenja izdahnutog NO, možemo zaključiti da koncentracija TSLP u serumu nije dobar biomarker za procjenu kontrole astme dječje dobi.

Odsutnost korelacije između serumskih koncentracija TSLP-a i vrijednosti ukupnog serumskog IgE i broja eozinofilnih granulocita perifernih krvi u skladu je s rezultatima drugih studija provedenih kod oboljelih od alergijske astme. Objašnjenje leži u činjenici da TSLP pokazuje poglavito karakteristike proupalnog markera bez obzira na vrstu upale (atopijska, neatopijska), dok su razine IgE u serumu i eozinofilnih granulocita značajni biljezi u procjeni atopijskog statusa, ali ne i stupnja upale.

Istraživanja su identificirala epitel dišnih putova kao glavni izvor TSLP-a koji regulira imunosno posredovanu upalnu bolest dišnih putova i odgovor na infekcije.[396] U mišjim modelima TSLP je identificiran kao "glavni prekidač" za alergijsku upalu.[96] Studije TSLP polimorfizma pokazuje povezanost s alergijskom astmom kako u djetinjstvu tako i u odrasloj dobi.[104, 113] TSLP također inducira proizvodnju Th2 citokina iz ljudskih mastocita.[17] TSLP ima direktnu ulogu u regulaciji supresivne aktivnosti Treg stanica.[93] Značajke astme u mišjim modelima, uključujući upalu dišnih putova, infiltraciju eozinofila, hiperplaziju vrčastih stanica i hiperreaktivnost dišnih putova, inducirane su transgeničnom ekspresijom plućnog TSLP-a.[87, 97] Nakon provokacije eksperimentalnim alergenom u mišjim modelima kojima nedostaje TSLP receptor, ne dolazi do razvoja eozinofilne upale dišnih putova.[100] Blokada TSLP receptora monoklonskim protutijelima smanjila je ukupan broj stanica u bronhoalveolarnom lavatu, eozinofile i limfocite, koncentracije IL-4 i IL-5 i ekspresiju nekoliko površinskih markera na lokalnim plućnim DC-ima u mišjem modelu astme izazvane OVA-om.[158]

U posljednjem desetljeću postalo je jasno da je astma heterogena bolest koja se sastoji od nekoliko fenotipova. Identifikacija tih fenotipova povezano je s razvojem biološke terapije za liječenje teške astme koja djeluje na protutijela, citokine i njihove receptore kao što su imunoglobulin E, IL-5 i receptor IL-5 ili IL-13. Nema sumnje da uvođenje biološke terapije predstavlja važan korak u suvremenom liječenju teške astme. Iako su inhalacijski kortikosteroidi i dalje kamen temeljac liječenja astme, postalo je očito da dublje razumijevanje patofiziologije astme omogućuje prilagodbu liječenje astme prema fenotipu svakog bolesnika. Trenutne biološke terapije kao što su monoklonska IgE-protutijela (omalizumab) ili IL-5-protutijela ciljaju bolesnike sa specifičnim fenotipovima kao što su alergijska ili eozinofilna astma. Anti-TSLP monoklonska protutijela mogla bi biti obećavajuća u većem broju fenotipova astme nego dosadašnja biološka terapija. TSLP ima ključnu ulogu u diferencijaciji CD4+ stanica u aktivirane Th2 stanice. Budući da je taj put uključen u većine pacijenata koji pokazuju T2 visoki fenotip astme, blokada TSLP-a će vjerojatno utjecati na veći broj pojedinaca nego liječenje s anti-IgE, anti-IL-5 ili anti-IL-13/IL-4. Blokada upalne kaskade na samom početku kaskade će vjerojatno imati značajan učinak na upalu dišnih putova. Prekidanje Th2 upalnog odgovora kroz blokadu TSLP-a čini se obećavajućom alternativom za bolesnike s teškom astmom. Iako ostaju otvorena pitanja načina djelovanja i ciljnim mjestima TSLP-a, utjecaj TLSP na Th2 upalu je jasno utvrđen.[397] Učinkovitost i sigurnost anti-TLSP monoklonskih protutijela

u širokom spektru bolesnika s Th2-posredovanom upalom dišnih putova treba se pokazati u velikim kliničkim ispitivanjima.[397, 398]

Terapijski potencijal inhibicije TSLP-a u bolesnika s astmom prvi put je procijenjena istraživanjem provokacije alergenom. Gauvreau i suradnici ustanovili su da je tromjesečno liječenje tezepelumabom, ljudskim anti-TSLP monoklonskim protutijelom, u bolesnika s blagom alergijskom astmom rezultiralo značajnim smanjenjem eozinofila u krvi i sputumu, te razine dušikovog oksida u izdahnutom zraku, što ukazuje da TSLP ima ključnu uzvodnu ulogu u regulaciji otpuštanja citokina tip 2 – IL-5, IL-4 i IL-13. Tezepelumab je također značajno smanjio i ranu i kasnu fazu alergenom izazvane bronhokonstrikcije, što upućuje da inhibira i neposredni događaj (oslobađanje mastocita dišnih putova) i kasne događaje (oslobađanje Th2 citokina, te regrutiranje i aktiviranje eozinofila).[160] Corren i suradnici su, u placebom kontroliranom 52-tjednom ispitivanju umjerene do teške nekontrolirane astme, izvijestili da je liječenje tezepelumabom povezano sa smanjenjem godišnje stope pogoršanja astme do 71 %, sa značajnim smanjenjem uočenim u bolesnika s T2 visokom astmom (eozinofili u krvi > 250/µL), ali i u onih s T2 niskom astmom.[162] Rezultati za podskupinu s T2 visokom astmom sugeriraju da sama inhibicija TSLP-a ima snažne učinke na egzacerbaciju astme, uglavnom uzrokovane virusnom infekcijom, čak i u odsutnosti antagonizma IL-33 i/ili IL-25.[103] Neočekivana učinkovitost tezepelumaba u T2 niskoj astmi trenutno nije dobro razumljiva. Kako pokusi na životinjama koriste isključivo alergijske, alergen osjetljive modele astme, malo toga je do sada razjašnjeno o T2 niskom tipu upale. Različiti citokini, uključujući IL-17, IL-6, GM-CSF i IFN-γ povezuju se s T2 niskom astmom, a nije potpuno jasna interakcija TSLP-a s tim citokinima kod ljudi s astmom. Rezultati trenutne treće faze studije će dalje utvrditi ima li TSLP ključnu patološko-biološku ulogu u egzacerbaciji astme u različitim podtipovima astme.[72]

Tezepelumab je prvi biološki lijek koji ima značajan pozitivan učinak na dva važna markera upale u astmi – broj eozinofila u krvi i frakciju dušikovog oksida (FeNO) u izdahnutom zraku. Ostali do sada testirani biološki lijekovi u bolesnika s astmom pokazali su različite učinke na te upalne markere. Na primjer, liječenje anti-IL-5 smanjuje broj eozinofila u krvi, ali nema utjecaja na razinu FeNO, što sugerira da glavni put osjetljiv na kortikosteroid ostaje aktiviran u bolesnika koji su liječeni s anti-IL-5. [399] S druge strane, biološki lijekovi koji blokiraju signalizaciju IL-4 ili IL-13 smanjuju razinu FeNO, ali ne utječu na broj cirkulirajućih eozinofila, opet ostavljajući ključni pokretač upale netaknut. [400] Opažanje da tezepelumab smanjuje

razinu oba upalna pokazatelja pokazuju da djeluje više uzvodno i da blokira najmanje dva relevantna upalna puta u astmi. Vjeruje se da je to klinički značajno, jer je istovremeno povećanje razine FeNO i broja eozinofila u krvi povezano s povećanim morbiditetom od astme.[401]

Na temelju tog širokog uzvodnog blokiranja nije iznenađujuće da je tezepelumab, za razliku od drugih bioloških lijekova, jednako učinkovit u smanjenju egzacerbacija astme u bolesnika s različitim fenotipovima astme: eozinofilna (alergijska i nealergijska) astma i neeozinofilna astma. Nameće se pitanje, zašto tezepelumab ne prevenira sve egzacerbacije. Što bi moglo biti odgovorno za ostatak egzacerbacija? Jedno od mogućih objašnjenja je da egzacerbacije astme izazvane invazivnim patogenima (bakterije, virusi ili gljive) koji uzrokuju novačenje neutrofila i aktivaciju i formiranje neutrofilnih izvanstaničnih zamki nisu spriječeni tezepelumabom.[402] U tim situacijama, druge terapije, kao što su makrolidi (iako nisu odobreni za ovu indikaciju), mogle bi biti prikladnije.[403]

U zaključku, čini se da je za sada tezepelumab najširi i najperspektivniji biološki lijek za liječenje trajne nekontrolirane astme. Smanjuje stopu egzacerbacije astme za više od polovice i poboljšava funkciju pluća bez obzira na fenotip astme. Buduće studije trebaju potvrditi njegovu učinkovitost i sigurnost, a znanstvenici bi trebali dalje istraživati, te razjasniti mehanizme egzacerbacije astme koje nisu inhibirane ciljanom biološkom terapijom kao što je tezepelumab.

Iako je još uvijek ostalo mnogo neodgovorenih pitanja, postoje nedvojbeni dokazi o važnosti TSLP-a u razvoju astme, te TSLP predstavlja mogući cilj djelovanja liječenja oboljelih od teške astme. Počevši od Soumelisa koji je prvi objavio važnost uloge TSLP-a u alergijskim bolestima, TSLP je istražen kao pokretač upalnoga odgovora tipa 2 na površinskim barijerama. Postalo je jasno da je izvorna predložena uloga TSLP-a točna, međutim biologija ovog citokina daleko je šira. Najuzbudljivije i iznenađujuće je novo otkriće o sposobnosti tezepelumaba u sprječavanju egzacerbacija i u eozinofilnoj i u neeozinofilnoj astmi.[162] Ovo otkriće sugerira da TSLP signalizacija nije potrebna samo tijekom inicijacije bolesti, nego je također uključena i u T2 nisku upalu. Razumijevanje uloge TSLP-a u drugim upalnim kaskadama bit će važan aspekt budućih istraživanja. Jedan doprinos tome mogle bi pružiti studije koje pokazuju da TSLP u kombinaciji sa stimulacijom s kostimulacijskim receptorom CD40 može promovirati

proizvodnju IL-23 od strane ljudskih DC, što ukazuje na ulogu TSLP-a u tip 17 upalnom odgovoru.[15]

Iako se većina istraživanja do sada koncentrirala na ulogu TSLP-a u T2 visokoj astmi, sve više je dokaza o njegovoj ulozi i u T2 niskoj astmi.

Prema dostupnim podacima dosadašnjih istraživanja, TSLP predstavlja potencijalno važno ciljno mjesto djelovanja novih lijekova u liječenju astme.

Kada sve gore navedeno uzmemo u obzir, rezultati našeg istraživanja ne iznenađuju. Zaključno možemo reći da su rezultati ovog istraživanja potvrdili hipotezu da je serumska koncentracija TSLP-a u djece oboljele od astme veća od koncentracije TSLP-a u zdrave populacije. Međutim nije potvrđena pretpostavka da postoji razlika u koncentraciji TSLP-a među različitim fenotipovima astme u djece, niti je nađena povezanost koncentracije TSLP-a u serumu i kontrole astme. Prema rezultatima našeg istraživanja, možemo zaključiti da koncentracija TSLP u serumu nije dobar biomarker u rutinskoj dijagnostici, niti u procjeni kontrole astme dječje dobi, niti je dobar pokazatelj plućne funkcije. Ostaje otvoreno pitanje o značaju uloge TSLP-a u astmi pretilih osoba.

Dosadašnja znanstvena literatura ističe TSLP kao potencijalni biomarker alergijske upale u astmi, no ovo istraživanje tu tezu opovrgava.

Ovo istraživanje predstavlja mali doprinos boljem razumijevanju uloge TSLP u astmi dječje dobi.

7. ZAKLJUČCI

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

1. Koncentracija TSLP-a u serumu statistički je značajno veća u djece s astmom u usporedbi sa zdravom djecom ($p < 0,005$).
2. Budući da nije nađena statistički značajna razlika u vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu između tri različita fenotipa astme (astme s alergijskom senzibilizacijom, astme bez alergijske senzibilizacije i astme inducirane virusnim infekcijama), smatramo da koncentracija TSLP-a u serumu nije dobar biomarker za razlikovanje fenotipova astme u djece.
3. Koncentracija TSLP-a u serumu nije dobar biomarker alergijske upale u astmi.
4. Koncentracija TSLP-a u serumu nije dobar pokazatelj kontrole astme (na osnovi upitnika u djece starije od 4 godine, spirometrijskih mjerenja – FEV1, MEF50, bronhodilatacijski test salbutamolom).
5. Koncentracija TSLP-a u serumu nije dobar pokazatelj plućne funkcije (FEV1, MEF50), niti je pokazatelj hiperreaktivnosti bronhalnog stabla.
6. Koncentracija TSLP-a u serumu nije značajno povišena u akutnoj egzacerbaciji astme.
7. Ne postoji razlika u promjeni koncentracije TSLP-a u akutnoj egzacerbaciji astme prema klinički predmnijevanom okidaču bolesti.
8. Terapija inhalacijskim kortikosteroidom ne utječe na koncentraciju TSLP-a u serumu.
9. Terapija antagonistom leukotrijenskih receptora ne utječe na koncentraciju TSLP-a u serumu.
10. Indirektno se može zaključiti da koncentracija TSLP-a u serumu ne ovisi o težini bolesti, jer djeca na kombiniranoj terapiji nisu imala više vrijednosti TSLP-a od djece bez protuupalne terapije ili one koja uzimaju monoterapiju.
11. Nađena je statistički značajna razlika između kvartilnih skupina TSLP-a ovisno o uhranjenosti ($p = 0,0331$), te je moguća uloga masnih stanica na koncentraciju TSLP-a u serumu. Mršavija djeca imaju niže, a pretila djeca više vrijednosti TSLP-a u serumu.

8. SAŽETAK

Uvod: Astma je kronična upalna bolest dišnih putova karakterizirana predominacijom pomagačkih limfocita T2. Limfopoetin strome timusa (TSLP) je citokin odgovoran za preusmjeravanje na T2 odgovor u astmi.

Cilj: Ispitati koncentraciju TSLP-a u serumu bolesnika s astmom i u zdravih ispitanika, te ustvrditi povezanost koncentracije TSLP u serumu s kliničkim i laboratorijskim karakteristikama naših bolesnika.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 207 ispitanika s astmom i 100 zdravih ispitanika dobi od 1 do 13 godina. Svim ispitanicima izmjerena je koncentracija TSLP u serumu metodom ELISA koristeći Human TSLP ELISA Kit (abcam, ab155444), a u 23 ispitanika koncentracija TSLP u serumu izmjerena je i u akutnoj egzacerbaciji astme.

Rezultati: Koncentracija TSLP-a u serumu statistički je značajno veća u djece s astmom u usporedbi sa zdravom djecom ($p < 0,005$). Nije nađena statistički značajna razlika u vrijednosti koncentracije TSLP-a u serumu između tri različita fenotipa astme (astme s alergijskom senzibilizacijom, astme bez alergijske senzibilizacije i astme inducirane virusnim infekcijama), niti između djece s dobro kontroliranom i nekontroliranom astmom (na osnovi upitnika u djece starije od 4 godine, spirometrijskih mjerenja). Koncentracija TSLP-a u serumu nije dobar pokazatelj plućne funkcije, niti je značajno povišena u akutnoj egzacerbaciji astme. Ni protuupalna terapija niti težina bolesti ne utječu na koncentraciju TSLP-a u serumu. Nađena je statistički značajna razlika između kvartilnih skupina TSLP-a ovisno o uhranjenosti ($p < 0,05$), te je moguća uloga masnih stanica na koncentraciju TSLP-a u serumu. Mršavija djeca imaju niže, a pretila djeca više vrijednosti TSLP-a u serumu.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja potvrdili su hipotezu da je serumska koncentracija TSLP-a u djece oboljele od astme značajno veća od koncentracije TSLP-a u zdrave djece, no koncentracija TSLP u serumu nije dobar biomarker u rutinskoj dijagnostici jer nam ne pomaže u razvrstavanju djece u različite fenotipove astme, ni u procjeni kontrole astme dječje dobi, niti je dobar pokazatelj plućne funkcije. Ostaje otvoreno pitanje o povezanosti koncentracije TSLP-a u serumu i astme u pretilih osoba.

Ključne riječi: TSLP, astma, djeca, fenotip

9. SUMMARY

Correlation between serum levels of thymic stromal lymphopoietin and childhood asthma phenotype;

Renata Vrsalović, 2022

Introduction: Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways characterized by a predominant Th2 response. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) has been considered to switch on the T2 response in asthma.

Aim: To evaluate the serum levels of TSLP in children with asthma and healthy controls, and to establish the correlation of serum TSLP with specific clinical and laboratory characteristics of our patients.

Patients and methods: The study included 207 children with asthma and 100 healthy controls aged 1 to 13 years. Serum levels of TSLP were measured in all children by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the Human TSLP ELISA Kit (abcam, ab155444). In 23 children with asthma, TSLP were measured in acute asthma exacerbations as well.

Results: Serum levels of TSLP were significantly higher in children with asthma compared to healthy children ($p<0,005$). No statistically significant difference was found in serum levels of TSLP between the three different asthma phenotypes (asthma with allergic sensitization, asthma without allergic sensitization and virus induced asthma), nor between children with well-controlled and uncontrolled asthma (based on asthma control test score in children older than 4 years or spirometric measurements). Serum level of TSLP is not a good indicator of pulmonary function, nor is it significantly elevated in acute asthma exacerbation. Anti-inflammatory therapy and disease severity do not affect serum levels of TSLP. A statistically significant differences was found between the quartile groups of TSLP depending on body mass index ($p<0.05$), and the role of adipose cells on serum levels of TSLP is possible. Slimmer children have lower, while obese ones have higher serum TSLP values.

Conclusion: The results of this study confirmed the hypothesis that serum levels of TSLP in children with asthma are significantly elevated than in healthy children, but serum TSLP is not a good biomarker in routine diagnostics because it does not help with classifying children into different asthma phenotypes, neither in the assessment of childhood asthma control, nor is it

a good indicator of lung function. The question of correlation between serum levels of TSLP and asthma in obese individuals remains open**.**

Key words: TSLP, asthma, children, phenotype

10. LITERATURA

[1] Leonard WJ. TSLP: finally in the limelight. Nat Immunol. 2002;3:605-7.

[2] Friend SL, Hosier S, Nelson A, Foxworthe D, Williams DE, Farr A. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. Exp Hematol. 1994;22:321-8.

[3] Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K, Foxworthe D, Price V, et al. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. J Exp Med. 2000;192:671-80.

[4] Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu Mr, Travis M, et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. J Immunol. 2001;167:336-43.

[5] He R, Geha RS. Thymic stromal lymphopoietin. Ann N Y Acad Sci. 2010;1183:13-24.

[6] Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. Nat Immunol. 2010;11:289-93.

[7] Park LS, Martin U, Garka K, Gliniak B, Di Santo JP, Muller W, et al. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. J Exp Med. 2000;192:659-70.

[8] Ziegler SF. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. Curr Opin Immunol. 2010;22:795-9.

[9] Reardon C, Lechmann M, Brustle A, Gareau MG, Shuman N, Philpott D, et al. Thymic stromal lymphopoetin-induced expression of the endogenous inhibitory enzyme SLPI mediates recovery from colonic inflammation. Immunity. 2011;35:223-35.

[10] Watson B, Gauvreau GM. Thymic stromal lymphopoietin: a central regulator of allergic asthma. Expert Opin Ther Targets. 2014;18:771-85.

[11] Quentmeier H, Drexler HG, Fleckenstein D, Zaborski M, Armstrong A, Sims JE, et al. Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. Leukemia. 2001;15:1286-92.

[12] Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, Wang ZE, Miller W, Rubin EM, et al. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. Science. 2000;288:136-40.

[13] Sherrill JD, Gao PS, Stucke EM, Blanchard C, Collins MH, Putnam PE, et al. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. J Allergy Clin Immunol. 2010;126:160-5.

[14] Taylor BC, Zaph C, Troy AE, Du Y, Guild KJ, Comeau MR, et al. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. J Exp Med. 2009;206:655-67.

[15] Volpe E, Pattarini L, Martinez-Cingolani C, Meller S, Donnadieu MH, Bogiatzi SI, et al. Thymic stromal lymphopoietin links keratinocytes and dendritic cell-derived IL-23 in patients with psoriasis. J Allergy Clin Immunol. 2014;164:373-81.

[16] Cianferoni A, Spergel J. The importance of TSLP in allergic disease and its role as a potential therapeutic target. Expert Rev Clin Immunol. 2014;10:1463-74.

[17] Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. J Exp Med. 2007;204:253-8.

[18] Kashyap M, Rochman Y, Spolski R, Samsel L, Leonard WJ. Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. J Immunol. 2011;187:1207-11.

[19] Lee HC, Ziegler SF. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:914-9.

[20] Bleck B, Tse DB, Gordon T, Ahsan MR, Reibman J. Diesel exhaust particle-treated human bronchial epithelial cells upregulate Jagged-1 and OX40 ligand in myeloid dendritic cells via thymic stromal lymphopoietin. J Immunol. 2010;185:6636-45.

[21] Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol. 2007;19:711-20.

[22] Kouzaki H, O'Grady SM, Lawrence CB, Kita H. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. J Immunol. 2009;183:1427-34.

[23] Smelter DF, Sathish V, Thompson MA, Pabelick CM, Vassallo R, Prakash YS. Thymic stromal lymphopoietin in cigarette smoke-exposed human airway smooth muscle. J Immunol. 2010;185:3035-40.

[24] Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. Nat Immunol. 2002;3:673-80.

[25] Zhang K, Shan L, Rahman MS, Unruh H, Halayko AJ, Gounni AS. Constitutive and inducible thymic stromal lymphopoietin expression in human airway smooth muscle cells: role in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;293:375-82.

[26] Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de WaalMalefyt R, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. Nat Immunol. 2004;5:426-34.

[27] Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. J Immunol. 2005;174:8183-90.

[28] Moon PD, Kim HM. Thymic stromal lymphopoietin is expressed and produced by caspase-1/NF-kappaB pathway in mast cells. Cytokine. 2011;54:239-43.

[29] Liu YJ. TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. Adv Immunol. 2009;101:1-25.

[30] Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:845-52.

[31] Jia X, Zhang H, Cao X, Yin Y, Zhang B. Activation of TRPV1 mediates thymic stromal lymphopoietin release via the Ca2+/NFAT pathway in airway epithelial cells. FEBS Lett. 2014;588:3047-54.

[32] Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, et al. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. J Exp Med. 2009;206:1135-47.

[33] Briot A, Lacroix M, Robin A, Steinhoff M, Deraison C, Hovnanian A. Par2 inactivation inhibits early production of TSLP, but not cutaneous inflammation, in Netherton syndrome adult mouse model. J Invest Dermatol. 2010;130:2736-42.

[34] Roan F, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H, Ziegler SF. The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. J Leukoc Biol. 2012;91:877-86.

[35] Ray RJ, Furlonger C, Williams DE, Paige CJ. Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro. Eur J Immunol. 1996;26:10-6.

[36] Rochman I, Watanabe N, Arima K, Liu YJ, Leonard WJ. Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4+ T cells. J Immunol. 2007;178:6720-4.

[37] Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. J Exp Med. 2005;202:1213-23.

[38] Wang YH, Ito T, Homey B, Watanabe N, Martin R, Barnes CJ, et al. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. Immunity. 2006;24:827-38.

[39] Duan W, Mehta AK, Magalhaes JG, Ziegler SF, Dong C, Philpott DJ, et al. Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2010;126:1284-93.

[40] Lei L, Zhang Y, Yao W, Kaplan MH, Zhou B. Thymic stromal lymphopoietin interferes with airway tolerance by suppressing the generation of antigen-specific regulatory T cells. J Immunol. 2011;186:2254-61.

[41] Ito T, Liu YJ, Arima K. Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders-TSLP programs the "Th2 code" in dendritic cells. Allergol Int. 2012;61:35-43.

[42] Kitajima M, Lee HC, Nakayama T, Ziegler SF. TSLP enhances the function of helper type 2 cells. Eur J Immunol. 2011;41:1862-71.

[43] Rochman Y, Leonard WJ. The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis. J Immunol. 2008;181:7699-705.

[44] Levin SD, Koelling RM, Friend SL, Isaksen DE, Ziegler SF, Perlmutter RM, et al. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. J Immunol. 1999;162:677-83.

[45] Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. Nature. 2005;436:1181-5.

[46] Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: the ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. J Immunol. 2007;179:2051-4.

[47] Nagata Y, Kamijuku H, Taniguchi M, Ziegler S, Seino K. Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in

antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function. Int Arch Allergy Immunol. 2007;144:305-14.

[48] Wu WH, Park CO, Oh SH, Kim HJ, Kwon YS, Bae BG, et al. Thymic stromal lymphopoietin-activated invariant natural killer T cells trigger an innate allergic immune response in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2010;126:290-9.

[49] Iseki M, Omori-Miyake M, Xu W, Sun X, Takaki S, Rawlings DJ, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B-cell activation and autoimmunity are mediated by CD4+ T cells and IL-4. Int Immunol. 2012;24:183-95.

[50] Comeau MR, Ziegler SF. The influence of TSLP on the allergic response. Mucosal Immunol. 2010;3:138-47.

[51] Nakajima S, Kabata H, Kabashima K, Asano K. Anti-TSLP antibodies: Targeting a master regulator of type 2 immune responses. Allergol Int. 2020;69:197-203.

[52] Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. Nat Immunol. 2008;9:310-8.

[53] Salter BM, Oliveria JP, Nusca G, Smith SG, Watson RM, Comeau M, et al. Thymic stromal lymphopoietin activation of basophils in patients with allergic asthma is IL-3 dependent. J Allergy Clin Immunol. 2015;136:1636-44.

[54] Cook EB, Stahl JL, Schwantes EA, Fox KE, Mathur SK. IL-3 and TNFα increase Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor (TSLPR) expression on eosinophils and enhance TSLP-stimulated degranulation. Clin Mol Allergy. 2012;10:8.

[55] Wong CK, Hu S, Cheung PF, Lam CW. Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010;43:305-15.

[56] Wang YH, Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. Clin Exp Allergy. 2009;39:798-806.

[57] Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. Nat Med. 2012;18:673-83.

[58] Koczulla AR, Vogelmeier CF, Garn H, Renz H. New concepts in asthma: clinical phenotypes and pathophysiological mechanisms. Drug Discov Today. 2017;22:388-96.

[59] Mjösberg J, Bernink J, Golebski K, Karrich JJ, Peters CP, Blom B, et al. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. Immunity. 2012;37:649-59.

[60] Halim TY, Krauss RH, Sun AC, Takei F. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. Immunity. 2012;36:451-63.

[61] Doherty TA, Khorram N, Lund S, Mehta AK, Croft M, Broide DH. Lung type 2 innate lymphoid cells express cysteinyl leukotriene receptor 1, which regulates TH2 cytokine production. J Allergy Clin Immunol. 2013;132:205-13.

[62] Yu S, Kim HY, Chang YJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. Innate lymphoid cells and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2014;133:943-50.

[63] Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. Clin Rev Allergy Immunol. 2019;56:219-33.

[64] Kabata H, Moro K, Koyasu S, Asano K. Group 2 innate lymphoid cells and asthma. Allergol Int. 2015;64:227-34.

[65] Kabata H, Moro K, Koyasu S. The group 2 innate lymphoid cell (ILC2) regulatory network and its underlying mechanisms. Immunol Rev. 2018;286:37-52.

[66] Mohapatra A, Van Dyken SJ, Schneider C, Nussbaum JC, Liang HE, Locksley RM. Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. Mucosal Immunol. 2016;9:275-86.

[67] Liu S, Verma M, Michalec L, Liu W, Sripada A, Rollins D, et al. Steroid resistance of airway type 2 innate lymphoid cells from patients with severe asthma: the role of thymic stromal lymphopoietin. J Allergy Clin Immunol. 2018;141:257-68.

[68] Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, et al. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. Nat Commun. 2013;4:2675.

[69] Smith SG, Chen R, Kjarsgaard M, Huang C, Oliveria JP, O'Byrne PM, et al. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. J Allergy Clin Immunol. 2016;137:75-86.

[70] Ziegler SF, Roan F, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H. The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Adv Pharmacol. 2013;66:129-55.

[71] Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4 +CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007;119:1258–66.

[72] Corren J, Ziegler SF. TSLP: from allergy to cancer. Nat Immunol. 2019;20:1603-9.

[73] Xie Y, Takai T, Chen X, Okumura K, Ogawa H. Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. J Dermatol Sci. 2012;66:233-7.

[74] Bjerkan L, Schreurs O, Engen SA, Jahnsen FL, Baekkevold ES, Blix IJ, et al. The short form of TSLP is constitutively translated in human keratinocytes and has characteristics of an antimicrobial peptide. Mucosal Immunol. 2015;8:49-56.

[75] Fornasa G, Tsilingiri K, Caprioli F, Botti F, Mapelli M, Meller S, et al. Dichotomy of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in inflammatory disorders of the bowel and skin. J Allergy Clin Immunol. 2015;136:413-22.

[76] Tsilingiri K, Fornasa G, Rescigno M. Thymic Stromal Lymphopoietin: To Cut a Long Story Short. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2017;3:174-82.

[77] Bjerkan L, Sonesson A, Schenck K. Multiple Functions of the New Cytokine-Based Antimicrobial Peptide Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP). Pharmaceuticals (Basel). 2016;9:41.

[78] Shikotra A, Choy DF, Ohri CM, Doran E, Butler C, Hargadon B, et al. Increased expression of immunoreactive thymic stromal lymphopoietin in patients with severe asthma. J Allergy Clin Immunol. 2012;129:104-11.

[79] Li Y, Wang W, Lv Z, Li Y, Chen Y, Huang K, et al. Elevated Expression of IL-33 and TSLP in the Airways of Human Asthmatics In Vivo: A Potential Biomarker of Severe Refractory Disease. J Immunol. 2018;200:2253-62.

[80] Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Fang C, Cousins D, et al. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol. 2008;181:2790-8.

[81] Balzar S, Fajt ML, Comhair SA, Erzurum SC, Bleecker E, Busse WW, et al. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. Data from the Severe Asthma Research Program. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:299-309.

[82] Okayama Y, Okumura S, Sagara H, Yuki K, Sasaki T, Watanabe N, et al. FcepsilonRI-mediated thymic stromal lymphopoietin production by interleukin-4-primed human mast cells. Eur Respir J. 2009;34:425-35.

[83] Kamekura R, Kojima T, Koizumi J, Ogasawara N, Kurose M, Go M, et al. Thymic stromal lymphopoietin enhances tight-junction barrier function of human nasal epithelial cells. Cell Tissue Res. 2009;338:283-93.

[84] Kimura S, Pawankar R, Mori S, Nonaka M, Masuno S, Yagi T, et al. Increased expression and role of thymic stromal lymphopoietin in nasal polyposis. Allergy Asthma Immunol Res. 2011;3:186-93.

[85] Mou Z, Xia J, Tan Y, Wang X, Zhang Y, Zhou B, et al. Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in allergic rhinitis. Acta Otolaryngol. 2009;129:297-301.

[86] Wang W, Li Y, Lv Z, Chen Y, Li Y, Huang K, et al. Bronchial Allergen Challenge of Patients with Atopic Asthma Triggers an Alarmin (IL-33, TSLP, and IL-25) Response in the Airways Epithelium and Submucosa. J Immunol. 2018;201:2221-31.

[87] Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, Liggitt HD, Dahl ME, Lewis DB, et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. Nat Immunol. 2005;6:1047-53.

[88] Miazgowicz MM, Headley MB, Larson RP, Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and the pathophysiology of atopic disease. Expert Rev Clin Immunol. 2009;5:547-56.

[89] Li YL, Li HJ, Ji F, Zhang X, Wang R, Hao JQ, et al. Thymic stromal lymphopoietin promotes lung inflammation through activation of dendritic cells. J Asthma. 2010;47:117-23.

[90] Zhang F, Huang G, Hu B, Song Y, Shi Y. A soluble thymic stromal lymphopoietin (TSLP) antagonist, TSLPR-immunoglobulin, reduces the severity of allergic disease by regulating pulmonary dendritic cells. Clin Exp Immunol. 2011;164:256-64.

[91] Miyata M, Hatsushika K, Ando T, Shimokawa N, Ohnuma Y, Katoh R, et al. Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis. Eur J Immunol. 2008;38:1487-92.

[92] He R, Oyoshi MK, Garibyan L, Kumar L, Ziegler SF, Geha RS. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:11875-80.

[93] Nguyen KD, Vanichsarn C, Nadeau KC. TSLP directly impairs pulmonary Treg function: association with aberrant tolerogenic immunity in asthmatic airway. Allergy Asthma Clin Immunol. 2010;6:4.

[94] Magalhaes JG, Rubino SJ, Travassos LH, Le Bourhis L, Duan W, Sellge G, et al. Nucleotide oligomerization domain-containing proteins instruct T cell helper type 2 immunity through stromal activation. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108:14896-901.

[95] Lee HC, Headley MB, Iseki M, Ikuta K, Ziegler SF. Cutting edge: inhibition of NF-kappaB-mediated TSLP expression by retinoid X receptor. J Immunol. 2008;181:5189-93.

[96] Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. Lancet. 2000;356:2144-8.

[97] Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. J Exp Med. 2005;202:829-39.

[98] Zhang Z, Hener P, Frossard N, Kato S, Metzger D, Li M, et al. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:1536-41.

[99] Han H, Xu W, Headley MB, Jessup HK, Lee KS, Omori M, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-mediated dermal inflammation aggravates experimental asthma. Mucosal Immunol. 2012;5:342-51.

[100] Kato A, Favoreto Jr S, Avila PC, Schleimer RP. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. J Immunol. 2007;179:1080-7.

[101] Berraïes A, Hamdi B, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Increased expression of thymic stromal lymphopoietin in induced sputum from asthmatic children. Immunol Lett. 2016;178:85-91.

[102] Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC, Marloie-Provost MA, Volpe E, Sastre X, et al. Cutting edge: proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. J Immunol. 2007;178:3373-7.

[103] Uller L, Persson C. Viral induced overproduction of epithelial TSLP: Role in exacerbations of asthma and COPD? J Allergy Clin Immunol. 2018;142:712.

[104] Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, et al. Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011;44:787-93.

[105] Liu M, Rogers L, Cheng Q, Shao Y, Fernandez-Beros ME, Hirschhorn JN, et al. Genetic variants of TSLP and asthma in an admixed urban population. PLoS One. 2011;6:e25099.

[106] He JQ, Hallstrand TS, Knight D, Chan -Yeung M, Sandford A, Tripp B, et al. A thymic stromal lymphopoietin gene variant is associated with asthma and airway hyperresponsiveness. J Allergy Clin Immunol. 2009;124:222-9.

[107] Wang IJ, Wu LS, Lockett GA, Karmaus WJ. TSLP polymorphisms, allergen exposures, and the risk of atopic disorders in children. Ann Allergy Asthma Immunol. 2016;116:139-45.

[108] Bønnelykke K, Matheson MC, Pers TH, Granell R, Strachan DP, Alves AC, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies ten loci influencing allergic sensitization. Nat Genet. 2013;45:902-6.

[109] Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, et al. Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;40:368-74.

[110] Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. Nat Genet. 2011;43:887-92.

[111] Ferreira MA, Matheson MC, Tang CS, Granell R, Ang W, Hui J, et al. Genome-wide association analysis identifies 11 risk variants associated with the asthma with hay fever phenotype. J Allergy Clin Immunol. 2014;133:1564-71.

[112] Birben E, Sahiner UM, Karaaslan C, Yavuz TS, Cosgun E, Kalayci O, et al. The genetic variants of thymic stromal lymphopoietin protein in children with asthma and allergic rhinitis. Int Arch Allergy Immunol. 2014;163:185-92.

[113] Bunyavanich S, Melen E, Wilk JB, Granada M, Soto-Quiros ME, Avila L, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is associated with allergic rhinitis in children with asthma. Clin Mol Allergy. 2011;9:1.

[114] Hunninghake GM, Soto-Quiros ME, Avila L, Kim HP, Lasky-Su J, Rafaels N, et al. TSLP polymorphisms are associated with asthma in a sex-specific fashion. Allergy. 2010;65:1566-75.

[115] Mehta AK, Duan W, Doerner AM, Traves SL, Broide DH, Proud D, et al. Rhinovirus infection interferes with induction of tolerance to aeroantigens through OX40 ligand, thymic stromal lymphopoietin, and IL-33. J Allergy Clin Immunol. 2016;137:278-88.

[116] Han J, Dakhama A, Jia Y, Wang M, Zeng W, Takeda K, et al. Responsiveness to respiratory syncytial virus in neonates is mediated through thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:1175-86.

[117] Lee HC, Headley MB, Loo YM, Berlin A, Gale M Jr, Debley JS, et al. Thymic stromal lymphopoietin is induced by respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells and promotes a type 2 response to infection. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:1187-96.

[118] Miazgowicz MM, Elliott MS, Debley JS, Ziegler SF. Respiratory syncytial virus induces functional thymic stromal lymphopoietin receptor in airway epithelial cells. J Inflamm Res. 2013;6:53-61.

[119] Lay MK, Céspedes PF, Palavecino CE, León MA, Díaz RA, Salazar FJ, et al. Human metapneumovirus infection activates the TSLP pathway that drives excessive pulmonary inflammationandviral replication in mice. Eur J Immunol. 2015;45:1680-95.

[120] Gu W, Wang Y, Hao C, Zhang X, Yan Y, Chen Z, et al. Elevated Serum Levels of Thymic Stromal Lymphopoietin in Wheezing Children Infected with Human Metapneumovirus. Jpn J Infect Dis. 2017;70:161-6.

[121] Perez GF, Pancham K, Huseni S, Preciado D, Freishtat RJ, Colberg-Poley AM, et al. Rhinovirus infection in young children is associated with elevated airway TSLP levels. Eur Respir J. 2014;44:1075-8.

[122] Perez GF, Pancham K, Huseni S, Jain A, Rodriguez-Martinez CE, Preciado D, et al. Rhinovirus-induced airway cytokines and respiratory morbidity in severely premature children. Pediatr Allergy Immunol. 2015;26:145-52.

[123] García-García ML, Calvo C, Moreira A, Cañas JA, Pozo F, Sastre B, et al. Thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and periostin in hospitalized infants with viral bronchiolitis. Medicine (Baltimore). 2017;96:e6787.

[124] Brandelius A, Yudina Y, Calvén J, Bjermer L, Andersson M, Persson C, et al. dsRNA-induced expression of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in asthmatic epithelial cells is inhibited by a small airway relaxant. Pulm Pharmacol Ther. 2011;24:59-66.

[125] Uller L, Leino M, Bedke N, Sammut D, Green B, Lau L, et al. Double-stranded RNA induces disproportionate expression of thymic stromal lymphopoietin versus interferon-beta in bronchial epithelial cells from donors with asthma. Thorax. 2010;65:626-32.

[126] Stier MT, Bloodworth MH, Toki S, Newcomb DC, Goleniewska K, Boyd KL, et al. Respiratory syncytial virus infection activates IL-13-producing group 2 innate lymphoid cells through thymic stromal lymphopoietin. J Allergy Clin Immunol. 2016;138:814-24.

[127] Chai R, Liu B, Qi F. The significance of the levels of IL-4, IL-31 and TLSP in patients with asthma and/or rhinitis. Immunotherapy. 2017;9:331-7.

[128] West EE, Kashyap M, Leonard WJ. TSLP: A Key Regulator of Asthma Pathogenesis. Drug Discov Today Dis Mech. 2012;9:10.

[129] Nygaard U, Hvid M, Johansen C, Buchner M, Fölster-Holst R, Deleuran M, et al. TSLP, IL-31, IL-33 and sST2 are new biomarkers in endophenotypic profiling of adult and childhood atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016;30:1930-8.

[130] Sun Q, Liu Y, Zhang S, Liu K, Zhu X, Liu J, et al. Thymic stromal lymphopoietin polymorphisms and allergic rhinitis risk: a systematic review and meta-analysis with 6351 cases and 11472 controls. Int J Clin Exp Med. 2015;8:15752-8.

[131] Rothenberg ME, Spergel JM, Sherrill JD, Annaiah K, Martin LJ, Cianferoni A, et al. Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. Nat Genet. 2010;42:289-91.

[132] Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, et al. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor-alpha (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. J Exp Med. 2011;208:901-8.

[133] Tasian SK, Doral MY, Borowitz MJ, Wood BL, Chen IM, Harvey RC, et al. Aberrant STAT5 and PI3K/mTOR pathway signaling occurs in human CRLF2-rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2012;120:833-42.

[134] van Bodegom D, Zhong J, Kopp N, Dutta C, Kim MS, Bird L, et al. Differences in signaling through the B-cell leukemia oncoprotein CRLF2 in response to TSLP and through mutant JAK2. Blood. 2012;120:2853-63.

[135] De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphpoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. J Exp Med. 2011;208:469-78.

[136] Olkhanud PB, Rochman Y, Bodogai M, Malchinkhuu E, Wejksza K, Xu M, et al. Thymic stromal lymphopoietinis a key mediator of breast cancer progression. J Immunol. 2011;186:5656-62.

[137] Pedroza-Gonzalez A, Xu K, Wu TC, Aspord C, Tindle S, Marches F, et al. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. J Exp Med. 2011;208:479-90.

[138] Pathak K. The expanding role of IL-7 and thymic stromal lymphopoietin as therapeutic target for rheumatoid arthritis. Expert Opin Ther Targets. 2014;18:581-94.

[139] Maizels RM, Hewitson JP, Smith KA. Susceptibility and immunity to helminth parasites. Curr Opin Immunol. 2012;24:459-66.

[140] Varricchi G, Pecoraro A, Marone G, Criscuolo G, Spadaro G, Genovese A, et al. Thymic stromal lymphopoietin isoforms, inflammatory disorders, and cancer. Front Immunol. 2018;9:1595.

[141] Wilson SR, Thé L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. Cell. 2013;155:285-95.

[142] Demehri S, Cunningham TJ, Manivasagam S, Ngo KH, Moradi Tuchayi S, Reddy R, et al. Thymic stromal lymphopoietin blocks early stages of breast carcinogenesis. J Clin Invest. 2016;126:1458-70.

[143] Perez-Andreu V, Roberts KG, Harvey RC, Yang W, Cheng C, Pei D, et al. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. Nat Genet. 2013;45:1494-8.

[144] West EE, Spolski R, Kazemian M, Yu ZX, Kemper C, Leonard WJ. A TSLP-complement axis mediates neutrophil killing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Sci Immunol. 2016;1:5.

[145] Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. J Exp Med. 2006;203:269-73.

[146] Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali JL, Metzger D, Chambon P. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:14795-800.

[147] Hartgring SA, Willis CR, Dean CE Jr, Broere F, van Eden W, Bijlsma JW, et al. Critical proinflammatory role of thymic stromal lymphopoietin and its receptor in experimental autoimmune arthritis. Arthritis Rheum. 2011;63:1878-87.

[148] Lo Kuan E, Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and cancer. J Immunol. 2014;193:4283-8.

[149] Ghirelli C, Sadacca B, Reyal F, Zollinger R, Michea P, Sirven P, et al. No evidence for TSLP pathway activity in human breast cancer. Oncoimmunology. 2016;5:e1178438.

[150] Yue W, Lin Y, Yang X, Li B, Liu J, He R. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) inhibits human colon tumor growth by promoting apoptosis of tumor cells. Oncotarget. 2016;7:16840-54.

[151] Bieber T. Atopic dermatitis. N Engl J Med. 2008;358:1483-94.

[152] Leyva-Castillo JM, Hener P, Jiang H, Li M. TSLP produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic march in mice. J Invest Dermatol. 2013;133:154-63.

[153] Mitchell PD, O'Byrne PM. Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma. Pharmacol Ther. 2017;169:104-12.

[154] Chauhan A, Singh M, Agarwal A, Paul N. Correlation of TSLP, IL-33, and CD4 + CD25 + FOXP3 + T regulatory (Treg) in pediatric asthma. J Asthma. 2015;52:868-72.

[155] Demehri S, Yockey LJ, Visness CM, Jaffee KF, Turkoz A, Wood RA, et al. Circulating TSLP associates with decreased wheezing in non-atopic preschoolchildren: data from the URECA birth cohort. Clin Exp Allergy. 2014;44:851-7.

[156] Lin SC, Huang JJ, Wang JY, Chuang HC, Chiang BL, Ye YL. Upregulated thymic stromal lymphopoietin receptor expression in children with asthma. Eur J Clin Invest. 2016;46:511-9.

[157] Koussih L, Ali A, Shan L, Becker A, Gounni AS. Serum level of thymic stromal lymphopoietin in allergic asthmatic children. Clin Immunol. 2012;145:92-3.

[158] Shi L, Leu SW, Xu F, Zhou X, Yin H, Cai L, et al. Local blockade of TSLP receptor alleviated allergic disease by regulating airway dendritic cells. Clin Immunol. 2008;129:202-10.

[159] Cheng DT, Ma C, Niewoehner J, Dahl M, Tsai A, Zhang J, et al. Thymic stromal lymphopoietin receptor blockade reduces allergic inflammation in a cynomolgus monkey model of asthma. J Allergy Clin Immunol. 2013;132:455-62.

[160] Gauvreau GM, O'Byrne PM, Boulet LP, Wang Y, Cockcroft D, Bigler J, et al. Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses. N Engl J Med. 2014;370:2102-10.

[161] Baatjes AJ, Smith SG, Dua B, Watson R, Gauvreau GM, O'Byrne PM. Treatment with anti-OX40L or anti-TSLP does not alter the frequency of T regulatory cells in allergic asthmatics. Allergy. 2015;70:1505-8.

[162] Corren J, Parnes JR, Wang L, Mo M, Roseti SL, Griffiths JM, et al. Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. N Engl J Med. 2017;377:936-46.

[163] Matera MG, Rogliani P, Calzetta L, Cazzola M. TSLP Inhibitors for Asthma: Current Status and Future Prospects. Drugs. 2020;80:449-58.

[164] Mitchell PD, O'Byrne PM. Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. Chest. 2017;151:1338-44.

[165] Henderson J. Childhood asthma phenotypes in the twenty-first century. Breathe. 2014;10:100-108.

[166] GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Respir Med. 2017;5:691-706.

[167] Garner R, Kohen D. Changes in the prevalence of asthma among Canadian children. Health Rep. 2008;19:45-50.

[168] Bisgaard H, Szefler S. Prevalence of asthma-like symptoms in young children. Pediatr Pulmonol. 2007;42:723-28.

[169] Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. N Engl J Med. 1995;332:133-8.

[170] ISAAC, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, [pristupljeno 13.06.2019.]. Dostupno na: http://isaac.auckland.ac.nz/about/about.php

[171] Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Eur Respir J. 1998;12:315-35.

[172] Mallol J, Solé D, Asher I, Clayton T, Stein R, Soto-Quiroz M. Prevalence of asthma symptoms in Latin America: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Pediatr Pulmonol. 2000;30:439-44.

[173] Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. Lancet. 2006;368:733-43.

[174] Hafner - Kavurić C, Šišul N, Zgrablić M. Zaštita astmatičnog djeteta i epidemiologija alergijskih bolesti u Istri. Arhiv ZMD. 1979;25:75-9.

[175] Kolbas V. Važnost ranog otkrivanja i prevencije dječje astme. Lij Vjes. 1979;101:457-61.

[176] Stipić-Marković A, Pevec B, Pevec MR, Ćustović A. Prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinitis, conjunctivitis and atopic eczema: ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) in a population of schoolchildren in Zagreb. Act Med Croatica. 2003;57:281-5.

[177] 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;13:505-9.

[178] Banac S, Tomulić KL, Ahel V, Rozmanić V, Simundić N, Zubović S, et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in Croatian children is increasing: survey study. Croat Med J. 2004;45:721-6.

[179] Aberle N, Kljaić Bukvić B, Blekić M, Vučković M, Bardak D, Gudelj A, et al. Allergic Diseases and Atopy Among Schoolchildren in Eastern Croatia. Acta Clin Croat. 2018;57:82-90.

[180] Banac S, Rozmanic V, Manestar K, Korotaj-Rozmanic Z, Lah-Tomulic K, Vidovic I, et al. Rising trends in the prevalence of asthma and allergic diseases among school children in the north-west coastal part of Croatia. J. Asthma. 2013;50:810-4.

[181] Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. Lancet. 2018;391:783-800.

[182] Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Thorax. 2007;62:758-66.

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

[184] Cabieses B, Uphoff E, Pinart M, Antó JM, Wright J. A systematic review on the development of asthma and allergic diseases in relation to international immigration: the leading role of the environment confirmed. PLoS One. 2014;9:e105347.

[185] Leynaert B, Sunyer J, Garcia-Esteban R, Svanes C, Jarvis D, Cerveri I, et al. Gender differences in prevalence, diagnosis and incidence of allergic and non-allergic asthma: a population-based cohort. Thorax. 2012;67:625-31.

[186] Andersson M, Hedman L, Bjerg A, Forsberg B, Lundbäck B, Rönmark E. Remission and persistence of asthma followed from 7 to 19 years of age. Pediatrics. 2013;132:435-42.

[187] Global Initiative for Asthma. 2018 GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2018. [Internet]. [pristupljeno 11.11.2018.]. Dostupno na https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/

[188] Brand PLP, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. Eur Respir J. 2008;32:1096-110.

[189] Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, et al. European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. Allergy. 2008;63:5-34.

[190] Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. Lancet. 2008;372:1107-19.

[191] Pavord ID, Beasley R, Agusti A, Anderson GP, Bel E, Brusselle G, et al. After asthma: redefining airways diseases. Lancet. 2018;391:350-400.

[192] Akdis CA, Arkwright PD, Brüggen MC, Busse W, Gadina M, Guttman-Yassky E, et al. Type 2 immunity in the skin and lungs. Allergy. 2020;75:1582-1605.

[193] Fajt ML, Wenzel SE. Development of new therapies for severe asthma. Allergy Asthma Immunol Res. 2017;9:3-14.

[194] Tojima I, Matsumoto K, Kikuoka H, Hara S, Yamamoto S, Shimizu S, et al. Evidence for the induction of Th2 inflammation by group 2 innate lymphoid cells in response to prostaglandin D2 and cysteinyl leukotrienes in allergic rhinitis. Allergy. 2019;74:2417-26.

[195] Meng Y, Wang C, Zhang L. Recent developments and highlights in allergic rhinitis. Allergy. 2019;74:2320-8.

[196] Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Crameri R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: receptors, functions, and roles in diseases. J Allergy Clin Immunol. 2016;138:984-1010.

[197] Sugita K, Steer CA, Martinez-Gonzalez I, Altunbulakli C, Morita H, Castro-Giner F, et al. Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol. 2018;141:300-10.

[198] Toki S, Goleniewska K, Zhang J, Zhou W, Newcomb DC, ZhouB, et al. TSLP and IL-33 reciprocally promote each other's lung protein expression and ILC2 receptor expression to enhance innate type-2 airway inflammation. Allergy. 2020;75:1606-17.

[199] Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D. Alarmins initiate host defense. Adv Exp Med Biol. 2007;601:185-94.

[200] Ro M, Lee AJ, Kim JH. 5-/12-Lipoxygenase-linked cascade contributes to the IL-33-induced synthesis of IL-13 in mast cells, thus promoting asthma development. Allergy. 2018;73:350-60.

[201] Boonpiyathad T, Sozener ZC, Satitsuksanoa P, Akdis CA. Immunologic mechanisms in asthma. Semin Immunol. 2019;46:101333.

[202] Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont LJ, Ceuppens JL, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. Thorax. 2006;61:202-8.

[203] Chesné J, Braza F, Mahay G, Brouard S, Aronica M, Magnan A. IL-17 in severe asthma. Where do we stand? Am J Respir Crit Care Med. 2014;190:1094-101.

[204] Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. Nat Immunol. 2010;11:577-84.

[205] Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation Trends Immunol. 2015;36:189-95.

[206] Jain VV, Perkins DL, Finn PW. Costimulation and allergic responses: immune and bioinformatic analyses. Pharmacol Ther. 2008;117:385-92.

[207] Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. Chem Immunol Allergy. 2006;91:59-75.

[208] Jacquet A. Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response. Clin Exp Allergy. 2011;41:305-11.

[209] Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. Immunity. 2009;31:412-24.

[210] Kemeny DM. The role of the T follicular helper cells in allergic disease. Cell Mol Immunol. 2012;9:386-9.

[211] Perros F, Hoogsteden HC, Coyle AJ, Lambrecht BN, Hammad H. Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. Allergy. 2009;64:995-1002.

[212] Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. Nat Rev Dis Primers 2015;1:15025.

[213] Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. J Allergy Clin Immunol. 2006;117:1277-84.

[214] Ma LL, O'Byrne PM. The pharmacological modulation of allergen-induced asthma. Inflammopharmacology. 2013;21:113-24.

[215] Diamant Z, Gauvreau GM, Cockcroft DW, Boulet LP, Sterk PJ, de Jongh FH, et al. Inhaled allergen bronchoprovocation tests. J Allergy Clin Immunol. 2013;132:1045-55.

[216] Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P, et al. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. Chest. 2010;138:1140-7.

[217] Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. Nat Immunol. 2015;16:45-56.

[218] Barnig C, Cernadas M, Dutile S, Liu X, Perrella MA, Kazani S, et al. Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. Sci Transl Med. 2013;5:174.

[219] O'Reilly R, Ullmann N, Irving S, Bossley CJ, Sonnappa S, Zhu J, et al. Increased airway smooth muscle in preschool wheezers who have asthma at school age. J Allergy Clin Immunol. 2013;131:1024-32.

[220] Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. N Eng J Med. 2002;346:1699-705.

[221] Brightling CE, Gupta S, Gonem S, Siddiqui S. Lung damage and airway remodelling in severe asthma. Clin Exp Allergy. 2012;42:638-49.

[222] Hartley RA, Barker BL, Newby C, Pakkal M, Baldi S, Kajekar R, et al. Relationship between lung function and quantitative computed tomographic parameters of airway remodeling, air trapping, and emphysema in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a single-center study. J Allergy Clin Immunol. 2016;137:1413-22.

[223] Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. Paediatr Respir Rev. 2004;5:155-61.

[224] McGeachie MJ, Yates KP, Zhou X, Guo F, Sternberg AL, Van Natta ML, et al. Patterns of growth and decline in lung function in persistent childhood asthma. N Engl J Med. 2016;374:1842-52.

[225] Smoliga JM, Weiss P, Rundell KW. Exercise induced bronchoconstriction in adults: evidence based diagnosis and management. BMJ. 2016;352:6951.

[226] de Nijs SB, Venekamp LN, Bel EH. Adult-onset asthma: is it really different? Eur Respir Rev. 2013;22:44-52.

[227]Brightling CE. Chronic cough due to nonasthmatic eosinophilic bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. Chest. 2006;129:116-21.

[228] Desai D, Brightling C. Cough due to asthma, cough-variant asthma and non-asthmatic eosinophilic bronchitis. Otolaryngol Clin North Am. 2010;43:123-30.

[229] Marks GB, Colquhoun JR, Girgis ST, Koski MH, Treloar AB, Hansen P, et al. Thunderstorm outflows preceding epidemics of asthma during spring and summer. Thorax. 2001;56:468-71.

[230] Covar RA, Macomber BA, Szefler SJ. Medications as asthma triggers. Immunol Allergy Clin North Am. 2005;25:169-90.

[231] Rajan JP, Wineinger NE, Stevenson DD, White AA. Prevalence of aspirin-exacerbated respiratory disease among asthmatic patients: a meta-analysis of the literature. J Allergy Clin Immunol. 2015;135:676-81.

[232] British Thoracic Society (BTS), Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN): British guidelines on the management of asthma. 2016. [Internet]. [pristupljeno 05.11.2018.]. Dostupno na https://www.brit-thoracic.org.uk/document-library/clinical-information/asthma/btssign-asthma-guideline-2016/

[233] Ducharme FM, Tse SM, Chauhan B. Diagnosis, management, and prognosis of preschool wheeze. Lancet. 2014;383:1593-604.

[234] Pedersen S. Preschool asthma-not so easy to diagnose. Prim Care Respir J. 2007;16:4-6.

[235] Joos GF, O'Connor B, Anderson SD, Chung F, Cockcroft DW, Dahlén B, et al. Indirect airway challenges. Eur Respir J. 2003;21:1050-68.

[236] Parsons JP, Hallstrand TS, Mastronarde JG, Kaminsky DA, Rundell KW, Hull JH, et al . An official American Thoracic Society clinical practice guideline: exercise-induced bronchoconstriction. Am J Respir Crit Care Med. 2013;187:1016-27.

[237] Brouwer AFJ, Roorda RJ, Duiverman EJ, Brand PLP. Reference values for peak flow and FEV1 variation in healthy schoolchildren using home spirometry. Eur Respir J. 2008;32:1262-8.

[238] Tan WC, Vollmer WM, Lamprecht B, Mannino DM, Jithoo A, Nizankowska-Mogilnicka E, et al. Worldwide patterns of bronchodilator responsiveness: results from the Burden of Obstructive Lung Disease study. Thorax. 2012;67:718-26.

[239] Boulet LP. Influence of comorbid conditions on asthma. Eur Respir J. 2009;33:897-906.

[240] Dixon AE, Kaminsky DA, Holbrook JT, Wise RA, Irvin CG. Allergic rhinitis and sinusitis in asthma: differential effects on symptoms and pulmonary function. Chest. 2006;130:429-35.

[241] Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ,et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. Eur Respir J. 2014;43:343-73.

[242] van Maanen A, Wijga AH, Gehring U, Postma DS, Smit HA, Oort FJ, et al. Sleep in children with asthma: results of the PIAMA study. Eur Respir J. 2013;41:832-7.

[243] Parsons JP, Mastronarde JG. Gastroesophageal reflux disease and asthma. Curr Opin Pulm Med. 2010;16:60-3.

[244] Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. Allergy. 2012;67:835-46.

[245] Baena-Cagnani C, Rossi GA, Canonica GW. Airway remodeling in children: when does it start? Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2007;7:196-200.

[246] Wilson N. The significance of early wheezing. Clin Exp Allergy. 1994;234:522-9.

[247] Stein RT, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Lombardi E, Taussiget L, et al. Peak flow variability, metacholine responsivness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood. Thorax. 1997;52:946-52.

[248] Turner SW, Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Judge PK, Cox M, et al. The relationship between infant airway function, childhood airway responsiveness, and asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169:921-7.

[249] Martinez FD. What Have We Learned From the Tucson Children's Respiratory Study? Paediatr Respir Rev. 2002;3:193-7.

[250] Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. Lancet. 1999;354:541-5.

[251]Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, Bacharier LB, Boehmer SJ, Krawiec M, et al. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. J Allergy Clin Immunol. 2004;114:1282-7.

[252] Guilbert TW, Mauger DT, Lemanske RF Jr. Childhood asthma-predictive phenotype. J Allergy Clin Immunol Pract. 2014;2:664-70.

[253] Lowe LA, Simpson A, Woodcock A, Morris J, Murray CS, Custovic A.; NAC Manchester Asthma and Allergy Study Group. Wheeze phenotypes and lung function in preschool children. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:231-7.

[254] Savenije OE, Granell R, Caudri D, Koppelman GH, Smit HA, Wijga A , et al. Comparison of childhood wheezing phenotypes in 2 birth cohorts: ALSPAC and PIAMA. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:1505-12.

[255] Henderson J, Granell R, Heron J, Sherriff A, Simpson A, Woodcock A, et al. Associations of wheezing phenotypes in the first 6 years of life with atopy, lung function and airway responsiveness in mid-childhood. Thorax. 2008;63:974-80.

[256] Belgrave DCM, Simpson A, Semic-Jusufagic A, Murray CS, Buchan I, Pickles A, et al. Joint modeling of parentally reported and physician-confirmed wheeze identifies children with persistent troublesome wheezing. J Allergy Clin Immunol. 2013;132:575-83.

[257] Cowan T, Guilbert TW. Pediatric asthma phenotypes. Curr Opin Pediatr. 2012;24:344-51.

[258] Brussee JE, Smit HA, Koopman LP, Wijga AH, Kerkhof M, Corver K, et al. Interrupter resistance and wheezing phenotypes at 4 years of age. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169:209-13.

[259] Collins SA, Pike KC, Inskip HM, Godfrey KM, Roberts G, Holloway JW, et al, and Southampton Women's Survey Study Group. Validation of novel wheeze phenotypes using longitudinal airway function and atopic sensitization data in the first 6 years of life: evidence from the Southampton Women's survey. Pediatr Pulmonol. 2013;48:683-92.

[260] Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. Nature. 2007;448:470-3.

[261] Galanter J, Choudhry S, Eng C, Nazario S, Rodríguez-Santana JR, Casal J, et al. ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177:1194-200.

[262] Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. N Engl J Med. 2010;363:1211-21.

[263] Granell R, Henderson AJ, Timpson N, St Pourcain B, Kemp JP, Ring SM, et al. Examination of the relationship between variation at 17q21 and childhood wheeze phenotypes. J Allergy Clin Immunol. 2013;131:685-94.

[264] Calışkan M, Bochkov YA, Kreiner-Møller E, Bønnelykke K, Stein MM, Du G, et al. Rhinovirus wheezing illness and genetic risk of childhood-onset asthma. N Engl J Med. 2013;368:1398-407.

[265] Smith JA, Drake R, Simpson A, Woodcock A, Pickles A, Custovic A. Dimensions of respiratory symptoms in preschool children: population-based birth cohort study. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177:1358-63.

[266] Spycher BD, Silverman M, Brooke AM, Minder CE, Kuehni CE. Distinguishing phenotypes of childhood wheeze and cough using latent class analysis. Eur Respir J. 2008;31:974-81.

[267] Wassall HJ, Devenny AM, Daud Khan S, Ninan TK, Russell G. A comparison of virus-associated and multi-trigger wheeze in school children. J Asthma. 2005;42:737-44.

[268] Doull IJM, Lampe FC, Smith S, Schreiber J, Freezer NJ, Holgate ST. Effect of inhaled corticosteroids on episodes of wheezing associated with viral infection in school age children: randomised double blind placebo controlled trial. Br Med J. 1997;315:858-62.

[269] Mihatov Štefanović I, Čičak B, Vrsalović R. Fenotipovi astme dječje dobi. Paediatr Croat. 2014;58 (Supl 1):79-83.

[270] Schultz A, Brand PL. Episodic viral wheeze and multiple trigger wheeze in preschool children: a useful distinction for clinicians? Paediatr Respir Rev. 2011;12:160-4.

[271] Brusse JE, Smit HA, Kerkhof M, Koopman LP, Wijga AH, Postma DS, et al. Exhaled nitric oxide in 4-year-old children: relationship with asthma and atopy. Eur Respir J. 2005;25:455-61.

[272] Caudri D, Wijga A, Hoekstra MO, Kerkhof M, Koppelman GH, Brunekreef B, et al. Prediction of asthma in symptomatic preschool children using exhaled nitric oxide, Rint and specific IgE. Thorax. 2010;65:801-7.

[273] Chawes BL, Buchvald F, Bischoff AL, Loland L, Hermansen M, Halkjaer LB, et al. Elevated exhaled nitric oxide in high-risk neonates precedes transient early but not persistent wheeze. Am J Respir Crit Care med. 2010;182:138-42.

[274] Ducharme FM, Morin J, Davis GM, Gingras J, Noya FJ. High physician adherence to phenotype-specific asthma guidelines, but large variability in phenotype assessment in children. Curr Med Res Opin. 2012;28:1561-70.

[275] Schultz A, Devadason SG, Savenije OE, Sly PD, Le Souef PN, Brand PL. The transient value of classifying preschool wheeze into episodic viral wheeze and multiple trigger wheeze. Acta Paediatr. 2010;99:56-60.

[276] Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. Respirology. 2006;11:54-61.

[277] Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Wilson NM, Hansel TT, et al. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. Pediatr Pulmonol. 2005;39:318-24.

[278] Mokhallati N, Guilbert TW. Moving towards precision care for childhood asthma. Curr Opin Pediatr. 2016;28:331-8.

[279] Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. Thorax 2003; 58:116-21.

[280] Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? Thorax. 1999;54:268-72.

[281] Del Giacco SR, Bakirtas A, Bel E, Custovic A, Diamant Z, Hamelmann E, et al. Allergy in severe asthma. Allergy. 2017;72:207-20.

[282] Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. Lancet. 2002;360:1313-22.

[283] de Groot JC, Ten Brinke A, Bel EH. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. ERJ Open Res. 2015;1:00024-2015.

[284] Thavagnanam S, Williamson G, Ennis M, Heaney LG, Shields MD. Does airway allergic inflammation pre-exist before late onset wheeze in children? Pediatr Allergy Immunol. 2010;21:1002-7.

[285] van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164:2107-13.

[286] Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. Thorax. 2002;57:875-9.

[287] Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. Thorax. 2012;67:675-81.

[288] Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, et al. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without TH2 cytokines. J Allergy Clin Immunol. 2012;129:974-82.

[289] Herr M, Just J, Nikasinovic L, Foucault C, Le Marec AM, Giordanella JP, et al. Risk factors and characteristics of respiratory and allergic phenotypes in early childhood. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:389-96.

[290] Park JA, Sharif AS, Tschumperlin DJ, Lau L, Limbrey R, Howarth P, et al. Tissue factor-bearing exosome secretion from human mechanically stimulated bronchial epithelial cells in vitro and in vivo. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:1375-83.

[291] Kuo CS, Pavlidis S, Loza M, Baribaud F , Rowe A, Pandis I, et al. A transcriptome-driven analysis of epithelial brushings and bronchial biopsies to define asthma phenotypes in U-BIOPRED. Am J Respir Crit Care Med. 2016;195:443-55.

[292] Wenzel SE. Emergence of biomolecular pathways to define novel asthma phenotypes. Type-2 immunity and beyond. Am J Respir Cell Mol Biol. 2016;55:1-4.

[293] Parulekar AD, Diamant Z, Hanania NA. Role of biologics targeting type 2 airway inflammation in asthma: what have we learned so far? Curr Opin Pulm Med. 2017;23:3-11.

[294] Robinson D, Humbert M, Buhl R, Cruz AA, Inoue H, Korom S, et al. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. Clin Exp Allergy 2017;47:161-75.

[295] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma: present in most, absent in many. Nat Rev Immunol. 2015;15:57-65.

[296] Borish L. The immunology of asthma: asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. Ann Allergy Asthma Immunol. 2016;117:108-14.

[297] Levine SJ, Wenzel SE. Narrative review: the role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes. Ann Intern Med. 2010;152:232-7.

[298] Barlow JL, McKenzie AN. Type-2 innate lymphoid cells in human allergic disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2014;14:397-403.

[299] Licari A, Castagnoli R, Brambilla I, Marseglia A, Tosca MA, Marseglia GL, et al. Asthma Endotyping and Biomarkers in Childhood Asthma. Pediatr Allergy Immunol Pulmonol. 2018;31:44-55.

[300] Parulekar AD, Diamant Z, Hanania NA. Role of T2 inflammation biomarkers in severe asthma. Curr Opin Pulm Med. 2016;22:59-68.

[301] Beydon N, Davis SD, Lombardi E, Allen JL, Arets HG, Aurora P, et al; the American Thoracic Society/European Respiratory Society Working Group on Infant and Young Children Pulmonary Function Testing. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: pulmonary function testing in preschool children. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175:1304-45.

[302] Saude EJ, Skappak CD, Regush S, Cook K, Ben-Zvi A, Becker A, et al. Metabolomic profiling of asthma: diagnostic utility of urine nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:757-64.

[303] Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. Am J Resp Crit Care Med. 2000;162:1403-6.

[304] Devulapalli CS, Carlsen KCL, Haland G, Munthe-Kaas MC, Pettersen M, Mowinckel P, et al. Severity of obstructive airways disease by age 2 years predicts asthma at 10 years of age. Thorax. 2008;63:8-13.

[305] Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Holgate ST, Arshad SH. Predicting persistent disease among children who wheeze during early life. Eur Respir J. 2003;22:767-71.

[306] Savenije OE, Kerkhof M, Koppelman GH, Postma DS. Predicting who will have asthma at school age among preschool children. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:325-31.

[307] Brand PL. The asthma predictive index: not a useful tool in clinical practice. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:293-4.

[308] Castro-Rodriguez JA. The asthma predictive index: a very useful tool for predicting asthma in young children. J Allergy Clin Immunol. 2010;126:212-6.

[309] Castro-Rodriguez JA, Cifuentes L, Rodriguez-Martinez CE. The asthma predictive index remains a useful tool to predict asthma in young children with recurrent wheeze in clinical practice. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:1082-3.

[310] Papi A, Nicolini G, Baraldi E, Boner AL, Cutrera R, Rossi GA, et al, the BEclomethasone and Salbutamol Treatment (BEST) for Children Study Group. Regular vs prn nebulized treatment in wheeze preschool children. Allergy. 2009;64:1463-71.

[311] Bacharier LB, Phillips BR, Zeiger RS, Szefler SJ, Martinez FD, Lemanske RF Jr, et al, and the CARE Network. Episodic use of an inhaled corticosteroid or leukotriene receptor antagonist in preschool children with moderate-to-severe intermittent wheezing. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:1127-35.

[312] Grad R, Morgan WJ. Long-term outcomes of early-onset wheeze and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:299-307.

[313] Rø AD, Simpson MR, Storrø O, Johnsen R, Videm V, Øien T. The predictive value of allergen skin prick tests and IgE tests at preschool age: the PACT study. Pediatr Allergy Immunol. 2014;25:691-8.

[314] Piippo-Savolainen E, Remes S, Kosppi M. Does blood eosinophilia in wheezing infants predict later asthma? A prospective 18-20 years follow-up. Allergy Asthma Proc. 2007;28:163-9.

[315]Anderson HM, Lemanske RF Jr, Arron JR, Holweg CTJ, Rajamanickam V, Gangnon RE, et al. Relationships among aeroallergen sensitization, peripheral blood eosinophils, and periostin in pediatric asthma development. J Allergy Clin Immunol. 2017;139:790-6.

[316] Leonardi NA, Spycher BD, Strippoli MPF, Frey U, Silverman M, Kuehni CE. Validation of the Asthma Predictive Index and comparison with simpler clinical prediction rules. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:1466-72.

[317] Rodriguez-Martinez CE, Sossa-Briceňo MP, Castro-Rodriguez JA. Factors predicting persistence of early wheezing through childhood and adolescence: a systematic review of the literature. J Asthma and Allergy. 2017;10:83-98.

[318] Martinez FD, Vercelli D. Asthma. Lancet. 2013;382:1360-72.

[319] Toncheva AA, Potaczek DP, Schedel M, Gersting SW, Michel S, Krajnov N, et al. Childhood asthma is associated with mutations and gene expression differences of ORMDL genes that can interact. Allergy. 2015;70:1288-99.

[320] Kreiner-Møller E, Strachan DP, Linneberg A, Husemoen LL, Bisgaard H, Bønnelykke K. 17q21 gene variation is not associated with asthma in adulthood. Allergy. 2015;70:107-14.

[321] Bouzigon E, Corda E, Aschard H, Dizier MH, Boland A, Bousquet J, et al. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. N Engl J Med. 2008;359:1985-94.

[322] Smit LAM, Bouzigon E, Pin I, Siroux V, Monier F, Aschard H, et al, and the EGEA Cooperative Group. 17q21 variants modify the association between early respiratory infections and asthma. Eur Respir J. 2010;36:57-64.

[323] Wjst M, Sargurupremraj M, Arnold M. Genome-wide association studies in asthma: what they really told us about pathogenesis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2013;13:112-8.

[324] Martel MJ, Rey E, Beauchesne MF, Malo JL, Perreault S, Forget A, et al. Control and severity of asthma during pregnancy are associated with asthma incidence in off spring: two-stage case-control study. Eur Respir J. 2009;34:579-87.

[325] Cox DW, Mullane D, Zhang GC, Turner SW, Hayden CM, Goldblatt J, et al. Longitudinal assessment of airway responsiveness from 1 month to 18 years in the PIAF birth cohort. Eur Respir J. 2015;46:1654-61.

[326] Bisgaard H, Jensen SM, Bonnelykke K. Interaction between asthma and lung function growth in early life. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185:1183-9.

[327] Firoozi F, Lemiere C, Ducharme FM, Beauchesne MF, Perreault S, Bérard A, et al. Effect of maternal moderate to severe asthma on perinatal outcomes. Respir Med. 2010;104:1278-87.

[328] Sonnenschein-van der Voort AM, Jaddoe VW, Raat H, Moll HA, Hofman A, de Jongste JC, et al. Fetal and infant growth and asthma symptoms in preschool children: the Generation R Study. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185:731-7.

[329] Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ,Martinez FD. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:661-75.

[330] Gruzieva O, Bergström A, Hulchiy O, Kull I, Lind T, Melén E, et al. Exposure to air pollution from traffic and childhood asthma until 12 years of age. Epidemiology. 2013;24:54-61.

[331] Ryan PH, Bernstein DI, Lockey J, Reponen T, Levin L, Grinshpun S, et al. Exposure to traffi c-related particles and endotoxin during infancy is associated with wheezing at age 3 years. Am J Respir Crit Care Med. 2009;180:1068-75.

[332] Perzanowski MS, Miller RL, Thorne PS, Barr RG, Divjan A, Sheares BJ, et al. Endotoxin in inner-city homes: associations with wheeze and eczema in early childhood. J Allergy Clin Immunol. 2006;117:1082-9.

[333] Litonjua AA, Milton DK, Celedon JC, Ryan L, Weiss ST, Gold DR. A longitudinal analysis of wheezing in young children: the independent eff ects of early life exposure to house dust endotoxin, allergens, and pets. J Allergy Clin Immunol. 2002;110:736-42.

[334] Amberbir A, Medhin G, Alem A, Britton J, Davey G, Venn A. The role of acetaminophen and geohelminth infection on the incidence of wheeze and eczema: a longitudinal birth-cohort study. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:165-70.

[335] Nicolaou NC, Simpson A, Lowe LA, Murray CS, Woodcock A, Custovic A. Day-care attendance, position in sibship, and early childhood wheezing: a population-based birth cohort study. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:500-6.

[336] Custovic A, Rothers J, Stern D, Simpson A, Woodcock A, Wright AL, et al. Effect of day care attendance on sensitization and atopic wheezing differs by Toll-like receptor 2 genotype in 2 population-based birth cohort studies. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:390-7.

[337] Wu P, Dupont WD, Griffin MR, Carroll KN, Mitchel EF, Gebretsadik T, et al. Evidence of a causal role of winter virus infection during infancy in early childhood asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178:1123-9.

[338] Holt PG, Sly PD. Prevention of allergic respiratory disease in infants: current aspects and future perspectives. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2007;7:547-55.

[339] Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson PD, Sigurbergsson F, Bjarnason R, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. Thorax. 2010;65:1045-52.

[340] Lemanske RF Jr, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. J Allergy Clin Immunol. 2005;116:571-7.

[341] Kusel MM, de Klerk NH, Kebadze T, Vohma V, Holt PG, Johnston SL, et al. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007;119:1105-10.

[342] Guilbert TW, Singh AM, Danov Z, Evans MD, Jackson, Burton R, et al. Decreased lung function after preschool wheezing rhinovirus illnesses in children at risk to develop asthma. J Allergy Clin Immunol. 2011;128:532-8.

[343] Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178:667-72.

[344] Leigh R, Oyelusi W, Wiehler S, Koetzler R, Zaheer RS, Newton R, et al. Human rhinovirus infection enhances airway epithelial cell production of growth factors involved in airway remodeling. J Allergy Clin Immunol. 2008;121:1238-45.

[345] Zhu L, Lee P-K, Lee W-M, Zhao Y, Yu D, Chen Y. Rhinovirus-induced major airway mucin production involves a novel TLR3-EGFRdependent pathway. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;40:610-9.

[346] Proud D, Turner RB, Winther B, Wiehler S, Tiesman JP, Reichling TD, et al. Gene expression profiles during in vivo human rhinovirus infection: insights into the host response. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178:962-8.

[347] Steinke JW, Borish L. Immune responses in rhinovirus-induced asthma exacerbations. Curr Allergy Asthma Rep. 2016;16:78.

[348] Bisgaard H, Hermansen MN, Bønnelykke K, Stokholm J, Baty F, Skytt NL, et al. Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children: prospective birth cohort study. BMJ. 2010;341:c4978.

[349] Rubner FJ, Jackson DJ, Evans MD, Gangnon RE, Tisler CJ, Pappas TE, et al. Early life rhinovirus wheezing, allergic sensitization, and asthma risk at adolescence. J Allergy Clin Immunol. 2017;139:501-7.

[350] Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. J Exp Med. 2005;201:937-47.

[351] Bisgaard H, Hermansen MN, Loland L, Halkjaer LB, Buchvald F. Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. N Engl J Med. 2006;354:1998-2005.

[352] van der Gugten AC, Koopman M, Evelein AMV, Verheij TJM, Uiterwaal CSPM, van der Ent CK. Rapid early weight gain is associated with wheeze and reduced lung function in childhood. Eur Respir J. 2012;39:403-10.

[353] Rzehak P, Wijga AH, Keil T, Eller E, Bindslev-Jensen C, Smit HA, et al, and the GA^{2}LEN-WP 1.5 Birth Cohorts. Body mass index trajectory classes and incident asthma in childhood: results from 8 European Birth Cohorts - a Global Allergy and Asthma European Network initiative. J Allergy Clin Immunol. 2013;131:1528-36.

[354] Flexeder C, Thiering E, Brüske I, Koletzko S, Bauer CP, Wichmann HE, et al, and the GINIplus and LISAplus Study Group. Growth velocity during infancy and onset of asthma in school-aged children. Allergy. 2012;67:257-64.

[355] Rasmussen F, Hancox RJ. Mechanisms of obesity in asthma. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2014;14:35-43.

[356] Scott HA, Wood LG, Gibson PG. Role of Obesity in Asthma: Mechanisms and Management Strategies. Curr Allergy Asthma Rep. 2017;17:53.

[357] Tantisira KG, Weiss ST. Complex interactions in complex traits: obesity and asthma. Thorax. 2001;56:ii64-73.

[358] Wilson SJ, Ward JA, Sousa AR, Corfield J, Bansal AT, De Meulder B, et al. Severe asthma exists despite suppressed tissue inflammation: findings of the U-BIOPRED study. Eur Respir J. 2016;48:1307-19.

[359] Liu AH, Zeiger R, Sorkness C, Mahr T, Ostrom N, Burgess S, et al. Development and cross-sectional validation of the Childhood Asthma Control Test. J Allergy Clin Immunol. 2007;119:817-25.

[360] Shay LA, Lafata JE. Where is the evidence? A systematic review of shared decision making and patient outcomes. Med Decis Making. 2015;35:114-31.

[361] Boyd M, Lasserson TJ, McKean MC, Gibson PG, Ducharme FM, Haby M. Interventions for educating children who are at risk of asthma-related emergency department attendance. Cochrane Database Syst Rev. 2009;2:CD001290.

[362] Pinnock H, Parke HL, Panagioti M, Daines L, Pearce G, Epiphaniou E, et al. Systematic meta-review of supported self-management for asthma: a healthcare perspective. BMC Med. 2017;15:64.

[363] Melani AS, Bonavia M, Cilenti V, Cinti C, Lodi M, Martucci P, et al. Inhaler mishandling remains common in real life and is associated with reduced disease control. Respir Med. 2011;105:930-8.

[364] Stelmach I, Grzelewski T, Majak P, Jerzynska J, Stelmach W, Kuna P. Effect of different antiasthmatic treatments on exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma. J Allergy Clin Immunol. 2008;121:383-9.

[365] Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemière C, Pizzichini E, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbation. Eur Respir J. 2006;27:483-94.

[366] Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, et al. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. J Allergy Clin Immunol. 2004;113:59-66.

[367] Heinzerling L, Mari A, Bergmann KC, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, et al. The skin prick test - European standards. Clin Transl Allergy. 2013;3:3.

[368] Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. Eur Respir J. 2005; 26:319-38.

[369] Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests. Eur Respir J. 2005; 26:948-68.

[370] Centers for disease control and prevetion - CDC (2000). Growth charts. [pristupljeno 13.06.2020.]. Dostupno na: https://www.cdc.gov/growthcharts/data/set2clinical/cj41c073.pdf
https://www.cdc.gov/growthcharts/data/set1clinical/cj41l024.pdf

[371] Just J, Bourgoin-Heck M, Amat F. Clinical phenotypes in asthma during childhood. Clin Exp Allergy. 2017;47:848-55.

[372] Sivan Y, Gadish T, Fireman E, Soferman R. The use of exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma in school children. J Pediatr. 2009;155:211-6.

[373] Chang D, Yao W, Tiller CJ, et al. Exhaled nitric oxide during infancy as a risk factor for asthma and airway hyperreactivity. Eur Respir J. 2015;45:98.

[374] Sánchez-García S, Habernau Mena A, Quirce S. Biomarkers in inflammometry pediatric asthma: utility in daily clinical practice. Eur Clin Respir J. 2017;4:1356160.

[375] Roan F, Obata-Ninomiya K, Ziegler SF. Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. J Clin Invest. 2019;129:1441-51.

[376] Weiss ST, Gold DR. Gender differences in asthma. Pediatr Pulmonol. 1995;19:153-5.

[377] Bibi H, Shoseyov D, Feigenbaum D, Nir P, Shiachi R, Scharff S, et al. Comparison of positive allergy skin tests among asthmatic children from rural and urban areas living within small geographic area. Ann Allergy Asthma Immunol. 2002;88:416-20.

[378] Green RJ, Klein M, Becker P, Halkas A, Lewis H, Kitchin O, Moodley T, Masekela R. Disagreement among common measures of asthma control in children. Chest 2013;143:117-22.

[379] Lesko LJ, Atkinson AJ. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. Annul Rev Pharmacol and Toxicol 2001;41:347-66.

[380] Dodig s, Richter D, Zrinski-Topić R. Inflammatory markers in childhood asthma. Clin Chem Lab Med 2011;49:587-99.

[381] Glück J, Rymarczyk B, Kasprzak M, Rogala B. Increased Levels of Interleukin-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin in Exhaled Breath Condensate in Chronic Bronchial Asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2016;169:51-6.

[382] Górska K, Nejman-Gryz P, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R. Comparison of Thymic Stromal Lymphopoietin Concentration in Various Human Biospecimens from Asthma and COPD Patients Measured with Two Different ELISA Kits. Adv Exp Med Biol. 2017;955:19-27.

[383] Nejman-Gryz P, Górska K, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Krenke R. Periostin and Thymic Stromal Lymphopoietin-Potential Crosstalk in Obstructive Airway Diseases. J Clin Med. 202015;9:3667.

[384] Cassell HR, Stern DA, Wright AL, Martinez FD. Early onset eczema and the association with early onset asthma. J Allergy Clin Immunol. 2018;141:130.

[385] Shore SA. Obesity and asthma: possible mechanisms. J Allergy Clin Immunol. 2008;121:1087-93.

[386] Hamilton D, Lehman H. Asthma Phenotypes as a Guide for Current and Future Biologic Therapies. Clin Rev Allergy Immunol. 2020;59:160-74.

[387] Ford ES. The epidemiology of obesity and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2005; 115:897-909.

[388] Telenga ED, Tideman SW, Kerstjens HA, Hacken NH, Timens W, Postma DS, et al. Obesity in asthma: more neutrophilic inflammation as a possible explanation for a reduced treatment response. Allergy 2012; 67:1060–8.

[389] Lugogo NL, Bappanad D, Kraft M. Obesity, metabolic dysregulation and oxidative stress in asthma. Biochim Biophys Acta. 2011;1810:1120-6.

[390] Morishita R, Franco Mdo C, Suano-Souza FI, Sole D, Puccini RF, Strufaldi MW. Body mass index, adipokines and insulin resistance in asthmatic children and adolescents. J Asthma 2016;53:478–84.

[391] Sutherland TJ, Cowan JO, Young S et al. The association between obesity and asthma: interactions between systemic and airway inflammation. Am J Respir Crit Care Med 2008; 178:469-75.

[392] Scott HA, Gibson PG, Garg ML, Wood LG. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. Eur Respir J 2011; 38:594–602.

[393] Paplinska-Goryca M, Misiukiewicz-Stepien P, Proboszcz M, Nejman-Gryz P, Gorska K, Krenke R. The Expressions of TSLP, IL-33, and IL-17A in Monocyte Derived Dendritic Cells from Asthma and COPD Patients are Related to Epithelial-Macrophage Interactions. Cells. 2020;9:1944.

[394] Silva FMC, Oliveira EE, Gouveia ACC, Brugiolo ASS, Alves CC, Correa JOA, et al. Obesity promotes prolonged ovalbumin-induced airway inflammation modulating T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses in BALB/c mice. Clin Exp Immunol. 2017;189:47-59.

[395] Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. Nat Med. 2012;18:716-25.

[396] Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. Nat Immunol 2013;14:536-42.

[397] Bel EH. Moving Upstream - Anti-TSLP in Persistent Uncontrolled Asthma. N Engl J Med. 2017;377:989-91.

[398] Ojanguren I, Martin JG, Lemiere C. Thymic Stromal Lymphopoietin: A Promising Target in the Treatment of Asthma? Arch Bronconeumol. 2017;53:545-6.

[399] Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med. 2009;360:973-84.

[400] Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. N Engl J Med. 2013;368:2455-66.

[401] Malinovschi A, Janson C, Borres M, Alving K. Simultaneously increased fraction of exhaled nitric oxide levels and blood eosinophil counts relate to increased asthma morbidity. J Allergy Clin Immunol. 2016;138:1301-8.

[402] Busse WW. A role for neutrophils in asthma exacerbations. Nat Med. 2017;23:658-9.

[403] Kugelberg E. Infection: TSLP complements neutrophil killing of bacteria. Nat Rev Immunol. 2017;17:4-5.

11. ŽIVOTOPIS

Renata Vrsalović, djevojački Smoljan, rođena je u Zagrebu 12. kolovoza 1972. gdje je završila osnovnu školu i prva tri razreda Prirodoslovno matematičkog obrazovnog centra (MIOC), a 4. razred srednje škole završila je kao sudionik međunarodne razmjene u Jenks High School, Tulsa, Oklahoma, SAD. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je u srpnju 1998. s odličnim uspjehom. U rujnu 1998. godine boravila je na stručnoj praksi u Zavodu za ginekologiju i opstetriciju Sveučilišne Klinike u Hamburgu (Universitäts Krankenhaus Eppendorf). Obavezni pripravnički staž obavila je u Kliničkoj bolnici Dubrava. Nakon položenoga stručnog ispita zaposlila se kao znanstveni novak u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević“, te je odslušala stručni poslijediplomski studij iz infektologije. Znanstveni poslijediplomski studij Medicinske znanosti upisala je 1999. godine, a u siječnju 2003. obranila je znanstveni magistarski rad „Dijagnostika i terapija infekcija prostate uzrokovanih *Chlamydia trachomatis*“, mentor prof. dr. sc. Višnja Škerk. Specijalizaciju iz pedijatrije započela je 2004. godine u KBC Sestre Milosrdnice. Tijekom specijalizacije završila je poslijediplomski studij Klinička pedijatrija. Specijalistički ispit iz pedijatrije položila je 2009., a subspecijalistički ispit iz pedijatrijske pulmologije 2013. godine. Tijekom dviju školskih godina predavala je pedijatriju kao vanjski suradnik u Srednjoj medicinskoj školi. 2007. položila je Europski tečaj naprednog održavanja života djece i novorođenčadi, 2012. je završila tečaj pedijatrijske fleksibilne bronhoskopije u organizaciji Europskog respiratornog društva (ERS) u Parizu, a 2017. je završila tečaj iz ultrazvuka pluća.

U svom dosadašnjem stručnom i znanstvenom radu objavila je više znanstvenih i stručnih članaka, od kojih su 6 citirana u bazi Current Contents, 3 Sci-Exp/SSCI, a 2 u Scopusu. Radovi su joj do sada citirani ukupno 105 puta (h index 4).

Udana je i majka dvojice sinova.

Članica je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog pedijatrijskog društva, Hrvatskog društva za pedijatrijsku pulmologiju, Hrvatskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju.

Zaposlena je na Klinici za pedijatriju, KBC Sestre milosrdnice, kao specijalist pedijatrije i subspecijalist pedijatrijske pulmologije. U veljači 2020. godine stekla je naziv primarijus.