

BIOMARKERS OF INFLAMMATORY ASTHMA PHENOTYPES

BIOMARKERI U INFLAMATORNIM FENOTIPOVIMA ASTME

Aleksandra Plavšić^{1,2}, Vesna Tomić Spirić^{1,2}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitetski klinički centar Srbije, Klinika za alergologiju i imunologiju, Beograd, Srbija

Correspondence: sandrony@yahoo.com

Abstract

Asthma is characterized by heterogeneity and variability in pathophysiologic mechanisms, clinical presentation, therapy response, and exacerbations. It is defined as a syndrome that is compromised by different endotypes and phenotypes. A phenotype evolves all asthma features and characteristics and should be determined in every single asthma patient, providing a personalized therapy approach. Based on induced sputum analysis, that corresponds with airway inflammation, there are 4 different inflammatory phenotypes: eosinophilic, neutrophilic, mixed and paucigranulocytic. There are two phenotypes based on key molecular asthma attributes: Type T2 (T2) and non-Type 2 (non T2). Biomarkers have a big and important role in defining phenotype, and they should be easily accessible and indicate pathophysiological processes and clinical response to therapy. Currently, there are no precise established T2 phenotype biomarkers, however, eosinophils, fraction of exhaled nitric oxide (FeNO), IgE have the biggest potential for T2 phenotype determination and have been largely investigated, while non T2 biomarkers are not described. Phenotypes may overlap and change over time which makes determining biomarkers, as a complete indicator of all phenotype features, very difficult and demanding. Induced sputum is a key method for inflammatory phenotypes determination and should be incorporated into everyday practice, considering that this would lead to more precise asthma diagnosis and personalized treatment. At the same time, biomarkers evaluation presents a great challenge in future research, given the high asthma variability.

Keywords:

phenotype,
biomarkers,
T2 asthma,
non-T2 asthma

Sažetak

Ključne reči:

fenotip,
biomarkeri,
T2 astma,
non T2 astma

Astmu karakterišu raznovrsnost i varijabilnost patofizioloških mehanizama, kliničke manifestacije i odgovora na terapiju, kao i nepredvidivost egzacerbacija. Danas se astma posmatra kao sindrom koji čini skup različitih endotipova i fenotipova. Fenotip odražava sve bitne odlike astme i, prema konceptu personalizovane medicine, treba ga definisati za svakog pacijenta i odrediti ciljani terapijski pristup. Na osnovu analize indukovano sputuma, koji korelira sa inflamacijom u disajnim putevima, utvrđena su 4 inflamatorna fenotipa: eozinofilni, neutrofilni, mešoviti i paucigranulocitni. Evaluacijom ključnih molekularnih odlika u astmi, definisana su 2 fenotipa: tip 2 (T2) i non tip 2 (non T2). Značajnu ulogu u definisanju fenotipova imaju biomarkeri koji su indikatori patološkog procesa i kliničkog odgovora na terapiju i od kojih se očekuje da budu lako dostupni. Za sada nisu tačno i precizno određeni svi T2 biomarkeri. Najviše istraživani biomarkeri T2 fenotipa su eozinofili, frakcija izdahnutog azot-oksida (FeNO) i imunoglobulin E (IgE), dok non T2 biomarkeri nisu opisani. Imajući u vidu da se fenotipovi mogu preklapati i menjati, definisanje biomarkera koji reprezentuju sve karakteristike fenotipa čini teškim i zahtevnim. Stoga je analiza indukovano sputuma ključna za definisanje fenotipova, a uvođenje ove analize u svakodnevnu kliničku praksu dovelo bi do preciznije dijagnoze astme, kao i preciznijeg i personalizovanog terapijskog pristupa. S druge strane, određivanje biomarkera predstavlja veliki izazov u budućim istraživanjima, imajući u vidu varijabilnost astme.

Uvod

Astma je hronična inflamatorna bolest koju karakterišu simptomi u vidu kratkog daha, sviranja u grudima, osećaja nedostatka vazduha, kašalj, kao i inflamacija, bronhijalna hiperreaktivnost, reverzibilna opstrukcija i remodelovanje disajnih puteva. Od astme boluje više od 300 miliona ljudi u svetu, sa rastućom prevalencijom zabeleženom u ovom veku (1). U prošlosti, astma se definisala kao jedan entitet, koji su činile dve različite forme: alergijska (ekstrinzička) i nealergijska (intrinzička) (2). Ova podela, međutim, ne opisuje na adekvatan način svu heterogenost i kompleksnost bronhijalne astme. Pacijenti sa astmom imaju varijabilne karakteristike koje se odnose na: pojavu bolesti u različitom životnom dobu (rano detinjstvo, mlađe ili starije doba), raznovrsnost stepena težine kliničke slike (blaga astma, teška astma, astma teška za lečenje), različitost odgovora na terapiju i nepredvidivost egzacerbacije. Ova raznovrsnost u različitim aspektima bolesti pod uticajem je genetike, epigenetike, molekularnih mehanizama, psiholoških efekata, hrane, mikrobioma i faktora okoline. Dijagnoza astme obuhvata više grupa pacijenta sa različitim patofiziološkim mehanizmima i raznovrsnom kliničkom manifestacijom. Zato se danas astma definiše kao sindrom.

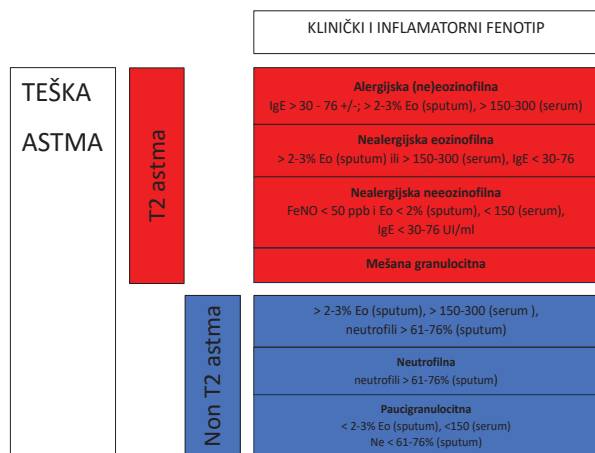
Fenotipovi u astmi

Istraživanja ukazuju da je astma sindrom koji se sastoji od više fenotipova i endotipova sa različitim inflamatornim mehanizmima (3). Sadašnji pristup pacijentima se zasniva na konceptu precizne medicine, sa ciljem da se za svakog pacijenta definiše fenotip i endotip bolesti i da se odabere ciljani, individualni terapijski pristup (4). Fenotip je opservirana karakteristika bolesti i uključuje kliničke, funkcionalne, vizualizovane i biološke karakteristike.

Određivanje fenotipova u astmi se sastoji od analize kliničkih parametara, trigera pogoršanja, tipa inflamacije, vremena postavljanja dijagnoze, prisustva komorbiditeta, ali i savremenih molekularnih tehnika (5). Fenotipovi u astmi se određuju na različite načine, uzimajući u obzir kliničke odrednice, biomarkere, klaster analize, a mogućnost preklapanja fenotipova dodatno ukazuje na složenost samog procesa fenotipizacije u astmi (6).

Na osnovu analize indukovano sputuma utvrđena su 4 fenotipa astme: eozinofilni, neutrofilni, mešani granulocitni i paucigranulocitni (7). Evaluacija indukovano sputuma omogućava neinvazivnu kolekciju ćelija iz pluća i predstavlja zlatni standard u određivanju inflamatornih fenotipova, ali je tehnički zahtevna procedura koja nema značajniju primenu u svakodnevnom radu. S druge strane, fenotipovi se mogu definisati i analizom klastera koji uzimaju u obzir različite varijable u statističkim modelima, u cilju grupisanja pacijenata sa specifičnim kliničkim karakteristikama. Tako su definisana 4 fenotipa: blaga alergijska astma ranog početka, srednje teška do teška alergijska astma ranog početka, nealergijska eozinofilna astma kasnog početka i nealergijska neeozinofilna astma kasnog početka (8). Uprkos velikom broju varijabilnosti u različitim klaster analizama, pokazalo se da godine kada je postavljena dijagnoza, povezanost sa alergijama i eozinofilija predstavljaju konstantne odrednice za određivanje kliničkih fenotipova (9).

Na osnovu molekularne analize inflamatornog odgovora, astma se deli na tip 2 (T2) i non tip 2 (non T2) fenotip (**slika 1**) (10). U literaturi se tip 2 fenotip sreće i pod nazivom T2 astma i T2 "high" astma (Th2), a non tip 2 se naziva i T2 "low" astma i non Th2. Tip 2 inflamacija se odlikuje povećanim stvaranjem i sekrecijom interleukina 4, 5 i 13 (IL-4, IL-5 i IL-13) od strane Th2 limfocita, posredovanih imunoglobulinom E (IgE), mastocitima i bazofilima, ali i sekrecijom ovih citokina od strane urođenih



Slika 1. Fenotipovi u astmi, preuzeto i adaptirano prema referenci 10.

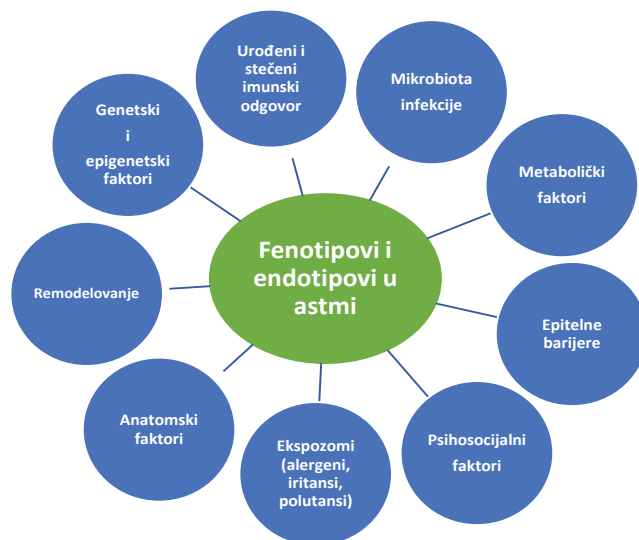
FeNO - frakcija izdahnutog azot-oksida (engl. *fraction of exhaled nitrogen oxide* - FeNO), Eo - eozinofili, Ne - neutrofili.

limfoidnih ćelija tipa 2 (engl. *innate lymphoid cells type 2* - ILC2), rezultujući eozinofilnom inflamacijom kod oko polovine pacijenta sa astmom (11). Ranije se o ovom fenotipu govorilo kao Th2, ali saznanja da ćelije urođene imunosti učestvuju u patofiziološkim procesima promeni- lo je nomenklaturu, pa se umesto Th2 govori o T2 inflamaci- ji. Non T2 fenotip nije precizno definisan, karakteriše se neutrofilnom i paucigranulocitnom inflamacijom, slabim odgovorom na kortikosteroide, sa patofiziološkim meha- nizmima urođene imunosti, pomoćnih T1 i T17 (Th1 i Th17) ćelija i njihovih produkata (12).

U kliničkoj praksi implementacija personalizovane i precizne medicine u astmi podrazumeva određivanje bio- markera pomoću kojih se definišu fenotipovi, predviđa tok bolesti, selektuju pacijenti ka biološkoj terapiji, prognozira i prati odgovor na terapiju. Idealan biomarker bi trebalo da odražava patofiziološke procese, da bude reproducibilan u kliničkom okruženju, lako dostupan i pristupačan (13). Imajući u vidu da se kod pacijenata sa astmom fenotipo- vi mogu međusobno preklapati i/ili menjati i da zavise od velikog broja različitih faktora (**slika 2**), određivanje bio- markera je vrlo zahtevno i komplikovano (14). Biomarkeri se nalaze u serumu, sputumu, urinu, endobronhijalnom bioptatu, izdahnutom vazduhu. Istraživanja biomarkera u astmi su vrlo aktuelna, ali je, uprkos njihovom obimu i značaju, mali broj biomarkera za sada našao primenu u svakodnevnom kliničkom radu.

Biomarkeri T2 inflamacije

Tip 2 inflamaciju karakterišu IL-4, IL-5, IL-13, koje sekretuju Th2 limfociti, sa IgE posredovanom aktivaci- jom mastocita, bazofila, eozinofila i oslobođenjem brojnih medijatora. Epitel disajnih puteva u odgovoru na različite stimuluse (povredu, infekcije, zagađenje) stvara citokine IL-25, IL-33 i timusni stromalni limfopoetin, koji aktivi- raju ILC2, ćelije urođene imunosti, koje sekretuju ključne Th2 citokine: IL-5 i IL-13 (11). Prema Globalnoj inicijativi za astmu (engl. *Global Initiative for Asthma* - GINA), tip



Slika 2. Faktori koji utiču na fenotipe i endotipove u astmi, preuzeto i prilagođeno prema referenci 14.

2 inflamaciju karakterišu povišeni eozinofili i povišena frakcija izdahnutog azot-oksida (engl. *fraction of exhaled nitrogen oxide* - FeNO) i može biti udružena sa povišenim nivoom IgE i atopijom (15). Tipu 2 inflamacije pripada- ju alergijska i eozinofilna astma, koje se odlikuju dobrim odgovorom na kortikosteroide i na biološku terapiju. Ova podela se koristi da definiše pacijente u kliničkim istra- živanjima i terapijskim preporukama, ali ne odražava svu heterogenost T2 fenotipa u svakodnevnom radu (16). Pacijenti koji imaju povišen nivo IgE, kao marker alergije, mogu imati i povišen broj eozinofila, ali ne i uvek. Većina studija ukazuje da su eozinofili, IgE i FeNO ključni bio- markeri ovog fenotipa.

Eozinofili

Eozinofili (Eo) nastaju u koštanoj srži i pod utica- jem različitih inflamatornih i infektivnih činilaca aktivira- ju se i migriraju ka serumu i tkivima. Ključni citokin za njihovu diferencijaciju i sazrevanje je IL-5. To su primarno tkivne ćelije, sa cirkulišućim poluživotom u serumu od 4 do 8 sati. Uglavnom naseljavaju respiratorni i digestiv- ni trakt 8 do 12 dana. Mnogobrojna istraživanja ukazuju da eozinofili imaju značajnu ulogu u inflamaciji i remo- delovanju u astmi i da je eozinofilna inflamacija prisutna kod polovine pacijenata (11, 17). Imajući u vidu da je broj eozinofila u krvi lako dostupan, postavlja se pitanje da li on korelira sa eozinofilnom inflamacijom u disajnim pute- vima. Bronhoalveolarna lavaža i endobronhijalna biopsija su metode kojima se najpreciznije identifikuje inflamacija u disajnim putevima. Ove su metode, međutim, vrlo za- htevne za izvođenje i nemaju primenu u kliničkoj prak- si. Zato je indukovani sputum metoda izbora za procenu inflamatornih fenotipova, a procenat eozinofila ≥ 2 i $\geq 3\%$ u indukovanom sputumu definiše eozinofilnu inflamaci- ju (7, 10, 18). Istraživanje na kohorti od 508 pacijenta sa astmom pokazalo je da broj eozinofila u krvi korelira sa eozinofilima u sputumu i da su vrednosti iznad 220/ μ L

prediktori $\geq 3\%$ eozinofila u sputumu, sa 77% senzitivnosti i 70% specifičnosti (19). Takođe, vrednosti $\geq 270/\mu\text{L}$ i $> 300/\mu\text{L}$ koreliraju sa eozinofilnom inflamacijom u plućima. Svako dupliranje broja eozinofila u serumu povećava verovatnoću eozinofilije u sputumu (20-22).

S druge strane, osim definisanja eozinofilnog fenotipa, eozinofili mogu imati značaj u predviđanju odgovora na terapiju. Dokazano je da pacijenti sa povišenim brojem eozinofila u sputumu bolje reaguju na kortikosteroidnu terapiju (23). Smatra se da je jedna od karakteristika eozinofilnog fenotipa upravo terapijski odgovor na kortikosteroide (11). Imajući u vidu da su egzacerbacije bitna karakteristika astme, uloga eozinofila kao prediktora rizika od egzacerbacija je takođe istraživana. Pokazano je da pacijenti sa $> 400/\mu\text{L}$ eozinofila imaju značajno više egzacerbacija i lošiju kontrolu bolesti u odnosu na pacijente sa eozinofilima ispod ove vrednosti (24). Međutim, korelacija sa eozinofilima u sputumu i serumu i pogoršanjima astme nije utvrđena u studiji sa 406 pacijenta sa teškom astmom (25). Tačan broj eozinofila u serumu koji predstavlja marker eozinofilne inflamacije u disajnim putevima, tačan broj koji korelira sa predikcijom odgovora na kortikosteroidnu terapiju i sa egzacerbacijama nije uniformno definisan, pa su potrebna dalja istraživanja radi definisanja *cut-off* vrednosti ili opsega koji u praksi može biti od koristi za ove parametre astme (u kontekstu široke dostupnosti ovog biomarkera).

Određivanje eozinofila u serumu ima bitnu ulogu u selekciji pacijenta sa teškom astmom kod kojih je indikovana biološka terapija sa anti-IL-5 antitelima (mepolizumab, reslizumab), anti-IL-5 receptor antitelom (benralizumab) i anti-IL-4 receptor α -antitelom (dupilumab), kao i odgovora na ovu terapiju. Prema GINA-i, *cut-off* vrednosti eozinofila > 150 i $> 300/\mu\text{L}$ imaju pacijenti sa teškom eozinofilnom astmom ka terapiji sa anti-IL5/anti-IL-5 R antitelima, a za anti-IL-4 receptor α -antitelo vrednost eozinofila je ≥ 150 i $\leq 300/\mu\text{L}$ (15). Pokazano je da broj eozinofila $\geq 150/\mu\text{L}$ pre započinjanja terapije predstavlja prediktivni terapijski biomarker za mepolizumab (26). Međutim, studije sa ispitanicima (*real life* studije) pokazale su da broj eozinofila ne korelira uvek sa kliničkim odgovorom na mepolizumab tokom jednogodišnje primene (27).

Imunoglobulin E

Imunoglobulin E ima ulogu u T2 inflamaciji jer aktivira mastocyte i bazofile, nakon kontakta sa alergenom i vezivanja za receptor na ovim ćelijama. Njegov značaj u patofiziologiji alergijske astme je poznat. Istraživanja su pokazala da je IgE dobar diksriminatorski faktor između Th2 "high" u Th2 "low" astme i da pacijenti sa Th2 "high" astmom imaju veće vrednosti ukupnog IgE (244 IU/ml) u odnosu na one sa Th2 "low" astmom (125 IU/ml) (28). Iako je uloga specifičnog IgE bitna za potvrdu senzibilizacije i predstavlja biomarker atopijske astme, ukupan nivo IgE nije uvek znak atopije (29). Pacijenti koji imaju normalne vrednosti ukupnog IgE mogu biti atopičari, a oni sa povišenim nivoom IgE ne moraju biti atopičari. Iako se

za terapiju teške astme primenjuje anti-IgE antitelo, nije pokazano da nivo ukupnog ili specifičnog IgE predstavlja prediktivni marker odgovora na ovu terapiju (30). U odnosu na značaj IgE u definisanju eozinofilne inflamacije, nije pokazano da ukupni IgE korelira sa eozinofilijom u sputumu (31). Interesantni su, međutim, rezultati studije Juana (Yuan) i saradnika, koja je ispitivala značaj varijabilnosti ukupnog IgE sa kliničkim i inflamatornim karakteristikama astme (32). U ovoj prospektivnoj analizi je utvrđeno da pacijenti, koji imaju veću varijabilnost IgE (definisanog kao visok koeficijent varijacije na osnovu 2 merenja), imaju lošiju kontrolu astme, intenzivnije lečenje, lošiju plućnu funkciju i veći stepen plućne inflamacije. Rezultat ove studije je pokazao da je varijabilnost ukupnog IgE nezavisan faktor rizika za buduće egzacerbacije. Ovi rezultati ukazuju na značaj određivanja IgE u više navrata jer je i ranije pokazano da postoji varijabilnost u vrednostima IgE tokom vremena (33).

Povišena frakcija izdahnutog azot-oksida

Pacijenti sa astmom imaju visoke nivoe azot-oksida u izdahnutom vazduhu i povišen nivo enzima inducibilne azotne sintetaze u epitelu disajnih puteva (34). Azot-oksid u izdahnutom vazduhu vodi poreklo iz plućnog epitela, nastaje kao posledica pojačane ekspresije inducibilne azotne sintetaze u odgovoru na inflamaciju. Citokin IL-13, kao bitan T2 marker, promovise i regulise ekspresiju epitelnih ćelija koje stvaraju inducibilnu azotnu sintetazu. Povišena frakcija izdahnutog azot-oksida je lako dostupan i standardizovan metod utvrđivanja inflamacije disajnih puteva (35). Prema vodičima Američkog torakalnog udruženja, FeNO od 25 delova na milijardu (engl. *parts per billion* - ppb) ne ukazuje na eozinofilnu inflamaciju; FeNO > 50 ppb ukazuje na eozonofilnu inflamaciju i odgovor na kortikosteroidnu terapiju (35). Vrednosti 25 - 50 ppb se interpretiraju u kliničkom kontekstu (35). Prema GINA-i, iako su veće vrednosti FeNO karakteristika T2 inflamacije, FeNO se ne može uzeti u obzir kao faktor koji služi za dijagnozu astme jer se povišene vrednosti nalaze i u drugim bolestima, kao što su alergijski rinitis, ekcemi, eozinofilni bronhitis, virusne infekcije, a niže vrednosti su prisutne kod pušača (15). Međutim, prema Nacionalnom Institutu za zdravlje i kliničku praksu Velike Britanije, FeNO > 40 ppb ukazuje na dijagnozu astme (36). Dakle, nije tačno i precizno definisano da li FeNO može biti značajan za dijagnozu astme i koje su to vrednosti. Velika metaanaliza je pokazala da FeNO ima visoku specifičnost (0,82, 95% : 0,76 - 0,86), a malu senzitivnost (0,65, 95% : 0,58 - 0,72), a da zapravo veće vrednosti (oko 50 ppb) govore u prilog dijagnozi astme i dobrom odgovoru na kortikosteroide (37). Različite *cut-off* vrednosti prema različitim vodičima ukazuju da FeNO kao pojedinačan biomarker inflamatornih fenotipova treba evaluirati uvek u kliničkom kontekstu, uzimajući u obzir dodatne faktore koje utiču na njegove vrednosti. To se naročito odnosi na vrednosti koje su u "sivoj zoni", između vrednosti koje definišu eozinofilnu i neoeozinofilnu astmu.

Istraživanje 500 bolesnika sa astmom je pokazalo da je FeNO udružen sa eozinofilima u sputumu, da $\text{FeNO} \geq 42$ ppb korelira sa $>3\%$ eoznofila u sputumu sa 74% pozitivne prediktivne vrednosti (20,38). Pokazano je da je $\text{FeNO} > 50$ ppb povezan za egzacerbacije u astmi. Kada se u obzir uzmu eozinofili u serumu, onda su $\text{FeNO} \geq 25$ ppb i $\text{Eo} \geq 150 \mu\text{L}$ povezani sa rizikom od egzacerbacija (39). Prospektivno trogodišnje istraživanje kod 122 bolesnika sa astmom pokazalo da $\text{FeNO} > 40,3$ ppb ukazuje sa 43% senzitivnosti i 86% specifičnosti na ubrzanu smanjenje plućne funkcije, smanjenje forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi (FEV1) i da su perzistentno visoke vrednosti povezane sa smanjenim bronhodilatatornim odgovorom (40). Povišena frakcija izdahnutog azot-oksida može imati ulogu kao dodatni marker u odluci za titriranje inhalacionim kortikosteroidima (IKS). Zapravo, pacijenti sa povišenim vrednostima FeNO imaju dobar odgovor na IKS (uz činjenicu da jedna trećina pacijenta koja ima povišene vrednosti FeNO jeste rezistentna na IKS) (41). Međutim, drugi autori smatraju da FeNO nema ulogu u fenotipizaciji inflamacije, da nije adekvatan prediktor pogoršanja astme, nije dovoljno dobar marker na osnovu koga se donose terapijske odluke i da, kao takav, nema veliki značaj u rutinskom kliničkom radu (42). S obzirom na to da godine, atopija, pušenje i gojaznost utiču na FeNO i da je visokosenzitivna na niske doze IKS, kao i da različiti vodiči definišu različite vrednosti za T2 inflamaciju, onda je upitna uloga FeNO kao pojedinačnog biomarkera u astmi (6, 10, 13). S obzirom na to da vrednosti FeNO variraju tokom vremena, potrebno je stalno poređenje, tj. redovno merenje i praćenje (35).

Povišena frakcija izdahnutog azot-oksida, kao indirektni biomarker IL-13, svakako ima svoje mesto u T2 inflamatornom fenotipu jer je IL-13 jedan od ključnih T2 citokina. U tom smislu, FeNO može imati značaj u monitoringu odgovora na dupilumab koji blokira IL-4 i IL-13. Pokazano je da se FeNO smanjuje nakon 2 nedelje terapije dupilumabom u kortikosteroidnoj zavisnoj teškoj astmi, a da se broj pacijenata sa $\text{FeNO} < 25$ ppb povećava sa početnih 44% na 84% pacijenta nakon 24 nedelje terapije (43). Smanjenje FeNO korelira sa redukcijom *per os* primenjene kortikosteroidne terapije (43).

Biomarkeri non T2 inflamacije

Non T2 inflamacija se u literaturi sreće i pod nazivima Th2 "low" astma, T2 "low" astma, neoeozinofilna astma, sugerišući da se radi o fenotipu u kojoj eozinofili i drugi T2 faktori nemaju ulogu u patogenezi. Ovaj fenotip nije toliko proučavan i jasno definisan, iako je prisutan kod polovine obolelih od astme. Non T2 se uglavnom definiše kao astma bez T2 inflamacije, sa prisutnim neutrofilnim ili paucigranulocitnim inflamatornim karakteristikama u indukovanom sputumu. Odlike ovog fenotipa su teži stepen bolesti, odsustvo eozinofilije u serumu i sputumu, odsustvo odgovora na kortikosteroidnu i biološku terapiju, a klinički fenotipovi su astma vrlo kasnog početka, astma gojaznih, neutrofilna astma pušača (12, 44, 45). Potencijalni

patofiziološki mehanizmi su non T2 inflamacija u disajnim putevima (sa neutrofilijom posredovanom IL-17 i interferonima), sistemska inflamacija udružena sa IL-6, gojaznošću i metaboličkim poremećajima, kao i paucigranulocitni neinflamatorni mehanizmi (45).

Analizirajući inflamatorne fenotipove 70 pacijenata na osnovu endobronhijalnog biopata, utvrđeno je da je neutrofilna astma prisutna kod 54% pacijenata i da je povezana sa težom bolešću, većim brojem egzacerbacija, smanjenim FEV1, smanjenjem reverzibilnosti, kao i većom dozom IKS terapije u odnosu na pacijente bez neutrofilne astme (46). U bronhijalnoj *lamini propriji* neutrofilne astme prisutno je više CD8+, IL-17+, IL-22+ ćelija. Veća plućna neutrofilija je povezana za povećanjem vrednosti IgE, senzibilizacijom na perenijalne alergene i zavisnošću od oralnih kortikosteroida. Rezultati ove studije sugerišu na ulogu neutrofila, IL-17, ali i Th2 kod ovih pacijenata. Nameće se zaključak postojanja heterogenosti samog neutrofilnog fenotipa ili postojanje novog fenotipa koji se karakteriše bronhijalnom neutrofilijom, IgE i IL-17, senzibilizacijom na perenijalne alergene, češćim pogoršanjima i zavisnošću od kortikostroida.

Specifični biomarkeri non T2 fenotipa nisu definisani. Analiza indukovnog sputuma određuje neutrofilni i paucigranulocitni fenotip, ali broj neutrofila u sputumu koji definiše neutrofilni fenotip nije precizno određen. Vrednosti se kreću od 40% do 76% (12). Istraživanja su pokazala da IL-17, IL-8, tumorski faktor nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha* - TNF- α) u sputumu i serumu koreliraju sa neutrofilnom plućnom inflamacijom i sa neutrofilima u teškoj astmi, ali ovi markeri nisu našli primenu u svakodnevnoj praksi (12). Neki autori dovode u pitanje postojanje T2 "low", odnosno non T2 fenotipa jer široka

Tabela 1. Karakteristike T2 i non T2 astme, preuzeto i prilagođeno prema referenci 45.

FeNO - frakcija izdahnutog azot-oksida, Eo - eozinofili.

Karakteristike	T2 astma	Non T2 astma
Godine dijagnoze	Rani početak	Kasni početak
Simptomi	Mogu imati značaj	Mogu imati značaj
Životno ugrožavajuće egzacerbacije	Više prisutne	Manje prisutne
Gojaznost/metabolički poremećaji	Mogu biti prisutni	Često prisutni
Plućna funkcija	Više opstrukcije	Manje opstrukcije
Odgovor na kratkododeljujuće bronhodilatatore	Više prisutan	Manje prisutan
Alergijska senzibilizacija	Prisutna	Odsutna
FeNO	Normalan ili povišen	Normalan ili snižen
Eozinofilija u disajnim putevima	Prisutna	Odsutna
Neutrofilija u disajnim putevima	Može biti prisutna	Može biti prisutna
Odgovor na kortikosteroide	Više prisutan	Manje prisutan

primena IKS u astmi dovodi do supresije T2 odgovora, što rezultira remisijom T2 fenotipa i odusutvom biomarkera T2 inflamacije (**tabela 1**) (47).

Kombinacija biomarkera

Različiti faktori, kao što su upotreba kortikosteroida, komorbiditeti i životne navike mogu imati uticaj na biomarkere u astmi i menjati njihove vrednosti (48). S druge strane, činjenica da se fenotipovi mogu preklapati i menjati tokom vremena otežava istraživanja biomarkera i njihovu primenu u svakodnevnom kliničkom radu. Stoga kombinacija više biomarkera u definisanju različitih karakteristika astme, uključujući fenotipove, odgovor na terapiju, predviđanje terapijskog odgovora, predviđanje egzacerbacija, predstavlja veliki izazov. Prema GINA-i, T2 fenotip karakterišu $Eo \geq 150/\mu l$ i/ili $FeNO \geq 20$ ppb i/ili $\geq 2\%$ eozinofila u sputumu i da je astma alergijska (15). Velika metaanaliza je ukazala da pojedinačni biomarkeri IgE, FeNO i Eo ne predstavljaju surogate za eozinofilnu inflamaciju (39). Kombinacija eozinofila u serumu, zajedno sa FeNO, identifikuje eozinofilju u sputumu (31). Međutim, kombinacija eozinofila, IgE i FeNO ne daje uvek potpunu sliku T2 raznovrsnosti, naročito kod teške astme (48). Za non T2 fenotip nije definisan nijedan biomarker. Postavlja se onda pitanje da li uopšte možemo izmeriti inflamaciju u kliničkoj praksi. Buduća istraživanja će pokušati da daju odgovor na ovo pitanje.

Zaključak

Definisanje inflamatornih fenotipova u astmi jeste kompleksno, imajući u vidu složenost patofizioloških mehanizama, raznovrsnost kliničke manifestacije, varijabilnost odgovora na terapiju i menjanje/preklapanje fenotipova tokom vremena. Ne postoje opšteprihvaćeni biomarkeri sa tačno definisanim vrednostima na osnovu kojih se mogu jasno odrediti inflamatorni fenotipovi. Istovremeno određivanje IgE, Eo i FeNO ima mesto u T2 fenotipu, ali ovi biomarkeri ne odražavaju sve karakteristike T2 fenotipa. Biomarkeri non T2 fenotipa nisu precizno opisani. Kliničke karakteristike, kombinacija više biomarkera, u više merenja, sa različitih mesta uzorkovanja, kao i parametri plućne funkcije mogu pomoći u definisanju fenotipova. Uvođenje indukovano sputuma u kliničku praksu, kao ključne metode u definisanju inflamatornih fenotipova, omogućilo bi precizniju dijagnozu i personalizovani pristup u lečenju pacijenata sa astmom.

Literatura

1. Stern J, Pier J, Litonjua AA. Asthma epidemiology and risk factors. *Semin Immunopathol.* 2020; 42(1):5-15.
2. Rackemann F. A working classification of asthma. *Am J Med.* 1947; 3:601-6.
3. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanism of disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019; 56(2):219-93.
4. Canonica GW, Fernando I, Biardini F, Puggioni F, Racca F, Passalacqua G, et al. Asthma: personalized and precision medicine. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2018; 18(1):51-8.
5. McIntyre AP, Viswanathan RK. Phenotypes and Endotypes in Asthma. *Adv Exp Med Biol.* 2023; 1426:119-42.
6. Mohan A, Lugogo NL. Phenotyping. *Precision Medicine, and Asthma. Semin Respir Crit Care Med.* 2022; 43(5):739-75.
7. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology.* 2006; 11(1):54-61.
8. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes in adult asthma: moving toward precision medicine. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 144(1):1-12.
9. Gauthier M, Ray A, Wenzel SA. Evolving Concepts of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 192(6):660-8.
10. Diamant Z, Vijverberg S, Alving K, Bakirtas A, Bjermer L, Custovic A, et al. Toward clinically applicable biomarkers for asthma: An EAACI position paper. *Allergy.* 2019; 74(10):1835-51.
11. Fathy JV. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(1):57-65.
12. Peri F, Amadeo A, Badina L, Maschio M, Barbi E, Ghirardo S. T2-Low Asthma: A Discussed but Still Orphan Disease. *Biomedicines.* 2023; 11(4):1226.
13. Tiotiu A. Biomarkers in asthma: state of art. *Asthma Res Pract.* 2018; 4:10.
14. Agache I, Akdis CA. Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *J Clin Invest.* 2019; 129(4):1493-503.
15. Levy ML, Bacharier LB, Bateman E, Boulet LP, Brightling C, Buhl R, et al. Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. *NPJ Prim Care Respir Med.* 2023; 33(1):7.
16. Oppenheimer J, Hoyte FCL, Phipatanakul W, Silver J, Howarth P, Lugogo NL. Allergic and eosinophilic asthma in the era of biomarkers and biologics: similarities, differences and misconceptions. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2022; 129(2):169-80.
17. Scott G, Asrat S, Allinne J, Keat Lim W, Nagashima K, Birchard D et al. IL-4 and IL-13, not eosinophils, drive type 2 airway inflammation, remodeling and lung function decline. *Cytokine.* 2023; 162:156091.
18. Tanaka A, Sato H, Akimoto K, Matsunaga T, Sagara H. Spontaneous sputum discriminates inflammatory phenotypes in patients with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2021; 126(1):54-60.
19. Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: Predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med.* 2013; 13:11.
20. Wagener AH, De Nijs SB, Lutter R, Sousa AR, Weersink EJ, Bel EH, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax.* 2015; 70(2):115-20.
21. Comou H, Bel EH. Improving the diagnosis of eosinophilic asthma. *Expert Rev Respir Med.* 2016; 10(10):1093-103.
22. Yap E, Chua WM, Layaram L, Zeng I, Vandal AC, Garrett J. Can we predict sputum eosinophils from clinical assessment in patients referred to an adult asthma clinic? *Intern Med J.* 2013; 43(1):46-52.
23. Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non eosinophilic asthma. *Thorax.* 2007; 62(12):1043-9.
24. Price DB, Rigazio A, Campbell JD, Bleecker ER, Corrigan CJ, Thomas M, et al. Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: a UK cohort study. *Lancet Respir Med.* 2015; 3(11):849-58.
25. Peters MC, Mager D, Ross KR, Phillips B, Gaston B, Cardet JC, et al. Evidence for Exacerbation-Prone Asthma and Predictive Biomarkers of Exacerbation Frequency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 202(7):973-82.
26. Ortega HG, Yancey SW, Mayer B, Gunsoy MB, Keene O, Bleecker E, et al. Severe eosinophilic asthma treated with mepolizumab stratified by baseline eosinophil thresholds: a secondary analysis

- of the DREAM and MENSA studies. *Lancet Resp Med.* 2016; 4(7): 549-56.
27. Bagnasco D, Massolo A, Bonavia M, Brussion L, Bucca C, Caminati M, et al. The importance of being not significant: blood eosinophils and clinical responses do not correlate in severe asthma patients treated with mepolizumab in real life. *Allergy* 2020; 75(6):1460-3.
28. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. The helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180(5):388-95.
29. Lee Y, Quoc QL, Park HS. Biomarkers for Severe Asthma: Lessons From Longitudinal Cohort Studies. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2021; 13(3):375-89.
30. Gibson PG, Reddel H, McDonald VM, Marks G, Jenkins C, Gillman A, et al. Effectiveness and response predictors of omalizumab in a severe allergic asthma population with a high prevalence of comorbidities: the Australian Xolair Registry. *Intern Med J.* 2016; 46(9):1054-62.
31. Westerhof GA, Korevaar DA, Amelink M, de Nijs SB, de Groot JC, Wang J, et al. Biomarkers to identify sputum eosinophilia in different adult asthma phenotypes. *Eur Respir J.* 2015; 46(3):688-96.
32. Yuan YL, Zhang X, Liu L, Wang G, Chen-Yu Hsu A, Huang D et al. Total IgE Variability Is Associated with Future Asthma Exacerbations: A 1-Year Prospective Cohort Study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021; 9(7):2812-24.
33. Hatipoğlu U, Subramanian A, Campbell T, Rice R, Mummadi S, Hu B, et al. Intrasubject Variability in Total IgE Levels in Patients with Moderate to Severe Persistent Allergic Asthma Over 1 Year. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016; 4(4):691-6.
34. Murugesan N, Saxena D, Dileep A, Adrish M, Hanania NA Update on the Role of FeNO in Asthma Management. *Diagnostics (Basel).* 2023; 13(8):142.
35. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184(5):602-15.
36. National Institute for Health and Care Excellence (NICE) Asthma: Diagnosis, Monitoring and Chronic Asthma Management. London, NICE, 2017.
37. Karrasch S, Linde K, Rücker G, Sommer H, Karsch-Völke M, Kleijnen J, et al. Accuracy of FeNO for diagnosing asthma: a systematic review. *Thorax.* 2017; 72(2):109-11.
38. Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35(9):1175-9.
39. Busse WW, Wenzel SE, Casale TB, FitzGerald JM, Rice MS, Daizadeh N, et al. Baseline FeNO as a prognostic biomarker for subsequent severe asthma exacerbations in patients with uncontrolled, moderate-to-severe asthma receiving placebo in the LIBERTY ASTHMA QUEST study: a post-hoc analysis. *Lancet Respir Med.* 2021; 9(10):1165-73.
40. Matsunaga K, Hirano T, Oka A, Ito K, Edakuni N. Persistently high exhaled nitric oxide and loss of lung function in controlled asthma. *Allergol Int.* 2016; 65(3):266-71.
41. Loewenthal L, Menzies-Gow A. FeNo in asthma. *Semin Respir Crit Care Med.* 2022; 43(5):635-45.
42. Petsky HL, Cates CJ, Kew KM, Chang AB. Tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils): a systematic review and meta-analysis. *Thorax.* 2018; 73(12):1110-9.
43. Rabe KF, Nair P, Brusselle G, Maspero JF, Castro M, Sher L, et al. Efficacy and Safety of Dupilumab in Glucocorticoid-Dependent Severe Asthma. *N Engl J Med.* 2018; 378(26):2475-85.
44. Breiteneder H, Peng YQ, Agache I, Diamant Z, Eiwegger T, Fokkens WJ, et al. Biomarkers for diagnosis and prediction of therapy responses in allergic diseases and asthma. *Allergy.* 2020; 75(12):3039-68.
45. Fitzpatrick AM, Chipps BE, Holguin F, Woodruff PG. T2-"Low" Asthma: Overview and Management Strategies. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020; 8(2):452-63.
46. Bullone M, Carriero V, Bertolini F, Folino A, Mannelli A, Di Stefano A, et al. Elevated serum IgE, oral corticosteroid dependence and IL-17/22 expression in highly neutrophilic asthma. *Eur Respir J.* 2019; 54(5):1900068.
47. Guida G, Bagnasco D, Carriero V, Bertolini F, Ricciardolo FLM, Nicola S, et al. Critical evolution of asthma biomarkers in clinical practice. *Front Med (Lausanne).* 2022; 9:969243.
48. Korevaar DA, Westerhof GA, Wang J, Cohen JF, Spijker R, Sterk PJ, et al. Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2015; 3(4):290-300.