

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Jolita Palačionytė

**EOZINOFILŲ POTIPIŲ
PROLIFERACINIS AKTYVUMAS
IR IMUNINIO ATSAKO YPATUMAI
SERGANT 2-O TIPO ASTMA**

Daktaro disertacija
Medicinos ir sveikatos mokslai,
medicina (M 001)

Kaunas, 2024

Disertacija rengta 2019–2023 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Pulmonologijos klinikoje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Kęstutis Malakauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Brigita Gradauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. habil. dr. Albinas Naudžiūnas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011);

prof. dr. Johann Christian Virchow (Rostoko universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2024 m. rugpjūčio 13 d. 13 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Didžiojoje auditorijoje.

Adresas: Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Jolita Palačionytė

**PROLIFERATIVE ACTIVITY OF
EOSINOPHIL SUBTYPES AND IMMUNE
RESPONSE CHARACTERISTICS IN
TYPE 2 ASTHMA**

Doctoral Dissertation
Medical and Health Sciences,
Medicine (M 001)

Kaunas, 2024

Dissertation has been prepared at the Department of Pulmonology of Faculty of Medicine of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2019–2023 year.

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Kęstutis Malakauskas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Habil. Dr. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Brigita Gradauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Habil. Dr. Albinas Naudžiūnas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biophysics – N 011);

Prof. Dr. Johann Christian Virchow (University of Rostock, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on August 13, 2024, at 1 p.m. in the Large Auditorium at the Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos.

Address: Eivenių 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS.....	10
Darbo tikslas.....	12
Uždaviniai.....	12
Tyrimo naujumas ir praktinė reikšmė.....	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	15
1.1. Astma ir jos paplitimas, problemos aktualumas.....	15
1.2. Astmos patogenezė.....	15
1.3. Eozinofilų biologinis vaidmuo sergant astma.....	17
1.4. Eozinofilopoetinių poveikis eozinofilų funkcijoms.....	19
1.5. Eozinofilopoetinių receptoriai ir jų vaidmuo eozinofilų funkcijoms.....	20
1.6. Eozinofilų proliferacinis aktyvumas ir poveikis bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms.....	21
1.7. 2-o tipo biologiniai žymenys, būdingi sergant astma.....	21
1.7.1. Žinomi 2-o tipo biologiniai žymenys.....	22
1.7.2. Nauji 2-o tipo biologiniai žymenys.....	23
1.8. 2-o tipo uždegimo slopinimas veikiant citokinus ir jų receptorius.....	25
2. METODAI.....	28
2.1. Bioetikos komiteto leidimas.....	28
2.2. Tiriamųjų populiacija.....	28
2.3. Pacientų įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijai.....	29
2.4. Tyrimo dalyvių ištyrimo eiga.....	30
2.5. Klausimynai.....	32
2.5.1. Astmos kontrolės testas.....	32
2.6. Instrumentiniai tyrimai.....	32
2.6.1. Plaučių funkcijos tyrimai.....	32
2.6.1.1. Spirometrija.....	32
2.6.1.2. Bronchų plėtimo mėginys.....	32
2.6.1.3. Bronchų inhaliacinis provokacinis mėginys su metacholinu.....	33
2.6.1.4. Bronchų inhaliacinis provokacinis mėginys su <i>Dermatophagoides</i> <i>pteronyssinus</i> alergenu.....	34
2.6.1.5. Azoto monoksido kiekio matavimas iškvepiamame ore.....	34
2.6.1.6. Įsijautrinimo alergenams vertinimas.....	35
2.6.2. Laboratoriniai tyrimai.....	35
2.6.2.1. Kraujo paėmimas ir pradinis vertinimas.....	35
2.6.2.2. Eozinofilų išskyrimas, fenotipavimas ir aktyvinimas.....	36
2.6.2.3. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių auginimas <i>in vitro</i> . Kombinuotųjų kultūrų su kraujo eozinofilų potipiais sudarymas ir bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos vertinimas.....	37

2.6.2.4.	Ribonukleino rūgšties išskyrimas iš eozinofilų. Eozinofilų paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiška.....	39
2.6.2.5.	Biologiškai aktyvių medžiagų kiekio serume nustatymas imunofermentinės analizės tyrimo metodu.....	40
2.6.2.6.	Biologiškai aktyvių medžiagų kiekio serume nustatymas Luminex technologija.....	41
2.7.	Biologinio vaisto paskyrimas sergant sunkia eozinofiline astma.....	42
2.8.	Statistinė duomenų analizė.....	42
3.	REZULTATAI.....	44
3.1.	Pirmojo disertacinio darbo uždavinio tyrimų rezultatai.....	44
3.1.1.	Tiriamųjų charakteristika	44
3.1.2.	Eozinofilopoetinių (interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio) poveikis eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui <i>in vitro</i> prieš ir po bronchų provokacijos alergenu	45
3.1.3.	Eozinofilų potipių paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiška prieš ir po bronchų provokacijos alergenu.....	49
3.2.	Antrojo disertacinio darbo uždavinio tyrimų rezultatai	53
3.2.1.	Tiriamųjų charakteristika	53
3.2.2.	Biologiškai aktyvių medžiagų (autotaksino, tirozin-proteinkinazės Met, lipoproteino A2 fosfolipazės, tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto, pentaksino 3, tioredoksino 1, matrikso metaloproteinazės-7, 9, 10 ir I C telopeptido I tipo kolageno) kiekiai serume sergant alergine astma ir jų kitimas <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alergeno poveikyje	54
3.2.3.	Biologiškai aktyvių medžiagų (tirozin-proteinkinazės Met, tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto, pentaksino 3, tioredoksino 1 ir I C telopeptido I tipo kolageno) kiekių serume sąsajos su žinomais astmos biologiniais žymenimis ir plaučių funkcija sergant alergine astma.....	57
3.3.	Trečiasis disertacinio darbo uždavinys.	60
3.3.1.	Tiriamųjų charakteristika	60
3.3.2.	Sergančiųjų sunkia eozinofiline astma klinikinės remisijos kriterijai po 24 savaičių gydymo monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5 ..	61
3.3.3.	Sergančiųjų sunkia eozinofiline astma 2-o tipo uždegimo biologinių žymenų kiekiai serume 24 savaites gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5.....	62
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	65
4.1.	Eozinofilų potipių proliferacinis aktyvumas <i>in vitro</i>	65
4.1.1.	Eozinofilopoetinių (interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio) poveikis eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui <i>in vitro</i>	65

4.1.2.	Eozinofilų potipių paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiška	66
4.2.	Naujų biologinių žymenų kiekiai serume sergant alergine astma ir jų kitimas <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alergeno poveikyje.....	67
4.2.1.	Lėtinio uždegimo biologinių žymenų (autotaksino, tirozin-protein-kinazės Met, lipoproteino A2 fosfolipazės ir tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto) kiekiai serume sergant alergine astma ir jų kitimas <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alergeno poveikyje	67
4.2.2.	Kraujo oksidacinio streso biologinių žymenų (pentaksino 3 ir tioredoksino 1) kiekiai serume sergant alergine astma ir jų kitimas <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alergeno poveikyje	69
4.2.3.	Užląstelinio užpildo apykaitos komponentų (matrikso metaloproteinazės 7, 9, 10 ir I C telopeptido I tipo kolageno) kiekiai serume sergant alergine astma ir jų kitimas <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alergeno poveikyje	70
4.3.	Klinikinės remisijos kriterijai ir 2-o tipo uždegimo biologinių žymenų kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir 24 savaites gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5.....	71
4.3.1.	Klinikinės remisijos kriterijai, plaučių funkcija ir naujų 2-o tipo biologinių žymenų kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5	71
4.3.2.	Alarminų (interleukino 25, interleukino 33 ir užkrūčio liaukos stromos limfopoetino) kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5	72
4.3.3.	Citokinų (interleukino 4, interleukino 5 ir interleukino 13) ir chemokino (eotaksino) kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5.....	73
4.3.4.	Tirpių receptorių (interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto ir didelio afiniteto imunoglobulino E receptoriaus) kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5.....	74
IŠVADOS		76
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS		77
SUMMARY IN ENGLISH.....		78
LITERATŪROS SĄRAŠAS		108
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....		120
PRIEDAI.....		123
CURRICULUM VITAE		178
PADĖKA		179

SANTRUMPOS

AA	–	alerginė astma
ATS	–	(angl. <i>American Thoracic Society</i>) Amerikos krūtinės draugija
ATX	–	autotaksinas
BLR	–	bronchų lygieji raumenys
CD	–	(angl. <i>cluster of differentiation</i>) leukocitų diferenciacijos antigenai
EDTA	–	etileno-diamino-tetra-acto rūgštis
ELISA	–	(angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) imunofermentinė analizė
FDA	–	(angl. <i>USA Food and Drug Administration</i>) Jungtinių Amerikos Valstijų maisto ir vaistų administracija
F _{ENO}	–	(angl. <i>fractional exhaled nitric oxide</i>) azoto monoksido kiekis iškvepiamajame ore
FEV ₁	–	(angl. <i>forced expiratory volume in 1 second</i>) forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę
FVC	–	(angl. <i>forced vital capacity</i>) forsuoata gyvybinė talpa
GM-CSF	–	(angl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>) granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantysis veiksnys
GM-CSFR	–	(angl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor</i>) granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorius
ICTP	–	(angl. <i>I C-telopeptide of type I collagen</i>) I C telopeptido I tipo kolagenas
Eos _{rez}	–	į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės
Eos _{užd}	–	į uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės
Ig	–	imunoglobulinas
IL	–	interleukinas
IL-3R	–	interleukino 3 receptorius
IL-5R	–	interleukino 5 receptorius
ILC2	–	(angl. <i>lymphoid type-2 cells</i>) 2-o tipo įgimtos limfoidinės ląstelės
KMI	–	kūno masės indeksas
Lp-PLA2	–	(angl. <i>lipoprotein-associated phospholipase A2</i>) lipoproteino A2 fosfolipazė
MACS	–	(angl. <i>magnetic-activated cell sorting</i>) magnetiniu būdu aktyvuotų ląstelių rūšiavimas
MET	–	(angl. <i>tyrosine-protein kinase Met</i>) tirozin-proteinkinazė Met
MMP	–	(angl. <i>matrix metalloproteinase</i>) matrikso metaloproteinazė
p	–	statistinis patikimumo lygmuo
PBS	–	praskiestas fosfatinio buferio druskų tirpalas
PGR	–	polimerazės grandininė reakcija (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PTX3	–	(angl. <i>pentraxin 3</i>) pentaksinas 3
r	–	Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas

RNR	–	ribonukleino rūgštis
sIL-5R α	–	(angl. <i>soluble interleukin 5 receptor subunit alpha</i>) tirpus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas
SA	–	sveiki asmenys
SEA	–	sunki eozinofilinė astma
sFc ϵ RI	–	tirpus didelio afiniteto imunoglobulino E receptorius
SNEA	–	sunki nealerginė eozinofilinė astma
Th0	–	(angl. <i>naïve helper T cells</i>) naivieji T limfocitai pagalbininkai
Th2	–	(angl. <i>T helper cells type 2</i>) 2-o tipo T limfocitai pagalbininkai
TRX1	–	(angl. <i>thioredoxin 1</i>) tioredoksinas 1
TSLP	–	(angl. <i>thymic stromal lymphopoietin</i>) užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas

ĮVADAS

Astma yra viena iš labiausiai paplitusių lėtinių ligų visame pasaulyje [1]. Vaikystėje astma dažniau serga berniukai, o tarp suaugusiųjų – moterys [2]. Astmos simptomai paprastai pastebimi ankstyvame amžiuje, bet tuo metu nėra specifiniai ir dažnai gali būti susiję su virusine kvėpavimo takų infekcija [3]. Sergant astma, būdingas dusulys, kosulys, švokštimas ir spaudimas krūtinėje. Visi šie simptomai yra susiję su lėtiniu kvėpavimo takų uždegimu [4-6]. Neišnešiojimas, ankstyvos plaučių infekcijos, rinitas, rūkymas ir nutukimas yra suaugusiųjų astmos rizikos veiksniai [6].

Kvėpavimo takų uždegimas yra laikomas vienu iš esminių patofiziologinių mechanizmų susijusių su astmos patogeneze ir lemiančių kvėpavimo takų struktūrinius pokyčius, apibūdinamus kaip remodeliacija [7]. Nors astma įprastai lengvai kontroliuojama standartiniu gydymu, vis dėlto ne visada pavyksta kontroliuoti ligos eigą [8]. Apie 5–10 procentų pacientų kenčia nuo nekontroliuojamos ar sunkios astmos, dėl kurios padidėja mirtingumas, stacionarinio gydymo poreikis, prastėja gyvenimo kokybė ir didėja sveikatos priežiūros išlaidos [9, 10]. Du pagrindiniai rizikos veiksniai, prisidedantys prie sunkios astmos – genetika ir aplinkos poveikis, kuris moduliuoja imuninį atsaką [8].

Astma – sudėtingesnė liga nei manyta anksčiau, kadangi yra nevienalytė [11]. Tai pastebėjus, pradėta domėtis astmos patogeneze, kvėpavimo takų uždegimo charakteristikomis, klinikine eiga. Taip prieš daugiau nei 10 metų pradėtos naudoti fenotipo ir endotipo sąvokos [12]. Pagal klinikines ligos išraiškas išskiriama alerginė, nealerginė, nutukusiųjų astma, astma su nuolatine bronchų obstrukcija, neutrofilinė astma [3, 13], o pagal vyraujančią patogenezinį mechanizmą ir uždegime dalyvaujančius citokinus – 2-o tipo (angl. *type 2*) ir ne 2-o tipo (angl. *non-type 2*) astma [14, 15]. Astmos fenotipų atpažinimas yra pakankamai tikslus atsižvelgiant į paciento lytį, amžių, alergijų buvimą/nebuvimą, šeiminių alerginių ligų anamnezę, amžių, kuomet buvo diagnozuota astma (vaikystėje ar suaugus), atsaką į gydymą įkvepiamaisiais gliukokortikoidais ir kt. Dažniausi astmos fenotipai yra alerginė astma (AA) ir nealerginė astma [16]. Tuo tarpu astmos endotipo atpažinimas – sudėtingesnis, reikalaujantis suprasti astmos patogenezę. Mažiausiai pusei sergančiųjų astma būdingas 2-o tipo uždegimas, kurį lemia 2-o tipo T limfocitai pagalbininkai (angl. *T helper 2*, Th2) [17].

Tiek astmos fenotipą, tiek endotipą atpažinti padeda biologiniai žymenys [18]. Astma dažniausiai siejama su 2-o tipo uždegimu [19], todėl naudojami 2-o tipo biologiniai žymenys [18]. Šiuo metu patvirtinti biologiniai žymenys: eozinofilų kiekis kraujyje ir skrepliuose, bendro imunoglobulino (Ig) E kiekis

kraujyje, azoto monoksido kiekis iškvepiamame ore (F_{NO}) ir peristino kiekis serume [20]. Vienas iš pagrindinių biologinių žymenų – eozinofilai. Tai daugiausia tirtas ir plačiausiai tiek moksliniuose tyrimuose, tiek klinikinėje praktikoje naudojamas biologinis žymuo [21]. Deja, nei vienas iš nurodytų biologinių žymenų nėra idealus ir visi turi savo trūkumų [22]. Siekiama, kad biologiniai žymenys būtų informatyvūs, lengvai išmatuojami ir nereikalaujantys daug kaštų [23]. Dėl šios priežasties ieškoma naujų, su 2-o tipo uždegimo patogenezėje susijusių biologinių žymenų [13]. Manoma, kad biologiškai aktyvios medžiagos, dalyvaujančios astmos patogenezėje, galėtų būti biologiniai žymenys [24].

Astmos patogenezės supratimas yra svarbus parenkant geriausią individualizuotą astmos gydymą [25]. Apie pusei sergančiųjų astma būdingas uždegimas, susijęs su eozinofilais [11]. Įprastai šių ląstelių kraujyje yra palyginti nedaug – apie 1 proc. visų leukocitų, o kvėpavimo takuose – < 3 proc. visų skrepliuose esančių ląstelių. Nepaisant jų mažo kiekio tiek kraujyje, tiek kvėpavimo takuose, eozinofilai laikomi vienomis svarbiausių ląstelių sergant astma [26–28]. Šių ląstelių kiekio padidėjimas tiek kraujyje, tiek kvėpavimo takuose yra susijęs su padidėjusiu bronchų jautrumu, kvėpavimo takų uždegimu ir oro srauto apribojimu (obstrukcija). Visa tai lemia astmos simptomus, dažnesnius paūmėjimus ir sunkesnę ligos eigą [11, 27]. Eozinofilų poveikis kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma priklauso ne tik nuo jų infiltracijos į kvėpavimo takus, bet ir nuo jų išgyvenamumo, nes tai pailgina eozinofilų poveikį plaučių struktūrinėms ląstelėms [29]. Nustatyti du eozinofilų potipiai plaučiuose – uždegiminiai ir rezidentiniai. Panašius eozinofilus galima aptikti ir kraujyje: į plaučių rezidentinius eozinofilus panašias ląsteles (Eos_{rez}), bei į uždegiminius eozinofilus panašias ląsteles ($Eos_{užd}$). Šios ląstelės skiriasi savo vaidmeniu astmos patogenezėje [30]: $Eos_{užd}$ dalyvauja uždegiminiame atsake, o Eos_{rez} – palaiko audinių homeostazę [31]. Eozinofilų kiekį kraujyje ir plaučiuose, jų išgyvenamumą, brendimą ir aktyvumą skatina citokinai – interleukinas (IL) 3, IL-5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys (angl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), kurie vadinami eozinofilopoetiniais. Aktyvinti eozinofilai išskiria biologiškai aktyvias medžiagas, kurios pasižymi proliferaciniu aktyvumu bronchų lygiųjų raumenų (BLR) ląstelėms [32] ir taip lemia šių ląstelių proliferaciją ir bronchų struktūros pokyčius [29]. Taip pat eozinofilų paviršiuje yra išreikšti citokinų receptoriai, įskaitant IL-3, IL-5 ir GM-CSF receptorius [33]. Eozinofilopoetiniai gali sustiprinti savo receptorių (interleukino 3 receptoriaus (IL-3R), interleukino 5 receptoriaus (IL-5R) ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptoriaus (GM-CSFR)) genų raišką ir taip suintensyvinti signalo perdavimą eozinofilams, prailginti jų išgyvenamumą, padidinti aktyvumą bei sustiprinti uždegiminį atsaką [34].

Eozinofilopoetinių poveikis eozinofilams priklauso ne tik nuo šių citokininų kiekio, bet ir nuo jų receptorių kiekio eozinofilų paviršiuje [35]. Tuo tarpu eozinofilopoetinių poveikis skirtingiems eozinofilų potipiams išlieka nežinomas.

Astmos gydymo tikslas – pasiekti simptomų kontrolę, sumažinti su astma susijusių paūmėjimų, su gydymu susijusių šalutinių poveikių ir mirtingumo riziką [36]. Gydant astmą vis dažniau naudojamas klinikinės remisijos terminas [37]. Šiuo terminu apibūdinamas aukštas ligos kontrolės lygis, įskaitant astmos simptomų, paūmėjimų ir geriamųjų gliukokortikoidų poreikio nebuvimą, taip pat optimalią plaučių funkciją [38]. Kadangi anksčiau astma buvo suprantama kaip vienalytė liga, visiems pacientams buvo skiriamas toks pats įkvepiamaisiais gliukokortikoidais pagrįstas gydymas [39]. Šis gydymas daugumai pacientų pakankamai kontroliuoja astmos simptomus [40], tačiau dalį jų ir toliau vargina nuolatiniai astmos simptomai ir sunki ligos eiga bei pasikartojantys ligos paūmėjimai su geriamųjų gliukokortikoidų poreikiu [27]. Supratimas apie astmos patogenezę pradėjo keistis prieš du dešimtmečius. Tuo metu atsirado daugiau žinių apie 2-o tipo uždegimą bei biologinius žymenis, kurie gali padėti šį uždegimą atpažinti. Visa tai paskatino domėtis gydymo galimybėmis, atlikti klinikinius tyrimus su monokloniniais antikūnais, nukreiptais prieš 2-o tipo uždegimo citokinus ir jų receptorus [41]. Atlikti tyrimai parodė, kad astmos gydymas gali būti individualizuotas ir dėl to veiksmingesnis, jeigu jis parenkamas pagal klinikinius požymius, vyraujančią patogenezinį kelią ir jame dalyvaujančius citokinus [42].

Kadangi sergant astma dažniausiai vyrauja 2-o tipo uždegimas, tikslinga ir toliau gilintis į jo patogenezę. Taigi iki šiol yra nepakankamai įvertintas eozinofilų potipių proliferacinis aktyvumas. Taip pat trūksta biologinių žymenų, galinčių padėti parinkti individualizuotą astmos gydymą bei prognozuojant ligos eigą.

Darbo tikslas

Ištirti eozinofilų potipių proliferacinį aktyvumą ir imuninio atsako ypatumus sergant 2-o tipo astma.

Uždaviniai

1. Įvertinti eozinofilopoetinių (interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio) poveikį sergančiųjų 2-o tipo astma ir sveikų asmenų eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui *in vitro*.

2. Nustatyti lėtinio uždegimo ir kraujo oksidacinio streso biologinių žymenų, bei užląstelinio užpildo apykaitos komponentų kiekį serume sergant alergine astma, lyginant su sveikais asmenimis, ir jų kitimą *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje.
3. Įvertinti sergančiųjų sunkia eozinofiline astma 2-o tipo biologinių žymenų (alarminų, citokinų, chemokinų, tirpių receptorių) kiekio serume kitimą ir klinikinės remisijos kriterijus, blokuojant interleukiną 5 monokloniniu antikūnu 24 savaičių laikotarpyje.

Tyrimo naujumas ir praktinė reikšmė

Eozinofilas – paslaptinga ląstelė. Šių ląstelių tyrimai atliekami nuo 19 amžiaus ir tęsiasi iki šiol. Per šį laikotarpį supratimas apie eozinofilą keitėsi – tyrimų pradžioje jos buvo laikomos „pasyviosiomis“ ląstelėmis, o vėliau – „veikliosiomis“ ląstelėmis, kurios atlieka daug funkcijų [43]. Dabar žinoma, kad eozinofilai dalyvauja vykstant audinių pokyčiams kvėpavimo takuose [44]. Vienas iš tokių pokyčių – kvėpavimo takų remodeliacija. Jau anksčiau atliktais tyrimais buvo nustatyta, kad eozinofilai turi įtakos BLR ląstelių proliferacijai [29, 45], tačiau nebuvo įvertinta, ar eozinofilopoetiniai sustiprina eozinofilų proliferacinį aktyvumą. Šiame tyrime siekėme nustatyti eozinofilopoetinių (IL-3, IL-5 ir GM-CSF) poveikį eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui. Naujovė ta, kad tyrime buvo naudoti eozinofilopoetiniais aktyvuoti kraujo eozinofilų potipiai (Eos_{uzd} ir Eos_{rez}), iš kurių, kartu su BLR ląstelėmis, sudarytos kombinuotos kultūros. Tokiu būdu siekėme parodyti skirtingus eozinofilų potipių proliferacinius aktyvumus veikiant skirtingiems eozinofilopoetinams. Darėme prielaidą, kad ne tik eozinofilopoetiniai, bet ir jų receptorių genų raiška eozinofilų potipių paviršiuje gali turėti įtakos reguliuojant eozinofilų proliferacinį aktyvumą, BLR ląstelių proliferaciją ir kvėpavimo takų remodeliaciją. Siekėme nustatyti eozinofilopoetinių receptorių genų raišką sutelkiant dėmesį į eozinofilopoetinių receptorių kiekį eozinofilų potipių paviršiuje skirtingose tiriamųjų grupėse.

Astmos fenotipų ir endotipų atpažinimas gali padidinti sėkmingo astmos gydymo tikimybę, pagerinti gydymo rezultatus ir pailginti išgyvenamumą [13]. Tirta daug galimų biologinių žymenų, tačiau klinikinėje praktikoje naudojama tik keletas iš jų, o ir šie nėra idealūs [46]. Siekėme surasti naujas 2-o tipo uždegimo patogenezėje dalyvaujančias biologiskai aktyvias medžiagas, kurios galėtų būti biologiniai žymenys. Remiantis literatūros duomenimis, pasirinkome mažiau tirtas medžiagas, kurios cirkuliuoja kraujyje [47-49]. Pasirinktas medžiagas suskirstėme į 3 grupes pagal jų vaidmenį astmos patogenezėje: lėtinio uždegimo biologiniai žymenys, kraujo oksidacinio streso biologiniai žymenys, užląstelinio užpildo apykaitos komponentai.

Pasirinkome ištirti 10 biologiškai aktyvių medžiagų kaip galimų biologinių žymenų, kurie galėtų ateityje būti naudojami atpažįstant astmos fenotipus ir endotipus. Visos medžiagos tirtos kraujyje, lengvai prieinamoje biologinėje terpėje. Tyrimus taip pat atlikome po bronchų provokacijos *Dermatophagoides pteronyssinus* alergenu, kas, mūsų žiniomis, iki šiol nebuvo atlikta.

Per pastarąjį dešimtmetį įvyko didelis proveržis astmos gydyme, kadangi naujai sukurti vaistai, veikiantys astmos patogenezės citokinus ir jų receptorių [50]. Monokloniniai antikūnai, nukreipti prieš 2-o tipo uždegimo citokinus ir jų receptorių, veiksmingai gydo sergančiuosius sunkia eozinofiline astma (SEA) [51]. Blokuojant IL-5 pastebimas ypač geras atsakas, dėl plataus IL-5 poveikio eozinofilams [52]. Dėl šios priežasties tyrimui pasirinkome monokloninį antikūną prieš IL-5 mepolizumabą. Siekėme ištirti, ar monokloniniai antikūnai prieš IL-5 veikia kitus 2-o tipo biologinius žymenis. Pasirinkome tirti alarminus (IL-25, IL-33 ir užkrūčio liaukos stromos limfopoetiną (TSLP)), kurie atlieka itin svarbų vaidmenį inicijuojant 2-o tipo uždegimą; pagrindinius 2-o tipo uždegimo citokinus (IL-4, IL-5 ir IL-13), kurie skatina eozinofiliją; chemokiną (eotaksiną), kuris skatina eozinofilų migraciją; ir tirpius receptorių (tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetą (sIL-5R α) ir tirpaus didelio afiniteto imunoglobulino E receptorių (sFc ϵ RI)).

Minėtų aspektų pagrindu buvo parengtas tyrimo planas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Astma ir jos paplitimas, problemos aktualumas

Astma yra lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga, kuriai būdingas dusulys, kosulys, švokštimas ir kintamas iškvepiamojo oro srautas, kuris vertinamas spirometrijos tyrimu [53]. Ši liga yra viena iš labiausiai paplitusių lėtinių ligų ir viena iš dažniausių mirties priežasčių pasaulyje [54]. Skaičiuojama, kad astma serga daugiau nei 300 milijonų asmenų, o ligos paplitimas didėja. Manoma, kad daugiausia tam įtakos turi oro užterštumas [55]. Astma serga visų šalių gyventojai, tačiau daugiausia – išsivysčiusiose Vakarų šalyse [1]. Higienos instituto duomenimis 2023 m. Lietuvoje astma sergančiųjų asmenų skaičius siekė 67 tūkstančius. Panašus sergamumas išlieka nuo 2020 metų. Nepaisant to, kad sergamumas astma pasaulyje didėja, tačiau mirtingumas – mažėja (sudaro 0,9 proc. visų mirčių) [56]. Astma itin opi visuomenės sveikatos problema ir dėl jos gydymui panaudojamų sveikatos priežiūros lėšų. Ypač tai aktualu dėl sergančiųjų sunkia astma, kurių gydymas reikalauja nemažų kaštų [57]. Be to šių pacientų sumažėja darbo produktyvumas bei našumas, didėja laikinojo nedarbingumo dienų skaičius [58, 59].

1.2. Astmos patogenezė

Astmos patogenezė yra sudėtingas daugiaveiksnis procesas, apimantis keletą genetinių ir aplinkos veiksnių [60]. Pastarąjį dešimtmetį buvo dedamos didelės pastangos suprasti ląstelinius ir molekulinis astmos mechanizmus [61]. Svarbus molekulinis astmos mechanizmas yra lėtinis kvėpavimo takų uždegimas, kurį sukelia iš uždegiminių ląstelių išsiskyre mediatoriai. Šis uždegimas lemia ne tik astmos simptomus, bet ir kvėpavimo takų hiperreaktyvumą, obstrukciją, padidėjusią gleivių gamybą ir kvėpavimo takų sienelių struktūros persitvarkymą (remodeliavimąsi) [62].

Išskiriami keli kvėpavimo takų uždegimo tipai [63]. Pagal vyraujančią uždegimo patogenezinį kelią ir jame dalyvaujančius citokinus išskiriami 2-o tipo ir ne 2-o tipo uždegimai [64], o vertinant skrepliuose vyraujančių ląstelių kiekį – eozinofilinis, mišrus granulocitinis, neutrofilinis ir paucigranulocitinis uždegimas [28]. Ne 2-o tipo uždegimą sunku apibrėžti, nes trūksta specifinių biologinių žymenų [65]. Šio uždegimo pagrindinė savybė – neutrofilų buvimas skrepliuose arba eozinofilų ir kitų 2-o tipo biologinių žymenų nebuvimas (t. y. normalus jų kiekis) [66]. Ne 2-o tipo uždegimu pasireiškianti astma dažniausiai siejama su prastu reagavimu į gydymą gliukokortikoidais ir biologiniais vaistais. O 2-o tipo uždegimui būdingas padidėjęs eozinofilų

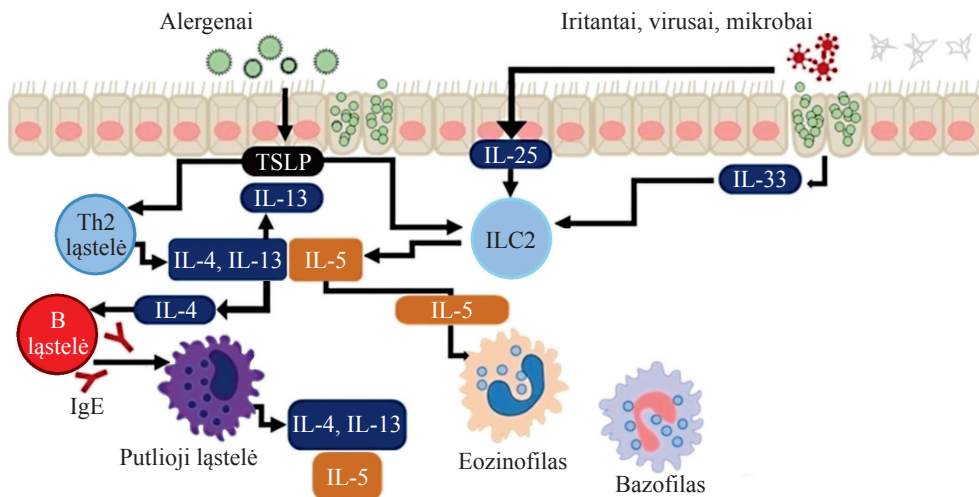
kiekis skrepliuose ir kraujyje [67]. 2-o tipo uždegimu pasireiškiančią astmą gerai veikia gydymas gliukokortikoidais ir biologiniais vaistais, tačiau, esant dideliame eozinofilų kiekiui, astma gali būti ir atspari šiam gydymui [68]. Ne 2-o tipo uždegimas dažniausiai pasireiškia suaugusiesiems [69] kvėpavimo takus paveikus iritantomis, virusams arba mikrobams [70]. 2-o tipo uždegimas dažnai prasideda vaikystėje, kai aplinkos dirgikliai, tokie kaip virusinė kvėpavimo takų infekcija, tėvų rūkymas, azoto dioksidas ir kiti oro teršalai ar alergenai, suaktyvina kvėpavimo takų epitelio ląsteles [63]. Apie pusei sergančiųjų astma, būdingas 2-o tipo uždegimas [69, 71], o mažiau nei pusei – ne 2-o tipo uždegimas [69]. Vyraujančio uždegimo nustatymas gali optimizuoti astmos kontrolę ir paskatinti individualizuotą gydymą, susietą su ligos patogenezė [39].

2-ojo tipo uždegimas laikomas tipišku alergiškų asmenų atsaku į alergenų poveikį, tačiau pasireiškia ir nealergiškiems asmenims [72]. Kvėpavimo takai nuolat turi sąlytį su aplinkos oru ir visa, kas yra jame. Kvėpavimo takų epitelis yra kvėpavimo takų uždegimo patogenezės pagrindas [73]. Reaguodamos į išorinius veiksnius, epitelio ląstelės išskiria citokinus, kurie vaidina pagrindinį vaidmenį reguliuojant tiek 2-o tipo, tiek ne 2-o tipo uždegiminį atsaką sergant astma [74]. Pagrindiniai epitelio citokinai – IL-25, IL-33 ir TSLP – vadinami alarminais. Jie inicijuoja tarpląstelinio signalo perdavimą Th2 ir 2-o tipo įgimtoms limfoidinėms ląstelėms (angl. *type 2 innate lymphoid cells*, ILC2). Pagal tai, kurioms ląstelėms perduodamas tarpląstelinis signalas, išskiriami du uždegimo patogeneziniai keliai [75, 76]: pirmuoju atveju uždegimas vadinamas 2-o tipo uždegimu (angl. *Th2 high*), antruoju atveju – ne 2-o tipo uždegimu (angl. *Th2 low*) (1.2.1 pav.) [77].

2-o tipo uždegimo metu iš aktyvintų epitelio ląstelių išsiskiria alarminai, dėl kurių poveikio dendritinės ląstelės išskiria T limfocitų pagalbininkų žymenį (angl. *cluster of differentiation*, CD) 4+ naiviesiems T limfocitams pagalbininkams (angl. *naive helper T cells*, Th0) ir suaktyvina jų diferenciaciją į Th2 ląsteles. Šios ląstelės migruoja į kvėpavimo takų epitelį ir pogleivį, kuriuose išskiria daug įvairių 2-o tipo uždegimo citokinų (daugiausiai IL-4, IL-5 ir IL-13) [78]. Šie citokinai skatina eozinofilų gamybą, aktyvumą, judėjimą, išgyvenamumą, diferenciaciją ir proliferacines savybes, tokiu būdu palaikant eozinofilinį uždegimą [72, 79].

2-o tipo uždegimo patogenezinis kelias

Ne 2-o tipo uždegimo patogenezinis kelias



1.2.1 pav. Astmos 2-o tipo ir ne 2-o tipo uždegimo patogeneziniai keliai (modifikuota pagal [80])

Ig – imunoglobulinas; IL – interleukinas; ILC2 – įgimtos 2-o tipo limfoidinės ląstelės; Th2 – 2-o tipo T limfocitai pagalbininkai; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas.

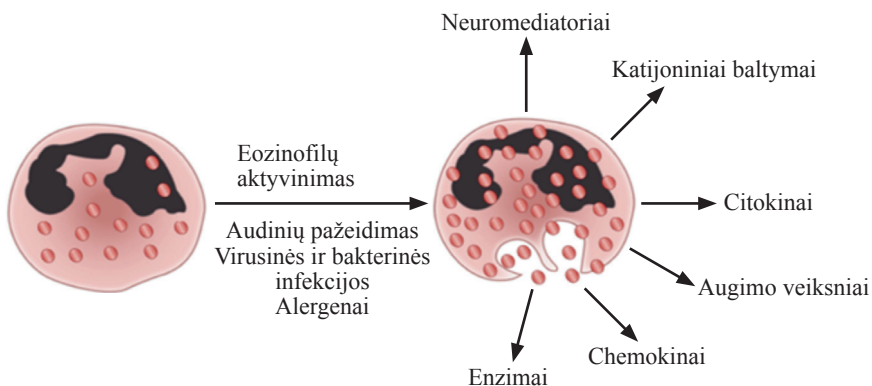
IL-4 – svarbus 2-o tipo uždegimo citokinas [69, 81]. Šis citokinas kartu su IL-13 skatina plazmines ląsteles gaminti IgE. IgE jungiasi prie putliųjų ląstelių bei bazofilų ir taip sukelia vietines alergines reakcijas [23]. IL-13 taip pat skatina kvėpavimo takų hiperreaktyvumą ir lygiųjų raumenų ląstelių susitraukimą, o tai lemia kvėpavimo takų susiaurėjimą [69]. IL-5 yra vienas iš pagrindinių citokinių, turinčių poveikį eozinofilams. Šis citokinas svarbus formuojantis, bręstant ir išgyvenant eozinofilams, taip pat turi įtakos eozinofilų diferenciacijai ir proliferaciniam aktyvumui [82]. IL-5 stimuliuoja eozinofilų gamybą kaulų čiulpuose, taip pat eozinofilų bei bazofilų aktyvumą ir judėjimą. Tokiu būdu palaikomas eozinofilinis kvėpavimo takų uždegimas [83].

1.3. Eozinofilų biologinis vaidmuo sergant astma

Pagrindinis vaidmuo astmos patogenezėje, kuomet vyrauja 2-o tipo uždegimas, tenka eozinofilams [13]. Ryšys tarp eozinofilų ir astmos pirmą kartą buvo nustatytas maždaug prieš šimtmetį. Taip pat įrodytas glaudus ryšys tarp eozinofilijos, astmos paūmėjimų ir plaučių funkcijos pablogėjimo [84].

Eozinofilai – tai galutinai diferenciuotą granuliu turintys leukocitai, kurie gaminami kaulų čiulpuose [85]. Sveikų asmenų (SA) kaulų čiulpuose susidarantių eozinofilų kiekis nėra didelis, todėl kraujyje jų cirkuliuoja nedaug [86]. Panaudojęs eozino dažus, eozinofilus aptiko ir pirmą kartą aprašė 1879 m. Paulas Ehrlichas. Vidutinis eozinofilų kiekis kraujyje yra $0,1 \times 10^9/l$, o 95-oji procentilė – $0,4 \times 10^9/l$ [87]. Viršutine normos riba laikomas $0,5 \times 10^9/l$ eozinofilų kiekis kraujyje [88]. Padidėjęs eozinofilų skaičius audiniuose ir (arba) kraujyje vadinamas eozinofilija [89]. Taigi šiuo metu naudojamos ribinės vertės gydant astmą ($0,15 \times 10^9/l$ arba $0,3 \times 10^9/l$) yra normos ribose [87]. Eozinofilai kraujyje gyvuoja nuo 16 iki 36 valandų, o migravus į audinius šis laikas pailgėja iki 2–5 dienų [90].

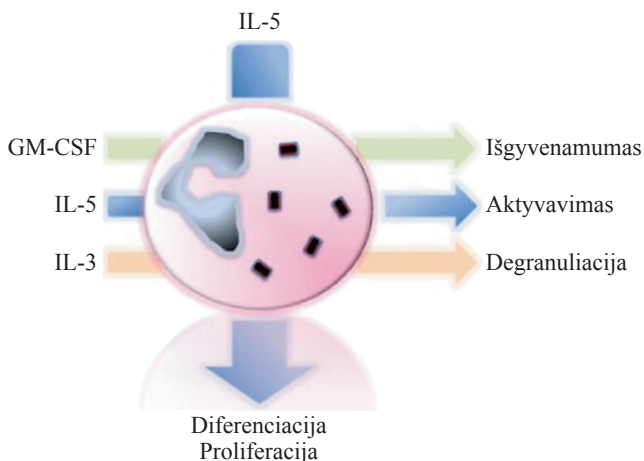
Eozinofilai dalyvauja imuniniame atsake prieš organizmo parazitus ir virusus, skatina alergines reakcijas. Po migracijos į audinius šios ląstelės aktyviai reguliuoja įvairius imuninius atsakus, išskirdamos biologiškai aktyvias medžiagas [89]. Apie 200 morfologiškai skirtingų citoplazminių granuliu randama eozinofiluose, o jose apie 35 rūšys įvairių biologiškai aktyvių medžiagų [86, 91]. Išsiskyrę iš eozinofilų citoplazminių granuliu, biologiškai aktyvios medžiagos veikia įvairias kvėpavimo takų ląsteles, įskaitant epitelį, taurines ląsteles, gleivių liaukas, lygiuosius raumenis (1.3.1 pav.) [92]. Dėl šių medžiagų citotoksinio poveikio hiperplazuoja taurinės ląstelės ir gleivių liaukos, vystosi subepitelinė fibrozė (kolageno kaupimasis bronchų sienelėse), mažėja epitelio barjero vientisumas, didėja kvėpavimo takų lygiųjų raumenų ląstelių masė [44]. Taigi, kvėpavimo takų eozinofilija prisideda prie kvėpavimo takų remodeliacijos vystymosi, o eozinofilų vaidmuo trikdant vietinę homeostazę yra neginčijamas [84].



1.3.1 pav. Eozinofilų aktyvinimas ir išskiriamos biologiškai aktyvios medžiagos

1.4. Eozinofilopoetinių poveikis eozinofilų funkcijoms

Kvėpavimo takų uždegimą sergant astma reguliuoja citokinų tinklas, kuriam priklauso daugiau nei 50 citokinų [93]. Pagrindiniai citokinai, turintys įtakos eozinofilams, yra IL-3, IL-5 ir GM-CSF. Visi 3 citokinai turi įtakos eozinofilų augimui ir išlikimui organizme [94]. Šie citokinai priklauso β grandinės citokinų šeimai [95] ir vadinami eozinofilopoetiniais [95, 96]. IL-3 ir IL-5 daugiausia gamina aktyvuoti T limfocitai ir putliosios ląstelės, o GM-CSF gamina T ląstelės, epitelio ląstelės ir makrofagai [34]. IL-3, IL-5 ir GM-CSF skiriasi savo struktūra, todėl šie citokinai gali skirtingai veikti eozinofilų funkcijas, o eozinofilų potipiai skirtingai reaguoti į tuos pačius eozinofilopoetinus [35, 95, 97, 98]. IL-5 skatina eozinofilų dauginimąsi ir diferenciaciją, o visi 3 eozinofilopoetiniai turi svarbų poveikį eozinofilų išgyvenimui, degranuliacijai ir eozinofilų aktyvinimui (1.4.1 pav.) [34]. Eozinofilopoetinių poveikis eozinofilų vystymuisi skiriasi laiko atžvilgiu – ankstyvosiose eozinofilų vystymosi stadijose svarbūs IL-3 ir GM-CSF, galutiniam subrendimui – IL-5. Veikiant IL-5, kaulų čiulpuose susidaro gerai subrendusių eozinofilų kolonijos, o veikiant IL-3 arba GM-CSF – mažiau subrendusios eozinofilų kolonijos, tačiau jų būna daugiau [95]. IL-3, IL-5 ir GM-CSF turi pleotropinį poveikį eozinofilams [99]. IL-3 ir GM-CSF daug stipriau veikia pleotropiškai nei IL-5, tačiau manoma, kad visų trijų eozinofilopoetinių funkcijos dažniausiai yra perteklinės [100]. Dėl visų anksčiau minėtų savybių IL-3, IL-5 ir GM-CSF laikomi potencialiu taikiniu gydant astmą [101], tačiau IL-5 buvo pasirinktas kaip prioritetas taikinis siekiant sumažinti eozinofiliją, nes jis daro specifinį poveikį eozinofiliniam uždegimui [97].

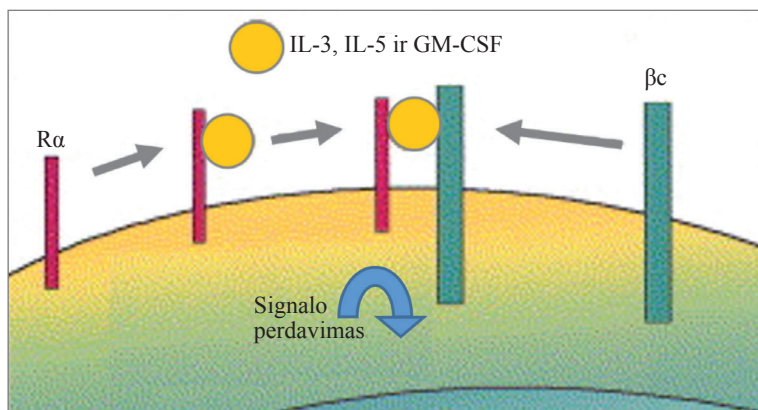


1.4.1 pav. Eozinofilopoetinių poveikis eozinofilams (modifikuota pagal [34])

IL – interleukinas; GM-CSF – granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys.

1.5. Eozinofilopoetinių receptoriai ir jų vaidmuo eozinofilų funkcijoms

Ne tik eozinofilopoetiniai, bet ir jų receptoriai atlieka svarbų vaidmenį astmos patogenezėje. IL-3, IL-5 ir GM-CSF receptoriai turi bendrą β grandinę ir savo citokinams specifines α grandines [102]. IL-5R yra gana specifinis, nes jis ekspresuojamas tik eozinofilų ir bazofilų paviršiuje, o IL-3R ir GM-CSFR – daugelyje kraujodaros ląstelių [97]. Nepaisant to, kad visi 3 eozinofilopoetiniai turi standartinį β grandinės receptoriaus subvienetą, kiekvienas skirtingai veikia eozinofilus dėl α grandinės subvienetui būdingų savybių [101]. Eozinofilopoetiniai mažu afinitetu jungiasi prie atitinkamos α grandinės, vėliau, priartėjus β grandinei, įvyksta konformaciniai pokyčiai ir eozinofilopoetinas dideliu afinitetu jungiasi prie β grandinės. Taip inicijuojamas tarpląstelinio signalo perdavimas [95]. IL-3, IL-5 ir GM-CSF receptorių surinkimas pavaizduotas 1.5.1 pav.



1.5.1 pav. Signalų perdavimas

$R\alpha$ – receptoriui specifiska α grandinė; βc – β grandinės subvienetas; IL – interleukinas; GM-CSF – granulocitų-makrofaugų kolonijas stimuliuojantis veiksnys.

Eozinofilopoetinių receptorių aktyvinimas eozinofilopoetiniais sukelia signalo perdavimą ir eozinofilų aktyvinimą [103]. Eozinofilų aktyvinimas IL-3, IL-5 arba GM-CSF priklauso nuo šių citokinų kiekio ir β grandinės citokinų receptorių kiekio eozinofilų paviršiuje. Tačiau egzistuoja ir svarbus kryžminis reguliavimas tarp šių citokinų kiekio ir jų receptorių raiškos [32]. Tyrimai parodė, kad visi eozinofilopoetiniai sumažina IL-5R α grandinės ir padidina IL-3R α grandinės ekspresiją, o GM-CSFR α grandinės ekspresiją reguliuoja GM-CSF (IL-3 ar IL-5 jo neveikia) [104].

1.6. Eozinofilų proliferacinis aktyvumas ir poveikis bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms

Eozinofilų vaidmuo kvėpavimo takų remodeliacijai, įskaitant BLR ląstelių proliferaciją, buvo nustatytas palyginti anksti [45]. Eozinofilų išskiriami citokinai, chemokinai ir augimo veiksniai sukelia įvairius kvėpavimo takų struktūrinius pokyčius [1]. Eozinofilų poveikis kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma priklauso ne tik nuo jų kiekio kvėpavimo takų audiniuose, bet ir išgyvenamumo trukmės, nes taip pailginamas poveikis plaučių struktūrinėms ląstelėms [29].

BLR ląstelės gamina užštelinio užpildo baltymus ir reguliuoja vietinę uždegiminę aplinką gamindamos citokinus, chemokinus ir augimo veiksnius [105]. Šios ląstelės atlieka vieną iš pagrindinių vaidmenų astmos patogenezėje [106], nes yra atsakingos už kvėpavimo takų tonusą, kuris palaiko atvirą kvėpavimo takų spindį ir užtikrina įkvėpimo bei iškvėpimo oro srautą [107]. Dėl šios priežasties BLR ląstelės yra svarbios obstrukcinių plaučių ligų, ypač astmos, patogenezėje. Išoriniai dirgikliai, tokie kaip alergenai, dulkės, oro teršalai ir aplinkos temperatūros pokyčiai, provokuoja BLR ląstelių hipertrofiją ir proliferaciją bei šių ląstelių disfunkciją [108]. Vienas iš pagrindinių patologiinių procesų, sukeliančių klinikinį astmos pasireiškimą ir lemiančių ligos sunkumą, yra BLR ląstelių hiperplazija [33]. Šis procesas kartu su taurinių ir liaukinių ląstelių hiperplazija, subepiteline fibroze ir kitais pataloginiais procesais lemia padidėjusią BLR ląstelių masę ir kvėpavimo takų remodeliaciją [109]. Kvėpavimo takų remodeliacija pakeičia tiek smulkių, tiek stambių kvėpavimo takų struktūrą [64]. Dėl šių priežasčių BLR ląstelės turėtų būti laikomos svarbiu terapiniu taikiniu [107].

1.7. 2-o tipo biologiniai žymenys, būdingi sergant astma

Biologinis žymuo – tai rodiklis, galintis padėti nustatyti ligą, jos sunkumą bei atsaką į gydymą. Klinikinėje praktikoje biologiniai žymenys tampa vis svarbesni, nes jie yra objektyvūs ir išmatuojami rodikliai apibūdinti ligą [110]. Išsamesnės žinios apie astmos patogenezę lėmė naujų biologinių žymenų poreikį ir jų paiešką. Tai buvo daroma siekiant individualizuoti astmos gydymą [23]. 2-o tipo žymenys susieja endotipą su fenotipu [111]. Atlikta daug tyrimų ieškant biologinių žymenų. Patvirtinti ir klinikinėje praktikoje naudojami tik keli [112].

1.7.1. Žinomi 2-o tipo biologiniai žymenys

Šiuo metu žinomi biologiniai žymenys yra eozinofilų kiekis (kraujyje ir skrepliuose), IgE kiekis serume, F_{ENO} kiekis iškvėpiamame ore ir peristino kiekis serume. Šie biologiniai žymenys yra svarbūs prognozuojant atsaką į 2-o tipo uždegimo gydymą [72]. Deja, visi patvirtinti biologiniai žymenys turi savo trūkumų ir nėra visiškai patikimi. Dėl šios priežasties nerekomenduojama tirti tik vieno biologinio žymens ir tik vieną kartą [22, 111, 113]. Biologinių žymenų kiekis gali kisti priklausomai nuo paciento svorio, alergenu poveikio, vartojamų vaistų, infekcinių susirgimų, rūkymo ar paros laiko [22]. Kadangi nei vienas iš patvirtintų biologinių žymenų nėra idealus, rekomenduojama tirti bent keletą iš jų lygiagrečiai ir tyrimą po kurio laiko kartoti. Tokiu būdu padidinamas šių tyrimų jautrumas ir specifiškumas, o tai leidžia geriau atpažinti 2-o tipo uždegimą [114]. Norima, kad biologiniai žymenys būtų ne tik informatyvūs, bet ir lengvai išmatuojami ir nereikalautų daug kaštų [115].

Daugiausia ištirtas 2-o tipo biologinis žymuo – eozinofilai. Eozinofilų kiekio kraujyje matavimas dažniausiai naudojamas klinikinėje praktikoje [22]. Eozinofilus gamina kaulų čiulpai, o jų gamybą skatina eozinofilo-poetiniai [116]. Šio biologinio žymens kraujyje nustatymas yra plačiausiai paplitęs, kadangi yra minimaliai invazyvus, lengvai, paprastai ir greitai atliekamas [22]. Eozinofilų kiekis kraujyje priklauso nuo cirkadinio ritmo, o parazitinės ligos ir geriamųjų gliukokortikoidų vartojimas dažniausiai sąlygoja eozinofilų kiekio pokyčius [110]. Eozinofilų normos ribos gali skirtis priklausomai nuo laboratorinės įrangos. Eozinofilų, kaip 2-o tipo uždegimo biologinio žymens, viršutine ribine verte laikomas $0,15 \times 10^9/l$ kiekis [117]. Eozinofilų kiekis kraujyje yra svarbus nustatant ligos endotipą, fenotipą, parenkant individualizuotą gydymą [118] ir prognozuojant atsaką į biologinius vaistus [22].

Eozinofilų kiekio skrepliuose nustatymas suteikia svarbios informacijos apie astmos patogenezę [61]. Skirtingai nei eozinofilų tyrimas kraujyje, skreplių ištyrimas reikalauja specializuotos įrangos ir patirties turinčių darbuotojų. Tai gali būti šio tyrimo apribojimas, kadangi atliekamas ne visose laboratorijose [22]. Be to, ne visi pacientai gali atkosėti skreplių, tokiu atveju reikalinga skreplių indukcija, o kartais skreplių surinkimas išvis negalimas [119]. 3 proc. eozinofilų kiekis skrepliuose laikomas kliniškai reikšminga ribine verte [120]. Kaip ir eozinofilų kiekis kraujyje, taip ir eozinofilų kiekis skrepliuose svarbus nustatant ligos endotipą ir fenotipą bei parenkant individualizuotą gydymą. Eozinofilų kiekis skrepliuose yra susijęs su jų kiekiu kraujyje, todėl kintant eozinofilų kiekiui kraujyje, keičiasi ir jų kiekis skrepliuose [121].

Serumo bendras IgE yra Ig, sukeliantis 1 tipo padidėjusio jautrumo reakcijas ir anafilaksiją. IgE taip pat vaidina pagrindinį vaidmenį AA astmos patogenezėje [61]. Bendro IgE kiekio kraujyje nustatymas, kaip ir eozinofilų kiekio kraujyje nustatymas, yra minimaliai invazyvus, lengvai, paprastai ir greitai atliekamas tyrimas [22]. IgE gamina plazminės ląstelės, veikiant IL-4 ir IL-13 [23]. Šio biologinio žymens kiekis serume yra svarbus atrenkant AA sergančius pacientus, kuriems galimas prieš IgE nukreiptas gydymas [22].

FeNO yra dar vienas biologinis žymuo, kuris specifiškesnis nei kiti, rodantis 2-o tipo uždegimą [61]. Jis nustatomas iškvepiamame ore. Tyrimas – neinvazinis, lengvai ir greitai atliekamas bei nereikalaujantis daug paciento pastangų [22]. Azoto monoksidą gamina kelių rūšių ląstelės – kvėpavimo takų epitelio ląstelės, eozinofilai ir makrofagai [13, 115]. Ribine verte laikomas 25 ppb FeNO kiekis [22, 115]. Šio biologinio žymens daugėja proporcingai intensyvėjant 2-o tipo uždegimui [72, 122]. FeNO kiekį didina rūkymas, nitratai maiste, kvėpavimo takų infekcija su bronchų susiaurėjimu, fizinė veikla, todėl viso to prieš tyrimą rekomenduojama vengti. Taip pat šiam tyrimui atlikti reikalinga speciali įranga [22, 110].

Periostinas siūlomas kaip pakaitinis biologinis žymuo [61]. Jo kiekio kraujyje nustatymas, kaip ir eozinofilų bei bendro IgE, yra minimaliai invazyvus, lengvai ir greitai atliekamas. Šis biologinis žymuo gaminamas fibroblastų, epitelio ir endotelio ląstelių, veikiant IL-4 ir IL-13 [123, 124]. Periostino ribinės vertės skiriasi priklausomai nuo amžiaus – jo kiekis vaikams yra didesnis nei suaugusiesiems ir viršija 50 ng/l, o dar labiau padidėja vaikui intensyviai augant. Periostino kiekį didina gretutinės atopinės ligos, o mažina – rūkymas [125]. Periostino tyrimas dažniau atliekamas moksliniais tikslais, o ne klinikinėje praktikoje. Taip yra dėl anksčiau minėtų šio tyrimo trūkumų [126].

1.7.2. Nauji 2-o tipo biologiniai žymenys

Nauji biologiniai žymenys gali padėti diagnozuoti ir gydyti astmą [61]. Vykdomi klinikiniai tyrimai ieškant naujų biologinių žymenų, kurie būtų svarbūs 2-o tipo uždegimo patogenezėje [13]. Manoma, kad daugelis biologiškai aktyvių medžiagų, kurios dalyvauja astmos patogenezėje, galėtų būti biologiniais žymenimis [24] (1.7.2.1 lentelė).

1.7.2.1 lentelė. Nauji 2-o tipo biologiniai žymenys

Grupė	Biologinis žymuo	Reikšmė astmos patogenezei	Šaltinis
Lėtinio uždegimo žymenys	ATX	Dalyvauja aktyvuojant eozinofilus, putliąsias ir dendritines ląsteles, limfocitus, kvėpavimo takų epitelio ir lygiųjų raumenų bei kitas ląsteles.	[127]
	MET	Dalyvauja kvėpavimo takų remodeliacijoje, valdant plaučių struktūrinių ląstelių procesus, tokius kaip augimas, išgyvenamumas, migracija ir diferenciacija.	[128]
	Lp-PLA2	Susijęs su kvėpavimo takų hiperreaktyvumu.	[129]
	sIL-5R α	Skatina eozinofilų diferenciaciją, brendimą ir aktyvinimą.	[130]
Kraujo oksidacinio streso žymenys	PTX3	Sąveikaudamas su komplemento komponentais, sustiprina uždegiminį atsaką.	[48]
	TRX1	Reguliuoja uždegiminį atsaką, slopindamas IL-13 gamybą, slopina eotaksino gamybą.	[131]
Užląstelinio užpildo apykaitos komponentai	MMP-7	Dalyvauja remodeliuojant užląstelinio užpildo komponentus, veikia uždegiminių ląstelių judėjimą, reguliuoja lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją, skatina 2-o tipo citokinų išskyrimą.	[132, 133]
	MMP-9		
	MMP-10		
	ICTP	Atspindinti užląstelinio užpildo komponento kolageno degradaciją.	[47]
Citokinai	IL-4	Skatina IgE sekreciją iš B limfocitų, uždegimo citokinų išsiskyrimą iš fibroblastų.	[134]
	IL-5	Skatina eozinofilų brendimą, aktyvinimą, išgyvenamumą, judėjimą iš kraujotakos į kvėpavimo takus.	[135]
	IL-13	Skatina IgE sekreciją iš B limfocitų, gleivių išsiskyrimą iš bronchų pogleivio liaukų.	[134]
Alarminai	IL-25	Skatina 2-o tipo citokinų gamybą ir išsiskyrimą iš efektorinių ląstelių.	[136]
	IL-33		
	TSLP		
Chemokinai	Eotaksinas	Skatina eozinofilų judėjimą iš kaulų čiulpų į kraujotaką.	[137]
Tirpūs receptoriai	sIL-5R α	Signalų perdavimas per šį receptorių skatina eozinofilų vystymąsi, išgyvenimą ir aktyvinimą.	[130]
	sFc ϵ RI	Šio receptoriaus aktyvinimas skatina citokinų ir chemokinų gamybą bei uždegimą.	[138]

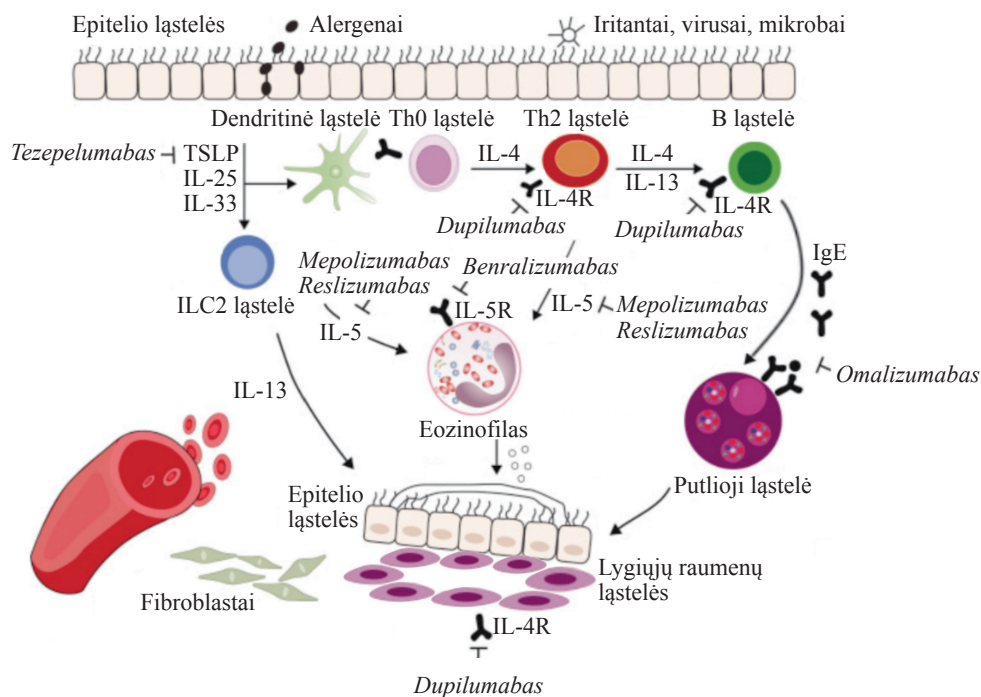
ATX – autotaksinas; ICTP – C telopeptido I tipo kolagenas; Ig – imunoglobulinas; IL – interleukinas; Lp-PLA2s – lipoproteino A2 fosfolipazė; MET – tirozin-proteinkinazė Met; MMP – matrikso metaloproteinazė; PTX3 – pentaksinas 3; sFc ϵ RI – tirpus didelio afiniteto imunoglobulino E receptoriaus; sIL-5R α – tirpus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; TRX1 – tioredoksinas 1; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas.

Vienos svarbiausių biologiškai aktyvių medžiagų, dalyvaujančių kvėpavimo takų uždegime, yra citokinai, kurių priskaičiuojama apie 50 [93]. Esant 2-o tipo uždegimui, ypač svarbūs Th2 ir ILCS ląstelių gausiai išskiriami IL-4, IL-5 ir IL-13 citokinai bei epitelio gaminami IL-25, IL-33, TSLP citokinai (alarminai). Šių citokinų kiekio serume nustatymas gali padėti nuspėti 2-o tipo uždegimą, tačiau kol kas naudojami tik atliekant mokslinius tyrimus ir nėra paplitę klinikinėje praktikoje [139]. Apibendrinus galima teigti, kad šiuo metu vykdoma naujų biologinių žymenų paieška. Tikimasi surasti tokių biologinių žymenų arba jų rinkinius, kurių ištyrimas būtų paprastas, pigus, o rezultatai kuo tiksliau leistų nuspėti 2-o tipo uždegimą ir jo intensyvumą.

1.8. 2-o tipo uždegimo slopinimas veikiant citokinus ir jų receptorius

Patogenezinis astmos gydymo tikslas – kvėpavimo takų uždegimo slopinimas [140]. Klinikinis gydymo tikslas – pasiekti ir palaikyti simptomų kontrolę bei sumažinti būsimą nepageidaujamų pasekmių riziką, įskaitant ligos paūmėjimus, plaučių funkcijos sumažėjimą ir šalutinį vaistų poveikį, neatsižvelgiant į astmos sunkumą [141]. Kelis dešimtmečius šiam uždegimui mažinti vartojami įkvėpjamieji vaistai – gliukokortikoidai, kurie naudojami pirminiam astmos gydymui [60]. Nepaisant gydymo įkvėpjamaisiais gliukokortikoidais kartu su bronchus plečiamaisiais vaistais, daliai pacientų liga išlieka nekontroliuojama arba iš dalies kontroliuojama ir nepavyksta išvengti ligos paūmėjimų. Tai paskatino ieškoti naujų gydymo galimybių [77].

Prieš du dešimtmečius pradėjo keistis supratimas apie astmos patogenezę ir tai lėmė astmos gydymo pokyčius. Dabar prieš paskiriant individualizuotą astmos gydymą, rekomenduojama tiksliai įvertinti ir nustatyti astmos fenotipą ir endotipą [142]. Tai padaryti padeda 2-o tipo biologiniai žymenys. Visa tai paskatino atlikti klinikinius tyrimus su monokloniniais antikūnais, nukreiptais prieš 2-o tipo uždegimo citokinus ir jų receptorius [41]. 2-o tipo uždegimo slopinimas biologiniais vaistais, patvirtintais Jungtinių Amerikos Valstijų maisto ir vaistų administracijos (angl. *USA Food and Drug Administration*, FDA), pavaizduotas 1.8.1 pav. ir 1.8.1 lentelėje [52, 143].



1.8.1 pav. Astmos 2-o tipo uždegimo slopinimas biologiniais vaistais (modifikuota pagal [52])

IL – interleukinas; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas; IL-4R – interleukino 4 receptoriaus; IL-5R – interleukino 5 receptoriaus.

1.8.1 lentelė. Jungtinių Amerikos Valstijų maisto ir vaistų administracijos patvirtintas biologinis sunkios astmos gydymas, pagrįstas indikacijomis ir amžiumi (modifikuota pagal [143])

Biologinis vaistas	Indikacijos	Patvirtintas amžius
Omalizumabas	Išsijautrinimas įkvėpiamiesiems alergenams ir bendro IgE kiekis 30–1300 IU/ml	6 metų ir vyresni
Mepolizumabas	Eozinofilų kiekis kraujyje $\geq 0,15 \times 10^9/l$	6 metų ir vyresni
Reslizumabas	Eozinofilų kiekis kraujyje $\geq 0,4 \times 10^9/l$	18 metų ir vyresni
Benralizumabas	Eozinofilų kiekis kraujyje $\geq 0,15 \times 10^9/l$	12 metų ir vyresni
Dupilumabas	Eozinofilinis fenotipas Nuo geriamųjų gliukokortikoidų priklausoma astma	6 metų ir vyresni
Tezepelumabas	Sunki astma, kuri yra nekontroliuojama standartinio gydymu	12 metų ir vyresni

Ig – imunoglobulinas.

Daugelį eozinofilų funkcijų kontroliuoja IL-5, todėl šio citokino slopinimas yra puikus pasirinkimas mažinti 2-o tipo uždegimą [144]. Yra du būdai kaip reguliuoti IL-5 poveikį eozinofilams. Vienas iš jų yra monokloninis antikūnas, nukreiptas prieš citokiną IL-5, kitas – monokloninis antikūnas, nukreiptas prieš jo receptorių [145]. Abu metodai yra veiksmingi mažinant cirkuliuojančių eozinofilų kiekį, o sumažėjus jų kiekiui, mažiau migruoja į kvėpavimo takus. Mepolizumabas ir reslizumabas yra nukreipti prieš IL-5, benralizumabas – prieš IL-5R [146]. Visi šie vaistai mažina astmos paūmėjimų dažnį, pagerina gyvenimo kokybę ir palengvina astmos simptomus [147–156]. Vienas iš monokloninių antikūnų prieš IL-5 veikimo ribojimų yra jų negebėjimas patekti į uždegimo vietą, kurioje veikia citokinai. Monokloninis antikūnas prieš IL-5 nesutrumpina kvėpavimo takuose jau esančių eozinofilų išgyvenamumo, tuo tarpu monokloninis antikūnas prieš IL-5R – priešingai – gali prisijungti prie audiniuose esančių eozinofilų ir sutrumpinti jų išgyvenamumą. Tai svarbus skirtumas tarp monokloninių antikūnų prieš citokinus ir prieš jų receptorius. Tai lemia didesnę monokloninių antikūnų prieš IL-5R gebėjimą mažinti eozinofilų kiekį, priešingai nei gali monokloniniai antikūnai prieš IL-5 [157].

Eozinofilai yra pagrindinės ir svarbiausios ląstelės astmos patogenezėje, kurių proliferacinis aktyvumas turi įtakos kvėpavimo takų remodeliacijai. Vienas iš galimų būdų paveikti jų kiekį – blokuoti 2-o tipo uždegimo citokinus arba jų receptorius. Kadangi daugelį eozinofilų funkcijų kontroliuoja IL-5, pasirinkime naudoti būtent šį citokiną blokuojantį vaistą. Nėra žinoma ar gydymas prieš IL-5 nukreiptu vaistu turi poveikį kitiems su 2-o tipo uždegimu susijusiems biologiniams žymenims. Nusprendėme ištirti biologiškai aktyvių medžiagų kiekius serume, esant sunkiai ir nesunkiai bei skirtingo fenotipo (alerginė / nealerginė) astmai.

Minėtų aspektų pagrindu buvo parengtas tyrimo planas.

2. METODAI

2.1. Bioetikos komiteto leidimas

Tyrimas vykdytas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų (toliau – Kauno klinikų) Pulmonologijos klinikoje turint Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Regioninio biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimą (Nr. BE-2-13, po papildymo – Nr. BE-2-13/2015). Tyrimo laikotarpiu suplanuoti nauji tyrimai, dėl ko gautas kitas bioetikos leidimas (Nr. BE-2-58, po papildymo – Nr. BE-2-58/2020). Į tyrimą įtraukti tik informuoto asmens sutikimo formą pasirašę tiriamieji. Tyrimas atliktas laikantis 1964 m. Helsinkio deklaracijos principų. Šis tyrimas taip pat registruotas *clinicaltrials.gov* puslapyje (identifikacijos numeris NCT04542902).

2.2. Tiriamųjų populiacija

Tiriamųjų populiaciją sudarė Kauno klinikų pacientai. Tyrimas truko nuo 2019 m. rugsėjo mėnesio iki 2023 m. rugsėjo mėnesio. Pacientai į tyrimą buvo įtraukti 2 būdais. Pirmasis būdas – duomenų apie tinkamus pacientus paieška naudojant ligoninės elektroninę informacinę sistemą. Su potencialiai tinkamais pacientais susisiekti telefonu. Antrasis būdas – tinkamų pacientų atranka jiems atvykus į polikliniką konsultuotis dėl astmos diagnozės nustatymo ar gydymo. AA grupę sudarė sergantieji nesunkia AA, SEA grupę – sergantieji sunkia alergine ir nealergine eozinofiline astma. Sveikų tiriamųjų grupę sudarė sveiki savanoriai, nesergantys plaučių ir alerginėmis ligomis bei neturintys kvėpavimo ir alergijos simptomų.

Tyrimė dalyvavo 100 asmenų – 37 sergantieji nesunkia AA, 36 sergantieji alergine arba nealergine SEA ir 27 sveiki tiriamieji. Priklausomai nuo disertacinio darbo uždavinio, pagrindinė tiriamoji grupė buvo pacientai, sergantys nesunkia AA ir / arba SEA. Kontrolinę grupę atstovavo sveiki tiriamieji.

Tyrimo etapai:

- Pirmojo disertacijos uždavinio įgyvendinimui ištirti 46 asmenys – 18 pacientų, sergančių sunkia nealergine eozinofiline astma (SNEA), 17 pacientų, sergančių AA ir 11 sveikų tiriamųjų.
- Antrajam uždavinio įgyvendinimui ištirti 36 asmenys – 20 pacientų, sergančių AA ir 16 sveikų tiriamųjų.
- Trečiajam uždaviniui įgyvendinti ištirta 18 asmenų. Visi jie sirgo alergine arba nealergine SEA ir buvo naujai paskirtas gydymas monokloniniu antikūnu prieš IL-5 mepolizumabu.

Tiriamieji, vykdant skirtingus uždavinius, nesikartojo. Detalūs tiriamųjų demografiniai ir klinikiniai duomenys pateikti skyriuje „3. Rezultatai ir jų aptarimas“ (3.1.1.1–3.3.1.1 lentelės).

2.3. Pacientų įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijai

Pacientų įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijai pateikti 2.3.1 lentelėje.

2.3.1 lentelė. Pacientų įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijai

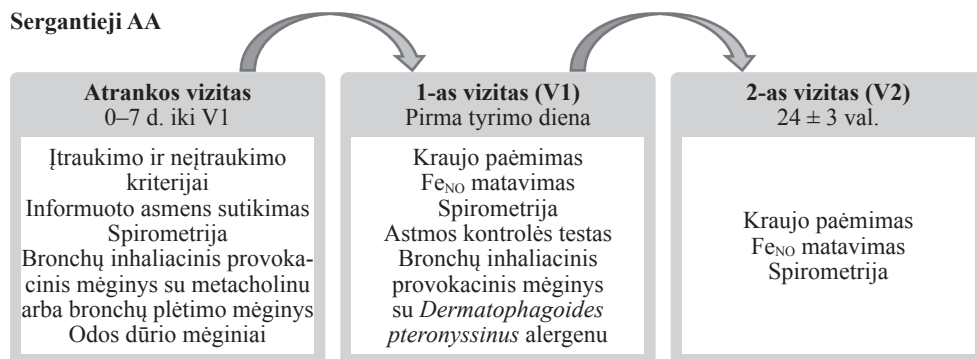
	AA	SEA	SA
Įtraukimo kriterijai			
18–80 metų	✓	✓	✓
Pasirašyta informuoto sutikimo forma	✓	✓	✓
Nesunki ligos eiga ir mažiausiai 1 mėnesį nevartojami įkvepiamieji gliukokortikoidai	✓		
Teigiamas bronchų inhaliacinis provokacinis mėginys su metacholinu arba teigiamas bronchų plėtimo mėginys	✓		
Atopija, patvirtinta odos dūrio mėginiais, įskaitant <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alergeną	✓		
SEA ir ≥ 1 metus vartojamos didelės įkvepiamųjų gliukokortikoidų dozės ir ilgo veikimo β_2 agonistai		✓	
Nekontroliuojama ligos eiga (≥ 2 astmos paūmėjimai per 1 metus, kurių metu vartojami geriamieji gliukokortikoidai)		✓	
Eozinofilų kiekis kraujyje $\geq 0,3 \times 10^9/l$		✓	
Kvėpavimo simptomų nebuvimas			✓
Atopijos nebuvimas, paneigta odos dūrio mėginiais			✓
Neįtraukimo kriterijai			
Rūkymas	✓	✓	✓
Nėštumas, maitinimas krūtimi	✓	✓	✓
Kitos lėtinės kvėpavimo sistemos ligos	✓	✓	✓
Kliniškai reikšmingos nekontroliuojamos gretutinės ligos	✓	✓	✓
Kvėpavimo takų infekcija ≤ 1 mėn.	✓	✓	✓
Astmos paūmėjimas ≤ 1 mėn.	✓	✓	
Geriamųjų gliukokortikoidų vartojimas	✓	✓	

AA – alerginė astma; SA – sveiki asmenys; SEA – sunki eozinofilinė astma.

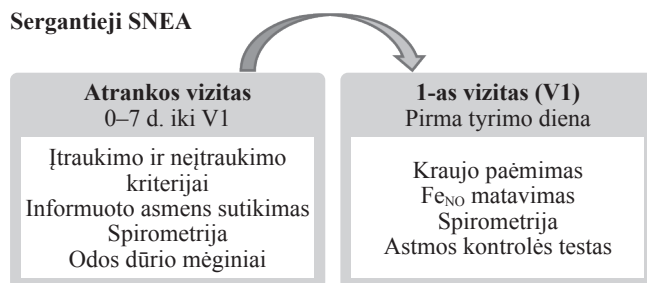
2.4. Tyrimo dalyvių ištyrimo eiga

Priklausomai nuo disertacinio darbo uždavinio ir tiriamosios grupės, tyrimo dalyvio ištyrimas truko nuo 2 iki 168 dienų (24 savaitės). Tyrimų schemas pagal disertacinio darbo uždavinius pateikiamos 2.4.1–2.4.3 pav. Tyrimams naudoti metodai detalai aprašomi 2.5–2.7 skyriuose).

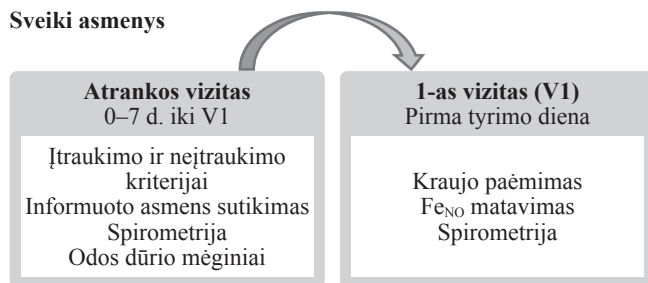
Sergantieji AA



Sergantieji SNEA



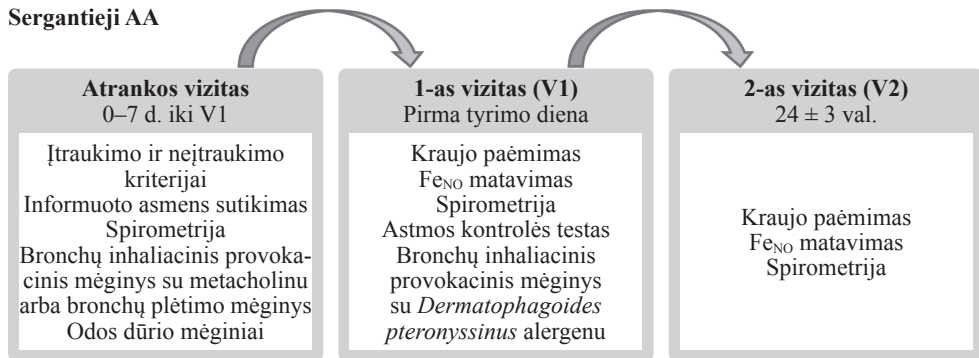
Sveiki asmenys



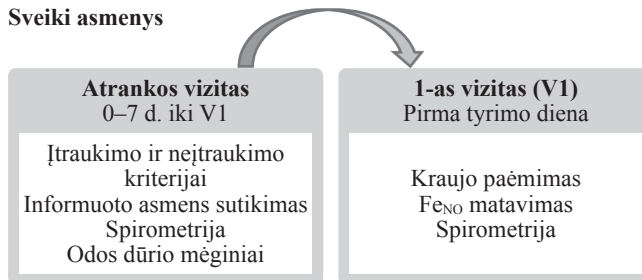
2.4.1 pav. Tyrimo eiga (pirmasis disertacinio darbo uždavinys)

AA – alerginė astma; Fe_{NO} – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma.

Sergantieji AA



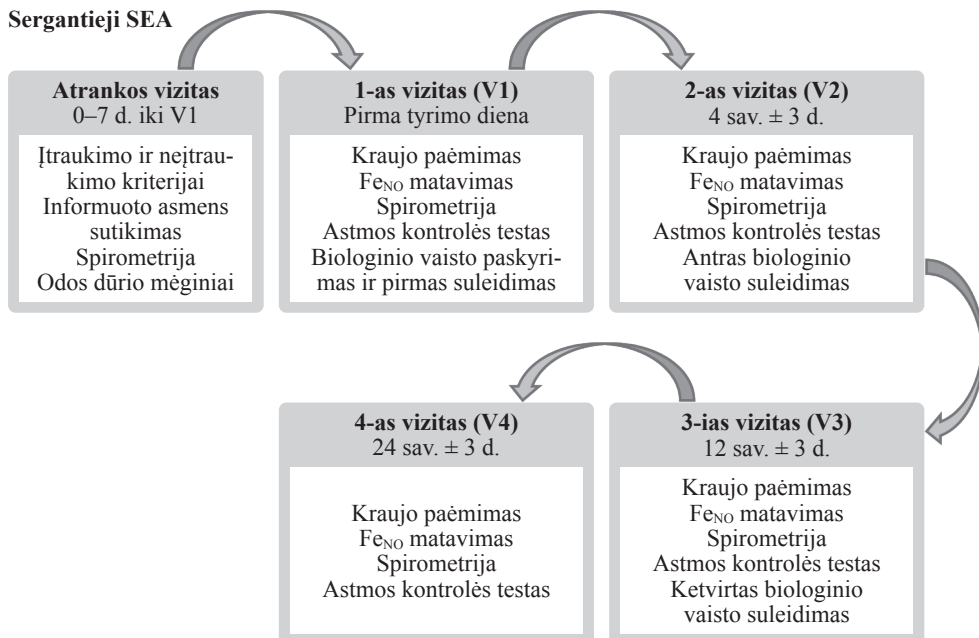
Sveiki asmenys



2.4.2 pav. Tyrimo eiga (antrasis disertacinio darbo uždavinys)

AA – alerginė astma; Fe_{NO} – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore.

Sergantieji SEA



2.4.3 pav. Tyrimo eiga (trečiasis disertacinio darbo uždavinys)

Fe_{NO} – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore; SEA – sunki eozinofilinė astma.

2.5. Klausimynai

2.5.1. Astmos kontrolės testas

Astmos kontrolei vertinti naudojami įvairūs klausimynai, vienas iš jų – astmos kontrolės testas. Tai paprastas, lengvai suprantamas, greitai užpildomas testas, kurį sudaro 5 klausimai su 5 galimais atsakymų variantais kiekvienam klausimui. Maksimali šio testo balų suma – 25 balai, minimali – 5 balai. Surinkus ≥ 20 balų, vertinama, kad astma gerai kontroliuojama, 16–19 balų – iš dalies kontroliuojama, ≤ 15 balų – nekontroliuojama. Astmos kontrolės testo patikimumas patvirtintas tyrimais, o vertimas į lietuvių kalbą yra įteisintas.

2.6. Instrumentiniai tyrimai

2.6.1. Plaučių funkcijos tyrimai

2.6.1.1. Spirometrija

Plaučių funkcijai įvertinti buvo atlikta spirometrija. Tai pagrindinis plaučių funkcijos tyrimas, kurio metu matuojamas iškvėpiamo oro kiekis ir greitis. Šis tyrimas buvo atliktas visiems tiramiesiems kiekvieno vizito metu naudojant spirometrą (*Ganshorn Medizin Electronic*, Niederlauer, Vokietija). Spirometrija atlikta laikantis griežtų spirometrijos atlikimo reikalavimų. Atlikimo technika: užspaudus nosį spaustuku ir apžiojus vienkartinį aparato kandiklį, reikia ramiai kvėpuoti, paskui visiškai iškvėpti, maksimaliai giliai įkvėpti ir staigiai bei ilgai pūsti. Spirometrija kartota tol, kol gauti mažiausiai 3 kokybiški tyrimo rezultatai, bet ne daugiau nei 8 kartus. Spirometrijos metu vertinti šie parametrai: forsuoata gyvybinė talpa (angl. forced vital capacity, FVC), forsuito iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę (angl. *forced expiratory volume in 1 second*, FEV₁) ir FEV₁/FVC santykis. Plaučių funkcijos vertinimas paremtas Amerikos krūtinės draugijos (angl. *American Thoracic Society*, ATS) rekomendacijomis. Siekiant įvertinti, kiek tiriamos plaučių funkcijos vertės yra nutolosios nuo norminių verčių, naudotos z-reikšmės (5-asis ir 95-asis procentiliai, kurie atitinka –1,645 ir +1,645 z reikšmės).

2.6.1.2. Bronchų plėtimo mėginys

Bronchų obstrukcijos grįžtamumui įvertinti buvo atliktas bronchų plėtimo mėginys. Šis tyrimas atliktas tiems AA grupės pacientams, kuriems atrankos vizito metu atliekant spirometriją rasta bronchų obstrukcija (FEV₁/FVC z-reikšmė $< -1,645$). Bronchų plėtimui naudotas suslėgtasis

įkvepiamasis tirpalas salbutamolis. Tiriamieji šį vaistą įkvėpdavo naudojant tarpinę (4 įkvėpimai po 100 µg). Spirometrija pakartotinai atlikta po 15 minučių nuo salbutamolio įkvėpimo naudojant tą patį spirometrą ir laikantis tų pačių spirometrijos atlikimo reikalavimų. Spirometrijos atlikimo technika aprašyta 2.6.1.1 skyriuje. Spirometrija kartota tol, kol gauti mažiausiai 3 kokybiški tyrimo rezultatai, bet ne daugiau nei 8 kartus. Po salbutamolio įkvėpimo atliktos spirometrijos rezultatai lyginti su pradiniais (prieš salbutamolio įkvėpimą) spirometrijos rezultatais. Bronchų plėtimo mėginio vertinimas paremtas ATS rekomendacijomis. FVC ir (arba) FEV₁ po salbutamolio įkvėpimo padidėjus ≥ 12 proc. ir ≥ 200 ml, mėginys laikytas teigiamu.

2.6.1.3. Bronchų inhaliacinis provokacinis mėginys su metacholinu

Siekiant įvertinti bronchų hiperreaktyvumą atliktas bronchų inhaliacinis provokacinis mėginys su metacholinu. Šis tyrimas atliktas tiems AA grupės tiriamiesiems, kuriems atrankos vizito metu atliekant spirometriją bronchų obstrukcijos nebuvo (FEV₁/FVC z-reikšmė $> -1,645$). Tyrimui naudota bronchus sutraukianti medžiaga metacholinas. Iš metacholino miltelių ir tirpiklio paruoštas metacholino tirpalas. Šiam tirpalui įkvėpti naudotas slėginis dozimetras (*ProvoX; Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Vokietija*). Metacholinas įkvepiamas pro burną. Atlikimo technika: užspaudus nosį spaustuku ir apžiojus vienkartinį aparato kandiklį reikia ramiai kvėpuoti. Aparatas automatiškai įpurškia reikiamą metacholino kiekį, o pacientas per vieną–keletą įkvėpimų (priklausomai nuo metacholino dozės) jį įkvepia. Pradinė metacholino dozė tyrimo pradžioje – 10,1 µg. Praėjus 2 min. po metacholino įkvėpimo, kartojama spirometrija. Tyrimas tęstas, jeigu FEV₁ (l) nesumažėdavo daugiau nei 20 proc. nuo pradinės spirometrijos metu išmatuoto FEV₁. Įkvepiamojo metacholino dozė buvo didinama spirometriją kartojant dar po 2 min. Tyrimas tęstas iki keturių metacholino įkvėpavimo – spirometrijos atlikimo – ciklų arba kol FEV₁ (l) sumažėdavo 20 proc. nuo pradinės spirometrijos metu išmatuoto FEV₁. Bronchų inhaliacinio provokacinio mėginio su metacholinu vertinimas paremtas ATS rekomendacijomis. Mėginys laikytas teigiamu, jeigu, baigus tyrimą, FEV₁ (l) sumažėdavo ≥ 20 proc. nuo pradinės spirometrijos metu išmatuoto FEV₁. Metacholino dozė, nulemianti ≥ 20 proc. FEV₁ sumažėjimą (PD_{20M}), buvo apskaičiuota pagal logaritmines nuo atsako į dozę priklausančias kreives dviejų gretimų taškų linijinės interpoliacijos metodu.

2.6.1.4. Bronchų inhaliacinis provokacinis mėginys su *Dermatophagoides pteronyssinus* alergenu

Bronchų inhaliacinis provokacinis mėginys su *Dermatophagoides pteronyssinus* alergenu atliktas visiems AA grupės tiriamiesiems. Pasirinktas *Dermatophagoides pteronyssinus* alergenas, kuris yra vienas iš pagrindinių, sąlygojančių AA. Tyrimui atlikti naudotas *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno tirpalas (*DIATER*, Madridas, Ispanija). Šiam tirpalui įkvėpti naudotas slėginis dozimetras (*ProvoX; Ganshorn Medizin Electronic*, Niederlauer, Vokietija). Alergenas įkvepiamas pro burną. Atlikimo technika: užspaudus nosį spaustuku ir apžiojus vienkartinį aparato kandiklį, reikia ramiai kvėpuoti. Aparatas automatiškai įpurškia reikiamą alergeno kiekį, o pacientas per vieną–keliolika įkvėpimų (priklausomai nuo alergeno dozės) jį įkvepia. Pradinė alergeno dozė, kurią pacientas įkvėpdavo tyrimo pradžioje, buvo 0,1 HEP/ml. Praėjus 10 min. po alergeno įkvėpimo kartojama spirometrija. Tyrimas tęstas, jeigu FEV₁ (l) nesumažėdavo daugiau nei 20 proc. nuo pradinės spirometrijos metu išmatuoto FEV₁. Įkvepiamojo alergeno dozė buvo didinama spirometriją kartojant dar po 10 min. Tyrimas tęstas iki šešių alergeno įkvėpavimo – spirometrijos atlikimo – ciklų arba kol FEV₁ (l) sumažėdavo 20 proc. nuo pradinės spirometrijos metu išmatuoto FEV₁. Bronchų inhaliacinio provokacinio mėginio su alergenu vertinimas paremtas ATS rekomendacijomis. Mėginys laikytas teigiamu, jeigu baigus tyrimą, FEV₁ (l) sumažėdavo ≥ 20 proc. nuo pradinės spirometrijos metu išmatuoto FEV₁. Alergeno *Dermatophagoides pteronyssinus* dozė, nulemianti ≥ 20 proc. FEV₁ sumažėjimą (PD_{20A}), buvo apskaičiuota pagal logaritmines nuo atsako į dozę priklausančias kreives dviejų gretimų taškų linijinės interpoliacijos metodu.

2.6.1.5. Azoto monoksido kiekio matavimas iškvepiamame ore

2-o tipo uždegimui nustatyti ir jo intensyvumui įvertinti atliktas Fe_{NO} kiekio matavimas iškvepiamame ore. Šis tyrimas paremtas iškvepiamojo oro, kuriame matuojamas azoto monoksido kiekis (ppb), analize. Padidėjęs azoto monoksido kiekis rodo 2-o tipo uždegimą. Ribine verte laikytas 25 ppb azoto monoksido kiekis. Fe_{NO} iškvepiamame ore matuotas visiems tiriamiesiems visų vizitų metu (išskyrus atrankos vizitą). Tyrimui atlikti naudotas *Vivatmo-me* prietaisas (*Bosch Healthcare Solutions*, Waiblingen, Vokietija). Fe_{NO} tyrimas atliktas prieš spirometriją siekiant išvengti netikslių tyrimo rezultatų, kuriuos gali lemti prieš tai buvęs fizinis krūvis. Fe_{NO} tyrimas atliktas laikantis griežtų Fe_{NO} tyrimo atlikimo reikalavimų. Atlikimo technika: užspaudus nosį spaustuku, reikia išpūsti visą orą į šoną, giliai įkvėpti ir, apžiojus aparato kandiklį, pūsti tam tikru stiprumu pagal ekrane rodomą skalę ne mažiau nei

10 s. Kiekvieno vizito metu tyrimas kartotas, kol gauti mažiausiai 2 kokybiški tyrimo rezultatai, bet ne daugiau nei 8 kartus. Iš gautų tyrimų atsakymų išvestas vidurkis. Kelis kartus šio tyrimo rezultatai nebuvo užfiksuoti, kadangi tiriamasis negalėjo kontroliuoti pūtimo stiprumo nepaisant vizualizacijos aparato ekrane.

2.6.1.6. Įsijautrinimo alergenams vertinimas

Tiriamųjų įsijautrinimas alergenams vertintas atliekant odos dūrio mėginius su dažniausiai aplinkoje pasitaikančiais alergenais: namų dulkių erkutėmis (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), šunų ir kačių pleiskanomis, penkių rūšių žolių žiedadulkėmis, beržinių augalų žiedadulkėmis, grybeliais (*Alternaria*, *Aspergillus* ir *Cladosporium*). Šis tyrimas atliktas visiems tyrimo dalyviams atrankos vizito metu, naudojant standartizuotus alergenų ekstraktus (*Stallergenes*, S.A., Antony, Prancūzija) ir laikantis griežtų odos dūrio mėginių ant vidinio dilbio paviršiaus atlikimo reikalavimų. Atlikimo technika: pirmiausia oda nuvalyta etilo alkoholiu; iš pradžių 5 cm atstumu nuo riešo linkio atliekami 2 kontroliniai mėginiai su izotoniniu 0,9 proc. natrio chlorido tirpalu ir 10 mg/ml histamino hidroklorido tirpalu (atitinkamai neigiama ir teigiama kontrolė). Vėliau 3 cm atstumu nuo kontrolinių mėginių lašinami tiriamieji alergenai. Atskiromis steriliomis adatomis, kurių smaigalio ilgis 1 mm, duriama alergeno lašo vietoje statmenai odos paviršiu pažeidžiant epidermį. Mėginiai vertinti praėjus 15 min. nuo alergeno lašo uždėjimo ant odos ir odos vientisumo pažeidimo adatele išmatuojant susidariusios pūkšlės matmenis ir apskaičiuojant jų vidurkį. Mėginys laikytas teigiamu, jeigu pūkšlės 2 skersmenų vidurkis ≥ 3 mm. Tačiau jeigu bent vienas kontrolinis mėginys neatitinka reikalavimų (naudojant izotoninį natrio chlorido tirpalą susidaro ≥ 3 mm pūkšlė arba naudojant histamino hidroklorido tirpalą pūkšlė nesiekia 3 mm), mėginiai nevertinti. Prieš šį tyrimą pacientai ne mažiau nei 1 savaitę turėjo nevartoti priešalerginių vaistų, geriamųjų hormoninių preparatų arba hormoninių tepalų.

2.6.2. Laboratoriniai tyrimai

2.6.2.1. Kraujo paėmimas ir pradinis vertinimas

Maždaug 20–50 ml kraujo (priklausomai nuo tyrimo vizito) iš kiekvieno tiriamojo buvo paimta į sterilius vakuuminius mėgintuvėlius su etilendiaminotetraacto rūgštimi (EDTA). Kraujo paėmimo technika: pirmiausia 15–20 cm aukščiau dūrio vietos uždedamas varžtis, oda dezinfekuojama 5–10 cm spinduliu ir oda bei vena praduriama adata su mėgintuvėlio laikikliu. Viena ranka fiksuojamas mėgintuvėlio laikiklis su adata, kita ranka į mėgintuvėlio

laikiklį iki galo įstumiamas vakuuminis mėgintuvėlis. Pasirodžius pirmiems kraujo lašams, varžtis atleidžiamas. Pripildžius mėgintuvėlį kraujo iki kiekio žymos, mėgintuvėlis ištraukiamas. Surinkus reikiamą kraujo mėgintuvėlių kiekį, adata su mėgintuvėlių laikikliu ištraukiama, dūrio vietoje uždedamas pleistras. Kraujo mėgintuvėliai bendram kraujo ir IgE tyrimui atlikti pristatyti į Kauno klinikų Laboratorinės medicinos kliniką. Bendram kraujo tyrimui atlikti naudotas XE-5000 (*Sysmex*, Kobe, Japonija) ir *UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System* automatinis hematologijos analizatorius (*Beckman Coulter*, Majamis, FL, JAV), o bendram IgE iširti – AIA-2000 automatinis imuninės sistemos analizatorius (*Tosoh Bioscience*, Pietų San Franciskas, CA, JAV). Kiti kraujo mėgintuvėliai, pristatyti į Kauno klinikų Pulmonologijos klinikos Pulmonologijos laboratoriją. Detalesnis šių kraujo mėginių ištyrimas aprašytas kitame skyriuje.

2.6.2.2. Eozinofilų išskyrimas, fenotipavimas ir aktyvinimas

Eozinofilams iš tiriamųjų kraujo išskirti naudotas aukšto tankio gradientas (*Ficoll*, GE Healthcare, Suomija). Aukšto tankio gradientas buvo išpilstomas į 15 ml centrifuginius mėgintuvėlius (*Nerbe plus GmbH & Co*, Winsen (Luhe), Vokietija), o ant paviršiaus atsargiai išliejama kraujo, praskiesto fosfatinio buferio druskų tirpalu (PBS) (*Lonza*, *Bio Whittaker*, Verier, Belgija). Kraujas centrifuguotas $400 \times g$ 30 min. kambario temperatūroje. Po centrifugavimo susidaręs viršutinis frakcionuotas sluoksnis (supernatantas) pašalintas paliekant apatinį sluoksnį, kuriame yra eritrocitų ir granulocitų. Eritrocitams pašalinti atlikta hipotoninė eritrocitų lizė su distiliuotu vandeniu apie 10 s, tuomet druskų pusiausyra atstatoma dvigubos koncentracijos PBS. Vėliau centrifuguota $300 \times g$ 10 min. kambario temperatūroje. Centrifugavimas buvo kartojamas tiek kartų, kad būtų gerai matomas granulocitų sluoksnis, o eritrocitai – visiškai lizavę. Eozinofilų frakcijai išgryninti iš granulocitų naudotas magnetiniu būdu aktyvuoto ląstelių rūšiavimo (MACS) metodas. Visos ląstelės, išskyrus eozinofilus, pažymėtos biotinu konjuguotais antikūnais prieš CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123, ir CD235A. Po inkubacijos į ląstelių suspensiją įpilami magnetiniai rutuliukai konjuguoti su antikūnais prieš biotiną. Po inkubacijos paruošta ląstelių suspensija pilama ant MS kolonėlės (*Miltenyi Biotec*, JAV). Magnetiškai pažymėtos ląstelės liko MS kolonėlėje, o eozinofilai per ją perėjo. Išskirta eozinofilų suspensija centrifuguota $400 \times g$ 10 min. kambario temperatūroje ir resuspenduota PBS. Eozinofilų kiekis ir gyvybingumas buvo įvertinti naudojant automatinį ląstelių skaitiklį ADAM (*Witec AB*, Sursee, Vokietija).

Eozinofilų skirstymas potipiais atliktas naudojant magnetinius rutulius, konjuguotus su antikūnais (*Miltenyi Biotec*, Somerville, Masačusetsas,

JAV) prieš CD62L, išreikštus ant Eos_{rez} (ne ant Eos_{užd}) ląstelių paviršiaus. Išskirtų eozinofilų suspensija centrifuguota 300 × g 10 min. kambario temperatūroje. Po centrifugavimo supernatantas pašalintas, o eozinofilai inkubuojami 10 min. 4 °C temperatūroje su MACS buferiu ir kristalizuojamo Ig molekulės fragmento receptoriaus blokavimo reagentu (*Miltenyi Biotec*, Somerville, Masačusetas, JAV). Po inkubacijos buvo įpilama CD62L *MicroBeads* (*Miltenyi Biotec*, Somerville, Masačusetas, JAV) ir inkubuojama 15 min. 4 °C temperatūroje. Paruošta ląstelių suspensija užpilta ant atskyrimo filtro magnetinėje kolonėlėje. Per kolonėlę Eos_{užd} pratekėjo ir subėgo į mėgintuvėlį, nes nebuvo pažymėti magnetine CD62L žyme, o magnetiškai pažymėti Eos_{rez} liko kolonėlėje. Tuomet magnetinė kolonėlė pašalinama iš stovo, perkeliama į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį ir išplaunama su MACS buferiu. Išskirti eozinofilų potipiai centrifuguoti 400 × g 10 min. kambario temperatūroje ir resuspenduoti PBS. Eozinofilų potipių kiekis ir gyvybingumas buvo įvertinti naudojant automatinį ląstelių skaitiklį ADAM.

Abiejų potipių eozinofilai buvo perkelti į atskirus *Eppendorf*® mėgintuvėlius su skirtingais eozinofilopoetiniais: IL-3, IL-5 arba GM-CSF (visų eozinofilopoetinių kiekis mėgintuvėliuose – 10 ng/ml). Tokiu būdu paruošti 6 mėgintuvėliai. Mėginiai inkubuoti termostate 3 valandas, o paskui centrifuguoti 10 minučių (greitis 400 × g) ir nupiltas supernatantas. Paruošti mėginiai naudoti sudarant kombinuotas ląstelių kultūras su BLR ląstelėmis. Detalesnis šių mėginių naudojimas aprašytas kitame skyriuje.

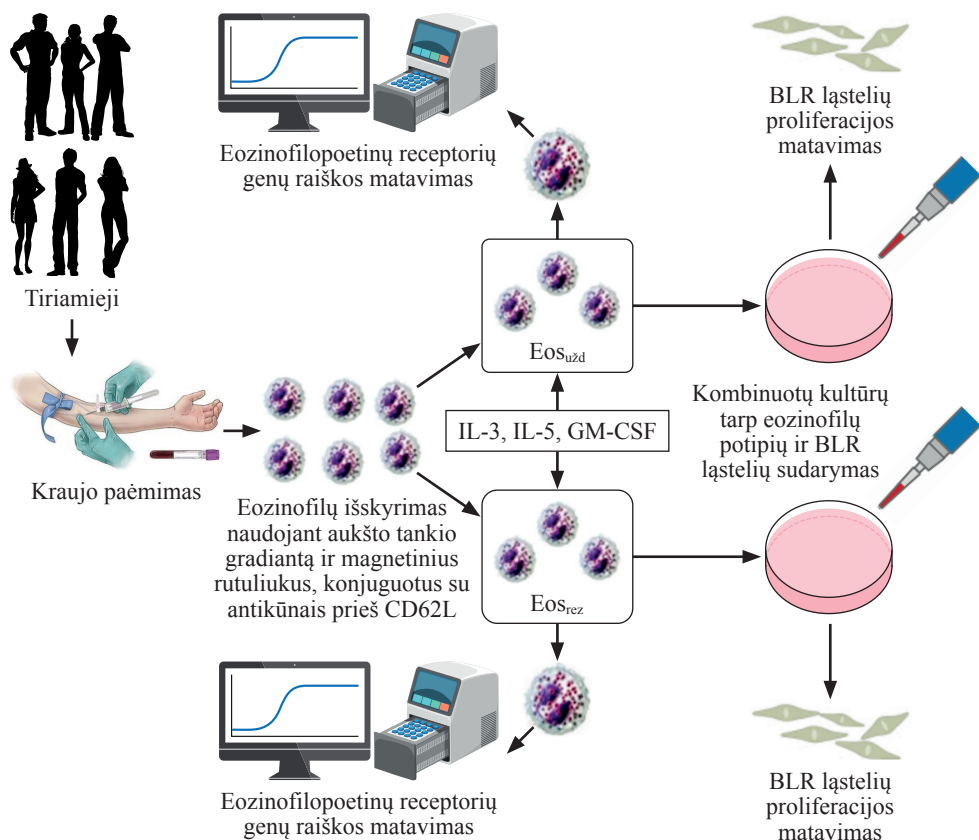
2.6.2.3. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių auginimas *in vitro*. Kombinuotųjų kultūrų su kraujo eozinofilų potipiais sudarymas ir bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos vertinimas

Kombinuotoms ląstelių kultūroms sudaryti buvo naudojamos nemirtingos sveiko žmogaus BLR ląstelės, išskirtos iš vieno donoro, įamžintos žmogaus telomerazės atvirkštinės transkriptazės raiška. BLR ląstelių linija auginama *Falcon* tipo plastikinėse lėkštelėse su „Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM)“ (*GIBCO by Life Technologies*, JK) terpe, papildyta streptomycinu/penicilinu (2 proc., *GIBCO by Life Technologies*, Peislis, JK), amfotericinu B (1 proc., *GIBCO*, Peislis, JK) ir jaučių vaisiaus serumu (10 proc. tūrio, *GIBCO by Life Technologies*, JK). BLR ląstelės buvo auginamos standartinėmis inkubavimo sąlygomis – 37 °C temperatūroje ir 5 proc. CO₂ ore. Eksperimentams BLR ląstelės surinktos tripsinizuojant 0,25 proc. tripsino tirpalu (*GIBCO by Life Technologies*, JK), o naudojant automatinį ląstelių skaitiklį ADAM ir propidžio jodido dažus (*Witec AG*, Šveicarija)

įvertinamas užaugintų ląstelių skaičius ir gyvybingumas. BLR ląstelės augintos 24-iose šulinėlių ląstelių kultūrų plokštelėse (*CytoOne*, *StarLab*, Briuselis, Belgija) į kiekvieną šulinėlį užsėjant po $2,5 \times 10^3$ gyvybingų ląstelių. Prieš sudarant eksperimentines kombinuotąsias kultūras su eozinofilais, terpė buvo pakeista į auginimo terpę be serumo, papildyta 1 proc. insulino-transferino ir seleno reagentu (*GIBCO by Life Technologies*, Peislis, JK) bei inkubuojama 24 val., kad būtų išvengta serume esančių mediatorių poveikio ląstelių dalijimuisi.

Kiekvienam tyrimui buvo paruoštos individualios kombinuotosios ląstelių kultūros tarp izoliuotų ir eozinofilopoetinių paveiktų kraujo eozinofilų potipių ir BLR ląstelių. Visiems eksperimentams naudoti $0,5 \times 10^5$ gyvybingi eozinofilai ir 2×10^5 BLR ląstelės. Eozinofilai su BLR ląstelėmis inkubuoti 72 val., vėliau inkubacijos terpę nusiurbta, šulinėliai vieną kartą nuplauti šiltu PBS.

BLR ląstelių proliferacija vertinta Alamaro mėlio (*Invitrogen by Life Technologies*, Peislis, JK) metodu. Šis metodas paremtas oksidacijos redukcijos reakcija ir auginimo terpės spalvos pokyčiu (nuo indigo mėlynos iki rožinės spalvos). Spalvos pokytis vertintas naudojant dviejų bangų ilgio spektrofotometriją, esant 570 nm ir 600 nm bangos ilgiams. Iš gautų šviesos absorbcijos reikšmių apskaičiuojama Alamaro mėlio spalvos redukcija procentais ir įvertinamas eozinofilopoetinais aktyvintų eozinofilų potipių poveikis BLR ląstelių proliferacijai.



2.6.2.3.1 pav. Eozinofilų potipių išskyrimas, fenotipavimas, aktyvinimas, eozinofilopoetinių receptorių genų raiškos ir bronchų lygiųjų raumenu ląstelių proliferacijos matavimas

BLR – bronchų lygieji raumensys; IL – interleukinas; GM-CSF – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys; Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; Eos_{užd} – į uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės.

2.6.2.4. Ribonukleino rūgšties išskyrimas iš eozinofilų. Eozinofilų paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiška

Siekiant įvertinti eozinofilopoetinių receptorių genų raišką, iš kraujo eozinofilų potipių išskirta ribonukleino rūgštis (RNR) ir atlikta atvirkštinės transkriptazės kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (PGR). Tai atlikta naudojant *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, JAV) pagal gamintojo instrukcijas. Atliekant RNR išskyrimą, buvo įtrauktas papildomas DNR skaidymo etapas, naudojant RNazės neturintį DNazės rinkinį (Qiagen, Valencia, CA, JAV). Išskirtos RNR grynumas ir koncentracija buvo įvertinti mikrotūrio spektrofotometru NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific,

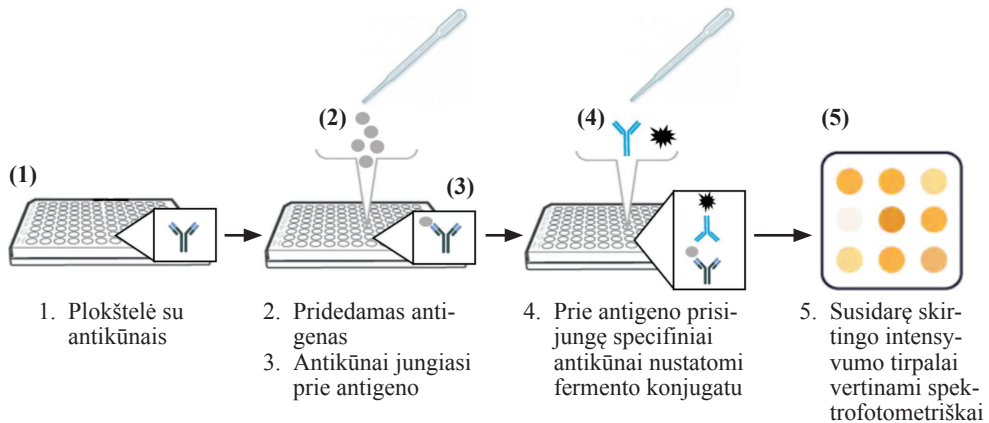
JAV). IL-3R, IL-5R ir GM-CSFR genų raiškos tirtos pasitelkus komercinį *Power SYBR® Green RNA-to-CT™* 1-žingsnio rinkinį (*Applied Biosystems*, Foster City). Siekiant pagausinti RNR kieki, PGR ciklai kartoti 40 kartų naudojant 7500 *Fast Real-Time* PGR sistemą. Pirmą ciklą sudarė: atvirkštinė transkripcija 48 °C temperatūroje (30 min.), *AmpliTaq Gold®* DNR polimerazės, UP (Ultra-Pure) aktyvavimas 95 °C temperatūroje (10 min.), denatūravimas 95 °C temperatūroje (15 s) ir vėdinimas bei pratęsimas 60 °C temperatūroje (1 min.). 18S geno raiška buvo naudojama kaip endogeninė kontrolė duomenų normalizavimui. Gauti duomenys analizuoti lyginamuoju ciklo slenksčio metodu.

2.6.2.5. Biologiškai aktyvių medžiagų kiekio serume nustatymas imunofermentinės analizės tyrimo metodu

Imunofermentinės analizės (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) tyrimas buvo naudojamas daugelio biologiškai aktyvių medžiagų kiekiui serume išmatuoti. Šiuo tyrimo metodu buvo tirtas I C telopeptido I tipo kolagenas (ICTP), autotaksinas (ATX), sIL-5R α , matrikso metalo-proteinazė-10 (MMP-10), tioredoksinas 1 (TRX1), IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP, eotaksinas ir sFc ϵ RI. Nustatyta apatinė ICTP aptikimo riba – 50 pg/ml, ATX – 33 pg/ml, sIL-5R α – 0,15 ng/ml, MMP-10 – 3 pg/ml ir TRX1 – 0,2 ng/ml, IL-4 – 1,3 pg/ml, IL-5 – 1,45 pg/ml, IL-13 – 0,7 pg/ml, IL-25 – 0,4 ng/ml, IL-33 – 0,9 pg/ml, TSLP – 3 pg/ml, sFc ϵ RI – 68 pg/ml. Kelių biologiškai aktyvių medžiagų kiekiai buvo mažesni už jautrumo diapazoną, todėl šie rezultatai buvo vertinti kaip nulinės reikšmės.

ELISA tyrimas buvo atliktas Kauno klinikų Pulmonologijos klinikos Pulmonologijos laboratorijoje pagal gamintojo pateikiamas instrukcijas. Tyrimo atlikimui naudoti 0,1 ml serumo mėginiai. Pirmiausia kraujas paimtas į *BD Vacutainer® SSTTM II Advance* mėgintuvėlius ir jam leista krešėti 30 min. Paskui mėgintuvėliai centrifuguoti 1300 \times g 10 min. kambario temperatūroje. Serumas padalytas ir supiltas į 1 ml kriogeninius mėgintuvėlius, kurie užšaldyti –80 °C temperatūroje. ELISA matavimai padaryti surinkus pakankamą mėginių kiekį. Atliekant tyrimą naudotos 96-ios šulinėlių plokštelės, padengtos antikūnais prieš tiriamus biologinius žymenis. Po serumo ir antikūnų inkubavimo į antikūno-antigeno-antikūno kompleksą pridėtas streptavidino-HRP konjugatas, vėliau chromogeninis substratas 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas, kuris buvo naudojamas mėlynai spalvai gauti, o spalvos intensyvumas yra susijęs su analitės kiekiu mėginyje. Siekiant sustabdyti fermentinę reakciją pridėtas sieros rūgšties tirpalas, o optinis tankis (angl. *Optical density*, OD) nuskaitytas esant 450 nm bangos ilgiui (540 nm bangos ilgio

nuskaitymas buvo naudojamas duomenų korekcijai) naudojant mikroplokštelių skaitytuvą – spektrofotometrą (*Biotek Epoch™*, Vermontas, JAV). Rezultatai išreikšti biologinių žymenų kiekiu 1 ml serumo.



2.6.2.5.1 pav. Schematinis imunofermentinės analizės tyrimo metodo pavaizdavimas

2.6.2.6. Biologiškai aktyvių medžiagų kiekio serume nustatymas Luminex technologija

Luminex® 100/200™ technologija buvo naudojama biologinių žymenų kiekiui serume išmatuoti. Šis tyrimas buvo atliktas Kauno klinikų Laboratorinės medicinos klinikoje. Luminex tyrimo metodu buvo tirtos 5 biologiškai aktyvios medžiagos serume: tirozin-proteinkinazė Met (MET), MMP-7, MMP-9, pentaksinas 3 (PTX3), lipoproteino A2 fosfolipazė (Lp-PLA2). Nustatyta apatinė MET aptikimo riba – 14,65 pg/ml, MMP-7 – 5,18 pg/ml, MMP-9 – 0,87 pg/ml, PTX3 – 42 pg/ml. Kelių biologiškai aktyvių medžiagų kiekiai buvo mažesni už jautrumo diapazoną, todėl šie rezultatai buvo vertinti kaip nulinės reikšmės.

Tyrimas atliktas pagal gamintojo pateikiamas instrukcijas. Tyrimo atlikimui naudoti 0,1 ml serumo mėginiai. Pirmiausia kraujas paimtas į *BD Vacutainer® SST™ II Advance* mėgintuvėlius ir jam leista krešėti 30 min. Po to mėgintuvėliai centrifuguoti $1300 \times g$ 10 min. kambario temperatūroje. Serumai padalyti ir supilti į 1 ml kriogeninius mėgintuvėlius, kurie užšaldyti $-80^\circ C$ temperatūroje. *Luminex* matavimai atlikti surinkus pakankamą mėginių kiekį. Serumai dedami į spalvomis koduotų granulių mišinį, iš anksto padengtą analizei specifiniais gaudymo antikūnais. Vėliau pridėti biotininiai aptikimo antikūnai, specifiniai tiriamosioms analitėms, ir jie sudarė antikūno ir antigeno kompleksą. Tada plokštelės analizuotos naudojant *Luminex® 100* analizatorių (*Luminex Corporation*, JAV). Vertės gautos

iš vidutinio fluorescencinio intensyvumo. Standartinės kreivės sukurtos iš etaloninių gamintojo pateiktų žinomos koncentracijos citokinų gradiento tirpalų. Rezultatai išreikšti biologinių žymenų kiekiu 1 ml serumo.

2.7. Biologinio vaisto paskyrimas sergant sunkia eozinofiline astma

Igyvendinant trečią disertacinio darbo uždavinį sergantiesiems SEA papildomai prie jau vartojamo astmos gydymo buvo skirtas biologinis vaistas. Visi tiriamieji prieš įtraukimą į šį tyrimą buvo aptarti Kauno klinikų Sunkios astmos ir kitų obstrukcinių plaučių ligų multidisciplininiame konsiliume, kurio metu nuspręsta sunkios nekontroliuojamos eozinofilinės astmos gydymui skirti monokloninį antikūną prieš IL-5 mepolizumą. Šis vaistas sergantiesiems SEA buvo skiriamas injekcinio tirpalo forma užpildytame švirkštiklyje (1 ml, 100 mg mepolizumabo) kas 4 savaites 24 savaitių tyrimo metu. Kiekvieną kartą vaistas leistas specialiai apmokytos bendrosios praktikos slaugytojos į žastą po oda, prieš tai odą nuvalius vatos gabalėliu, suvilgytu odos dezinfekcijai skirta priemone. Po pirmojo vaisto suleidimo, tiriamieji 1 val. laiko buvo stebėti gydymo įstaigoje dėl galimų šalutinių poveikių – vertinta savijauta, matuotas arterinis kraujo spaudimas, širdies susitraukimų dažnis. Šis vertinimas atliktas prieš vaisto leidimą ir 20 min. bei 1 val. po jo. Kiekvieno vizito metu vaistas suleistas tik atlikus visus tam vizitui suplanuotus tyrimus.

2.8. Statistinė duomenų analizė

Duomenų bazė sukurta naudojantis *Microsoft Office Excel*. Statistinė analizė atlikta SPSS ir *GraphPad Prism* statistinėmis programinėmis įrangomis (*IBM SPSS Statistics 20*; Chicago, IL, USA ir *GraphPad Prism 8.0.1* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA). Naudoti aprašomosios ir analitinės statistikos metodai. Tyrimo imties dydis buvo apskaičiuotas naudojant Schwarze formulę. Minimalus tiriamųjų skaičius, kad būtų galima padaryti statistiškai reikšmingas išvadas – 70 sergančiųjų astma ir 23 sveiki tiriamieji.

Duomenų pasiskirstymo normalumas tikrintas panaudojant Šapiro-Vilko (angl. *Shapiro-Wilks*) testą. Pateikti normalųjų skirstinį tenkinančių duomenų vidurkiai su standartine vidurkio paklaida, o normalųjų skirstinį netenkinantys duomenys pateikti mediana ir tarpkvartiliniu diapazonu. Kadangi duomenų pasiskirstymas neatitiko normalumo testo, vertinant skirtumą tarp dviejų nepriklausomų grupių, kurių kiekvienoje buvo nedidelis duomenų kiekis, naudojome neparametrinį Mann-Whitney U testą. Norėdami įvertinti skirtumą

tarp dviejų priklausomų imčių, naudojome neparametrinį Wilcoxon suderintų porų ranginį testą. Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas naudotas dviejų duomenų rinkinių koreliacijai įvertinti. Statistiškai reikšmingais laikyti rezultatai, kai statistinis patikimumas (p) buvo <0,05.

Tyrimo finansavimas

Šis tyrimas yra dalis Lietuvos mokslo tarybos mokslininkų grupių projekto „Kraujo eozinofilų potipių specifinės miRNR kaip biožymenys ir gydymo taikiniai sergant astma“ (Nr. S-MIP-21-17, 2021 m.). Taip pat tyrimą finansavo Ateities biomedicinos fondas (Nr. 2017). Trūkstamas priemonės įsigyti padėjo Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mokslo fondas 2021, 2022 ir 2023 metais.

Doktoranto indėlis į tyrimą

1. Idėjos generavimas, dalyvavimas kuriant dizainą bei metodiką;
2. Bioetikos leidimams gauti skirtos dokumentacijos pildymas;
3. Tyrimų, skirtų tiriamųjų atrankai, atlikimas bei rezultatų analizė;
4. Tiriamųjų klinikinių ir demografinių duomenų rinkimas bei analizė;
5. Pacientų duomenų bazės kūrimas ir statistinė duomenų analizė;
6. Septynerių mokslinių tezių rengimas ir pristatymas;
7. Trejų publikacijų rašymas ir pateikimas.

3. REZULTATAI

3.1. Pirmojo disertacinio darbo uždavinio tyrimų rezultatai

3.1.1. Tiriamųjų charakteristika

Igyvendinant pirmąjį disertacinio darbo uždavinį ištirta 18 asmenų, sergančių SNEA, 17 asmenų, sergančių AA, kuri negydoma įkvepiamaisiais gliukokortikoidais ir 11 SA (iš viso 46 tiriamieji). SNEA grupės tiriamieji reikšmingai vyresni nei AA ar SA grupių. Taip yra dėl to, kad SNEA paprastai pasireiškia vyresnio amžiaus žmonėms. SNEA grupės tiriamųjų kūno masės indeksas (KMI) taip pat reikšmingai didesnis, palyginti su AA ir SA grupėmis. FEV₁ sergančiųjų SNEA grupėje reikšmingai mažesnis nei sergančiųjų AA ar SA. Tiek SNEA, tiek AA grupių tiriamųjų kraujyje eozinofilų kiekis reikšmingai didesnis nei SA grupėje, o lyginant abi astma sergančiųjų asmenų grupes tarpusavyje, pastebėta, jog SNEA grupės tiriamųjų kraujyje eozinofilų daugiau nei sergančiųjų AA. Abejose sergančiųjų astma grupėse Fe_{NO} lygiai reikšmingai didesni, palyginti su SA grupe, tačiau lyginant tarpusavyje, reikšmingo skirtumo nenustatyta. Bendras IgE kiekis reikšmingai didesnis abejose sergančiųjų astma grupėse, o lyginant šias grupes tarpusavyje – AA sergančiųjų grupėje. Demografiniai ir klinikiniai šių tiriamųjų duomenys pateikti 3.1.1.1 lentelėje.

3.1.1.1 lentelė. Demografiniai ir klinikiniai tiriamųjų duomenys

	SNEA	AA	SA
Tirtų asmenų skaičius, n	18	17	11
Lytis, V/M	4/14	12/5	3/8
Amžius, metais	57,8 ± 2,4 * #	28,1 ± 2,4	31,4 ± 3,2
KMI, kg/m ²	29,9 ± 1,6 * #	24,0 ± 0,9	25,3 ± 1,2
FEV ₁ , l	1,6 ± 0,1 * #	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,2
FEV ₁ , % būtinojo dydžio	58,9 ± 4,7 * #	86,8 ± 2,4 #	99,1 ± 3,5
PD _{20M} , mg	NA	0,22 ± 0,34	NA
PD _{20A} , HEP/ml	NA	14,12 ± 1,92	NA
Kraujo eozinofilų kiekis, × 10 ⁹ /l	0,63 ± 0,09 * #	0,39 ± 0,05 # §	0,17 ± 0,02
Kraujo eozinofilų kiekis, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenais, × 10 ⁹ /l	NA	0,51 ± 0,06	NA

3.1.1.1 lentelės tęsinys

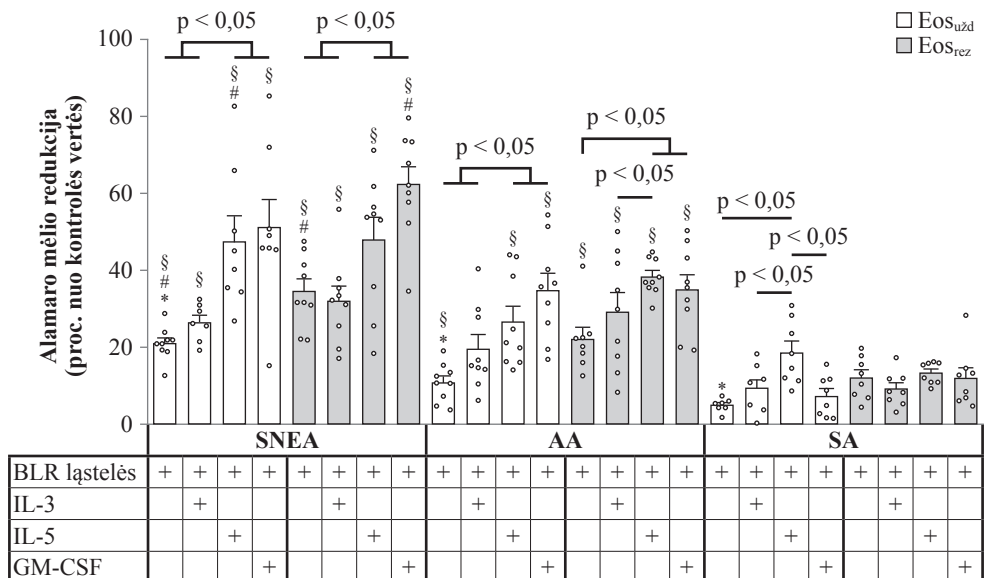
	SNEA	AA	SA
Fe _{NO} , ppb	49,1 ± 8,3 [#]	51,6 ± 8,9 ^{#§}	10,8 ± 1,9
Fe _{NO} , praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu, ppb	NA	78,2 ± 12,6	NA
Bendras IgE, IU/ml	158,8 ± 45,2 ^{*#}	837,3 ± 316,7 [#]	18,2 ± 5,0
Bendras IgE, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu, IU/ml	NA	861.1 ± 323.1	NA

AA – alerginė astma; Fe_{NO} – azoto monoksido kiekio iškvėpiamame ore; FEV₁ – forsuito iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; Ig – imunoglobulinas; KMI – kūno masės indeksas; M – moterys; NA – neatlikta; PD_{20A} – provokacinė alergeno dozė, nulėmusi FEV₁ sumažėjimą 20 proc.; PD_{20M} – provokacinė metacholino dozė, nulėmusi FEV₁ sumažėjimą 20 proc.; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma; V – vyrai. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su AA grupe; [#]p < 0,05, palyginti su SA grupe, [§]p < 0,05, palyginti su AA grupe po bronchų provokacijos alergenu.

3.1.2. Eozinofilopoetinių (interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio) poveikis eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui *in vitro* prieš ir po bronchų provokacijos alergenu

Tyrėme eozinofilopoetinių (IL-3, IL-5 ir GM-CSF) poveikį eozinofilų potipių (Eos_{užd} ir Eos_{rez}) proliferaciniam aktyvumui. IL-3 neturėjo įtakos nei Eos_{užd}, nei Eos_{rez} proliferaciniam aktyvumui SNEA sergančiųjų grupėje. O IL-5 ir GM-CSF reikšmingai sustiprino Eos_{užd} ir Eos_{rez} proliferacinį aktyvumą (BLR ląstelių kiekis reikšmingai padidėjo inkubuojant su IL-5 ir GM-CSF aktyvintais eozinofilais, palyginti su BLR ląstelėmis, inkubuotomis neaktyvintais eozinofilais). AA grupėje IL-5 ir GM-CSF reikšmingai sustiprino Eos_{užd} ir Eos_{rez} proliferacinį aktyvumą (BLR ląstelių kiekis reikšmingai padidėjo inkubuojant su IL-5 ir GM-CSF aktyvintais eozinofilais, palyginti su BLR ląstelėmis, inkubuotomis neaktyvintais eozinofilais). O IL-3 neturėjo reikšmingos įtakos Eos_{užd} ir Eos_{rez} proliferaciniam aktyvumui. Tik IL-5 reikšmingai sustiprino Eos_{užd} proliferacinį aktyvumą SA grupėje (BLR ląstelių kiekis reikšmingai padidėjo inkubuojant su IL-5 aktyvintais eozinofilais, palyginti su BLR ląstelėmis, inkubuotomis neaktyvintais eozinofilais). O IL-3 ir GM-CSF neturėjo įtakos abiem eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui SA grupėje.

IL-5 poveikis Eos_{užd} proliferaciniam aktyvumui reikšmingai didesnis SNEA tiriamųjų grupėje, palyginti su AA tiriamųjų grupe. GM-CSF poveikis Eos_{rez} proliferaciniam aktyvumui reikšmingai didesnis SNEA grupėje, palyginti su AA grupe. IL-3 ir GM-CSF poveikis Eos_{užd} proliferaciniam aktyvumui reikšmingai didesnis AA sergančiųjų grupėje, palyginti su SA. Tačiau IL-3, IL-5 ir GM-CSF veikia Eos_{rez} proliferacinį aktyvumą reikšmingai stipriau AA sergančiųjų grupėje, palyginti su SA grupe. IL-3, IL-5 ir GM-CSF poveikis abiejų eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui reikšmingai didesnis SNEA grupėje, palyginti su SA grupe. Gauti rezultatai pateikti 3.1.2.1 lentelėje ir 3.1.2.1 pav.



3.1.2.1 pav. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos vertinimas pagal Alamaro mėlio redukciją procentais nuo kontrolės vertės

AA – alerginė astma; BLR – bronchų lygieji raumenys; Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; IL – interleukinas; GM-CSF – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantysis veiksnys; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. SNEA grupė n = 9, AA grupė n = 9, SA grupė n = 8. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su Eos_{rez} toje pačioje tiriamųjų grupėje; #p < 0,05, palyginti su atitinkamais sergančiųjų AA eozinofilų potipiais; §p < 0,05, palyginti su atitinkamais SA eozinofilų potipiais. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

3.1.2.1 lentelė. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos vertinimas pagal Alamaro mėlio redukciją procentais nuo kontrolės vertės

	SNEA		AA		SA	
	Eos _{užd}	Eos _{rez}	Eos _{užd}	Eos _{rez}	Eos _{užd}	Eos _{rez}
Neaktyvinti eozinofilai	21,1 ± 1,4 * # §	34,7 ± 3,1 # §	10,6 ± 1,7 * §	22,2 ± 3,0 §	5,1 ± 0,6 *	12,1 ± 1,9
IL-3	26,6 ± 1,8 §	32,1 ± 3,8 §	19,6 ± 3,6	29,3 ± 4,9 §	9,4 ± 2,1	9,3 ± 1,6
IL-5	47,6 ± 6,5 §	48,0 ± 5,8 §	26,6 ± 4,0 §	38,3 ± 1,6 §	18,6 ± 2,9	13,4 ± 1,0
GM-CSF	51,2 ± 7,3 # §	62,4 ± 4,5 # §	34,8 ± 4,3 §	35,1 ± 3,7 §	7,4 ± 1,9	12,0 ± 2,7

AA – alerginė astma; IL – interleukinas; GM-CSF – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantysis veiksnys; Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; Eos_{užd} – į uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma; SNEA grupė n = 9, AA grupė n = 9, SA grupė n = 8. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su Eos_{rez} toje pačioje tiriamųjų grupėje; #p < 0,05, palyginti su atitinkamais sergančiųjų AA eozinofilų potipiais; §p < 0,05, palyginti su atitinkamais SA eozinofilų potipiais. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

Tyrėme bronchų provokacijos alergenu poveikį BLR ląstelių kiekiui po 72 valandų inkubacijos kartu su eozinofilopoetiniais aktyvintais Eos_{užd} ir Eos_{rez}. BLR ląstelių kiekis buvo vertintas prieš ir praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. Tyrimo metu nustatyta, kad bronchų provokacija alergenu reikšmingai padidina BLR ląstelių kiekį po inkubacijos kartu su IL-5 ir GM-CSF aktyvintais Eos_{rez}, palyginti su BLR ląstelių kiekiu prieš bronchų provokaciją alergenu. O bronchų provokacija alergenu neturėjo reikšmingo poveikio BLR ląstelių kiekiui po inkubacijos kartu su IL-3 aktyvintais Eos_{rez}, palyginanti su šių ląstelių kiekiu prieš bronchų provokaciją. Bronchų provokacija alergenu reikšmingai nepakeitė BLR ląstelių kiekio po 72 valandų inkubacijos kartu su IL-3, IL-5 ir GM-CSF aktyvintais Eos_{užd}, palyginti su BLR ląstelių kiekiu prieš bronchų provokaciją alergenu. Gauti rezultatai pateikti 3.1.2.2 lentelėje ir 3.1.2.2 pav.

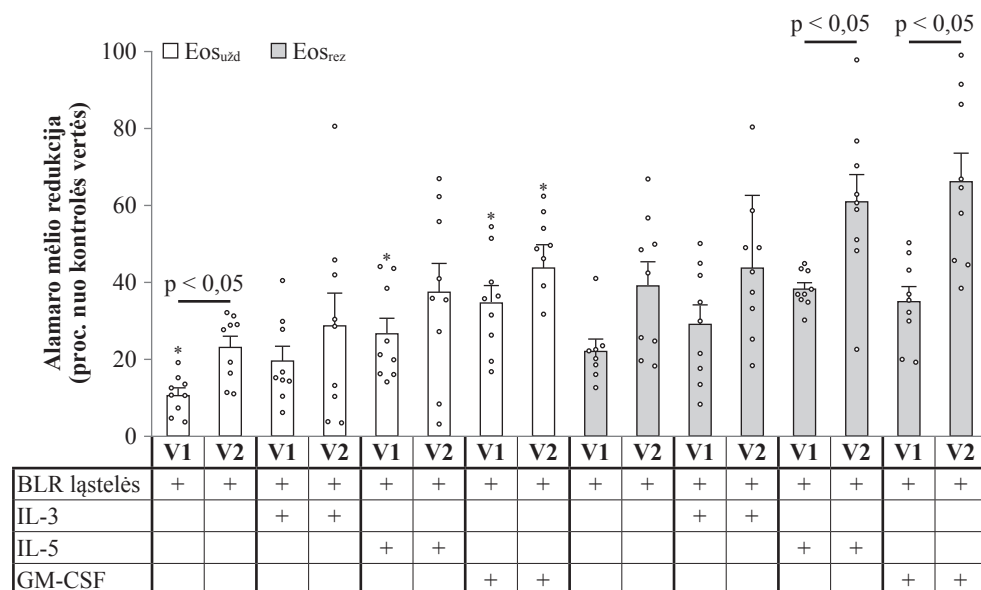
3.1.2.2 lentelė. Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos vertinimas pagal Alamaro mėlio redukciją procentais nuo kontrolės vertės prieš bronchų provokaciją alergenu ir po jos

	Vizitas	Eos _{užd}	Eos _{rez}
Neaktyvinti eozinofilai	V1	10,9 ± 1,7 * #	22,2 ± 3,0
	V2	23,1 ± 2,8	39,3 ± 5,9
IL-3	V1	19,6 ± 3,6	29,3 ± 4,9
	V2	28,8 ± 8,3	43,9 ± 6,2

3.1.2.2 lentelės tęsinys

	Vizitas	Eos _{užd}	Eos _{rez}
IL-5	V1	26,6 ± 4,0 *	38,3 ± 1,6 #
	V2	37,4 ± 7,4	61,1 ± 6,9
GM-CSF	V1	34,8 ± 4,3 *	35,1 ± 3,7 #
	V2	43,8 ± 5,9 *	66,2 ± 7,3

Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; Eos_{užd} – į uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės; IL – interleukinas; GM-CSF – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantysis veiksnys; V1 – pirmas tyrimo vizitas (prieš bronchų provokaciją alergenu); V2 – antras tyrimo vizitas, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. AA grupė n = 9. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su Eos_{rez}; #p < 0,05, palyginti su tos pačios grupės ir to paties eozinofilų potipio V2. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.



3.1.2.2 pav. Bronchų provokacijos alergenu poveikis eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui, vertinant Alamaro mėlio redukciją procentais nuo kontrolės vertės

BLR – bronchų lygieji raumenys; IL – interleukinas; GM-CSF – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantysis veiksnys; Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; Eos_{užd} – į uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės; V1 – pirmas tyrimo vizitas (prieš bronchų provokaciją alergenu); V2 – antras tyrimo vizitas, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. AA grupė n = 9. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su Eos_{rez}. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

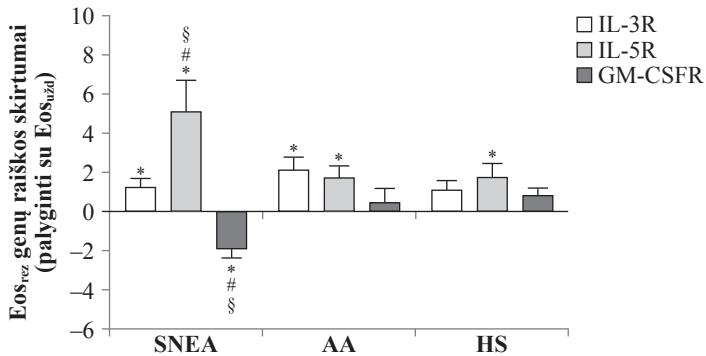
3.1.3. Eozinofilų potipių paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiška prieš ir po bronchų provokacijos alergenu

SNEA ir AA sergančiųjų grupėse Eos_{rez} paviršiaus IL-3R genų raiška reikšmingai didesnė nei $Eos_{užd}$. SA grupėje IL-3R geno raiška tarp eozinofilų potipių reikšmingai nesiskyrė. SNEA, AA ir SA grupėse Eos_{rez} paviršiaus IL-5R genų raiška reikšmingai didesnė, palyginti su $Eos_{užd}$. SNEA tiriamųjų grupėje GM-CSFR geno raiška $Eos_{užd}$ paviršiuje reikšmingai didesnė, palyginti su Eos_{rez} . AA ir SA grupėse GM-CSFR geno raiška tarp eozinofilų potipių reikšmingai nesiskyrė (3.1.3.1 lentelė, 3.1.3.1 pav.).

3.1.3.1 lentelė. Eozinofilų paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiškos skirtumai (kartais) lyginant į plaučių rezidentinius eozinofilus panašias ląsteles su į uždegiminius eozinofilus panašiomis ląstelėmis tose pačiose tiriamųjų grupėse

	SNEA	AA	SA
IL-3R	1,2 ± 0,5 *	2,1 ± 0,7 *	1,1 ± 0,5
IL-5R	5,1 ± 1,6 * # §	1,7 ± 0,6 *	1,7 ± 0,7 *
GM-CSFR	-1,9 ± 0,5 * # §	0,5 ± 0,7	0,8 ± 0,4

AA – alerginė astma; IL-3R – interleukino 3 receptorius; IL-5R – interleukino 5 receptorius; GM-CSFR – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorius; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. SNEA grupė n = 9, AA grupė n = 9, SA grupė n = 8. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su į uždegiminius eozinofilus panašiomis ląstelėmis; #p < 0,05, palyginti su AA grupe. §p < 0,05, palyginti su SA grupe. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.



3.1.3.1 pav. Eozinofilų paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiškos skirtumai tarp eozinofilų potipių tose pačiose tiriamųjų grupėse

AA – alerginė astma; Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; Eos_{uzd} – į uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės; IL-3R – interleukino 3 receptorius; IL-5R – interleukino 5 receptorius; GM-CSFR – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorius; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. SNEA grupė n = 9, AA grupė n = 9, SA grupė n = 8. Pateiktas duomenų vidurkis su standartinė vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su į uždegiminius eozinofilus panašiomis ląstelėmis; #p < 0,05, palyginti su AA grupe. §p < 0,05, palyginti su SA grupe. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

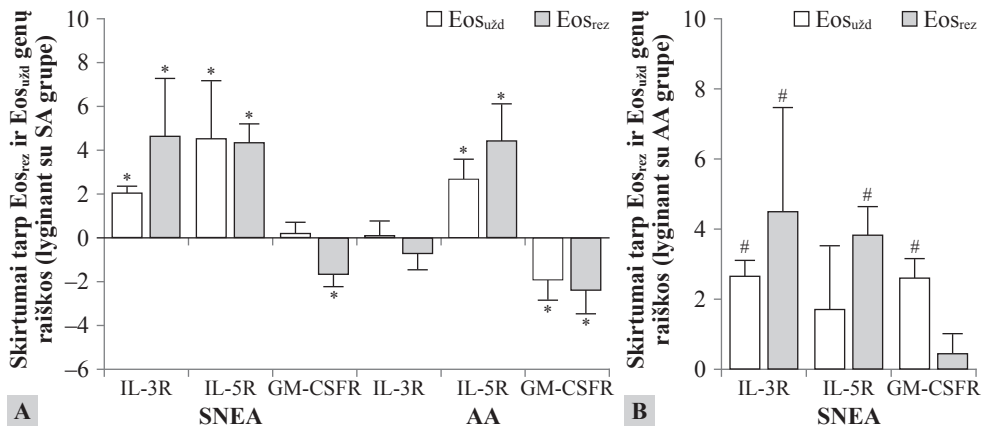
Reikšmingai didesnė IL-3R geno raiška nustatyta abiejuose eozinofilų potipiuose, išskirtuose SNEA sergančiųjų grupėje, palyginti su SA grupe. Taip pat abiejuose eozinofilų potipiuose, išskirtuose SNEA ir AA sergančiųjų grupėse, rasta reikšmingai didesnė IL-5R geno raiška nei Eos_{uzd}, išskirtuose SA grupėje. SA grupėje išskirtuose Eos_{rez} pastebėta reikšmingai didesnė GM-CSFR geno raiška nei SNEA sergančiųjų grupėje. Be to, reikšmingai didesnė GM-CSFR geno raiška nustatyta abiejuose SA grupės eozinofilų potipiuose, nei SNEA sergančiųjų grupėje (3.1.3.2 lentelė, 3.1.3.2 pav. A).

Reikšmingai didesnė IL-3R geno raiška nustatyta abiejuose eozinofilų potipiuose, išskirtuose SNEA sergančiųjų grupėje, palyginti su AA tiriamųjų grupe. Eos_{rez}, išskirtuose SNEA grupėje, reikšmingai didesnė IL-5R geno raiška nei AA grupėje. Reikšmingai didesnė GM-CSFR geno raiška buvo nustatyta Eos_{uzd}, išskirtuose SNEA grupėje nei AA tiriamųjų grupėje (3.1.3.2 lentelė, 3.1.3.2 pav. B).

3.1.3.2 lentelė. Eozinofilų potipių paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiškos skirtumai tarp tiriamųjų grupių (kartais)

	SNEA (lyginta su SA)		AA (lyginta su SA)		SNEA (lyginta su AA)	
	Eos _{užd}	Eos _{rez}	Eos _{užd}	Eos _{rez}	Eos _{užd}	Eos _{rez}
IL-3R	2,1 ± 0,3 *	4,7 ± 2,6 *	0,1 ± 0,7	-0,7 ± 0,7	2,7 ± 0,4 #	4,5 ± 3,0 #
IL-5R	4,5 ± 2,6 *	4,4 ± 0,8 *	2,7 ± 0,9 *	4,4 ± 1,7 *	1,7 ± 1,8	3,8 ± 0,8 #
GM-CSFR	0,2 ± 0,5	-1,7 ± 0,6 *	-1,9 ± 0,9 *	-2,4 ± 1,1 *	2,6 ± 0,5 #	0,5 ± 0,6

AA – alerginė astma; Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; Eos_{užd} – uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės; IL-3R – interleukino 3 receptoriaus; IL-5R – interleukino 5 receptoriaus; GM-CSFR – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptoriaus; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. SNEA grupė n = 10, AA grupė n = 9, SA grupė n = 8. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su SA grupe; #p < 0,05, palyginti su AA grupe. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.



3.1.3.2 pav. Eozinofilų potipių paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiškos skirtumai tarp tiriamųjų grupių, lyginant sunkia nealergine eozinofiline astma ir alergine astma sergančiuosius su sveikais asmenimis (A), lyginant sunkia nealergine eozinofiline astma sergančiuosius su sergančiaisiais alergine astma (B) (kartais)

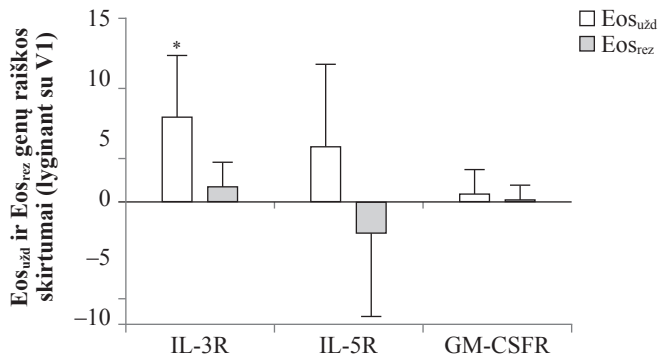
AA – alerginė astma; Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; Eos_{užd} – uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės; IL-3R – interleukino 3 receptoriaus; IL-5R – interleukino 5 receptoriaus; GM-CSFR – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptoriaus; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. SNEA grupė n = 9, AA grupė n = 9, SA grupė n = 8. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida, kartotinis pokytis, palyginti su Eos_{užd} IL-3R, IL-5R ir GM-CSFR genų raiška. *p < 0,05, palyginti su SA grupe; #p < 0,05, palyginti su AA grupe. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

Alergeno poveikis eozinofilopoetinių receptorių genų raiškai eozinofilų potipių paviršiuje nustatytas palyginus sergančiųjų AA rezultatus prieš ir praėjus 24 valandoms po bronchų provokacijos alergenu. Bronchų provokacija alergenu reikšmingai padidino $Eos_{užd}$ paviršiaus IL-3R genų raišką, palyginti su tomis pačiomis ląstelėmis prieš bronchų provokaciją alergenu. O abiejų eozinofilų potipių paviršiaus IL-5R ir GM-CSFR genų raiška prieš ir po bronchų provokacijos alergenu reikšmingai nesiskyrė (3.1.3.3 lentelė, 3.1.3.3 pav.).

3.1.3.3 lentelė. *Sergančiųjų alergine astma eozinofilų potipių paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiškos skirtumai prieš ir po bronchų provokacijos alergenu (kartais)*

	IL-3R	IL-5R	GM-CSFR
$Eos_{užd}$	$7,0 \pm 5,4 *$	$4,5 \pm 6,7$	$0,7 \pm 2,0$
Eos_{rez}	$1,3 \pm 2,0$	$-2,6 \pm 6,8$	$0,2 \pm 1,2$

Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; $Eos_{užd}$ – į uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės; IL-3R – interleukino 3 receptorius; IL-5R – interleukino 5 receptorius; GM-CSFR – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorius. AA grupė n = 9. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida, kartotinis pokytis, palyginti su IL-3R, IL-5R ir GM-CSFR geno raiška po bronchų alergeno poveikio. * $p < 0,05$ palyginti su V2. Statistinė analizė: tiriant grupes, taikytas Mann–Whitney dvipusis U testas; tiriant vieną grupę – Wilcoxon suderintos poros pasirašyto rango dvipusis testas.



3.1.3.3 pav. *Sergančiųjų alergine astma eozinofilų potipių paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiškos skirtumai prieš ir po bronchų provokacijos alergenu (kartais)*

Eos_{rez} – į plaučių rezidentinius eozinofilus panašios ląstelės; $Eos_{užd}$ – į uždegiminius eozinofilus panašios ląstelės; IL-3R – interleukino 3 receptorius; IL-5R – interleukino 5 receptorius; GM-CSFR – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorius. AA grupė n = 9. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida, kartotinis pokytis, palyginti su IL-3R, IL-5R ir GM-CSFR geno raiška po bronchų alergeno poveikio. * $p < 0,05$, palyginti su V2. Statistinė analizė: tiriant grupes, taikytas Mann–Whitney dvipusis U testas; tiriant vieną grupę – Wilcoxon suderintos poros pasirašyto rango dvipusis testas.

3.2. Antrojo disertacinio darbo uždavinio tyrimų rezultatai

3.2.1. Tiriamųjų charakteristika

Igyvendinant antrąjį disertacinio darbo uždavinį ištirta 20 sergančiųjų AA ir 16 SA. 3.2.1.1 lentelėje pateikti abiejų tiriamųjų grupių demografiniai ir klinikiniai duomenys. AA ir SA grupių tiriamieji amžiumi ir KMI reikšmingai nesiskyrė. FEV₁ (l) taip pat reikšmingai nesiskyrė, tačiau skirtumas tarp grupių išryškėjo, kai FEV₁ buvo išreikštas procentais. AA grupės tiriamųjų kraujo eozinofilų, Fe_{NO} ir bendro IgE kiekis reikšmingai didesnis nei SA grupėje. AA sergančiųjų grupės FEV₁ (l) reikšmingai sumažėjo praėjus 24 valandoms po bronchų provokacijos alergenu, o eozinofilų kraujyje ir Fe_{NO} kiekis reikšmingai padidėjo. Tuo tarpu bendro IgE kiekis po bronchų provokacijos alergenu reikšmingai nepasikeitė.

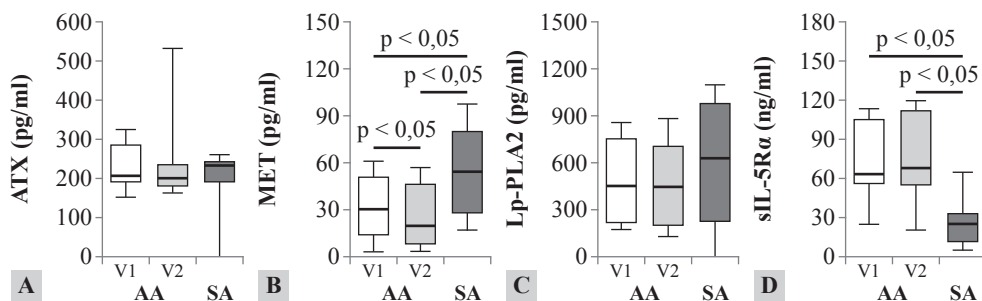
3.2.1.1 lentelė. Demografiniai ir klinikiniai tiriamųjų duomenys

	AA		SA
Tirtų asmenų skaičius, n	20		16
Lytis, V/M	11/9		6/10
Amžius, metais	27,2 ± 2,2		28,2 ± 1,4
KMI, kg/m ²	24,5 ± 1,1		22,7 ± 0,8
Astmos kontrolės testas, balais	18,3 ± 1,3		NA
PD _{20M} , mg	0,33 ± 0,07		NA
PD _{20A} , HEP/ml	9,5 ± 3,0		NA
	V1	V2	
FEV ₁ , l	3,6 ± 0,2 #	3,3 ± 0,2	4,0 ± 0,2
FEV ₁ , % būtinojo dydžio	88,5 ± 3,0 * #	81,3 ± 3,8 *	99,4 ± 3,3
Fe _{NO} , ppb	48,2 ± 7,5 * #	76,8 ± 11,7 *	13,3 ± 2,0
Kraujo eozinofilų kiekis, × 10 ⁹ /l	0,34 ± 0,05 * #	0,46 ± 0,05 *	0,10 ± 0,01
Bendras IgE, IU/ml	577,9 ± 175,6 *	603,4 ± 188,2 *	32,3 ± 12,9

AA – alerginė astma; Fe_{NO} – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore; FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; Ig – imunoglobulinas; KMI – kūno masės indeksas; M – moterys; NA – neatlikta; PD_{20A} – provokacinė alergeno dozė, nulėmusi FEV₁ sumažėjimą 20 proc; PD_{20M} – provokacinė metacholino dozė, nulėmusi FEV₁ sumažėjimą 20 proc.; SA – sveiki asmenys; V – vyrai; V1 – pirmas tyrimo vizitas; V2 – antras tyrimo vizitas, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. Pateiktas duomenų vidurkis su standartinė vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti su SA grupe; #p < 0,05, palyginti su AA sergančiųjų grupe V2. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

3.2.2. Biologiškai aktyviųjų medžiagų (autotaksino, tirozin-proteinkinazės Met, lipoproteino A2 fosfolipazės, tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto, pentaksino 3, tioredoksino 1, matriksinio metaloproteinazės-7, 9, 10 ir I C telopeptido I tipo kolageno) kiekiai serume sergant alergine astma ir jų kitimas *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje

Ištyrėme abiejų tiriamųjų grupių serume esančių pasirinktų biologiškai aktyviųjų medžiagų kiekius, kurios pateiktos 3.2.2.1 lentelėje. Nustatėme, kad ATX kiekis sergančiųjų AA serume buvo panašus prieš ir po bronchų provokacijos alergenu ir reikšmingai nesiskyrė nuo SA (3.2.2.1 pav. A). Vertinant MET kiekį serume, rasti reikšmingi skirtumai tarp AA sergančiųjų ir SA grupių – sergančiųjų AA serume MET kiekis buvo mažesnis nei SA. Praėjus 24 valandoms po bronchų provokacijos alergenu, MET kiekis AA tiriamųjų grupėje reikšmingai sumažėjo, palyginti su kiekiu, kuris buvo prieš bronchų provokaciją alergenu (3.2.2.1 pav. B). Lp-PLA2 kiekis serume reikšmingai nesiskyrė tarp sergančiųjų AA abiejų tyrimo vizitų metu ir lyginant su SA (3.2.2.1 pav. C). Tuo tarpu sIL-5R α kiekis AA grupės tiriamųjų serume buvo reikšmingai didesnis, palyginti su SA grupe. Po bronchų provokacijos alergenu sIL-5R α kiekis serume AA grupėje išliko panašus kaip ir prieš bronchų provokaciją alergenu (3.2.2.1 pav. D).



3.2.2.1 pav. Autotaksino (A), tirozin-proteinkinazės Met (B), lipoproteino A2 fosfolipazės (C) ir tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto (D) kiekis serume sergant alergine astma ir lyginant su sveikais asmenimis

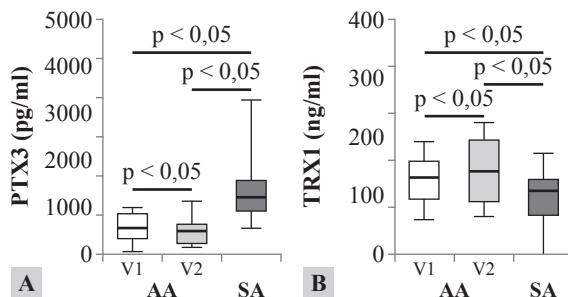
AA – alerginė astma; ATX – autotaksinas; Lp-PLA2s – lipoproteino A2 fosfolipazė; MET – tirozin-proteinkinazė Met; SA – sveiki asmenys; sIL-5R α – tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; V1 – pirmas tyrimo vizitas; V2 – antras tyrimo vizitas, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. AA grupė n = 20, SA grupė n = 16. Duomenys pateikti mediana ir tarpkvartiliniu diapazonu. Statistinė analizė: tariant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

3.2.2.1 lentelė. Sergančiųjų alergine astma ir sveikų asmenų biologiškai aktyvių medžiagų kiekiai serume

Biologiškai aktyvios medžiagos	AA		SA
	V1	V2	
ATX (pg/ml)	206,8 (190,9; 286,3)	201,5 (180,3; 235,5)	233,3 (190,9; 243,9)
MET (pg/ml)	30,5 (14,0; 51,1) * #	19,8 (8,0; 46,6) *	54,3 (28,0; 80,3)
Lp-PLA2 (pg/ml)	451,4 (216,4; 755,1)	445,5 (199,9; 706,6)	629,3 (224,9; 980,8)
sIL-5R α (ng/ml)	63,4 (55,9; 105,4) *	67,9 (54,9; 112,1) *	25,2 (11,3; 33,2)
PTX3 (pg/ml)	560,1 (326,1; 875,2) * #	498,9 (226,5; 651,1) *	1217,6 (919,8; 1580,1)
TRX1 (ng/ml)	131,2 (93,8; 173,6) * #	142,0 (89,4; 195,6) *	113,9 (67,4; 136,1)
MMP-7 (pg/ml)	332,9 (241,5; 421,3)	295,1 (272,1; 327,7)	278,3 (195,3; 379,2)
MMP-9 (pg/ml)	253,7 (151,4; 339,9)	211,9 (116,9; 293,7)	204,2 (94,8; 498,0)
MMP-10 (pg/ml)	896,1 (318,9; 1501,0)	971,0 (355,7; 1682,6)	502,7 (324,0; 1052,5)
ICTP (pg/ml)	523,0 (478,0; 552,0) *	476,3 (411,6; 531,4) *	589,0 (540,0; 693,0)

AA – alerginė astma; ATX – autotaksinas; Fe_{NO} – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore; ICTP – C telopeptido I tipo kolagenas; Lp-PLA2s – lipoproteino A2 fosfolipazė; MET – tirozin-proteinkinazė Met; MMP – matrikso metaloproteinazė; PTX3 – pentaksinas 3; SA – sveiki asmenys; sIL-5R α – tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; TRX1 – tioredoksinas 1; V1 – pirmas tyrimo vizitas; V2 – antras tyrimo vizitas, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. AA grupė n = 20, SA grupė n = 16. Duomenys pateikti mediana ir tarpkvartiliniu diapazonu. *p < 0,05, palyginti su SA grupe; #p < 0,05, palyginti su AA sergančiųjų grupe V2. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

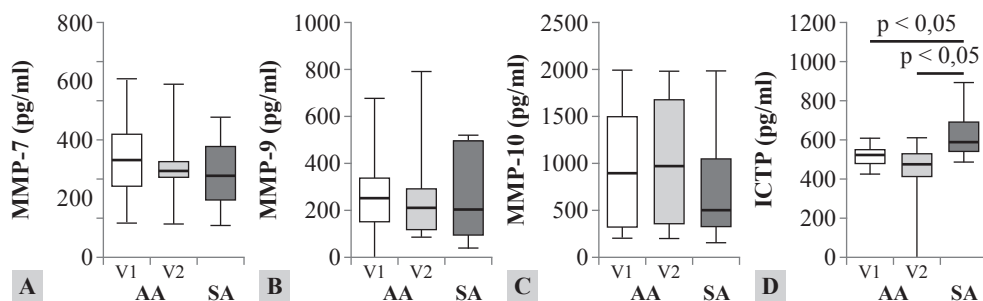
Ištyrėme kraujo oksidacinio streso žymenų PTX3 ir TRX1 kiekius sergančiųjų AA ir SA serume. Rezultatai pateikti 3.2.2.1 lentelėje. Reikšmingai mažesnis PTX3 kiekis nustatytas AA grupės tiriamųjų serume, palyginti su SA grupe, o po bronchų provokacijos alergenu šis kiekis dar labiau sumažėjo (3.2.2.2 pav. A). Tuo tarpu TRX1 kiekis AA grupės tiriamųjų serume buvo reikšmingai didesnis nei SA grupėje. Be to, TRX1 kiekis dar labiau padidėjo praėjus 24 valandoms po bronchų provokacijos alergenu atlikimo, palyginti su rezultatais prieš bronchų provokaciją alergenu (3.2.2.2 pav. B).



3.2.2.2 pav. Pentaksino 3 (A) ir tioredoksino 1 (B) kiekis serume sergant alergine astma ir lyginant su sveikais asmenimis

AA – alerginė astma; PTX3 – pentaksinas 3; SA – sveiki asmenys; TRX1 – tioredoksinas 1; V1 – pirmas tyrimo vizitas; V2 – antras tyrimo vizitas, praėjus 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. AA grupė n = 20, SA grupė n = 16. Duomenys pateikti mediana ir tarpkvartiliniu diapazonu. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

Ištyrėme trijų MMP ir ICTP kiekius serume. Tyrimų rezultatai pateikti 3.2.2.1 lentelėje. Lyginant MMP-7, MMP-9 ir MMP-10 kiekius serume abejuose tiriamųjų grupėse, rezultatai buvo panašūs – visų trijų MMP kiekiai AA ir SA grupių tiriamųjų serumuose reikšmingai nesiskyrė, o atlikta bronchų provokacija alergenu įtakos šių medžiagų kiekiui neturėjo (3.2.2.3 pav. A–C). Tuo tarpu ICTP kiekis serume AA sergančiųjų grupėje buvo reikšmingai mažesnis, palyginti su SA grupe, o bronchų provokacija alergenu ICTP kiekiui įtakos neturėjo (3.2.2.3 pav. D).



3.2.2.3 pav. Matrikso metaloproteinazės-7 (A), 9 (B), 10 (C) ir C telopeptido I tipo kolageno (D) kiekis serume sergant alergine astma ir lyginant su sveikais asmenimis

AA – alerginė astma; ICTP – C telopeptido I tipo kolagenas; MMP – matrikso metaloproteinazė; SA – sveiki asmenys; V1 – pirmas tyrimo vizitas; V2 – antras tyrimo vizitas, 24 val. po bronchų provokacijos alergenu. AA grupė n = 20, SA grupė n = 16. Duomenys pateikti mediana ir tarpkvartiliniu diapazonu. Statistinė analizė: tiriant dvi nepriklausomas grupes, taikytas Mann-Whitney U testas, dvi priklausomas grupes – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

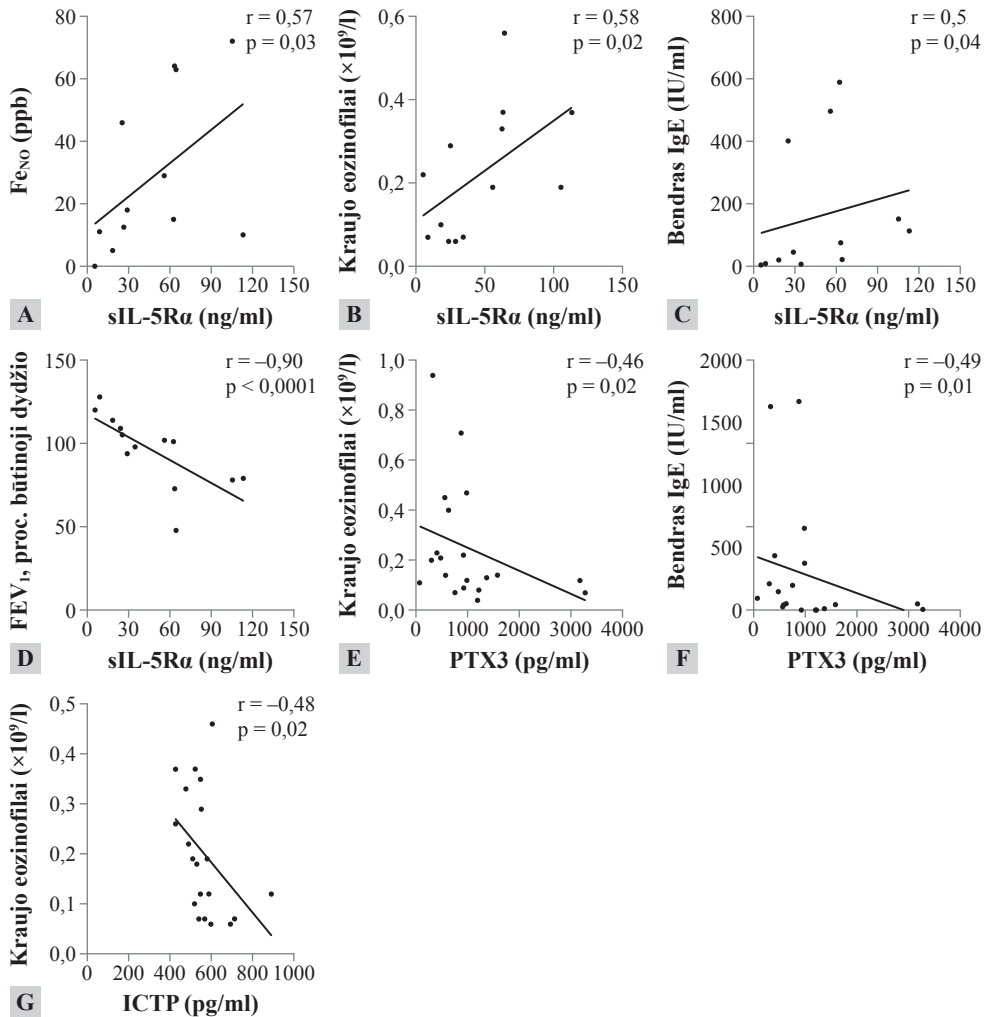
3.2.3. Biologiškai aktyvių medžiagų (tirozin-proteinkinazės Met, tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto, pentaksino 3, tioredoksino 1 ir I C telopeptido I tipo kolageno) kiekių serume sąsajos su žinomais astmos biologiniais žymenimis ir plaučių funkcija sergant alergine astma

Tyrėme tas biologiškai aktyvias medžiagas, kurių kiekis serume AA sergančiųjų grupėje reikšmingai skyrėsi nuo SA grupės ir kurios galėtų turėti prognostinę reikšmę sergant astma. Ieškojome MET, sIL-5R α , PTX3, TRX1 ir ICTP kiekių koreliacijų su patvirtintais astmos biologiniais žymenimis (Fe_{NO}, kraujo eozinofilų ir bendro IgE kiekiu) bei plaučių funkcija (FEV₁). Vertinant MET koreliaciją su Fe_{NO}, kraujo eozinofilų ir bendro IgE kiekiu bei FEV₁, reikšmingų koreliacijų AA grupėje nenustatėme (3.2.3.1 lentelė). O ištyrus sIL-5R α koreliacijas, nustatyta reikšmingai teigiama koreliacija su Fe_{NO}, kraujo eozinofilų ir bendro IgE kiekiu (3.2.3.1 pav. A–C). Be to, nustatyta stipri neigiama koreliacija tarp sIL-5R α ir FEV₁ (3.2.3.1 pav. D) bei PTX3 stipri neigiama koreliacija su kraujo eozinofilų ir bendro IgE kiekiu (3.2.3.1 pav. E–F), tačiau reikšmingų koreliacijų su Fe_{NO} ir FEV₁ nebuvo. Be to, nustatyta reikšmingai neigiama ICTP koreliacija su kraujo eozinofilų kiekiu (3.2.3.1 pav. G), tačiau ICTP koreliacijos su Fe_{NO}, bendru IgE ir FEV₁ nebuvo. Gauti rezultatai pateikti 3.2.3.1. lentelėje.

3.2.3.1 lentelė. *Sergančiųjų alergine astma serumo tirozin-proteinkinazės Met, tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto, pentaksino 3, tioredoksino 1 ir I C telopeptido I tipo kolageno kiekių koreliacijos su žinomais biologiniais žymenimis bei forsuoto iškvėpimo tūriu per pirmąją sekundę*

	Fe _{NO} (ppb)	Kraujo eozinofilai ($\times 10^9/l$)	Bendras IgE (IU/ml)	FEV ₁ , proc. būtinojo dydžio
MET (pg/ml)	r = 0,02 p = 0,47	r = -0,07 p = 0,39	r = -0,06 p = 0,41	r = -0,07 p = 0,40
sIL-5R α (ng/ml)	r = 0,57 p = 0,03	r = 0,58 p = 0,02	r = 0,52 p = 0,04	r = -0,90 p < 0,0001
PTX3 (pg/ml)	r = -0,32 p = 0,10	r = -0,46 p = 0,02	r = -0,49 p = 0,01	r = 0,23 p = 0,17
TRX1 (ng/ml)	r = 0,25 p = 0,18	r = 0,19 p = 0,23	r = 0,35 p = 0,06	r = -0,23 p = 0,18
ICTP (pg/ml)	r = -0,02 p = 0,46	r = -0,48 p = 0,02	r = -0,11 p = 0,32	r = 0,17 p = 0,24

Fe_{NO} – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore; FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; ICTP – C telopeptido I tipo kolagenas; Ig – imunoglobulinas; MET – tirozin-proteinkinazė Met; PTX3 – pentaksinas 3, r – Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas; sIL-5R α – tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; TRX1 – tioredoksinas 1. Statistinė analizė: Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas.



3.2.3.1 pav. Sergančiųjų alergine astma koreliacijos tarp serumo tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto ir azoto monoksido kiekio iškvėpiamajame ore (A), tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto ir kraujo eozinofilų kiekio (B), tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto ir bendro imunoglobulino E kiekio (C), tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto ir forsuoto iškvėpimo tūrio per pirmąją sekundę (D), pentaksino 3 ir kraujo eozinofilų kiekio (E), pentaksino 3 ir bendro imunoglobulino E kiekio (F), I C telopeptido I tipo kolageno ir kraujo eozinofilų kiekio (G)

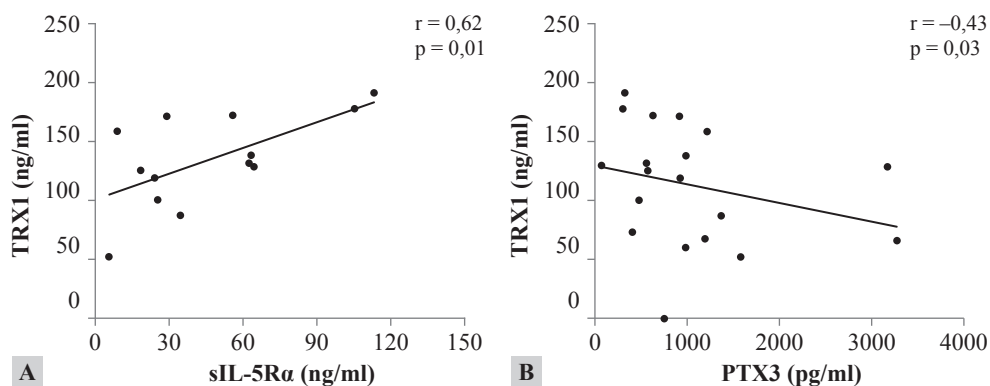
Fe_{NO} – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore; FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; ICTP – C telopeptido I tipo kolagenas; Ig – imunoglobulinas; p – patikimumo lygmuo; PTX3 – pentaksinas 3, r – Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas; sIL-5R α – tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; TRX1 – tioredoksinas 1. Statistinė analizė: Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas.

Įvertinome biologiškai aktyvių medžiagų, kurių kiekiai tiriamųjų grupėse skyrėsi, koreliacijas tarpusavyje. Nustatėme, kad sIL-5R α reikšmingai teigiamai koreliavo su TRX1, o PTX3 reikšmingai neigiamai – su TRX1 (3.2.3.2 lentelė, 3.2.3.2 pav.). Jokių kitų reikšmingų koreliacijų tarp skirtingų biologiškai aktyvių medžiagų kiekių nebuvo (3.2.3.2 lentelė).

3.2.3.2 lentelė. *Sergančiųjų alergine astma serumo tirozin-proteinkinazės Met, tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto, pentaksino 3, tioredoksino 1 ir IC telopeptido I tipo kolageno kiekių koreliacijos tarpusavyje*

	MET (pg/ml)	sIL-5Rα (ng/ml)	PTX3 (pg/ml)	TRX1 (ng/ml)	ICTP (pg/ml)
MET (pg/ml)	–	r = – 0,27 p = 0,45	r = 0,09 p = 0,75	r = – 0,35 p = 0,22	r = – 0,16 p = 0,55
sIL-5R α (ng/ml)	r = – 0,27 p = 0,45	–	r = – 0,38 p = 0,2	r = 0,62 p = 0,01	r = – 0,06 p = 0,85
PTX3 (pg/ml)	r = 0,09 p = 0,75	r = – 0,38 p = 0,2	–	r = – 0,49 p = 0,02	r = 0,31 p = 0,19
TRX1 (ng/ml)	r = – 0,35 p = 0,22	r = 0,62 p = 0,01	r = – 0,49 p = 0,02	–	r = – 0,05 p = 0,86
ICTP (pg/ml)	r = – 0,16 p = 0,55	r = – 0,06 p = 0,85	r = 0,31 p = 0,19	r = – 0,05 p = 0,86	–

ICTP – C telopeptido I tipo kolagenas; MET – tirozin-proteinkinazė Met; p – patikimumo lygmuo; PTX3 – pentaksinas 3, r – Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas; sIL-5R α – tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; TRX1 – tioredoksinas 1. Statistinė analizė: Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas.



3.2.3.2 pav. *Serumo tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto ir tioredoksino 1 (A), pentaksino 3 ir tioredoksino 1 (B) kiekių koreliacijos sergant alergine astma*

p – patikimumo lygmuo; PTX3 – pentaksinas 3, r – Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas; sIL-5R α – tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; TRX1 – tioredoksinas 1. Statistinė analizė: Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas.

3.3. Trečiasis disertacinio darbo uždavinys

3.3.1. Tiriamųjų charakteristika

Igyvendinant trečiąjį disertacinio darbo uždavinį iširta 18 sergančiųjų SEA. Visi pacientai tyrimams atvyko keturis kartus: prieš pradėdant gydymą 100 mg mepolizumabo injekcija po oda (V1) ir 4-ą (V2), 12-ą (V3) bei 24-ą (V4) savaitę nuo gydymo mepolizumabu pradžios.

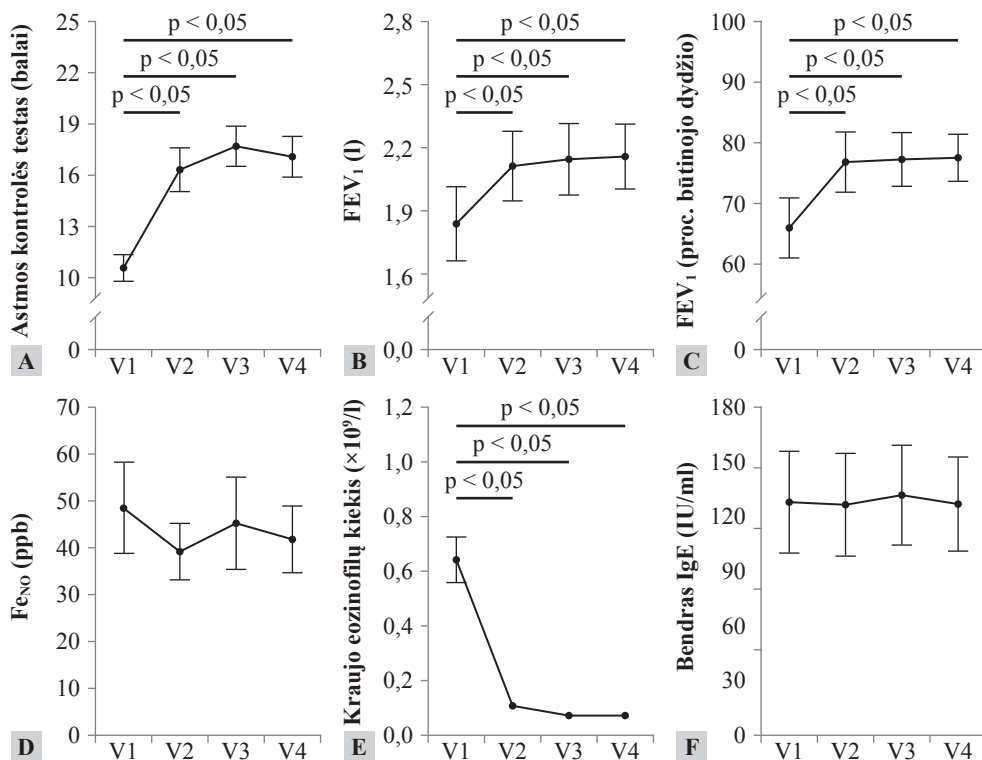
Dauguma tiriamųjų turėjo antsvorį ir buvo moterys. Prieš pradėdant gydymą 100 mg mepolizumabo injekcija po oda, visiems pacientams karto-davosi astmos paūmėjimai. Po pirmosios mepolizumabo dozės astmos paūmėjimų nebuvo nė vienam pacientui, tačiau po antrosios mepolizumabo dozės vienam pacientui astma paūmėjo. Vėliau tęsiant gydymą mepolizu-mabu, pacientų, patyrusių astmos paūmėjimą, nepadaugėjo.

Praėjus 4 savaitėms nuo gydymo mepolizumabu pradžios, astmos kontrolės testas ir FEV₁ reikšmingai padidėjo, tuo tarpu eozinofilų kiekis kraujyje reikšmingai sumažėjo ir šis poveikis išliko viso gydymo metu (3.3.1.1 lentelė, 3.3.1.1 pav. A–C, E). FeNO ir bendro IgE kiekiai tiek prieš gydymą, tiek jo metu reikšmingai nesiskyrė (3.3.1.1 lentelė, 3.3.1.1 pav. D, F).

3.3.1.1 lentelė. Demografiniai ir klinikiniai tiriamųjų duomenys

	SEA			
Tirtų asmenų skaičius, n	18			
Lytis, V/M	4/18			
Amžius, metai	57,6 ± 2,2			
KMI, kg/m ²	30,3 ± 1,7			
	V1	V2	V3	V4
Tiriamųjų, kurie patyrė astmos paūmėjimus, skaičius	18	0	1	0
Astmos kontrolės testas, balais	10,6 ± 0,8 * # £	16,3 ± 1,3	17,7 ± 1,2	17,1 ± 1,2
FEV ₁ , l	1,84 ± 0,18 * # £	2,11 ± 0,16	2,15 ± 0,17	2,16 ± 0,15
FEV ₁ , proc. būtinąjo dydžio	66,0 ± 4,9 * # £	76,9 ± 4,9	77,3 ± 4,4	77,6 ± 3,8
FeNO, ppb	48,6 ± 9,7	39,3 ± 6,0	45,3 ± 9,8	41,9 ± 7,1
Kraujo eozinofilų kiekis, × 10 ⁹ /l	0,64 ± 0,08 * # £	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Bendras IgE, IU/ml	128,1 ± 27,9	126,7 ± 28,0	131,9 ± 27,3	127,0 ± 25,7

FeNO – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore; FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; Ig – imunoglobulinas; KMI – kūno masės indeksas; M – moterys; V – vyrai; V1 – pirmas vizitas; V2 – antras vizitas, praėjus 4 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda; V3 – trečias vizitas, praėjus 12 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda; V4 – ketvirtas vizitas, praėjus 24 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda. Pateiktas duomenų vidurkis su standartinė vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti V2; #p < 0,05, palyginti su V3; £p < 0,05, palyginti su V4. Statistinė analizė: tiriant dvi priklausomas grupes, taikytas Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.



3.3.1.1 pav. Astmos kontrolēs testo balų (A), forsuoto iškvėpimo tūrio per pirmąją sekundę (B, C), azoto monoksido kiekio iškvėpiamame ore (D), kraujo eozinofilų (E) ir bendro imunoglobulino E kiekio (F) kitimas per 24 savaites gydymo monokloniniu antikūnu prieš IL-5 mepolizumabu

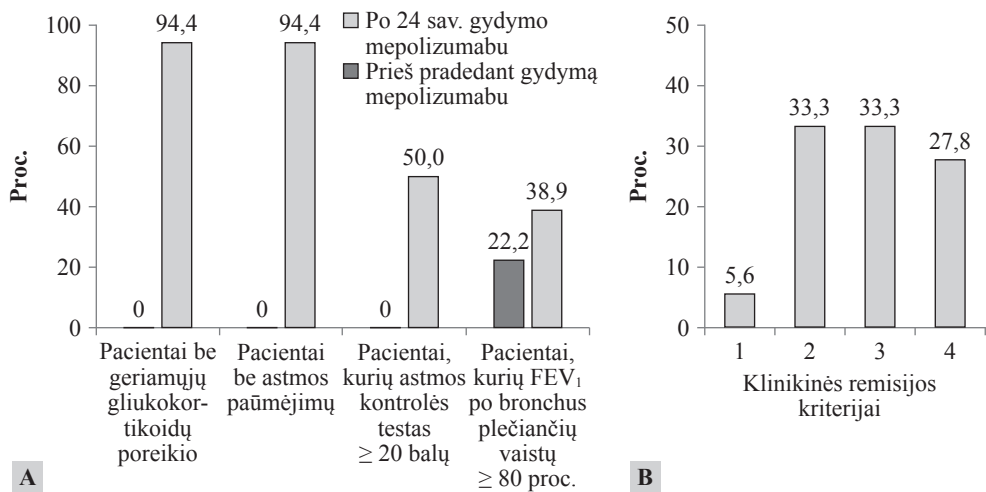
FeNO – azoto monoksido kiekis iškvėpiamame ore; FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; Ig – imunoglobulinas; V1 – pirmas vizitas; V2 – antras vizitas, praėjus 4 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda; V3 – trečias vizitas, praėjus 12 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda; V4 – ketvirtas vizitas, praėjus 24 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda. SEA grupė n = 18. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti V2; #p < 0,05, palyginti su V3; ‡p < 0,05, palyginti su V4. Statistinė analizė: tiriant dvi priklausomas grupes, taikytas Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

3.3.2. Sergančiųjų sunkia eozinofiline astma klinikinės remisijos kriterijai po 24 savaičių gydymo monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5

Praėjus 24-ioms gydymo mepolizumabu savaitėms, pacientų, kurie nepatyrė astmos paūmėjimų ir gydymui nevaratojo geriamųjų gliukokortikoidų, skaičius padidėjo nuo 0 (0 proc.) iki 17 (94,4 proc.). Taip pat nuo 0 (0 proc.) iki 9 (50 proc.) padidėjo pacientų skaičius, kurių astmos kontrolēs testas buvo ≥ 20 balų. Pacientų skaičius, kurių FEV₁ buvo ≥ 80 proc. po bronchus

plečiančių vaistų įkvėpimo, padidėjo nuo 4 (22,2 proc.) iki 7 (38,9 proc.) (3.3.2.1 pav. A).

Praėjus 24-ioms gydymo mepolizumabu savaitėms, 5 pacientai (27,8 proc.) atitiko visus 4 klinikinės remisijos kriterijus, 6 pacientai (33,3 proc.) – 3 kriterijus. Tuo tarpu prieš pradėdant gydymą mepolizumabu, nė vienas pacientas (0 proc.) neatitiko visų 4 ar 3 klinikinės remisijos kriterijų. Be to, po 24-ių gydymo mepolizumabu savaitių 6 pacientai (33,3 proc.) atitiko 2 klinikinės remisijos kriterijus ir tik 1 pacientas (5,6 proc.) – 1 kriterijų. Prieš pradėdant gydymą mepolizumabu, 2 ir 1 klinikinės remisijos kriterijus atitinkamai atitiko 4 ir 0 pacientų (0 proc.; 22,2 proc.) (3.3.2.1 pav. B).



3.3.2.1 pav. 24 savaites monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5 mepolizumabu gydytų pacientų, atitinkančių atskirus klinikinės remisijos kriterijus, skaičius (A); 24 savaites monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5 mepolizumabu gydytų pacientų, atitinkančių 1, 2, 3 arba visus 4 klinikinės remisijos kriterijus, skaičius (B)

FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę. SEA grupė n = 18.

3.3.3. Sergančiųjų sunkia eozinofiline astma 2-o tipo uždegimo biologinių žymenų kiekiai serume 24 savaites gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5

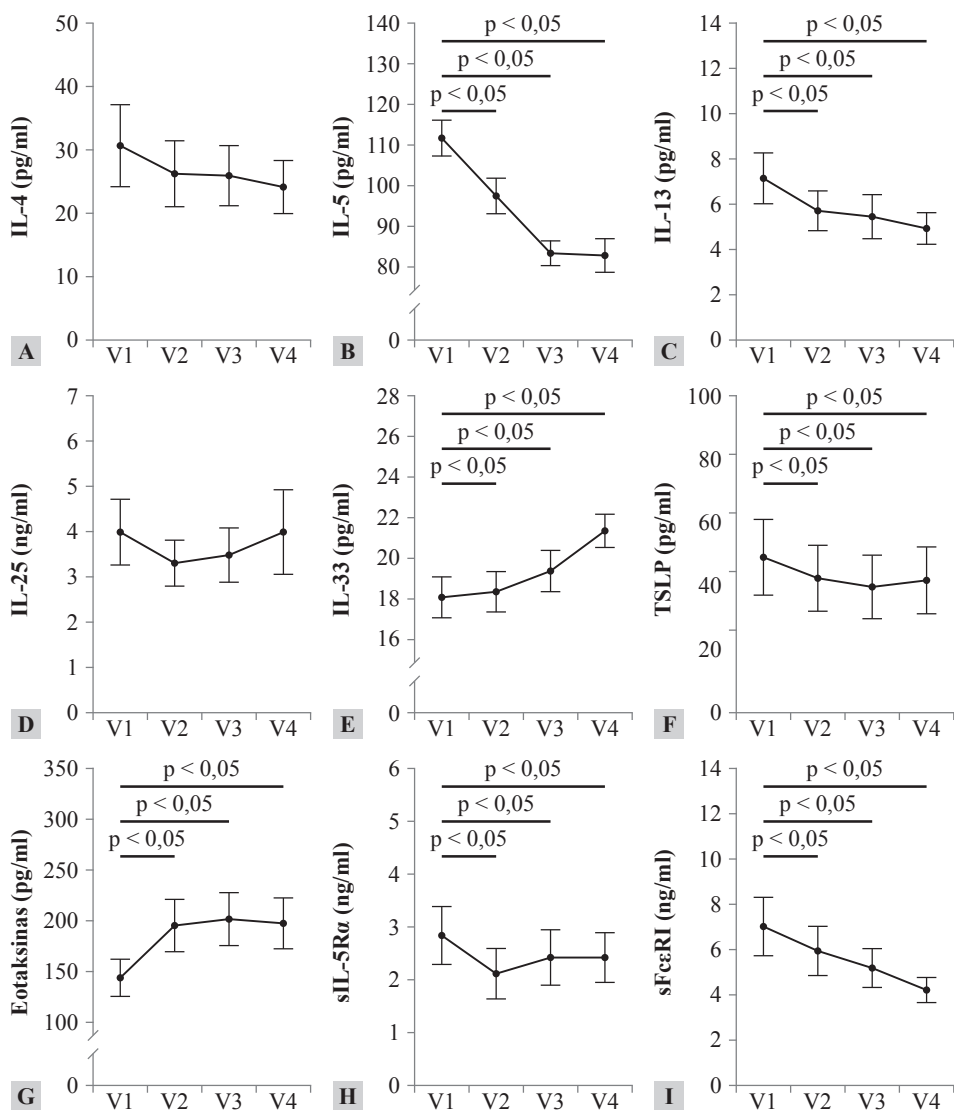
Praėjus 4 savaitėms nuo gydymo mepolizumabu pradžios, IL-4 ir IL-25 kiekis serume reikšmingai nepasikeitė (3.3.3.1 pav. A, D); tuo tarpu IL-5, IL-13, TSLP, sIL-5R α ir sFc ϵ RI kiekis serume reikšmingai sumažėjo ir šis poveikis išliko viso gydymo metu (3.3.3.1 pav. B, C, H, I). IL-33 ir eotaksino kiekis serume reikšmingai padidėjo po 4 savaitių, kai buvo pradėtas gydymas

mepolizumabu, ir šis poveikis išliko viso gydymo metu (3.3.3.1 pav. E, G). Rezultatai pateikti 3.3.3.1 lentelėje.

3.3.3.1 lentelė. 2-o tipo uždegimo biologinių žymenų kiekis serume 24 savaites gydant prieš interleukiną 5 nukreiptu vaistu mepolizumabu

	SEA			
	V1	V2	V3	V4
IL-4 (pg/ml)	30,7 ± 6,5	26,3 ± 2,2	26,0 ± 4,7	24,2 ± 4,2
IL-5 (pg/ml)	111,7 ± 4,4 * # £	97,5 ± 4,3	83,5 ± 3,0	82,8 ± 4,1
IL-13 (pg/ml)	7,2 ± 1,1 * # £	5,7 ± 0,9	5,5 ± 1,0	4,9 ± 0,8
IL-25 (ng/ml)	4,0 ± 0,7	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,6	4,0 ± 0,9
IL-33 (pg/ml)	18,1 ± 1,0 * # £	18,4 ± 1,0	19,4 ± 1,0	21,3 ± 0,8
TSLP (pg/ml)	49,1 ± 11,9 * # £	42,4 ± 10,3	39,7 ± 10,0	41,8 ± 10,5
sIL-5Rα (ng/ml)	2,84 ± 0,55 * # £	2,11 ± 0,47	2,43 ± 0,52	2,42 ± 0,47
Eotaksinas (pg/ml)	143,9 ± 18,2 * # £	195,3 ± 25,5	201,7 ± 25,9	197,5 ± 24,8
sFcεRI (ng/ml)	7,0 ± 1,3 * # £	5,9 ± 1,1	5,2 ± 0,9	4,2 ± 0,6

IL – interleukinas; SEA – sunki eozinofilinė astma; sFcεRI – tirpus didelio afiniteto imunoglobulino E receptoriaus; sIL-5Rα – tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas; V1 – pirmas vizitas; V2 – antras vizitas, praėjus 4 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda; V3 – trečias vizitas, praėjus 12 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda; V4 – ketvirtas vizitas, praėjus 24 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda. SEA grupė n = 18. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida. *p < 0,05, palyginti V2; #p < 0,05, palyginti su V3; £p < 0,05, palyginti su V4. Statistinė analizė: tiriant dvi priklausomas grupes, taikytas Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.



3.3.3.1 pav. Interleukino 4 (A), interleukino 5 (B), interleukino 13 (C), interleukino 25 (D), interleukino 33 (E), užkrūčio liaukos stromos limfopoetino (F), eotaksino (G), tirpus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto (H), tirpus didelio afiniteto imunoglobulino E receptoriaus (I) kiekis serume 24 savaites gydant prieš interleukiną 5 nukreiptu vaistu mepolizumabu

IL – interleukinas; SEA – sunki eozinofilinė astma; sFceRI – tirpus didelio afiniteto imunoglobulino E receptoriaus; sIL-5Rα – tirpus interleukino 5 receptoriaus alfa subvienetas; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas; V1 – pirmas vizitas; V2 – antras vizitas, praėjus 4 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda; V3 – trečias vizitas, praėjus 12 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda; V4 – ketvirtas vizitas, praėjus 24 sav. po pirmos mepolizumabo injekcijos po oda. SEA grupė n = 18. Pateiktas duomenų vidurkis su standartine vidurkio paklaida.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Eozinofilų potipių proliferacinis aktyvumas *in vitro*

4.1.1. Eozinofilopoetinių (interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio) poveikis eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui *in vitro*

Eozinofilų vystymasis ir funkcijos priklauso nuo citokinų. Citokinai, reguliuojantys eozinofilų brendimą ir aktyvumą, vadinami eozinofilopoetiniais. Jiems priklauso IL-3, IL-5 ir GM-CSF [11, 158]. Eozinofilų vaidmuo kvėpavimo takų remodeliacijai, įskaitant BLR ląstelių dauginimąsi, buvo nustatytas palyginti anksti [45]. Jau anksčiau atliktais tyrimais įrodėme, kad bet kurių eozinofilų potipių įtraukimas į bendrą kultūrą reikšmingai padidina BLR ląstelių dauginimąsi [159], tačiau iki šiol tyrimų su eozinofilopoetinių aktyvintais eozinofilų potipiais nebuvo atlikta. Šiuo tyrimu siekėme nustatyti eozinofilopoetinių poveikį eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui. Naudojant kombinuotus eozinofilopoeitiniais aktyvintus kraujo eozinofilų potipius ir BLR ląstelių kultūros modelį, imituojant procesus *in vitro*, paaiškėjo, kad IL-5 ir GM-CSF, bet ne IL-3, yra svarbūs eozinofilų proliferaciniam aktyvumui. Abu šie citokinai reikšmingai sustiprino Eos_{užd} ir Eos_{rez} poveikį BLR ląstelių proliferacijai AA ir SNEA sergančiųjų grupėse.

Kvėpavimo takai nuolat kontaktuoja su dirgikliais, virusais, mikrobais ir alergenais, kurie gali sukelti astmos paūmėjimą [1]. Norėdami įvertinti eozinofilopoetinių poveikį imituojant astmos paūmėjimus, naudojome labiausiai aplinkoje paplitusį *Dermatophagoides pteronyssinus* – namų dulkių erkės – alergeną, su kuriuo žmonės nuolat kontaktuoja. Šis tyrimas parodė, kad bronchų provokacija alergenu sustiprina Eos_{užd} proliferacinį aktyvumą, bet eozinofilopoetinių poveikis papildomai nepadidina jų atsako. Galima daryti prielaidą, kad Eos_{užd} kaulų čiulpuose išsiskiria aktyvesnės būsenos arba turi didesnę aktyvintų eozinofilopoetinių receptorių kiekį. Todėl jų proliferacinį aktyvumą mažiau veikia eozinofilopoeitinai. Bronchų provokacija alergenu sustiprino Eos_{rez} proliferacinį aktyvumą, o IL-5 ir GM-CSF padidino jų atsaką. Tai leidžia daryti prielaidą, kad Eos_{rez} gali būti mažiau aktyvinti, o bronchų provokacija alergenu, imituojant astmos paūmėjimą, sustiprina jų atsaką į IL-5 ir GM-CSF. Galime spėti, kad sustiprėjusi BLR remodeliacija, esant astmos paūmėjimui, gali būti susijusi su Eos_{rez} funkcijomis ir su IL-5 bei GM-CSF poveikiu jų proliferaciniam aktyvumui, bet ne su Eos_{užd} funkcijomis ir eozinofilopoetinių poveikiu jų proliferaciniam aktyvumui.

Nustatėme, kad IL-5 ir GM-CSF poveikis eozinofilų potipiams reikšmingai padidino BLR ląstelių skaičių. Tai lemia kvėpavimo takų remodeliaciją,

bronchų sienelės sustorėjimą ir kvėpavimo takų susiaurėjimą, vedantį į obstrukciją. Dėl šios priežasties BLR ląstelių dauginimasis gali būti siejamas su sunkia astmos eiga ir pablogėjusia plaučių funkcija. To būtų galima išvengti blokuojant IL-5 ir GM-CSF poveikį eozinofilams.

FDA 2015 m. patvirtino pirmąjį humanizuotą monokloninį antikūną, blokuojantį IL-5 (mepolizumabą), skirtą sunkiai eozinofilinei astmai gydyti. Po 2 metų ta pati institucija patvirtino antrąjį humanizuotą monokloninį antikūną, blokuojantį IL-5R (benralizumabą). Gydytas monokloniniais antikūnais prieš IL-5 ir prieš IL-5R reikšmingai pagerino sergančiųjų sunkia astma gyvenimo kokybę sumažindamas astmos paūmėjimų dažnį ir geriamųjų gliukokortikoidų vartojimą bei pagerindamas plaučių funkciją ir gyvenimo kokybę [147, 151, 153, 154, 160]. Manome, kad GM-CSF blokavimas gali būti alternatyvus taikyns gydant astmą. Pirmasis tyrimas su monokloniniais antikūnais prieš GM-CSF sergant astma buvo atliktas 2012–2014 m. Šio 2-ą fazių tyrimo pagrindinis tikslas – pagerinti sergančiųjų astma plaučių funkciją – buvo įgyvendintas nevisiškai, nes ne visi tiriamieji pajuto siekiamą poveikį, tačiau FEV₁ reikšmingai padidėjo sergančiųjų astma grupėje, kurioje eozinofilų kiekis tyrimo pradžioje buvo $> 0,3 \times 10^9/l$. Šio tyrimo metu taip pat nenumatyta reikšmingo poveikio astmos paūmėjimams mažinti ar astmos kontrolei gerinti. Manoma, kad tyrimo rezultatai nebuvo pakankamai geri dėl netinkamai pasirinktos tiriamųjų populiacijos arba tiriamojo vaisto dozės [161]. Iki šiol klinikinių tyrimų su monokloniniais antikūnais prieš GM-CSF nebuvo atlikta.

4.1.2. Eozinofilų potipių paviršiaus interleukino 3, interleukino 5 ir granulocitų-makrofažų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių genų raiška

IL-3, IL-5 arba GM-CSF poveikis eozinofilų aktyvinimui priklauso ne tik nuo citokinų kiekio, bet ir nuo jų receptorių kiekio eozinofilų paviršiuje. IL-3, IL-5 ir GM-CSF turi bendrą β grandinę ir citokinams specifines α grandines [32]. Nepaisant to, kad visi trys citokinai turi standartinį β grandinės receptoriaus subvienetą, kiekvienas skirtingai veikia eozinofilų savybes dėl α grandinės subvienetui būdingų savybių [147]. Darėme prielaidą, kad eozinofilų receptorių genų raiška eozinofilų potipiuose gali atlikti svarbų vaidmenį reguliuojant eozinofilų proliferacinį aktyvumą, BLR ląstelių proliferaciją ir kvėpavimo takų remodeliaciją. Siekėme nustatyti IL-3R, IL-5R ir GM-CSFR genų raišką sutelkdami dėmesį į numatomą eozinofilopoetinių receptorių skaičių eozinofilų paviršiuje skirtingose tiriamųjų grupėse.

Šio tyrimo metu buvo gauti reikšmingi eozinofilopoetinių receptorių genų raiškos skirtumai tarp Eos_{užd} ir Eos_{rez}. Abejose sergančiųjų astma grupėse

Eos_{rez} išsiskyrė didesne IL-3R raiška nei Eos_{užd}. Abiejų eozinofilų potipių IL-3R genų raiška buvo reikšmingai didesnė SNEA tiriamųjų grupėje nei AA ir SA grupėse. Įdomu tai, kad, nors IL-3R genų raiška buvo didesnė SNEA sergančiųjų grupėje, tačiau nenustatėme reikšmingo IL-3 poveikio eozinofilų potipių proliferaciniam aktyvumui. Taigi, IL-3R padidėjimas gali būti susijęs su kitų eozinofilų potipių biologinėmis savybėmis, ypač Eos_{užd} astmos paūmėjimų metu, o tai turi būti ištirta. Vertindami IL-5R geno raišką, nustatėme reikšmingą padidėjimą abiejuose eozinofilų potipiuose ir abejuose sergančiųjų astma grupėse, palyginti su SA. Tad galime daryti išvadą, kad padidėjusi IL-5R geno raiška gali būti susijusi su sustiprėjusiu Eos_{užd} ir Eos_{rez} proliferaciniu aktyvumu po jų aktyvinimo IL-5 paveiktais eozinofilais.

GM-CSFR geno raiška, kaip ir IL-3R, gali būti nesusijusi su eozinofilų potipių proliferaciniu aktyvumu. Taip teigiame, kadangi skirtingai nuo IL-3R ir IL-5R, geno GM-CSFR raiška abiejuose eozinofilų potipiuose AA tiriamųjų grupėje ir Eos_{rez} SNEA tiriamųjų grupėje buvo reikšmingai sumažėjusi, palyginti su SA grupe. Tai galėtume paaiškinti tuo, kad β grandinės citokinų receptoriai turi specifinį su ligandu susijusį kryžminio reguliavimo mechanizmą. Visi eozinofilopoetiniai gali sumažinti IL-5R ir padidinti IL-3R raišką, o GM-CSF pats slopina savo receptorių raišką. Sergant astma, padidėja IL-5 ir ypač GM-CSF kiekis kraujyje [104], todėl tai gali būti susiję su reikšmingai mažesne GM-CSFR genų raiška eozinofilų potipiuose. Tačiau eozinofilopoetino receptorių kiekis nėra pagrindinė signalo perdavimo priežastis. Eozinofilų potipių proliferacinis aktyvumas po aktyvavimo GM-CSF gali padidėti dėl to, kad aktyvuotoje būsenoje yra daugiau receptorių.

4.2. Naujų biologinių žymenų kiekiai sergant alergine astma ir jų kitimas *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje

4.2.1. Lėtinio uždegimo biologinių žymenų (autotaksino, tirozin-proteinkinazės Met, lipoproteino A2 fosfolipazės ir tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto) kiekiai sergant alergine astma ir jų kitimas *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje

Su lėtiniu uždegimu susijusios biologiškai aktyvios medžiagos (ATX, MET, Lp-PLA2s, sIL-5Rα) atlieka svarbų vaidmenį skatinant ir palaikant kvėpavimo takų uždegimą sergant astma. Tyrimai *in vitro* parodė, kad ATX aktyvuoja įvairius ląstelių tipus [127], susijusius su kvėpavimo takų uždegimu, o Lp-PLA2 yra fermentas, susijęs su uždegimu ir įvairių ligų, įskaitant astmą, patogenezę [21]. Atlikto tyrimo metu nenustatėme, kad šios su lėtiniu

uždegimu susijusios medžiagos gali turėti prognostinės vertės atpažįstant AA fenotipą.

MET signalo perdavimas glaudžiai susijęs su imuninių ląstelių aktyvumu ir citokinių bei chemokinių, susijusių su astmos patogenezė, gamyba [162]. Anksčiau atlikti tyrimai parodė, kad MET aktyvinimas ir jo signalo perdavimas gali padidinti uždegiminių ląstelių, tokių kaip eozinofilai ir T limfocitai, aktyvumą kvėpavimo takuose. Be to, MET lemias citokinių išsiskyrimas, įskaitant IL-8 ir IL-13, gali sukelti ar paūminti jau esamą kvėpavimo takų uždegimą ir tokiu būdu lemti ligos sunkumą [163, 164]. Prieš kelerius metus atliktas tyrimas, kurio metu tirta MET geno raiška sergančiųjų astma kvėpavimo takų biopsinėse medžiagose [165]. Tyrimo rezultatas – padidėjusi MET geno raiška bronchų epitelio ląstelėse. Todėl įvertinome MET kiekį serume kaip galimą AA fenotipo biologinį žymenį. Šio tyrimo rezultatai parodė reikšmingą MET kiekio sumažėjimą tiek prieš, tiek praėjus 24 valandoms po bronchų provokacijos alergenu, o tai rodo galimą MET vaidmenį AA patogenezėje ir jo reakciją į alergenų poveikį. MET veikia kaip hepatocitų augimo veiksnio receptorių, o kai hepatocitų augimo veiksniai prisijungia prie MET receptoriaus, suaktyvinami tarpląsteliniai signalų perdavimo keliai, kurie yra labai svarbūs sergant astma [164]. MET kiekio sumažėjimas sergančiųjų AA serume gali reikšti šių receptorių proteolitinio skilimo slopinimą, o tai rodo ryškesnę su MET susijusį signalo perdavimą ir imuninių ląstelių aktyvinimą.

sIL-5R α , kuris susidaro atsiskyrus užląsteliniam domeniui, yra aptinkamas kraujyje. IL-5 yra labai svarbus citokinas, kuris, veikdamas kaip signalinė molekulė, atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant imuninę sistemą, ypač esant alerginėms ir uždegiminėms reakcijoms. Jis, visų pirma, žinomas dėl savo vaidmens diferencijuojant, brandinant ir aktyvinant eozinofilus. IL-5 prisijungia prie savo receptorių eozinofilų paviršiuje ir inicijuoja signalizacijos kelius, dėl kurių aktyvinami eozinofilai. Pastebėta, kad sergantiesiems astma su diagnozuota nosies polipoze, padidėja sIL-5R α kiekis serume [130]. Šio tyrimo išvados rodo, kad sergant AA sIL-5R α kiekis yra reikšmingai didesnis nei SA, tačiau bronchų provokacija alergenu sIL-5R α kiekio sergant AA nekeičia. Tai rodo ilgalaikį IL-5 signalo perdavimą ir nuolatinį eozinofilinį uždegimą. Be to, sIL-5R α kiekis serume reikšmingai koreliuoja su F_{ENO} kiekiu, eozinofilų kiekiu kraujyje, bendro IgE kiekiu ir FEV₁. Dėl šios priežasties sIL-5R α kiekio serume matavimas gali turėti diagnostinės bei terapinės naudos [166]. Gerai žinomų astmos žymenų derinimas su sIL-5R α , kaip galimu biologiniu žymeniu, gali padidinti jo prognostinę vertę.

4.2.2. Kraujo oksidacinio streso biologinių žymenų (pentaksino 3 ir tioredoksino 1) kiekiai serume sergant alergine astma ir jų kitimas *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje

Oksidacinis stresas vaidina svarbų vaidmenį sergant astma. Įrodyta, kad oksidacinio streso biologiškai aktyvios medžiagos yra susiję su oksidacine žala ląstelėms ir kvėpavimo takų uždegimu [167]. Oksidacinio streso žymenų matavimas serume leidžia įvertinti oksidacinio streso įtaką ląstelėms ir ligos progresavimui. PTX3 yra tirpus receptorių, kuris atlieka svarbų vaidmenį imuniniuose atsakuose [168, 169]. Kalbant apie astmą, PTX3 reguliuoja kvėpavimo takų uždegimą, kvėpavimo takų remodeliavimo ir oksidacinio streso procesus, todėl jis yra potencialus astmos sunkumo biologinis žymuo ir taip pat gydymo taikinytis [170]. PTX3 kiekis skrepliuose buvo tiriamas tiek vaikų, tiek suaugusiųjų, sergančių astma, populiacijose. Nustatyta, kad PTX3 kiekis yra didesnis sergant astma, palyginti su SA [171, 172]. Tačiau trūksta PTX3 kiekio serume tyrimų. Šio tyrimo rezultatai parodė mažesnį PTX3 kiekį sergančiųjų AA serume, palyginti su SA. Be to, po bronchų provokacijos alergenu AA tiriamųjų grupėje PTX3 kiekis reikšmingai sumažėjo, palyginti su kiekiu prieš bronchų provokaciją alergenu. PTX3 kiekio serume sumažėjimas sergant AA gali būti nulemtas keletu priežasčių. PTX3 kiekis serume gali svyruoti, o tai atspindi uždegiminiuosius procesus, susijusius su šia kvėpavimo takų liga. Be to, PTX3 prisideda prie audinių atstatymo ir regeneracijos. Tai padeda moduluoti uždegiminį atsaką, kuris yra labai svarbus gydant pažeistus audinius. Taip pat nustatėme reikšmingą neigiamą koreliaciją tarp PTX3 kiekio ir eozinofilų kiekio kraujyje, o tai rodo, kad pacientams su dideliu eozinofilų kiekiu, PTX3 kiekis sumažėjo. Kaip imuninis moduliatorius, PTX3 gali turėti įtakos pakitusiam imuniniam atsakui sergant astma, o sumažėję PTX kiekiai gali rodyti imuninio profilio pasikeitimą kitų imuninių molekulių naudai.

TRX1 atlieka savo antioksidacinę funkciją mažindamas oksiduotų baltymų kiekį ir išlaikydamas jų aktyvią būseną. Kalbant apie astmą, yra daug įrodymų, patvirtinančių, kad TRX1 dalyvauja reguliuojant kvėpavimo takų uždegimą ir oksidacinį stresą. Tyrimai parodė pakitusią TRX1 geno raišką ir aktyvumą bronchų epitelio ląstelėse, kvėpavimo takų lygiųjų raumenų ląstelėse ir imuninėse ląstelėse sergant astma [173–175]. Pažymėtina, kad vieno tyrimo rezultatai parodė, kad sergančiųjų AA kraujo plazmoje TRX1 kiekis buvo reikšmingai didesnis nei SA [176, 177]. Šie rezultatai atskleidė, kad sisteminis oksidacinis stresas ir astmos metu esantis uždegimas yra susiję su padidėjusiu TRX1 išsiskyrimu į kraują. Be to, sergant astma, imuninė sistema per stipriai reaguoja į alergenus sukeldama uždegimą ir bronchų obstrukciją. TRX1 potencialiai moduluoja imuninių ląstelių funkciją, citokinų gamybą ir

bendrą imuninį atsaką kvėpavimo takuose, o tai gali turėti įtakos AA simptomų sunkumui ir trukmei. Šio tyrimo išvados pabrėžia TRX1 svarbą sergant AA. TRX1 kiekis serume AA tiriamųjų grupėje buvo reikšmingai didesnis nei SA grupėje, o tai rodo galimą ryšį tarp TRX1 ir AA. Šie rezultatai taip pat rodo, kad TRX1 gali turėti įtakos alerginėms reakcijoms ir gali būti šio astmos fenotipo biologiniu žymeniu. Be to, TRX1 kiekis AA grupėje reikšmingai padidėjo praėjus 24 valandoms po bronchų provokacijos alergenu. Tai rodo, kad alergeno poveikis sukelia atsaką, dėl kurio padidėja TRX1 gamyba arba išsiskyrimas į kraują. Tokie TRX1 kiekio serume pokyčiai gali rodyti oksidacinio streso ir uždegimo vaidmenį sergant astma, padedant gydytojams įvertinti ligos sunkumą ir atsaką į gydymą.

4.2.3. Užląstelinio užpildo apykaitos komponentų (matrikso metalo-proteinazės 7, 9, 10 ir I C telopeptido I tipo kolageno) kiekiai serume sergant alergine astma ir jų kitimas *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje

MMP yra proteolitinių fermentų šeima, dalyvaujanti remodeliuojant užląstelinio užpildo komponentus, tokius kaip kolagenas ir elastinas, o šie atlieka pagrindinį vaidmenį sergant astma [61]. MMP-7, MMP-9 ir MMP-10 yra svarbūs astmos patogenezėje, ypač kvėpavimo takų remodeliavimui ir užląstelinio užpildo pakitimams. Nors MMP-7 ir MMP-10 vaidmuo sergant astma vis dar tiriamas, tuo tarpu MMP-9 jau nustatytas ryšys su ligos sunkumu ir kvėpavimo takų remodeliavimo procesais [178]. Pagrindinis mūsų tyrimo pastebėjimas, kad MMP-7, MMP-9 ir MMP-10 kiekiai serume išliko panašūs abejose tirtose grupėse, o tai rodo, kad jos gali neturėti jokios prognostinės reikšmės sergant astma.

Be to, ištyrėme kolageno skilimo žymenį ICTP ir gavome įdomių rezultatų. Nors ICTP tiesiogiai nedalyvauja kvėpavimo takų remodeliacijoje, jis veikia kaip kolageno skilimo žymeklis, kuris yra pagrindinis kūno jungiamojo audinio komponentas, įskaitant kvėpavimo takų sienelės. Teoriškai padidėjęs kolageno skilimas prisideda prie kvėpavimo takų struktūros pokyčių. Ankstesniame tyrime buvo tiriamas ICTP kiekis sergančiųjų astma skrepliuose ir nustatyta, kad šių pacientų ICTP kiekis yra mažesnis nei SA [179]. Tačiau nebuvo tirta ICTP kiekis serume. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad sergančiųjų AA serume ICTP kiekis reikšmingai mažesnis nei SA. Sergant astma, kvėpavimo takų remodeliacija pasižymi padidėjusia užląstelinio užpildo baltymų gamyba [180]. Ši padidėjusi kvėpavimo takų audinių masė gali atsirasti dėl padidėjusios užląstelinio užpildo baltymų gamybos arba sumažėjusio jų skilimo [181]. Mažesnis ICTP kiekis, kurį nustatėme,

gali būti paaiškintas sumažėjusiu kolageno skaidymu kvėpavimo takų audinyje. Be to, ICTP kiekis reikšmingai koreliuoja su eozinofilų kiekiu kraujyje – didesnis eozinofilų kiekis kraujyje koreliuoja su sumažėjusiu ICTP kiekiu. ICTP kiekio serume ir eozinofilų skaičiaus derinimas gali suteikti vertingos prognostinės informacijos ne tik apie AA fenotipą, bet ir įvertinant ligos sunkumą bei kvėpavimo takų remodeliavimosi laipsnį.

Naujų biologinių žymenų nustatymas ir jų koreliacija su jau patvirtintais biologiniais žymenimis yra labai svarbu atpažįstant AA fenotipą. Šio tyrimo duomenimis, AA fenotipui atpažinti galėtų būti naudojami MET, sIL-5R α , PTX3, TRX1 ir ICTP. Šių biologiškai aktyvių medžiagų kiekiai serume gerokai skyrėsi nuo SA grupės. Be to, sIL-5R α parodė reikšmingą ryšį su jau patvirtintais astmos biologiniais žymenimis: Fe_{NO}, eozinofilų kiekiu kraujyje ir bendru IgE. Dėl šios priežasties sIL-5R α gali būti AA biologinis žymuo.

Kitos biologiškai aktyvios medžiagos, tokios kaip PTX3 ir ICTP, taip pat gali būti naudingos atpažįstant AA fenotipą. Būsiami tyrimai turėtų atskleisti šių biologinių žymenų dinamiką, įvertinti jų specifiškumą ir jautrumą didesnėje tiriamųjų populiacijoje, be to, įvertinti jų, kaip biologinių žymenų, potencialą ir prognostinę reikšmę.

4.3. Klinikinės remisijos kriterijai ir 2-o tipo uždegimo biologinių žymenų kiekio serume pokyčiai sergant sunkia eozinofiline astma ir 24 savaites gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5

4.3.1. Klinikinės remisijos kriterijai, plaučių funkcija ir naujų 2-o tipo biologinių žymenų kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5

IL-5 yra vienas iš svarbiausių citokinų 2-o tipo uždegimo patogenezėje. Šis citokinas dalyvauja pritraukiant ir aktyvuojant eozinofilus bei prailginant jų išgyvenamumą. IL-5 slopinimas veiksmingai mažina eozinofilų skaičių, eozinofilinį kvėpavimo takų uždegimą ir taip palengvina su astma susijusius simptomus [182].

Atliktas tyrimas parodė, kad monokloninis antikūnas prieš IL-5 mepolizumabas lemia ilgalaikį plaučių funkcijos pagerėjimą (padidėja FEV₁) ir eozinofilinio uždegimo susilpnėjimą (sumažėja eozinofilų kiekis kraujyje). Šis poveikis yra glaudžiai susijęs su mepolizumabo sąlygotu astmos kontrolės pagerėjimu. Tyrimo rezultatai atitinka kitų anksčiau atliktų tyrimų rezultatus [183–187]. Taip pat nustatėme, kad bendro IgE kiekis serume gydymo metu reikšmingai nepakito. Kadangi mepolizumabas blokuoja IL-5, gali neveikti kitų 2-o tipo uždegimo komponentų [188, 189]. Gydymo mepolizumabu metu Fe_{NO} kiekis taip pat reikšmingai nepakito ir tai atitinka kitų tyrimų

rezultatus, kurie neparodė F_{eNO} pokyčių gydymo metu [187, 190]; priešingai, buvo nustatyta, kad jo kiekis reikšmingai padidėja [191]. Skiriant gydymą monokloniniu antikūnu prieš IL-5 mepolizumabu, reikšmingai padidėjo pacientų surenkamų astmos kontrolės balų kiekis. Tai rodo, kad, nepaisant to, jog iki gydymo biologiniais vaistais pradžios pacientams skirtas standartinis gydymas pagal GINA rekomendacijas, pacientų liga buvo sunki.

Astmos remisija apibrėžiama kaip ilgalaikis simptomų nebuvimas ir plaučių funkcijos normalizavimas bei optimizavimas. Gydant biologiniais vaistais, pasiekiami keli astmos remisijos kriterijai [182]. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad po 24 savaičių gydymo mepolizumabu beveik du trečdaliai pacientų atitiko tris ar keturis astmos remisijos kriterijus. Taip pat įvertinome kiekvieną kriterijų atskirai prieš ir po 24 savaičių gydymo mepolizumabu. Nė vienas pacientas prieš gydymą mepolizumabu neatitiko šių kriterijų: be gliukokortikoidų, be paūmėjimų ir astmos kontrolės testas ≥ 20 balų. Po 24 savaičių gydymo mepolizumabu šie rezultatai reikšmingai pagerėjo. Daugelis anksčiau atliktų tyrimų parodė, kad mepolizumabas sumažina astmos paūmėjimų skaičių, pagerina plaučių funkciją ir astmos kontrolę bei sumažina geriamųjų gliukokortikoidų vartojimo dažnumą [147–149, 192]. Šio tyrimo rezultatai atitinka anksčiau paskelbtų tyrimų rezultatus. Teigiame, kad pacientai buvo tinkamai atrinkti ir gydymas mepolizumabu veiksmingai slopina 2-o tipo uždegimą.

4.3.2. Alarminų (interleukino 25, interleukino 33 ir užkrūčio liaukos stromos limfopoetino) kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5

Bronchų epitelis išskiria IL-25, IL-33 ir TSLP. Šie citokinai inicijuoja tarpląstelinio signalo perdavimą ir yra vadinami alarminais. Alarminai skatina IL-4, IL-5, IL-13 išsiskyrimą ir 2-o tipo uždegimo vystymąsi [75, 193]. Nors mepolizumabas blokuoja IL-5, šio tyrimo rezultatai rodo, kad 2-o tipo uždegimo slopinimas sumažino TSLP kiekį ir padidino IL-33 kiekį serume, o IL-25 kiekis nepasikeitė. Tai galime paaiškinti tuo, kad ne tik alarminai skatina citokinų išsiskyrimą, bet yra ir grįžtamasis ryšys – 2-o tipo citokinų poveikis epiteliui. Nors eozinofilai turi receptorius visiems trimis alarminams, vertinant jų pagrindines funkcijas, nustatyta, kad tik IL-25 ir IL-33 tiesiogiai veikia eozinofilus prisijungę prie eozinofilų IL-17RB ir ST2 receptorių [194–196]. TSLP daugiau dalyvauja alerginio uždegimo patogenezėje padėdamas formuoti imuninę aplinką ir netiesiogiai sukeldamas eozinofilų aktyvavimą ir pritraukimą veikiant kitiems citokinams, kuriuos gamina Th2 ląstelės [197]. Šio tyrimo išvados rodo sudėtingą kompensacinį atsaką citokinų tinkle.

Ne tik epitelio ląstelės gamina IL-25, bet ir eozinofilai yra svarbus šio alarmino šaltinis [198]. Pažymėtina, kad nors biologiniai vaistai mažina eozinofilų kiekį serume, IL-25 lygio sumažėjimo nepastebėta. Šis neatitikimas rodo, kad kiti ląstelių veiksniai, galbūt epitelis, gali kompensuoti sumažėjusią eozinofilinę IL-25 gamybą išlaikydami jo kiekį serume. Toks kompensacinis mechanizmas pabrėžia sudėtingą pusiausvyrą tarp eozinofilų aktyvumo ir citokinų gamybos, kai IL-33 lygis didėja galbūt kaip tiesioginis atsakas į sumažėjusį eozinofilų skaičių.

Be to, ši analizė apima TSLP, kurio vaidmuo skiriasi nuo IL-25 ir IL-33 pirmiausia tuo, kad TSLP aktyvuoja dendritines ląsteles, o ne eozinofilus. Eozinofilų skaičiaus sumažėjimas susilpnina dendritines ląsteles ir tokiu būdu gali sutrikdyti TSLP sukeltą aktyvacijos kelią. Šis pastebėjimas sutampa su diskusijomis apie kompensacinius imuninės sistemos mechanizmus, kai vieno citokino sumažėjimas dėl tikslinės terapijos nebūtinai sukelia tiesioginį susijusių uždegimo žymenų sumažėjimą dėl sudėtingų grįžtamųjų ryšių ir tarpusavio priklausomybės imuniniame tinkle.

4.3.3. Citokinų (interleukino 4, interleukino 5 ir interleukino 13) ir chemokino (eotaksino) kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5

IL-4 ir IL-13 yra vieni svarbiausių 2-o tipo uždegimo citokinų [199]. Pagrindiniai IL-4 ir IL-13 šaltiniai yra Th2 ir ILC2 ląstelės, o reikšmingą indėlį šių dviejų citokinų gamybai taip pat turi eozinofilai, bazofilai, putliosios ir kt. ląstelės [134]. Nors aprašyta, kad IL-4 svarbesnis AA atvejais, jis taip pat turi didelę reikšmę esant nealerginei astmai. Alarminų suaktyvintos ILC2 ir Th2 ląstelės lemia padidėjusį IL-4 kiekį [82]. IL-33 yra ypač svarbus alarminas, turintis įtakos IL-4 gamybai [200]. Atliekant šį tyrimą, nors gydymo mepolizumabu metu IL-33 kiekis serume padidėjo, vis dėlto nebuvo reikšmingo poveikio IL-4 kiekiui. Nepakitęs IL-4 kiekis serume gydymo metu rodo kompensacinius IL-4 mechanizmus.

IL-4 ir IL-13 veikia daugelį ląstelių, pvz., B ląsteles, eozinofilus, bazofilus, monocitus ir fibroblastus [199]. Abu citokinai tiesiogiai prisideda prie audinių uždegimo ir remodeliacijos. Be to, IL-4 ir IL-13 atlieka svarbų vaidmenį pritraukiant eozinofilus į uždegimo vietą. Abu citokinai sinergizuoja, kad sustiprintų alergines reakcijas. Skirtingai nei IL-4, IL-13 kiekis reikšmingai sumažėjo gydant mepolizumabu. Nors dauguma IL-4 gaminančių ląstelių gali gaminti ir IL-13, sumažėjęs eozinofilų skaičius buvo susijęs su IL-13 sumažėjimu, o tuo tarpu IL-4 kompensacinių mechanizmų nebuvo. Tai gali reikšti, kad IL-13 gamyba yra labiau susijusi su eozinofiliniu uždegimu,

nes tai yra pagrindinis citokinas, kurį gamina Th2 ir ILC2 ląstelės, tiesiogiai nukreiptos į eozinofilus [201].

Abu citokinai – IL-4 ir IL-13 – susiję su eozinofilų chemotaksės indukcija, skatina eotaksino gamybą [202]. Eotaksinas yra mažas baltymas, kurį sintetina daugybė skirtingų ląstelių tipų (epitelinės ląstelės, lygiųjų raumenų ląstelės, fibroblastai). Eotaksiną stimuliuoja IL-4 ir IL-13, kuriuos gamina Th2 ląstelės. Eotaksinas skatina eozinofilų pritraukimą iš kvėpavimo takų kraujagyslių į plaučių audinį [137]. Mes nustatėme, kad gydymo mepolizumabu metu eotaksino kiekis serume reikšmingai padidėjo [203]. Patys eozinofilai gali moduluoti chemokinių, įskaitant eotaksiną, gamybą tiesiogiai sąveikaudami su kitomis ląstelėmis arba per jų išskiriamus citokinus. Tokių reguliavimo funkcijų nebuvimas arba sumažėjimas gali sukelti per didelę eotaksino gamybą kitose imuninės sistemos ląstelėse, tokiose kaip epitelio, endotelio ląstelės ir fibroblastai. Be to, organizmas, atpažindamas sumažėjusį turimų eozinofilų skaičių, inicijuoja kompensacinį mechanizmą, kad pritrauktų daugiau eozinofilų į vietas, kur jų paprastai reikia. Kad tai pasiektų, organizmas padidina eotaksino, stipraus chemokino, atsakingo už eozinofilų pritraukimą, gamybą. Šis atsakas yra natūralus organizmo bandymas palaikyti homeostazę ir veiksmingai valdyti uždegiminiuosius procesus.

4.3.4. Tirpių receptorių (interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto ir didelio afiniteto imunoglobulino E receptoriaus) kiekio serume kitimas sergant sunkia eozinofiline astma ir gydant monokloniniu antikūnu prieš interleukiną 5

Ištyrėme dviejų tirpių receptorių – sIL-5R α ir sFc ϵ RI – kiekį kraujyje. IL-5R yra didelio afiniteto receptorių, ekspresuojamas ant eozinofilų, bazofilų ir putliųjų ląstelių [130]. Šis receptorių yra sudarytas iš dviejų subvienetų: IL-5R α ir β c. Nors sIL-5R α unikaliai sąveikauja su IL-5, β c subvienetas tiesiogiai su juo nesijungia, bet yra būtinas tolesniems signalizacijos procesams [204]. sIL-5R α gali veikti kaip receptorių (prisijungti prie IL-5) ir keisti biologinį IL-5 poveikį (daryti įtaką imuniniam atsakui). Mes nustatėme, kad gydymo mepolizumabu metu sIL-5R α kiekis serume reikšmingai sumažėjo. Tai galima paaiškinti tuo, kad po gydymo mepolizumabu organizmas gali norėti išlaikyti likusį IL-5 lygį, o sIL-5R α į kraują neišsiskiria.

Taip pat ištyrėme sFc ϵ RI, kuris yra ekspresuojamas daugelio ląstelių, kiekį serume. Eozinofilas taip pat laikomas ląstele, ekspresuojančia šį receptorių [205, 206]. Sutrumpinta IgE surišančio α subvieneto versija randama kaip tirpi izoforma serume [207]. sFc ϵ RI serume paprastai randamas dviem pagrindinėmis formomis: laisva forma ir kompleksine forma, kur jis yra

susijęs su IgE. Nors sFcεRI pirmiausia ekspresuoja imuninės ląstelės, tokios kaip putliosios ląstelės ir bazofilai, eozinofilai taip pat yra galimas tirpių receptorių šaltinis, ypač esant pataloginėms būklėms, tokioms kaip astma, kuomet yra padidėjęs eozinofilų aktyvumas. Šio tyrimo išvados rodo, kad gydymas mepolizumabu sumažina cirkuliuojančio sFcεRI kiekį. Šį sumažėjimą galima paaiškinti keliais mechanizmais: pirma, eozinofilų skaičiaus sumažėjimas gali tiesiogiai sumažinti sFcεRI gamybą, antra, IL-5 aktyvumo sumažėjimas gali lemti imuninės sistemos aktyvacijos sumažėjimą, įskaitant kelius, susijusius su sFcεRI gamyba arba išsiskyrimu iš ląstelės paviršiaus. Be to, esant mažiau eozinofilų ir sumažėjus IgE receptorių, receptoriai gali mažiau skilti ir išsiskirti į tirpią formą [208].

IŠVADOS

1. Eozinofilopoetiniai interleukinas 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys, bet ne interleukinas 3, skatina abiejų eozinofilų potipių (į plaučių rezidentinius ir uždegiminius eozinofilus panašių ląstelių), išskirtų iš sergančiųjų 2-o tipo astma kraujo, proliferacinį aktyvumą bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms *in vitro* lyginant su sveikais asmenimis. Abiejų eozinofilų potipių proliferacinis aktyvumas siejamas su eozinofilų paviršiaus interleukino 5 receptoriaus geno raiška. Be to, į plaučių rezidentinius eozinofilus panašių ląstelių proliferacinis aktyvumas dar labiau sustiprėjo *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje lyginant su proliferaciniu aktyvumu nesant alergeno.
2. Biologinių žymenų analizė atskleidė:
 - Tirozin-proteinkinazės Met, pentaksino 3 ir I C telopeptido I tipo kolageno kiekis serume yra mažesnis sergančiųjų alergine astma nei sveikų asmenų. Be to *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje tirozin-proteinkinazės Met ir pentaksino 3 kiekis dar labiau sumažėjo.
 - Tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto ir tioredoksino 1 kiekis serume yra didesnis sergančiųjų alergine astma nei sveikų asmenų. Be to *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno poveikyje tioredoksino 1 kiekis dar labiau padidėjo.
 - Autotaksino ir matrikso metaloproteinazių 7, 9 bei 10 kiekiai serume tarp sergančiųjų alergine astma ir sveikų asmenų reikšmingai nesiskyrė.
 - Tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto kiekis serume teigiamai susijęs su žinomais 2-o tipo astmos biologiniais žymenimis (azoto monoksido kiekiu iškvepiamame ore, kraujo eozinofilų kiekiu, bendro imunoglobulino E kiekiu) ir tai rodo galimą šio biologinio žymens vaidmenį alerginės kilmės uždegime.
3. Interleukino 5 blokavimas sergant sunkia eozinofiline astma sumažina interleukino 13, užkrūčio liaukos stromos limfopoetino, tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto, tirpaus didelio afiniteto imunoglobulino E receptoriaus kiekius serume ir padidina klinikinės remisijos kriterijų pasiekiamumą.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Šis tyrimas papildė žinias apie astmos patogenezę. Tyrimo metu nustatyta, kad eozinofilopoetiniai interleukinas 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys stiprina abiejų eozinofilų potipių proliferacinį aktyvumą bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms. Dėl šios priežasties interleukino 5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio poveikio slopinimas gali sumažinti bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją, tuo pačiu ir kvėpavimo takų remodeliaciją, sergant 2-o tipo astma. Sergančiųjų alergine astma serume tirozin-proteinkinazės Met, pentaksino 3, tioredoksino 1, I C telopeptido I tipo kolageno, o ypač tirpaus interleukino 5 receptoriaus alfa subvieneto kiekiai skiriasi nuo sveikų asmenų. Vertinant tai, šie biologiniai žymenys gali būti pasirenkami nustatant uždegimo tipą klinikinėje praktikoje ir parenkant individualizuotą gydymą. Tyrimas atskleidė, kad interleukino 5 blokavimas turi įtakos ne tik interleukino 5, bet ir kitų 2-o tipo uždegimo citokinų pusiausvyrai. Tai gali būti svarbu parenkant biologinį vaistą sunkiai eozinofilinei astmai gydyti.

SUMMARY IN ENGLISH

ABBREVIATIONS

AA	–	allergic asthma
ASM	–	airway smooth muscle
ATX	–	autotaxin
BAC	–	bronchial allergen challenge
BMI	–	body mass index
ELISA	–	enzyme-linked immunosorbent assay
FeNO	–	fractional exhaled nitric oxide
FEV ₁	–	forced expiratory volume in 1 second
GM-CSF	–	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GM-CSFR	–	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor
HS	–	healthy subjects
ICTP	–	I C-telopeptide of type I collagen
iEOS-like	–	inflammatory-like eosinophil
Ig	–	immunoglobulin
IL	–	interleukin
IL-3R	–	interleukin 3 receptor
IL-5R	–	interleukin 5 receptor
Lp-PLA2	–	lipoprotein-associated phospholipase A2
MMP	–	matrix metalloproteinase
p	–	significance value
PTX3	–	pentraxin 3
rEOS-like	–	lung resident-like eosinophil
SEA	–	severe eosinophilic asthma
sFcεRI	–	soluble high-affinity IgE receptor
SNEA	–	severe non-allergic eosinophilic asthma
Th2	–	T helper cells type 2
TRX1	–	thioredoxin 1
TSLP	–	thymic stromal lymphopoietin

INTRODUCTION

Asthma ranks among the most prevalent chronic diseases worldwide [1]. It is more commonly diagnosed in boys during childhood, while women are more frequently affected in adulthood [2]. Asthma symptoms often manifest early in life and are initially non-specific, commonly associated with viral respiratory infections [3]. Typical symptoms include shortness of breath, coughing, wheezing, and chest tightness, all stemming from chronic inflammation of the airways [4–6]. Risk factors for adult-onset asthma include prematurity, early lung infections, rhinitis, smoking, and obesity [6].

Airway inflammation is considered one of the essential pathophysiological mechanisms associated with asthma pathogenesis and leading to

structural changes in the airway, described as remodelling [7]. Although standard treatments can generally control asthma symptoms, it is not always possible to control the course of the disease [8]. Approximately 5–10% of patients suffer from severe, uncontrolled asthma, which increases mortality, hospitalisations, reduces quality of life, and raises healthcare costs [9, 10]. The primary risk factors for severe asthma are genetic predisposition and environmental factors that modulate immune responses [8].

Asthma is a more complex disease than previously thought, as it is heterogeneous [11]. This realisation prompted research into asthma pathogenesis, the characteristics of airway inflammation, and clinical course. This led to the introduction of phenotype and endotype concepts more than 10 years ago [12]. Based on clinical manifestations, allergic, non-allergic, obese asthma, asthma with persistent bronchial obstruction, and neutrophilic asthma are distinguished [3, 13], while based on the predominant pathogenic mechanism and cytokines involved in inflammation, type 2 and non-type 2 asthma have been identified [14, 15]. The identification of asthma phenotypes is highly precise, considering factors such as sex, age, allergies, family history of diseases, age at asthma diagnosis (childhood or adulthood), response to inhaled corticosteroid treatment, etc. The most common asthma phenotypes are allergic asthma (AA) and non-allergic asthma [16]. In contrast, asthma endotype identification is more complex, requiring an understanding of asthma pathogenesis. About half of asthma patients exhibit type 2 inflammation, characterised by T helper 2 (Th2) lymphocytes [17].

Biological markers aid in identifying both asthma phenotype and endotype [18]. Asthma is most commonly associated with type 2 inflammation [19], hence the use of type 2 inflammation biological markers [18]. Currently approved biological markers include: blood and sputum eosinophil counts, total immunoglobulin (Ig) E levels in blood, exhaled nitric oxide (F_{ENO}) levels, and periostin [20]. One of the main biological markers is the eosinophil count. This is the most researched and widely used biological marker in both scientific research and clinical practice [21]. Unfortunately, none of the mentioned biological markers are ideal and all have their drawbacks [22]. The aim is for biological markers to be informative, easily measurable, and cost-effective [23]. For this reason, new biological markers associated with type 2 inflammation pathogenesis are being sought [13]. It is believed that biologically active substances involved in asthma pathogenesis are potential new biological markers [24].

Understanding the pathogenesis of asthma is important in selecting the best individualized asthma treatment [25]. Approximately half of asthma patients exhibit eosinophil-associated inflammation [11]. Typically, these cells are relatively few in the blood – about 1% of all leukocytes – and in the

airway – < 3% of all cells found in sputum. Despite their small numbers in both blood and the airway, eosinophils are considered one of the most important cells in asthma [26–28]. An increase in the number of these cells in both blood and the airway is associated with increased bronchial sensitivity, airway inflammation, and airflow limitation (obstruction). All of these contribute to asthma symptoms, more frequent exacerbations, and a more severe disease course [11, 27]. The impact of eosinophils on airway remodelling in asthma depends not only on their infiltration into the airway but also on their survival, as this prolongs the impact of eosinophils on lung structural cells [29]. Two types of eosinophils are identified in the lungs: inflammatory and resident. Similar eosinophils can also be found in the blood: these cells include lung resident-like eosinophil cells (rEOS-like) and inflammatory-like eosinophil cells (iEOS-like). These cells differ in their roles in asthma pathogenesis [30]: iEOS-like participate in the inflammatory response, while rEOS-like maintains tissue homeostasis [31]. Cytokines such as interleukin (IL) 3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), known as eosinopoietins, promote the level of eosinophils in the blood and lungs, their survival, maturation, and activation. Activated eosinophils release biologically active substances that exhibit proliferative activity on airway smooth muscle (ASM) cells [32], thereby promoting the proliferation of these cells and changes in bronchial structure [29]. Additionally, cytokine receptors are expressed on the surface of eosinophils, including IL-3, IL-5, and GM-CSF receptors [33]. Eosinophilopoietins can enhance the expression of their receptors (interleukin 3 receptor (IL-3R), interleukin 5 receptor (IL-5R) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor (GM-CSFR)) and thus intensify signal transmission to eosinophils, prolong their survival, increase their activity and enhance their inflammatory response [34]. The impact of eosinophilopoietins on eosinophils depends not only on the quantity of these cytokines but also on the quantity of their receptors on the surface of eosinophils [35]. Meanwhile, the effect of eosinophilopoietins on different eosinophil subtypes remains unknown.

Asthma treatment aims to control symptoms, reduce exacerbations, minimise treatment-related side effects, and lower mortality risk [36]. In the treatment of asthma, the term clinical remission is increasingly used [37]. This signifies a high level of disease control, including absence of asthma symptoms, absence of exacerbations, reduced systemic corticosteroid need for exacerbation treatment, and optimal lung function [38]. Previously, asthma was understood as a uniform disease, and all patients were prescribed the same treatment based on inhaled corticosteroids [39]. This treatment adequately controls asthma symptoms for the majority of patients [40], but some

continue to experience persistent asthma symptoms, severe disease progression, and recurring exacerbations requiring oral corticosteroids [27]. Understanding of asthma pathogenesis began to change two decades ago. At that time, more knowledge emerged about type 2 inflammation and biological markers that can help identify this inflammation. All of this has prompted interest in treatment options, conducting clinical trials with monoclonal antibodies targeting type 2 inflammation cytokines and their receptors [41]. Studies have shown that asthma treatment can be more effective when individualized based on clinical characteristics, predominant pathogenic pathway, and involved cytokines [42].

Given the predominance of type 2 inflammation in asthma patients, continued investigation into its pathogenesis is warranted, including evaluating eosinophil subtype proliferative activity. Additionally, new biological markers are needed to tailor asthma treatments and predict disease progression.

The aim

To investigate the proliferative activity of eosinophil subtypes and immune response characteristics in type 2 asthma.

Objectives

1. To evaluate the effect of eosinophilopoietins (interleukin 3, interleukin 5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) on the proliferative activity of eosinophil subtypes in patients with type 2 asthma and healthy individuals *in vitro*.
2. To determine the level of biological markers of chronic inflammation, oxidative stress, and level of extracellular matrix metabolism products in allergic asthma, compared to healthy individuals, and their change in allergen exposure.
3. To assess the change in serum levels of type 2 biomarkers (cytokines, alarmins, chemokines, soluble receptors) and clinical remission criteria by blocking interleukin 5 with a monoclonal antibody in patients with severe eosinophilic asthma over 24 weeks.

Research novelty

- No studies have been conducted on eosinophilopetins-activated eosinophils, and their subtypes effect on ASM cells proliferation in asthma.
- Many potential biomarkers have been investigated, but only a few are used in clinical practice. Our study was based on circulating biologically active substances involved in the pathogenesis of type 2 inflammation as potential serum biomarkers: chronic inflammation-related substances, blood oxidative stress indicators, and matrix metalloproteinases (MMPs) and I C-telopeptide of type I collagen (ICTP) degradation products.
- Blocking IL-5 with monoclonal antibody mepolizumab may alter the balance of other type 2 inflammation biological markers in severe eosinophilic asthma (SEA).

STUDY DESIGN AND METHODS

The research protocol was approved by the Regional Biomedical Research Ethics Committee of the Lithuanian University of Health Sciences (BE-2-13; BE-2-58). The study was registered in the U.S. National Institutes of Health trial registry ClinicalTrials.gov with identifier NCT04542902.

A study was carried out in the Department of Pulmonology at the Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos (Kauno klinikos). The study was prospective and lasted from September 2019 until August 2023. All asthma patients were examined and/or treated at the Kauno klinikos Pulmonology Clinic. Healthy individuals were volunteers.

One-hundred subjects were included in the study, of which 37 had AA, 36 had SEA, as well as 27 healthy subjects (HS) who met the inclusion criteria. For the first study objective, 46 subjects were studied – 18 patients with severe non-allergic eosinophilic asthma (SNEA), 17 AA and 11 HS. For the second objective, 36 subjects were studied – 20 patients with AA and 16 HS were investigated. For the third objective, 18 patients with SEA were investigated. The subjects did not repeat for different objectives.

Ample time was provided for all aforementioned subjects to be introduced to all aspects of the study, and sufficient time to become acquainted with the provided study protocol, after which all questions the participants had were addressed. The investigation began following the protocol being signed by each participant.

Table 1. The inclusion and exclusion criteria

	AA	SEA	HS
Inclusion criteria			
Age, 18–80 years	✓	✓	✓
Patients who have signed the informed consent	✓	✓	✓
Non severe course of the disease and inhaled steroids free period of at least 1 month	✓		
Positive methacholine challenge or bronchial reversibility test	✓		
Positive skin prick test for at least <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> allergen	✓		
SEA and ≥ 1 year treated with high doses of inhaled steroids + long-acting beta-agonist		✓	
In the 12 months before the screening visit ≥ 2 exacerbations of asthma that required treatment with oral steroids		✓	
Peripheral blood eosinophil $\geq 0.3 \times 10^9/L$		✓	
No symptoms of respiratory disease			✓
All skin prick tests negative			✓
Exclusion criteria			
Smoker	✓	✓	✓
Pregnancy, breastfeeding	✓	✓	✓
Other chronic airway diseases	✓	✓	✓
Other clinically significant non-controlled disease	✓	✓	✓
Active airway infection ≤ 1 months prior to study	✓	✓	✓
Asthma exacerbation ≤ 1 months prior to study	✓	✓	
Use of oral steroids	✓	✓	

AA – allergic asthma; HS – healthy subjects; SEA – severe eosinophilic asthma.

After the approval of the inclusion or exclusion criterion, all valid participants were invited to the study no later than the following four weeks. After arriving at the hospital, participants were required to stay for thirty minutes to a maximum of two hours. Depending on the specified study group, between one and five visits were scheduled for study participants. The study course and the tests executed during the visits are presented in Fig. 1–3.

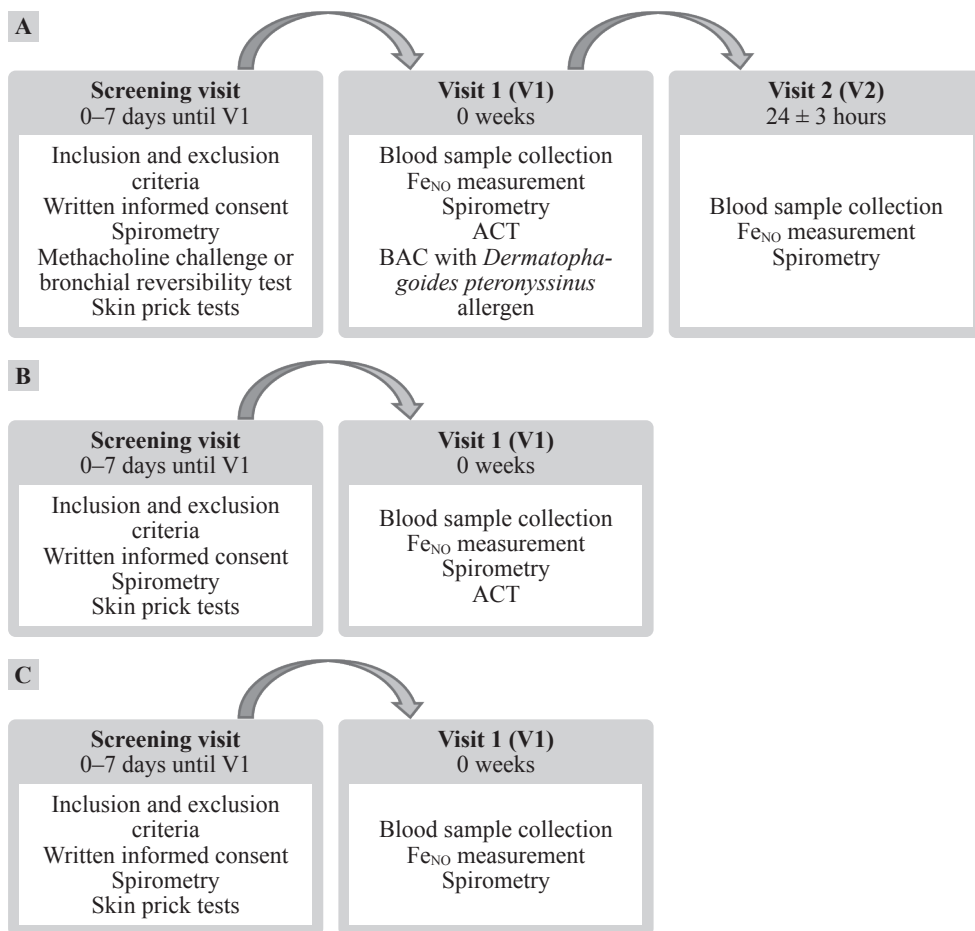


Fig. 1. Research design for the first study objective:
A – allergic asthma group, **B** – severe non-allergic eosinophilic asthma group, **C** – healthy subjects group

ACT – asthma control test; BAC – bronchial allergen challenge; Fe_{NO} – fractional exhaled nitric oxide.

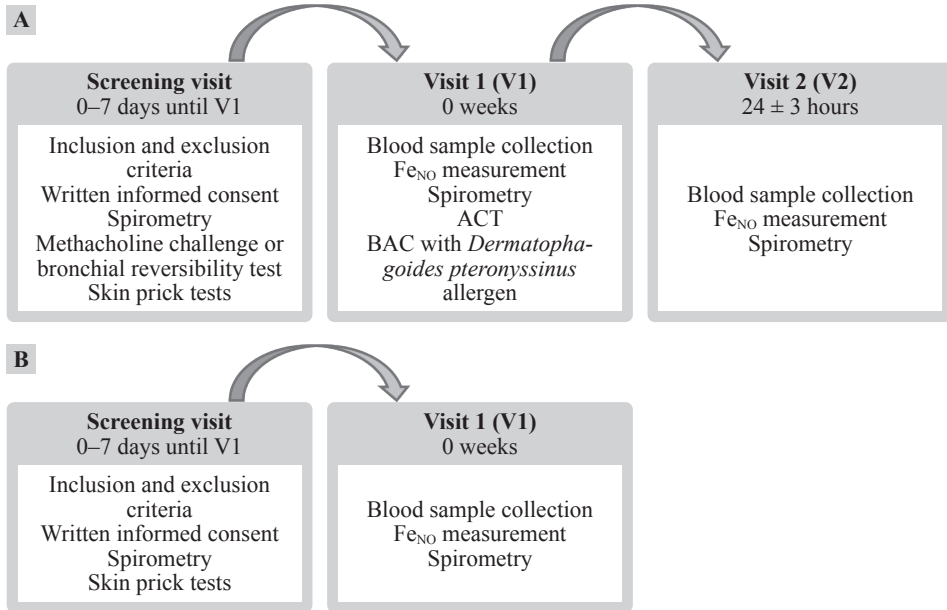


Fig. 2. Research design for the second study objective:
A – allergic asthma group, **B** – healthy subjects group

ACT – asthma control test; BAC – bronchial allergen challenge; FeNO – fractional exhaled nitric oxide.

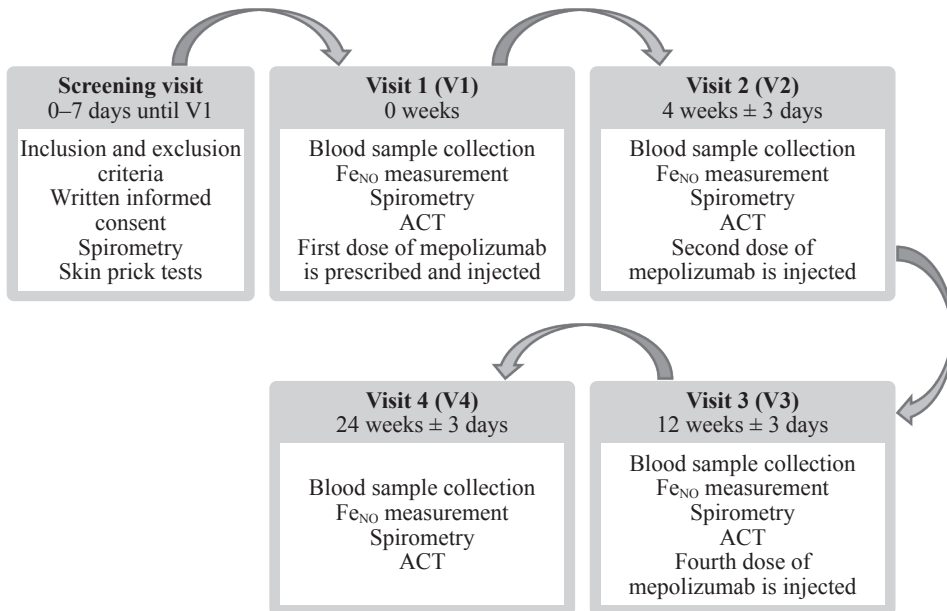


Fig. 3. Research design for the third study objective
 (severe eosinophilic asthma)

ACT – asthma control test; FeNO – fractional exhaled nitric oxide.

Asthma control test

Various questionnaires, including the asthma control test, are used to assess asthma control. It is a simple, easy-to-understand, quick-to-complete test consisting of 5 questions with 5 possible answers for each question. The maximum score of this test is 25 points; the minimum is 5 points. A score of ≥ 20 points means that asthma is well controlled, 16–19 points partly controlled, and ≤ 15 uncontrolled.

Pulmonary function tests

- **Spirometry.** This test was performed to assess lung function. Spirometry testing was carried out for each participant for a minimum of three times. An ultrasonic spirometer was utilized for lung function testing (Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany).
- **Bronchial reversibility test.** This test was performed to evaluate the reversibility of bronchial obstruction. The bronchial reversibility test was utilized for participants with bronchial obstruction in the AA group. This test was performed using a Ganshorn spirometer (Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany) in which airflow limitations were framed during the screening visit.
- **Methacholine challenge test.** Bronchial inhalation provocation with methacholine was performed to assess bronchial hyperreactivity. The methacholine challenge test was provided for the subjects in the AA group, who did not show airflow limitations during the initial screening visit. A dosimeter (ProvoX; Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany) was used for the inhalation of methacholine.
- **Bronchial allergen challenge (BAC) with *Dermatophagoides pteronyssinus*.** The BAC using the *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen (DIATER, Madrid, Spain) was performed for all subjects within the AA group in which a dosimeter (ProvoX; Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany) was used for allergen inhalation.
- **F_{ENO} test.** This test was performed to determine type 2 airway inflammation and assess its intensity. F_{ENO} test was provided for all study participants in all predetermined groups. The F_{ENO} levels were recorded twice for the participants in the AA group; an initial level and another in the following twenty-four hours using the BAC with the *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. F_{ENO} was measured by a handheld Vivatmo-me device (Bosch Healthcare Solutions, Waiblingen, Germany).

- **Skin prick testing.** The subjects' sensitization to allergens was evaluated by performing skin prick samples with *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, dog and cat dander, five mixed grass pollens, birch pollen, mugwort, *Alternaria*, *Aspergillus*, and *Cladosporium* was performed for all study subjects. This testing was performed using standardized allergen extracts (Stallergenes, S.A., Antony, France).

Blood tests

- **Blood collection and baseline assessment.** Approximately 20-50 ml of blood (depending on the test visit) were drawn for all participants into vacutainers which contained dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid (K2EDTA) (BD Vacutainer®; Becton Dickinson UK Ltd., Wokingham, UK). Samples of the routine clinical chemistry assay were directly transported to the in-hospital Department of Laboratory Medicine laboratory. For the complete blood count test, the XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan) and UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System automated hematology analyzer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) were employed. For the total IgE level test, the AIA-2000 automated immunoassay analyzer (Tosoh Bioscience, South San Francisco, CA, USA) was employed.
- **Peripheral blood cell analysis.** Samples of the blood cell analysis were directly transported to the in-hospital Department of Pulmonology laboratory. Ficoll centrifugation was used for the isolation of erythrocytes and granulocytes. Eosinophils were separated using magnetic separation methods. The phenotyping of eosinophils was based on magnetic bead-conjugated antibodies against L-selectin.
- **Eosinophil activation.** Isolated eosinophil subtypes transferred into separate Eppendorf® vacutainer tubes with different eosinophilopoetins: IL-3, IL-5, or GM-CSF (all three eosinophilopoetins were used at 10 ng/mL). Six vacutainers were prepared and adjusted the volume to 500 µL using DMEM cell culture. The samples were incubated in a thermostat for three hours and then centrifugated for 10 minutes at a speed of 400 g. After centrifugation, the supernatant was decanted into another container. Resuspension of the remaining eosinophils was done with DMEM cell culture and poured onto ASM cells.

- **ASM cell proliferation assay.** From one donor, healthy human ASM cells were isolated. Combined cell cultures within isolated and affected eosinophilopoietins blood eosinophil subtypes and ASM cells were collected from each study individual and prepared using 0.5×10^5 viable eosinophils and 2×10^5 ASM cells which were then grown for three days for all samples. ASM cell proliferation was assessed using Alamar blue assay.
- **Gene expression assessment.** To evaluate the expression of eosinophilopoietin receptor genes, RNA was isolated from blood eosinophil subtypes, and a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction was performed. The expression levels of IL-3, IL-5, and GM-CSF genes were determined for both eosinophil subtypes by qPCR using the commercial Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Evaluation of the gene expression changes was dependent on fold change between different eosinophil subtypes within the same group and of the same eosinophil subtypes between the differing groups.
- **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** This test was used to measure the amount of many biologically active substances in serum. A lower limit of detection was identified for ICTP – 50 pg/mL; autotaxin (ATX) – 33 pg/mL; sIL-5R α – 0.15 ng/mL; MMP-10 – 3 pg/mL; and thioredoxin 1 (TRX1) – 0.2 ng/mL, IL-4 – 1.3 pg/mL, IL-5 – 1.45 pg/mL, IL-13 – 0.7 pg/mL, IL-25 – 0.4 ng/mL, IL-33 – 0.9 pg/mL, thymic stromal lymphopoietin (TSLP) – 3 pg/mL, soluble high-affinity IgE receptor (sFc ϵ RI) – 68 pg/mL. 96-well plates precoated with primary antibodies against investigated proteins were used for the assay. After a sufficient period of incubation with blood serum or sample standards, the bound analyte was then allowed to associate with biotinylated detection antibodies. A streptavidin-HRP (SPP) conjugate was added to the antibody-antigen-antibody complex. Chromogenic substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was used to produce a blue-coloured product with an intensity in relation to the amount of analyte in the sample. A sulphuric acid solution was added to stop the enzymatic reaction, and optical density (OD) was read at 450 nm wavelength (540 nm for wavelength correction) by means of using a microplate spectrophotometer (Biotek Epoch™, Vermont, USA).
- **Luminex assay.** This test was used to measure serum levels of biomarkers. A lower limit of detection was identified for MET – 14.65 pg/mL; MMP-7 – 5.18 pg/mL; MMP-9 – 0.87 pg/mL; and

pentraxin 3 (PTX3) – 42 pg/mL. Serum samples were added to a mixture of color-coded beads which were pre-coated with analyte-specific capture antibodies. Afterward, biotinylated detection antibodies specific to the analytes of interest were added and formed an antibody–antigen sandwich. The plates were then analyzed using a Luminex® 100 analyzer (Luminex Corporation, USA). The concentration values were acquired from the mean fluorescent intensity. Standard curves were generated from the reference cytokine gradient concentrations; the concentrations of these cytokines in serum samples were then calculated from the standard curves. For technical reasons, several biologically active substance levels were below the sensitivity range; therefore, these results were then treated as zero values.

Prescribing a biological drug

In the implementation of the third task of the dissertation, the biological drug mepolizumab was prescribed in addition to the already-used asthma treatment for patients with SEA. This drug was administered as a solution for injection in a pre-filled pen (1 mL, 100 mg mepolizumab) every 4 weeks during the 24-week study. Each time, the drug is injected under the skin by a specially trained general practice nurse. After the first injection of the drug, the subject's 1 hour time was monitored in the treatment facility for possible side effects.

Statistical analysis

Using SPSS statistical software (IBM SPSS Statistics 20; Chicago, IL, USA) statistical analyses were performed. Both descriptive and analytical statistical methods were used. The study's sample size was calculated using the Schwarze formula. The minimum number of subjects needed to draw statistically significant conclusions is 70 with asthma and 23 HS. The Shapiro–Wilk test was utilized for the assumption of normality in data distribution. As the data distribution did not pass the normality test, the difference between two independent groups with low numbers of individuals was assessed in each group in which a nonparametric Mann–Whitney two-sided U-test was used. Nonparametric Wilcoxon matched-pair, signed-rank, two-sided test was used with an employed pairs test to evaluate the difference between two dependent samples. Spearman's rank correlation coefficient was used to estimate correlations between two sets of data. The statistically significant difference minimal limit for values was $p < 0.05$.

Research funding

The study was funded by the Research Council of Lithuania (Nr. S-MIP-21-17), the Future Biomedicine Foundation (Nr. 2017), and the Science Foundation of the Lithuanian University of Health Sciences.

PhD candidate's contributions to the study

1. Idea generation, participation in creating design and methodology;
2. Completing documentation for obtaining bioethics permits;
3. Conducting diagnostic tests for the selection of subjects and analyzing the results;
4. Collection and analysis of clinical and demographic data;
5. Creation of a patient database and statistical data analysis;
6. Preparation and presentation of seven scientific theses;
7. Preparation and submitting three publications.

RESULTS

Effect of eosinophilopoietins on the proliferative properties of eosinophil subtypes

Forty-six adults were included in the study, in which eighteen were SNEA patients, seventeen steroid-free non-severe AA patients, and eleven HS. Demographic and clinical characteristics of the study population are provided in Table 2. It was noted that the SNEA patients were significantly older than the AA and HS groups which is congruent with patients with SNEA as it usually manifests as a late-onset disease. A higher body mass index (BMI) value was recorded for SNEA patients in comparison to AA and HS. A significant decrease in forced expiratory volume in one second (FEV₁) was observed only in SNEA patients. The blood eosinophil counts were higher in SNEA and AA patients than HS, with a higher count in the former SNEA group. No differences in FeNO levels were found in either asthma groups. The serum total IgE levels were higher in SNEA and AA patients than HS, with the highest levels shown in the AA group.

Table 2. Demographic and clinical characteristics of the study population

	SNEA	AA	HS
Number, n	18	17	11
Sex, M/F	4/14	12/5	3/8
Age, years	57.8 ± 2.4 **	28.1 ± 2.4	31.4 ± 3.2
BMI, kg/m ²	29.9 ± 1.6 **	24.0 ± 0.9	25.3 ± 1.2
FEV ₁ , L	1.6 ± 0.1 **	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2
FEV ₁ , % of predicted	58.9 ± 4.7 **	86.8 ± 2.4 #	99.1 ± 3.5
PD _{20M} , mean (range), mg	ND	0.22 ± 0.34	ND
PD _{20A} , mean (range), HEP/mL	ND	14.12 ± 1.92	ND
Blood eosinophil count, × 10 ⁹ /L	0.63 ± 0.09 **	0.39 ± 0.05 #§	0.17 ± 0.02
Blood eosinophil count 24 h after allergen challenge, × 10 ⁹ /L	ND	0.51 ± 0.06	ND
FeNO, ppb	49.1 ± 8.3 #	51.6 ± 8.9 #§	10.8 ± 1.9
FeNO, 24 h after allergen challenge, ppb	ND	78.2 ± 12.6	ND
Total IgE, IU/mL	158.8 ± 45.2 **	837.3 ± 316.7 #	18.2 ± 5.0
Total IgE, 24 h after allergen challenge, IU/mL	ND	861.1 ± 323.1	ND

AA – allergic asthma; BMI – body mass index; F – female; FeNO – fractional exhaled nitric oxide; FEV₁ – forced expiratory volume in 1s; HS – healthy subjects; IgE – immunoglobulin E; M – male; ND – not done; PD_{20A} – the *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen provocation dose causing a 20% decrease in FEV₁; PD_{20M} – the provocation dose of methacholine causing a 20% decrease in FEV₁; SNEA – severe non-allergic eosinophilic asthma. Data presented as mean ± standard error of the mean. *p < 0.05 comparing with AA group. #p < 0.05 comparing with HS group. §p < 0.05 comparing with AA group after allergen challenge.

IL-3 did not affect the proliferative properties of any eosinophil subtypes in the SNEA group; however, IL-5 and GM-CSF significantly enhanced the effect on the proliferative properties of iEOS-like and rEOS-like cells. For those in the AA group, IL-5 and GM-CSF significantly enhanced the effect of iEOS-like and rEOS-like cells on ASM cell proliferation. Also, it was noted that IL-3 had no significant impact on any eosinophil subtypes. For those in the HS group, IL-5 had a significant effect on the proliferative properties of iEOS-like cells. At the same time, IL-3 and GM-CSF had no significant impact on any eosinophil subtypes.

The effect of IL-5 on the proliferative properties of iEOS-like cells in was higher the SNEA group than in the AA group. It was also noted in the meantime that the effect of GM-CSF on the proliferative properties of rEOS-like cells was higher in comparison to the AA group.

It was noted that the effect of IL-3 and GM-CSF on the proliferative properties of iEOS-like cell was higher in the AA group than the HS group, while the effect of IL-3, IL-5, and GM-CSF on the proliferative properties of rEOS-like cells was higher in the AA group when compared to the HS group. The effect of IL-3, IL-5, and GM-CSF on the proliferative properties of both eosinophil subtypes was higher in the SNEA group than the HS group (Table 3, Fig. 4).

Table 3. Effect of eosinophilopoetins on proliferative properties of blood eosinophil subtypes (changes of reduced Alamar blue reagent % over control)

	SNEA		AA		HS	
	iEOS-like	rEOS-like	iEOS-like	rEOS-like	iEOS-like	rEOS-like
Non-activated eosinophils	21.1 ± 1.4 * # §	34.7 ± 3.1 # §	10.6 ± 1.7 * §	22.2 ± 3.0 §	5.1 ± 0.6 *	12.1 ± 1.9
IL-3	26.6 ± 1.8 §	32.1 ± 3.8 §	19.6 ± 3.6	29.3 ± 4.9 §	9.4 ± 2.1	9.3 ± 1.6
IL-5	47.6 ± 6.5 §	48.0 ± 5.8 §	26.6 ± 4.0 §	38.3 ± 1.6 §	18.6 ± 2.9	13.4 ± 1.0
GM-CSF	51.2 ± 7.3 # §	62.4 ± 4.5 # §	34.8 ± 4.3 §	35.1 ± 3.7 §	7.4 ± 1.9	12.0 ± 2.7

AA – allergic asthma; HS – healthy subjects; iEOS-like – inflammatory-like eosinophils; IL – interleukin; GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; rEOS-like – lung resident-like eosinophils; SNEA – severe non-allergic eosinophilic asthma. SNEA group n = 10, AA group n = 9, HS group n = 8. Data presented as the mean ± standard error of the mean. *p < 0.05 compared with appropriate rEOS-like cells in the same group. #p < 0.05 compared with appropriate eosinophil subtypes from AA group. §p < 0.005 compared with appropriate eosinophil subtypes from HS group. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

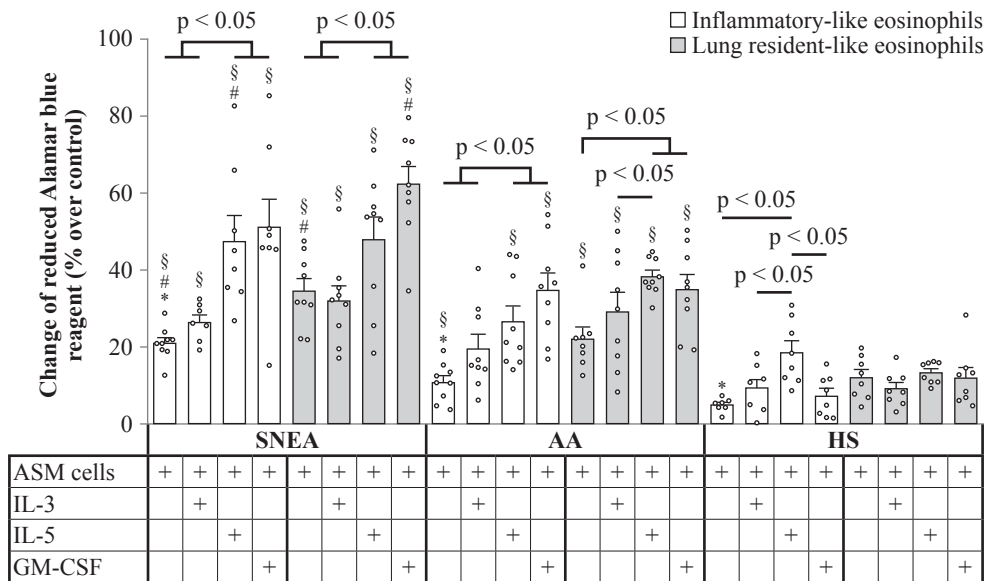


Fig. 4. Effect of eosinophilopoetins on proliferative properties of blood eosinophil subtypes

AA – allergic asthma; ASM – airway smooth muscle; HS – healthy subjects; IL – interleukin; GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; SNEA – severe non-allergic eosinophilic asthma. SNEA group n = 10, AA group n = 9, HS group n = 8. Data presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ compared with appropriate rEOS-like cells in the same group. # $p < 0.05$ compared with appropriate eosinophil subtypes from AA group. § $p < 0.005$ compared with appropriate eosinophil subtypes from HS group. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

The effect on the proliferative properties of eosinophil subtypes following an *in vitro* provoked acute AA episode after a provided BAC was determined by means of comparing the results of an initial and subsequent twenty-four hour sample after the allergen challenge was given to the same subject.

The BAC significantly increased the effect of IL-5 and GM-CSF on the proliferative properties of rEOS-like cells. Also noted was that IL-3 had no significant effect on rEOS-like cells. The BAC did not significantly change ASM cell number after seventy-two hours of incubation in co-culture with IL-3-, IL-5-, and GM-CSF-activated iEOS-like cells in comparison to the same cells before the BAC (Table 4, Fig. 5).

Table 4. The effect of bronchial allergen challenge on proliferative properties of blood eosinophil subtypes in allergic asthma (changes of reduced Alamar blue reagent % over control)

	Visit	iEOS-like	rEOS-like
Non-activated eosinophils	V1	10.9 ± 1.7 * #	22.2 ± 3.0
	V2	23.1 ± 2.8	39.3 ± 5.9
IL-3	V1	19.6 ± 3.6	29.3 ± 4.9
	V2	28.8 ± 8.3	43.9 ± 6.2
IL-5	V1	26.6 ± 4.0 *	38.3 ± 1.6 #
	V2	37.4 ± 7.4	61.1 ± 6.9
GM-CSF	V1	34.8 ± 4.3 *	35.1 ± 3.7 #
	V2	43.8 ± 5.9 *	66.2 ± 7.3

iEOS-like – inflammatory-like eosinophils; IL – interleukin; GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; rEOS-like – lung resident- like eosinophils. AA group n = 9. Data presented as the mean ± standard error of the mean. *p < 0.05 compared with appropriate rEOS-like cells in the same group. #p < 0.05 compared with appropriate eosinophil subtypes from AA group. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

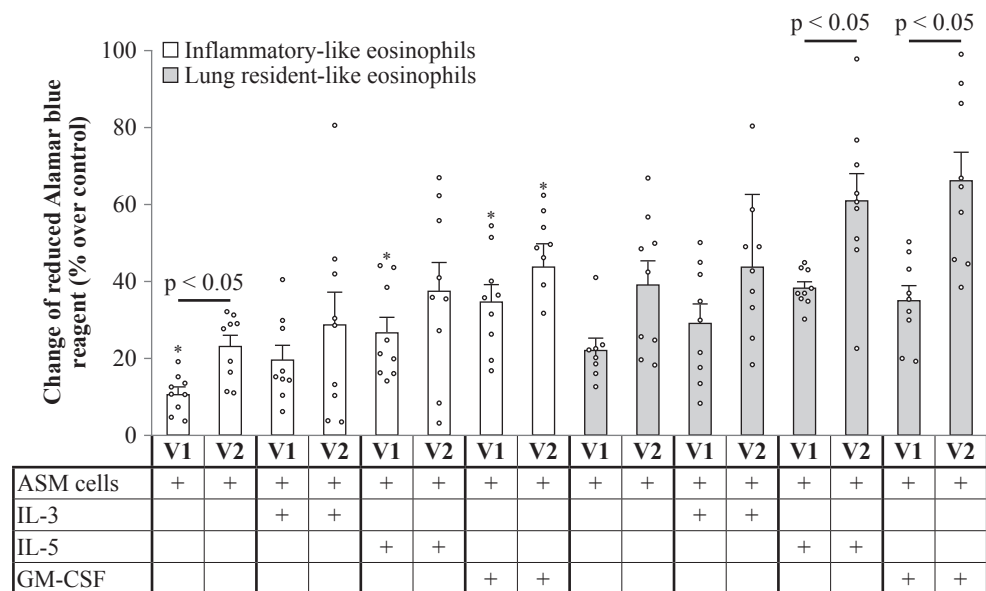


Fig. 5. The effect of bronchial allergen challenge on proliferative properties of blood eosinophil subtypes in allergic asthma

ASM – airway smooth muscle; IL – interleukin; GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, V1 – visit 1 (before bronchial allergen challenge); V2 – visit 2 (24 h after bronchial allergen challenge). Results from independent experiments of AA, n = 8. Data presented as the mean ± standard error of the mean. *p < 0.05 compared with appropriate rEOS-like cells. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

When compared to iEOS-like cells, rEOS-like cells which were isolated from the SNEA and AA groups showed a higher expression of the IL-3R gene. Concurrently, in the HS group, expression of the IL-3R gene did not differ significantly between eosinophil subtypes. rEOS-like cells isolated from SNEA, AA, and HS groups showed a higher expression of the IL-5R gene compared with iEOS-like cells. In SNEA, a higher expression of the GM-CSFR gene was found in isolated iEOS-like compared with rEOS-like cells. Concurrently, in the AA and HS groups, expression of the GM-CSFR gene did not differ significantly between eosinophil subtypes (Table 5, Fig. 6).

Table 5. Differences in expression of interleukin 3 receptor, interleukin 5 receptor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor genes (folds) between lung resident-like and inflammatory-like eosinophils in the same groups

	SNEA	AA	HS
IL-3R	1.2 ± 0.5 *	2.1 ± 0.7 *	1.1 ± 0.5
IL-5R	5.1 ± 1.6 * # §	1.7 ± 0.6 *	1.7 ± 0.7 *
GM-CSFR	-1.9 ± 0.5 * # §	0.5 ± 0.7	0.8 ± 0.4

AA – allergic asthma; HS – healthy subjects; IL-3R – interleukin 3 receptor; IL-5R – interleukin 5 receptor; GM-CSFR – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor; SNEA – severe non-allergic eosinophilic asthma. SNEA group n = 10, AA group n = 9, HS group n = 8. Data presented as the mean ± standard error of the mean. *p < 0.05 compared with appropriate rEOS-like cells in the same group. #p < 0.05 compared with appropriate eosinophil subtypes from AA group. §p < 0.005 compared with appropriate eosinophil subtypes from HS group. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

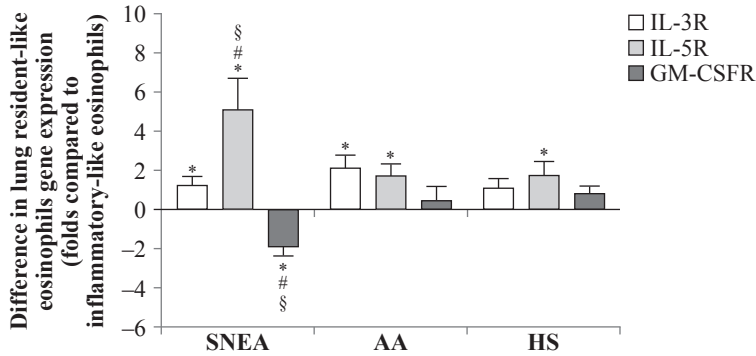


Fig. 6. Differences in expression of interleukin 3 receptor, interleukin 5 receptor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes between lung resident-like and inflammatory-like eosinophils in the same groups

AA – allergic asthma; HS – healthy subjects; IL-3R – interleukin 3 receptor; IL-5R – interleukin 5 receptor; GM-CSFR – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor; SNEA – severe non-allergic eosinophilic asthma. SNEA group n = 10, AA group n = 8, HS group n = 11. Data presented as the mean ± standard error of the mean, fold change over expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR gene on inflammatory-like eosinophils. *p < 0.05 compared with inflammatory-like eosinophils; #p < 0.05 compared with AA group; §p < 0.05 compared with HS group. Statistical analysis: between investigated groups, Mann-Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

Level of potential serum biomarkers before and after bronchial provocation with *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen

Thirty-six subjects which were aged from 18 to 49 years old were included in the study, in which there were twenty with AA and sixteen HS. Table 6 delineates the demographic and clinical data descriptive statistics of each group within the study population. The AA and HS groups did not differ significantly in age, gender, or BMI. FEV₁ (L) also did not differ between the aforementioned study groups; however, the difference between the groups was evident when FEV₁ was expressed as a percentage. In the AA patients' group blood, eosinophil counts, Fe_{NO}, and total IgE levels were significantly higher than for the HS group. The FEV₁ (L) of the AA group decreased twenty-four hours after BAC, while the blood eosinophil count and Fe_{NO} was significantly increased. It was also noted that, total IgE levels did not change significantly after BAC.

Table 6. Demographic and clinical characteristics of the study population

	AA		HSs
Number, n	20		16
Sex, M/F	11/9		6/10
Age, years	27.2 ± 2.2		28.2 ± 1.4
BMI, kg/m ²	24.5 ± 1.1		22.7 ± 0.8
ACT, score	18.3 ± 1.3		NA
PD _{20M} , mg	0.33 ± 0.07		NA
PD _{20A} , HEP/mL (range)	9.5 ± 3		NA
	V1	V2	
FEV ₁ , L	3.6 ± 0.2 #	3.3 ± 0.2	4.0 ± 0.2
FEV ₁ , % of predicted	88.5 ± 3.0 * #	81.3 ± 3.8 *	99.4 ± 3.3
Fe _{NO} , ppb	48.2 ± 7.5 * #	76.8 ± 11.7 *	13.3 ± 2.0
Blood eosinophils count, × 10 ⁹ /L	0.34 ± 0.05 * #	0.46 ± 0.05 *	0.10 ± 0.01
Total IgE, IU/mL	577.9 ± 175.6 *	603.4 ± 188.2 *	32.3 ± 12.9

AA – allergic asthma; ACT – asthma control test; F – female; Fe_{NO} – fractional exhaled nitric oxide; FEV₁ – forced expiratory volume in 1 second; HSs – healthy subjects; IgE – immunoglobulin E; M – male; NA – not assessed; PD_{20A} – the *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen provocation dose causing a 20% decrease in FEV₁; PD_{20M} – the provocation dose of methacholine causing a 20% decrease in FEV₁; V1 – experimental day; V2 – experimental day – 24 hours after V1. Data presented as the mean ± standard error of the mean. *p < comparing with the HS group. #p < 0.05 comparing with the AA group after BAC. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

It was noted that a serum circulating ATX levels in the control group were similar to AA patients prior to and following BAC (Fig. 7 A). When evaluating the serum level of (tyrosine-protein kinase Met) MET, significant differences between the study groups of AA and HSs were noted. The MET level in the AA group 24 h after the BAC reduced was significantly lower compared to before the BAC (Fig. 7 B). Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) level in serum did not differ between healthy controls in samples provided in both of the visits made by the AA group (Fig. 7 C). Lastly, the chronic inflammation-related soluble interleukin 5 receptor subunit alpha (sIL-5Rα) level was found to be elevated in AA patients compared to the HS group. Before BAC, circulating sIL-5Rα levels in AA patients remained similar after BAC. These levels were significantly higher compared to HS groups (Fig. 7 D). All results are shown in Table 7.

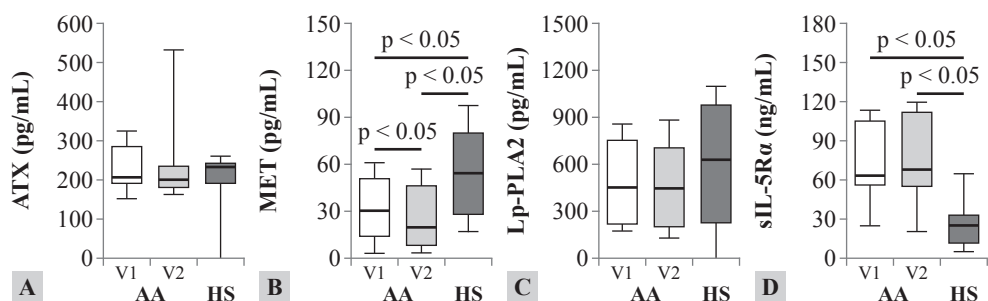


Fig. 7. Serum levels of autotaxin (A), tyrosine-protein kinase Met (B), lipoprotein-associated phospholipase A2 (C), and soluble interleukin 5 receptor subunit alpha (D)

AA – allergic asthma; ATX – autotaxin; HS – healthy subjects; Lp-PLA2s – lipoprotein-associated phospholipase A2; MET – tyrosine-protein kinase Met; sIL-5R α – soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; V1 – experimental day; V2 – experimental day – 24 hours after V1. AA group n = 20, HS group n = 16. Data are presented as the median with interquartile range. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

Table 7. The level of biologically active substances in asthma patients and healthy subjects

Biologically active substances	AA		HSs
	V1	V2	
ATX (pg/mL)	206.8 (190.9; 286.3)	201.5 (180.3; 235.5)	233.3 (190.9; 243.9)
MET (pg/mL)	30.5 (14.0; 51.1) * #	19.8 (8.0; 46.6) *	54.3 (28.0; 80.3)
Lp-PLA2 (pg/mL)	451.4 (216.4; 755.1)	445.5 (199.9; 706.6)	629.3 (224.9; 980.8)
sIL-5R α (ng/mL)	63.4 (55.9; 105.4) *	67.9 (54.9; 112.1) *	25.2 (11.3; 33.2)
PTX3 (pg/mL)	560.1 (326.1; 875.2) * #	498.9 (226.5; 651.1) *	1217.6 (919.8; 1580.1)
TRX1 (ng/mL)	131.2 (93.8; 173.6) * #	142.0 (89.4; 195.6) *	113.9 (67.4; 136.1)
MMP-7 (pg/mL)	332.9 (241.5; 421.3)	295.1 (272.1; 327.7)	278.3 (195.3; 379.2)
MMP-9 (pg/mL)	253.7 (151.4; 339.9)	211.9 (116.9; 293.7)	204.2 (94.8; 498.0)
MMP-10 (pg/mL)	896.1 (318.9; 1501.0)	971.0 (355.7; 1682.6)	502.7 (324.0; 1052.5)
ICTP (pg/mL)	523.0 (478.0; 552.0) *	476.3 (411.6; 531.4) *	589.0 (540.0; 693.0)

AA – allergic asthma; ATX – autotaxin; FeNO – fractional exhaled nitric oxide; HSs – healthy subjects; ICTP – I C-telopeptide of type I collagen; Lp-PLA2s – lipoprotein-associated phospholipase A2; MET – tyrosine-protein kinase Met; MMP-7 – matrix metalloproteinase-7; MMP-9 – matrix metalloproteinase-9; MMP-10 – matrix metalloproteinase-10; PTX3 – pentraxin 3; sIL-5R α – soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; TRX1 – thioredoxin 1; V1 – experimental day; V2 – experimental day – 24 hours after V1. AA group n = 20, HS group n = 16. Data are presented as the median with interquartile range. *p < 0.05 comparing with HS group, #p < 0.05 comparing with AA V2. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

Circulating PTX3 and TRX1 levels were investigated in order to predict oxidative stress in asthmatic patients' serum to denote them as a potential biomarker in asthma. A lower level of PTX3 was found in the AA group and was significantly different in comparison to the HS group. The PTX3 level in the AA group decreased twenty-four hours after the BAC and was significantly lower compared to the level before the BAC (Fig. 8 A). In the AA group, serum levels of TRX1 were significantly higher than in the HSs. Furthermore, levels were significantly elevated in the AA group twenty-four hours following the BAC, in comparison to the results before the BAC (Fig. 8 B). All results are shown in Table 7.

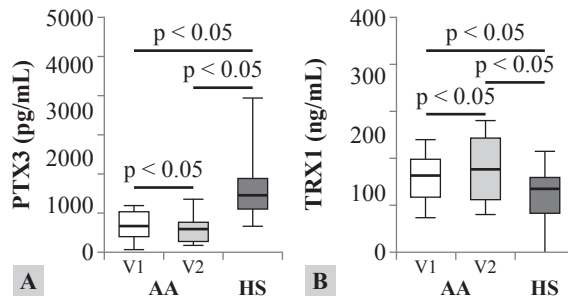


Fig. 8. Serum levels of pentraxin 3 (A) and thioredoxin 1 (B)

AA – allergic asthma; HSs – healthy subjects; PTX3 – pentraxin 3; TRX1 – thioredoxin 1; V1 – experimental day; V2 – experimental day – 24 hours after V1. AA group n = 20, HS group n = 16. Data are presented as the median with interquartile range. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

Serum levels of selected MMPs and ICTP degradation products were investigated as potential predictive and prognostic biomarkers in asthma. MMP-7 remained homogenous between both investigated groups, indicating no potential prognostic value (Fig. 9 A). AA patients were not able to be distinguished from the HS group by the serum MMP-9 level. BAC had no effect on MMP-9 level in the AA group (Fig. 9 B). The results of MMP-10 did not differ among the asthma groups; serum levels of MMP-10 were similar during both visits of the AA patients. No significant differences were observed in comparison to the HS group (Fig. 9 C). Furthermore, there was an investigation of the collagen degradation indicating marker, ICTP. Serum levels of ICTP in the AA group were significantly lower in comparison to the HS group (Fig. 9 D). Additionally, BAC was not affectual to the ICTP level in the AA group (Fig. 9 D). The results are shown in Table 7.

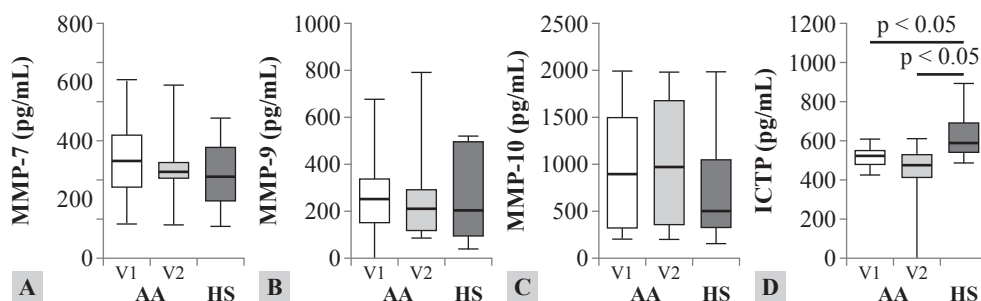


Fig. 9. Serum levels of matrix metalloproteinase 7 (A), 9 (B), 10 (C), and I C-telopeptide of type I collagen (D)

AA – allergic asthma; HSs – healthy subjects; ICTP – I C-telopeptide of type I collagen; MMP-7 – matrix metalloproteinase-7; MMP-9 – matrix metalloproteinase-9; MMP-10 – matrix metalloproteinase-10; V1 – experimental day; V2 – experimental day – 24 hours after V1. AA group n = 20, HS group n = 16. Data are presented as the median with interquartile range. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

Clinical remission criteria and changes in serum biological markers level in patients with severe eosinophilic asthma treated for 24 weeks with the anti-interleukin 5 monoclonal antibody mepolizumab

Eighteen subjects total, in ages from 37 to 80 years old with SEA participated in the study. Patients were examined at four separate time points: before beginning treatment with 100 mg subcutaneous injection of mepolizumab and subsequently every four weeks (V1) and 4 (V2), 12 (V3), and 24 (V4) after the beginning treatment of mepolizumab.

Most study subjects were women and there was a tendency that they were overweight. Before add-on treatment with 100 mg subcutaneous injection of mepolizumab, all patients had asthma exacerbation. Appreciating asthma exacerbation count after the first dose of mepolizumab, exacerbation was not found, however, after the second dose of mepolizumab, one patient had asthma exacerbation. Subsequent continuation of mepolizumab treatment did not increase the number of patients experiencing asthma exacerbations.

Four weeks following the initiation of mepolizumab treatment, the ACT, and FEV₁ significantly increased; however, the blood eosinophil count significantly decreased, and this noted effect continued for the duration of the treatment (Table 8, Fig. 10 A–C, E). FeNO and total IgE levels were not significantly different both before and during the course of the treatment (Table 8, Fig. 10 D, F).

Table 8. Demographic and clinical characteristics of the study population

	SEA			
Number, n	18			
Sex, M/F	4/18			
Age, years	57.6 ± 2.2			
BMI, kg/m ²	30.3 ± 1.7			
	V1	V2	V3	V4
Patients number, who had asthma exacerbations	18	0	1	0
ACT, score	10.6 ± 0.8 * # £	16.3 ± 1.3	17.7 ± 1.2	17.1 ± 1.2
FEV ₁ , L	1.84 ± 0.18 * # £	2.11 ± 0.16	2.15 ± 0.17	2.16 ± 0.15
FEV ₁ , % of predicted	66.0 ± 4.9 * # £	76.9 ± 4.9	77.3 ± 4.4	77.6 ± 3.8
FeNO, ppb	48.6 ± 9.7	39.3 ± 6.0	45.3 ± 9.8	41.9 ± 7.1
Blood eosinophil count, × 10 ⁹ /L	0.64 ± 0.08 * # £	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Total IgE, IU/mL	128.1 ± 27.9	126.7 ± 28.0	131.9 ± 27.3	127.0 ± 25.7

ACT – asthma control test; F – female; FeNO – fractional exhaled nitric oxide; FEV₁ – forced expiratory volume in 1s; Ig – immunoglobulin; M – male; SEA – severe eosinophilic asthma; V1 – visit before starting treatment of mepolizumab; V2 – visit 4 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 1 mepolizumab dose); V3 – visit 12 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 3 mepolizumab doses); V4 – visit 24 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 6 mepolizumab doses). Data presented as the mean ± standard error of the mean. *p < 0.05 comparing with V2, #p < 0.05 comparing with V3, £p < 0.05 comparing with V4. Statistical analysis – Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

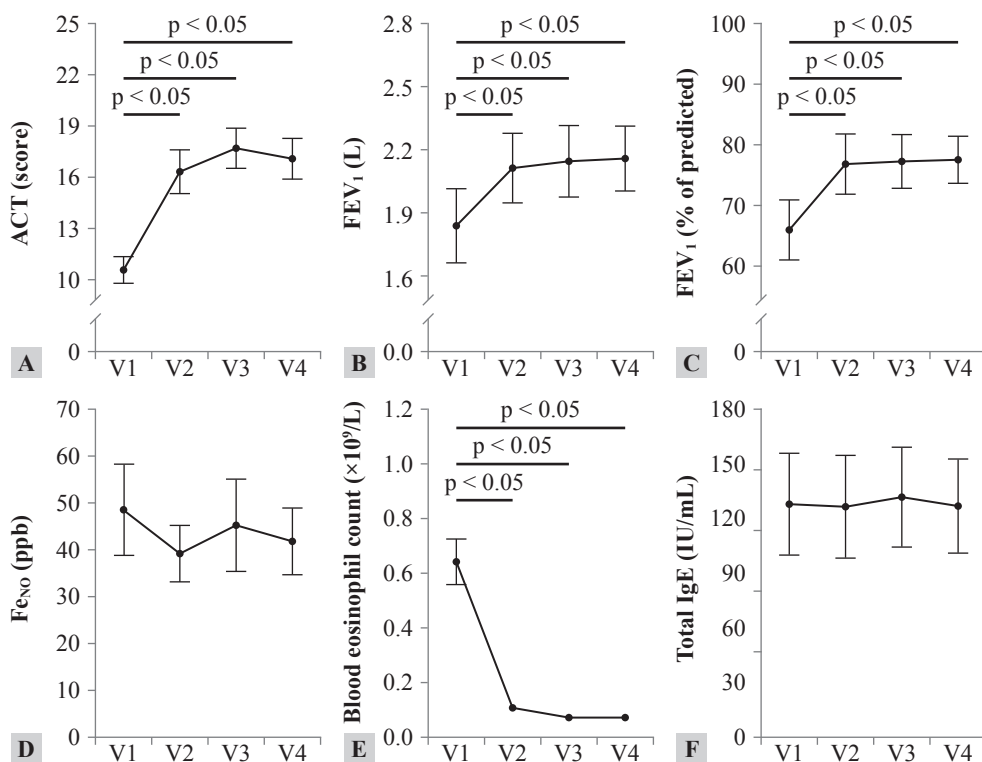


Fig. 10. Asthma control test scores (A), forced expiratory volume in 1 s (B, C), fractional exhaled nitric oxide (D), blood eosinophil count (E), and total immunoglobulin E (F) levels during 24 weeks of treatment with the anti-IL-5 drug mepolizumab

ACT – asthma control test; Fe_{NO} – fractional exhaled nitric oxide; FEV₁ – forced expiratory volume in 1 s; Ig – immunoglobulin; V1 – visit before starting treatment of mepolizumab; V2 – visit 4 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 1 mepolizumab dose); V3 – visit 12 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 3 mepolizumab doses); V4 – visit 24 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 6 mepolizumab doses). SEA group n = 18. Data presented as the mean ± standard error of the mean. Statistical analysis – Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

Within the eighteen patients analyzed, following twenty-four weeks of mepolizumab treatment, exacerbation-free – patients and short-term systemic corticosteroid-free – free patients increased from 0 (0%) to 17 (94.4%), patients with asthma control test (ACT) ≥ 20 increased from 0 (0%) to 9 (50%), and patients with FEV₁ ≥ 80% post bronchodilator increased from 4 (22.2%) to 7 (38.9%) (Fig. 11 A). Succeeding twenty-four weeks of treatment with mepolizumab, five patients (27.8%) fulfilled the four-component clinical remission definition, and six patients (33.3%) fulfilled the three-component definition. Prior to starting treatment with mepolizumab, 0 patients (0 %) met these criteria. Furthermore, following twenty-four weeks of treatment with

mepolizumab, six patients (33.3%) fulfilled the two-component clinical remission definition, and one patient (5.6%) fulfilled the one-component definition. Prior to beginning treatment with mepolizumab, 4 and 0 patients (0%; 22.2%) respectively met these criteria (Fig. 11 B).

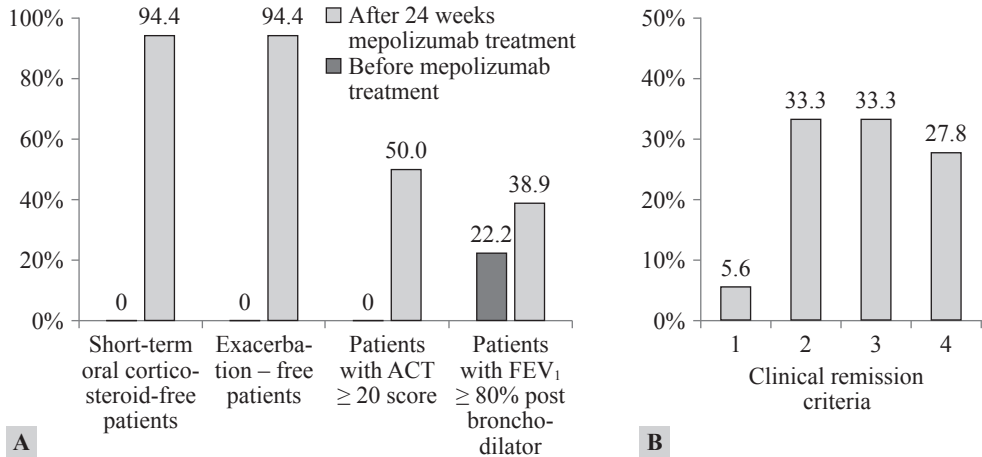


Fig. 11. 24 weeks mepolizumab-treated patients number meeting individual criteria for clinical remission in asthma (**A**). 24 weeks mepolizumab-treated patients number, who meet one, two, three, or four criteria for clinical remission (**B**)

ACT – asthma control test; FEV₁ – forced expiratory volume in 1s. SEA group n = 18.

This study found that within the succeeding four weeks after initiating treatment with mepolizumab, the serum levels of IL-4 and IL-25 significantly did not change (Fig. 12 A, D); concurrently, serum levels of IL-5, IL-13, TSLP, sFcεRI significantly decreased, and this noted effect persisted for the duration the treatment (Fig. 12 B, C, H, I). The serum levels of IL-33 and eotaxin increased considerably after four weeks initiating treatment with mepolizumab, and this effect persisted for the remainder of the treatment (Fig. 12 E, G). All results are shown in Table 9.

Table 9. Serum levels of type 2 inflammation biological markers during 24 weeks of treatment with the anti-IL-5 drug mepolizumab

	SEA			
	V1	V2	V3	V4
IL-4 (pg/mL)	30.7 ± 6.5	26.3 ± 2.2	26.0 ± 4.7	24.2 ± 4.2
IL-5 (pg/mL)	111.7 ± 4.4 * # £	97.5 ± 4.3	83.5 ± 3.0	82.8 ± 4.1
IL-13 (pg/mL)	7.2 ± 1.1 * # £	5.7 ± 0.9	5.5 ± 1.0	4.9 ± 0.8
IL-25 (ng/mL)	4.0 ± 0.7	3.3 ± 0.5	3.5 ± 0.6	4.0 ± 0.9
IL-33 (pg/mL)	18.1 ± 1.0 * # £	18.4 ± 1.0	19.4 ± 1.0	21.3 ± 0.8
TSLP (pg/mL)	49.1 ± 11.9 * # £	42.4 ± 10.3	39.7 ± 10.0	41.8 ± 10.5
sIL-5Rα (ng/mL)	2.84 ± 0.55 * # £	2.11 ± 0.47	2.43 ± 0.52	2.42 ± 0.47
Eotaxin (pg/mL)	143.9 ± 18.2 * # £	195.3 ± 25.5	201.7 ± 25.9	197.5 ± 24.8
sFceRI (ng/mL)	7.0 ± 1.3 * # £	5.9 ± 1.1	5.2 ± 0.9	4.2 ± 0.6

IL – interleukin; sFceRI – soluble high-affinity IgE receptor; sIL-5Rα – soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; SEA – severe eosinophilic asthma; TSLP – thymic stromal lymphopoietin; V1 – visit before starting treatment of mepolizumab; V2 – visit 4 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 1 mepolizumab dose); V3 – visit 12 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 3 mepolizumab doses); V4 – visit 24 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 6 mepolizumab doses). Data presented as the mean ± standard error of the mean. *p < 0.05 comparing with V2, #p < 0.05 comparing with V3, £p < 0.05 comparing with V4. Statistical analysis – Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

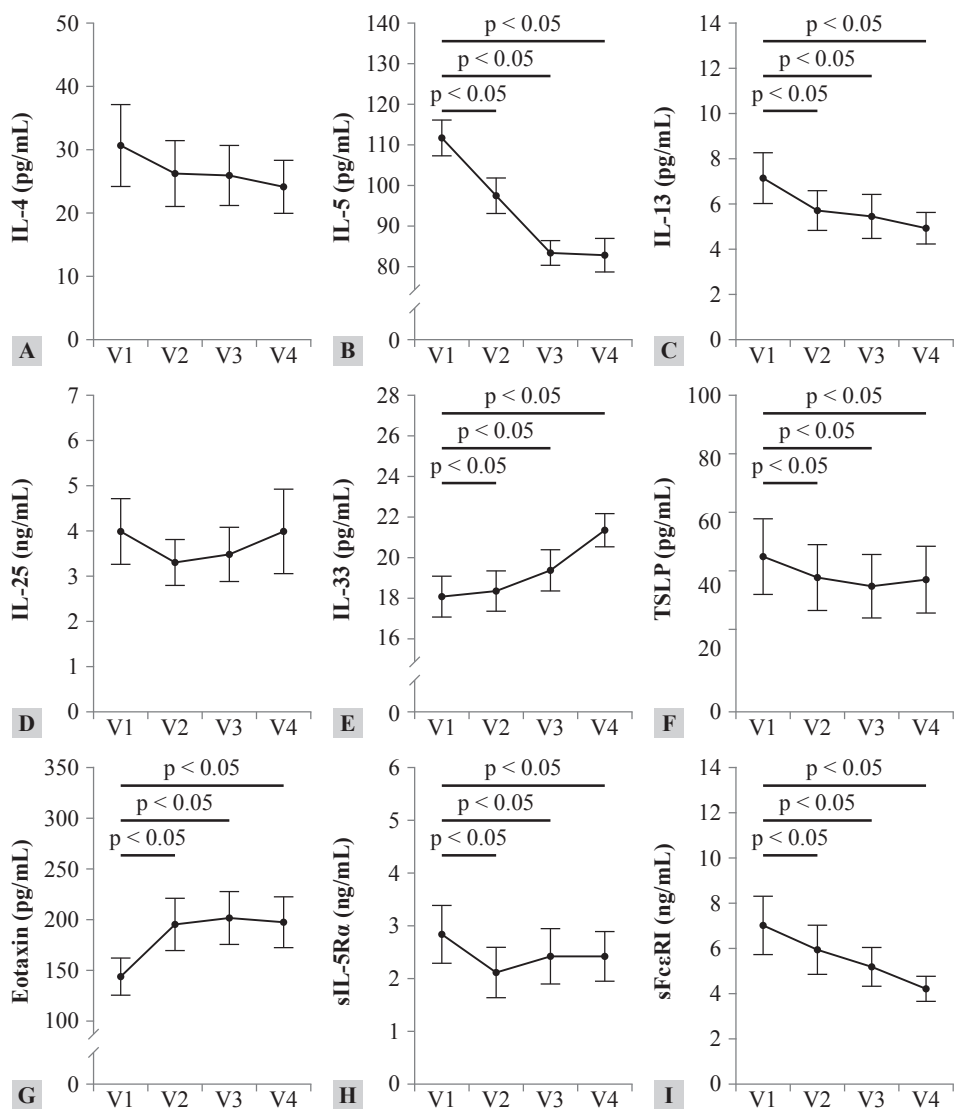


Fig. 12. Serum levels of interleukin 4 (A), interleukin 5 (B), interleukin 13 (C), interleukin 25 (D), interleukin 33 (E), thymic stromal lymphopoietin (F), eotaxin (G), soluble interleukin 5 receptor subunit alpha (H), soluble high-affinity IgE receptor (I) during 24 weeks of treatment with the anti-IL-5 drug mepolizumab

IL – interleukin; sFc ϵ RI – soluble high-affinity IgE receptor; sIL-5R α – soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; TSLP – thymic stromal lymphopoietin; V1 – visit before starting treatment of mepolizumab; V2 – visit 4 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 1 mepolizumab dose); V3 – visit 12 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 3 mepolizumab doses); V4 – visit 24 weeks after starting treatment of mepolizumab (after 6 mepolizumab doses). SEA group n = 18. Data presented as the mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis – Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

CONCLUSIONS

1. The eosinophilopoietins interleukin 5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not interleukin 3, promote the proliferative activity of both eosinophil subtypes (lung resident-like eosinophil and inflammatory-like eosinophil) isolated from type 2 asthmatic blood to bronchial smooth muscle cells *in vitro* compared to healthy people. The proliferative activity of both eosinophil subtypes is associated with the expression of the interleukin 5 receptor gene on the surface of eosinophils. In addition, the proliferative activity of lung-resident eosinophil-like cells was further enhanced under exposure to *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen compared to the proliferative activity in the absence of allergen.
2. Analysis of biological markers revealed:
 - Serum levels of tyrosine-protein kinase Met, pentaxin 3 and I C telopeptide type I collagen are lower in patients with allergic asthma than in healthy individuals. In addition, exposure to *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen further decreased tyrosine-protein kinase Met and pentaxin 3 levels.
 - Serum levels of soluble interleukin 5 receptor alpha subunit and thioredoxin 1 are higher in allergic asthma than in healthy individuals. In addition, exposure to *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen further increased the level of thioredoxin 1.
 - The serum levels of autotaxin and matrix metalloproteinases 7, 9, and 10 did not differ significantly between patients with allergic asthma and healthy individuals.
 - The amount of soluble interleukin 5 receptor alpha subunit in serum is positively related to known biological markers of type 2 asthma (exhaled nitrogen oxides level in exhaled air, blood eosinophil level, total immunoglobulin E level) and this indicates the possible role of this biological marker in inflammation of allergic.
3. Blockade of interleukin 5 in patients with severe eosinophilic asthma reduces serum levels of interleukin 13, thymic stromal lymphopoietin, soluble interleukin 5 receptor alpha subunit, soluble high-affinity immunoglobulin E receptor. It increases the achievement of clinical remission criteria.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

This study added to the knowledge about the pathogenesis of asthma. The study found that eosinophilopoietin interleukin 5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance the proliferative activity of both eosinophil subtypes on bronchial smooth muscle cells. For this reason, inhibiting the effects of interleukin 5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor may reduce bronchial smooth muscle cell proliferation and, at the same time, airway remodeling in type 2 asthma. The levels of tyrosine-protein kinase Met, pentaxin 3, thioredoxin 1, I C telopeptide type I collagen, and especially the alpha subunit of the soluble interleukin 5 receptor in the serum of patients with allergic asthma differ from those of healthy individuals. Considering this, these biomarkers can be used to determine the type of inflammation in clinical practice and select individualized treatment. The study revealed that blocking interleukin 5 affects the balance of interleukin 5 and other type 2 inflammatory cytokines. This may be important in the selection of a biologic for the treatment of severe eosinophilic asthma.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1(1):15025.
2. Chowdhury NU, Guntur VP, Newcomb DC, Wechsler ME. Sex and gender in asthma. *Eur Respir Rev*. 2021;30(162).
3. Saikumar Jayalatha AK, Hesse L, Ketelaar ME, Koppelman GH, Nawijn MC. The central role of IL-33/IL-1RL1 pathway in asthma: From pathogenesis to intervention. *Pharmacol Ther*. 2021;225:107847.
4. Stubbs MA, Clark VL, McDonald VM. Living well with severe asthma. *Breathe (Sheff)*. 2019;15(2):e40-e9.
5. Zajac D, Wojciechowski P. The Role of Vitamins in the Pathogenesis of Asthma. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10).
6. Wu TD, Brigham EP, McCormack MC. Asthma in the Primary Care Setting. *Med Clin North Am*. 2019;103(3):435-52.
7. Xiong DJP, Martin JG, Lauzon AM. Airway smooth muscle function in asthma. *Front Physiol*. 2022;13:993406.
8. Schoettler N, Streck ME. Recent Advances in Severe Asthma: From Phenotypes to Personalized Medicine. *Chest*. 2020;157(3):516-28.
9. Rogliani P, Calzetta L, Matera MG, Laitano R, Ritondo BL, Hanania NA, et al. Severe Asthma and Biological Therapy: When, Which, and for Whom. *Pulm Ther*. 2020;6(1):47-66.
10. Desai D, Brightling C. Cytokine and anti-cytokine therapy in asthma: ready for the clinic? *Clin Exp Immunol*. 2009;158(1):10-9.
11. Ilmarinen P, Kankaanranta H. Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;114(1):109-17.
12. Dunican EM, Fahy JV. The Role of Type 2 Inflammation in the Pathogenesis of Asthma Exacerbations. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12 Suppl 2(Suppl 2):S144-9.
13. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(2):219-33.
14. Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res*. 2017;367(3):551-69.
15. Aghasafari P, George U, Pidaparti R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflamm Res*. 2019;68(1):59-74.
16. 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.
17. Hussain M, Liu G. Eosinophilic Asthma: Pathophysiology and Therapeutic Horizons. *Cells*. 2024;13(5).
18. Wan XC, Woodruff PG. Biomarkers in Severe Asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016;36(3):547-57.
19. George L, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Chronic Dis*. 2016;7(1):34-51.
20. Tiotiu A. Biomarkers in asthma: state of the art. *Asthma Res Pract*. 2018;4:10.
21. Puzzovio PG, Levi-Schaffer F. Latest Progresses in Allergic Diseases Biomarkers: Asthma and Atopic Dermatitis. *Front Pharmacol*. 2021;12:747364.
22. Narendra D, Blixt J, Hanania NA. Immunological biomarkers in severe asthma. *Semin Immunol*. 2019;46:101332.

23. Bhakta NR, Woodruff PG. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again. *Immunol Rev.* 2011;242(1):220-32.
24. Caminati M, Pham DL, Bagnasco D, Canonica GW. Type 2 immunity in asthma. *World Allergy Organ J.* 2018;11(1):13.
25. Maspero J, Adir Y, Al-Ahmad M, Celis-Preciado CA, Colodenco FD, Giavina-Bianchi P, et al. Type 2 inflammation in asthma and other airway diseases. *ERJ Open Res.* 2022;8(3).
26. Kita H. Eosinophils: multifunctional and distinctive properties. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161 Suppl 2(0 2):3-9.
27. Wechsler ME, Munitz A, Ackerman SJ, Drake MG, Jackson DJ, Wardlaw AJ, et al. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clin Proc.* 2021;96(10):2694-707.
28. Tliba O, Panettieri RA, Jr. Paucigranulocytic asthma: Uncoupling of airway obstruction from inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(4):1287-94.
29. Januskevicius A, Janulaityte I, Kalinauskaite-Zukauske V, Gosens R, Malakauskas K. The Enhanced Adhesion of Eosinophils Is Associated with Their Prolonged Viability and Pro-Proliferative Effect in Asthma. *J Clin Med.* 2019;8(9).
30. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirotton D, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3279-95.
31. Abdala-Valencia H, Coden ME, Chiarella SE, Jacobsen EA, Bochner BS, Lee JJ, et al. Shaping eosinophil identity in the tissue contexts of development, homeostasis, and disease. *J Leukoc Biol.* 2018;104(1):95-108.
32. Gregory B, Kirchem A, Phipps S, Gevaert P, Pridgeon C, Rankin SM, et al. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. *J Immunol.* 2003;170(11):5359-66.
33. McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:93.
34. Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimbaldeston MA, Bonder CS, et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol Rev.* 2012;250(1):277-302.
35. Guthridge MA, Stomski FC, Thomas D, Woodcock JM, Bagley CJ, Berndt MC, et al. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells.* 1998;16(5):301-13.
36. Venkatesan P. 2023 GINA report for asthma. *Lancet Respir Med.* 2023;11(7):589.
37. Busse WW, Chupp G, Corbridge T, Stach-Klysh A, Oppenheimer J. Targeting Asthma Remission as the Next Therapeutic Step Toward Improving Disease Control. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2024;12(4):894-903.
38. Thomas D, McDonald VM, Pavord ID, Gibson PG. Asthma remission: what is it and how can it be achieved? *Eur Respir J.* 2022;60(5).
39. Gans MD, Gavrilova T. Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes. *Paediatr Respir Rev.* 2020;36:118-27.
40. Papi A, Blasi F, Canonica GW, Morandi L, Richeldi L, Rossi A. Treatment strategies for asthma: reshaping the concept of asthma management. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2020;16:75.

41. O'Dwyer DN, Moore BB. The role of periostin in lung fibrosis and airway remodeling. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(23):4305-14.
42. 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.
43. Lacy P, Rosenberg HF, Walsh GM. Molecular Biology of Eosinophils: Introduction. *Methods Mol Biol.* 2021;2241:1-14.
44. Siddiqui S, Bachert C, Bjermer L, Buchheit KM, Castro M, Qin Y, et al. Eosinophils and tissue remodeling: Relevance to airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2023; 152(4):841-57.
45. Nakagome K, Nagata M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front Immunol.* 2018;9:2220.
46. Adatia A, Vliagoftis H. Challenges in severe asthma: Do we need new drugs or new biomarkers? *Front Med (Lausanne).* 2022;9:921967.
47. Ronnow SR, Sand JMB, Staunstrup LM, Bahmer T, Wegmann M, Lunding L, et al. A serological biomarker of type I collagen degradation is related to a more severe, high neutrophilic, obese asthma subtype. *Asthma Res Pract.* 2022;8(1):2.
48. Koussih L, Atoui S, Tliba O, Gounni AS. New Insights on the Role of pentraxin-3 in Allergic Asthma. *Front Allergy.* 2021;2:678023.
49. Park GY, Lee YG, Berdyshev E, Nyenhuis S, Du J, Fu P, et al. Autotaxin production of lysophosphatidic acid mediates allergic asthmatic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(8):928-40.
50. Most JF, Bork S. New developments in asthma therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2020;51:59-65.
51. Lin SC, Shi LS, Ye YL. Advanced Molecular Knowledge of Therapeutic Drugs and Natural Products Focusing on Inflammatory Cytokines in Asthma. *Cells.* 2019;8(7).
52. Krings JG, McGregor MC, Bacharier LB, Castro M. Biologics for Severe Asthma: Treatment-Specific Effects Are Important in Choosing a Specific Agent. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(5):1379-92.
53. Hashmi MF, Cataletto ME. Asthma. *StatPearls.* Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Mary Cataletto declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2024.
54. Kaplan A, van Boven JFM, Ryan D, Tsiligianni I, Bosnic-Anticevich S, Group REGAW. GINA 2020: Potential Impacts, Opportunities, and Challenges for Primary Care. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(4):1516-9.
55. Jiang XQ, Mei XD, Feng D. Air pollution and chronic airway diseases: what should people know and do? *J Thorac Dis.* 2016;8(1):E31-40.
56. Collaborators GBDCRD. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med.* 2020;8(6):585-96.
57. Cote A, Godbout K, Boulet LP. The management of severe asthma in 2020. *Biochem Pharmacol.* 2020;179:114112.
58. Taponen S, Lehtimäki L, Karvala K, Luukkonen R, Uitti J. Correlates of employment status in individuals with asthma: a cross-sectional survey. *J Occup Med Toxicol.* 2017;12:19.
59. Provost D, Delmas MC, Benezet L, Ribet C, Chesneau J, Raheison C, et al. Impact of asthma on working life: an analysis of the French CONSTANCES cohort. *Occup Environ Med.* 2023;80(7):392-8.

60. Patel VH, Thannir S, Dhanani M, Augustine I, Sandeep SL, Mehadi A, et al. Current Limitations and Recent Advances in the Management of Asthma. *Dis Mon.* 2023; 69(7):101483.
61. Habib N, Pasha MA, Tang DD. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells.* 2022;11(17).
62. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol.* 2013;4:263.
63. Jartti T, Bonnelykke K, Elenius V, Feleszko W. Role of viruses in asthma. *Semin Immunopathol.* 2020;42(1):61-74.
64. Varricchi G, Ferri S, Pepys J, Poto R, Spadaro G, Nappi E, et al. Biologics and airway remodeling in severe asthma. *Allergy.* 2022;77(12):3538-52.
65. Hudey SN, Ledford DK, Cardet JC. Mechanisms of non-type 2 asthma. *Curr Opin Immunol.* 2020;66:123-8.
66. Sze E, Bhalla A, Nair P. Mechanisms and therapeutic strategies for non-T2 asthma. *Allergy.* 2020;75(2):311-25.
67. Robinson LM, Boland JR, Braverman JM. Revisiting a Classic Study of the Molecular Clock. *J Mol Evol.* 2016;82(2-3):110-6.
68. Barcik W, Boutin RCT, Sokolowska M, Finlay BB. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. *Immunity.* 2020;52(2):241-55.
69. Jeong J, Lee HK. The Role of CD4(+) T Cells and Microbiota in the Pathogenesis of Asthma. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).
70. Ham J, Lim M, Kim D, Kim HY. Memory-like innate lymphoid cells in the pathogenesis of asthma. *Front Immunol.* 2022;13:1005517.
71. Solomon Y, Malkamu B, Berhan A, Eyayu T, Almaw A, Legese B, et al. Peripheral blood eosinophilia in adult asthmatic patients and its association with the severity of asthma. *BMC Pulm Med.* 2023;23(1):96.
72. 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(2):161-75.
73. Frey A, Lunding LP, Ehlers JC, Weckmann M, Zissler UM, Wegmann M. More Than Just a Barrier: The Immune Functions of the Airway Epithelium in Asthma Pathogenesis. *Front Immunol.* 2020;11:761.
74. Duchesne M, Okoye I, Lacy P. Epithelial cell alarmin cytokines: Frontline mediators of the asthma inflammatory response. *Front Immunol.* 2022;13:975914.
75. Hong H, Liao S, Chen F, Yang Q, Wang DY. Role of IL-25, IL-33, and TSLP in triggering united airway diseases toward type 2 inflammation. *Allergy.* 2020;75(11): 2794-804.
76. Porsbjerg CM, Sverrild A, Lloyd CM, Menzies-Gow AN, Bel EH. Anti-alarmins in asthma: targeting the airway epithelium with next-generation biologics. *Eur Respir J.* 2020;56(5).
77. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):57-65.
78. Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(1):35-50.
79. Henry EK, Inclan-Rico JM, Siracusa MC. Type 2 cytokine responses: regulating immunity to helminth parasites and allergic inflammation. *Curr Pharmacol Rep.* 2017; 3(6):346-59.
80. KleinJan A. Airway inflammation in asthma: key players beyond the Th2 pathway. *Curr Opin Pulm Med.* 2016;22(1):46-52.

81. Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*. 2015; 75(1):14-24.
82. Cai T, Qiu J, Ji Y, Li W, Ding Z, Suo C, et al. IL-17-producing ST2(+) group 2 innate lymphoid cells play a pathogenic role in lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(1):229-44 e9.
83. David B, Bafadhel M, Koenderman L, De Soyza A. Eosinophilic inflammation in COPD: from an inflammatory marker to a treatable trait. *Thorax*. 2021;76(2):188-95.
84. Bystrom J, Amin K, Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein--a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res*. 2011;12(1):10.
85. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(12):746-60.
86. Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front Immunol*. 2014;5:570.
87. Lommatzsch M, Nair P, Virchow JC. Normal blood eosinophil counts in humans. *Respiration*. 2024.
88. Salahuddin M, Anjum F, Cherian SV. Pulmonary Eosinophilia. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Fatima Anjum declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Sujith Cherian declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2024.
89. O'Sullivan JA, Bochner BS. Eosinophils and eosinophil-associated diseases: An update. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):505-17.
90. Park YM, Bochner BS. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010;2(2):87-101.
91. Ueki S, Tokunaga T, Fujieda S, Honda K, Hirokawa M, Spencer LA, et al. Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016;16(8):54.
92. Samitas K, Radinger M, Bossios A. Current update on eosinophilic lung diseases and anti-IL-5 treatment. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2011;6(3):189-205.
93. Walsh GM. Targeting eosinophils in asthma: current and future state of cytokine- and chemokine-directed monoclonal therapy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010;6(5):701-4.
94. Kandikattu HK, Upparahalli Venkateshaiah S, Mishra A. Synergy of Interleukin (IL)-5 and IL-18 in eosinophil mediated pathogenesis of allergic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;47:83-98.
95. Esnault S, Kelly EA. Essential Mechanisms of Differential Activation of Eosinophils by IL-3 Compared to GM-CSF and IL-5. *Crit Rev Immunol*. 2016;36(5):429-44.
96. Radonjic-Hoesli S, Valent P, Klion AD, Wechsler ME, Simon HU. Novel targeted therapies for eosinophil-associated diseases and allergy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015;55:633-56.
97. Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 2004;59(8):793-805.
98. Panousis C, Dhagat U, Edwards KM, Rayzman V, Hardy MP, Braley H, et al. CSL311, a novel, potent, therapeutic monoclonal antibody for the treatment of diseases mediated by the common beta chain of the IL-3, GM-CSF and IL-5 receptors. *MAbs*. 2016; 8(3):436-53.
99. Akuthota P, Weller PF. Eosinophils and disease pathogenesis. *Semin Hematol*. 2012; 49(2):113-9.

100. Esnault S, Kelly EA, Shen ZJ, Johansson MW, Malter JS, Jarjour NN. IL-3 Maintains Activation of the p90S6K/RPS6 Pathway and Increases Translation in Human Eosinophils. *J Immunol.* 2015;195(6):2529-39.
101. Nelson RK, Brickner H, Panwar B, Ramirez-Suastegui C, Herrera-de la Mata S, Liu N, et al. Human Eosinophils Express a Distinct Gene Expression Program in Response to IL-3 Compared with Common beta-Chain Cytokines IL-5 and GM-CSF. *J Immunol.* 2019;203(2):329-37.
102. Dougan M, Dranoff G, Dougan SK. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. *Immunity.* 2019;50(4):796-811.
103. Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(4):482-98.
104. Kalinauskaite-Zukauske V, Januskevicius A, Janulaityte I, Miliauskas S, Malakauskas K. Expression of eosinophil beta chain-signaling cytokines receptors, outer-membrane integrins, and type 2 inflammation biomarkers in severe non-allergic eosinophilic asthma. *BMC Pulm Med.* 2019;19(1):158.
105. Chiarella SE, Cardet JC, Prakash YS. Sex, Cells, and Asthma. *Mayo Clin Proc.* 2021; 96(7):1955-69.
106. Camoretti-Mercado B, Lockey RF. Airway smooth muscle pathophysiology in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(6):1983-95.
107. Doeing DC, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol (1985).* 2013;114(7):834-43.
108. Chetty A, Nielsen HC. Targeting Airway Smooth Muscle Hypertrophy in Asthma: An Approach Whose Time Has Come. *J Asthma Allergy.* 2021;14:539-56.
109. Berair R, Saunders R, Brightling CE. Origins of increased airway smooth muscle mass in asthma. *BMC Med.* 2013;11:145.
110. 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.
111. Agache I, Eguiluz-Gracia I, Cojanu C, Laculiceanu A, Del Giacco S, Zemelka-Wiacek M, et al. Advances and highlights in asthma in 2021. *Allergy.* 2021;76(11):3390-407.
112. Kunc P, Fabry J, Lucanska M, Pecova R. Biomarkers of Bronchial Asthma. *Physiol Res.* 2020;69(Suppl 1):S29-S34.
113. Nixon J, Newbold P, Mustelin T, Anderson GP, Kolbeck R. Monoclonal antibody therapy for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease with eosinophilic inflammation. *Pharmacol Ther.* 2017;169:57-77.
114. Coumou H, Bel EH. Improving the diagnosis of eosinophilic asthma. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(10):1093-103.
115. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(1):1-12.
116. Simon HU, Yousefi S, Germic N, Arnold IC, Haczku A, Karaulov AV, et al. The Cellular Functions of Eosinophils: Collegium Internationale Allergologica (CIA) Update 2020. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(1):11-23.
117. Brusselle G, Pavord ID, Landis S, Pascoe S, Lettis S, Morjaria N, et al. Blood eosinophil levels as a biomarker in COPD. *Respir Med.* 2018;138:21-31.
118. Nagase H, Ueki S, Fujieda S. The roles of IL-5 and anti-IL-5 treatment in eosinophilic diseases: Asthma, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int.* 2020;69(2):178-86.

119. Korevaar DA, Damen JA, Heus P, Moen MJ, Spijker R, van Veen IH, et al. Effectiveness of FeNO-guided treatment in adult asthma patients: A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy*. 2023;53(8):798-808.
120. Svenningsen S, Nair P. Asthma Endotypes and an Overview of Targeted Therapy for Asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:158.
121. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):16-27.
122. Badar A, Salem AM, Bamosa AO, Qutub HO, Gupta RK, Siddiqui IA. Association Between FeNO, Total Blood IgE, Peripheral Blood Eosinophil and Inflammatory Cytokines in Partly Controlled Asthma. *J Asthma Allergy*. 2020;13:533-43.
123. Li W, Gao P, Zhi Y, Xu W, Wu Y, Yin J, et al. Periostin: its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target. *Respir Res*. 2015;16(1):57.
124. Izuhara K, Nunomura S, Nanri Y, Ogawa M, Ono J, Mitamura Y, et al. Periostin in inflammation and allergy. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(23):4293-303.
125. Izuhara K, Nunomura S, Nanri Y, Ono J, Takai M, Kawaguchi A. Periostin: An emerging biomarker for allergic diseases. *Allergy*. 2019;74(11):2116-28.
126. Takahashi K, Meguro K, Kawashima H, Kashiwakuma D, Kagami SI, Ohta S, et al. Serum periostin levels serve as a biomarker for both eosinophilic airway inflammation and fixed airflow limitation in well-controlled asthmatics. *J Asthma*. 2019;56(3):236-43.
127. Georas SN. LPA and Autotaxin: Potential Drug Targets in Asthma? *Cell Biochem Biophys*. 2021;79(3):445-8.
128. Ito Y, Correll K, Schiel JA, Finigan JH, Prekeris R, Mason RJ. Lung fibroblasts accelerate wound closure in human alveolar epithelial cells through hepatocyte growth factor/c-Met signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(1):L94-105.
129. Nolin JD, Murphy RC, Gelb MH, Altemeier WA, Henderson WR, Jr., Hallstrand TS. Function of secreted phospholipase A(2) group-X in asthma and allergic disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(6):827-37.
130. Wilson TM, Maric I, Shukla J, Brown M, Santos C, Simakova O, et al. IL-5 receptor alpha levels in patients with marked eosinophilia or mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(5):1086-92 e1-3.
131. Wang J, Zhou J, Wang C, Fukunaga A, Li S, Yodoi J, et al. Thioredoxin-1: A Promising Target for the Treatment of Allergic Diseases. *Front Immunol*. 2022;13:883116.
132. Goswami S, Angkasekwinai P, Shan M, Greenlee KJ, Barranco WT, Polikepahad S, et al. Divergent functions for airway epithelial matrix metalloproteinase 7 and retinoic acid in experimental asthma. *Nat Immunol*. 2009;10(5):496-503.
133. Salomao R, Assis V, de Sousa Neto IV, Petriz B, Babault N, Durigan JLQ, et al. Involvement of Matrix Metalloproteinases in COVID-19: Molecular Targets, Mechanisms, and Insights for Therapeutic Interventions. *Biology (Basel)*. 2023;12(6).
134. Pelaia C, Heffler E, Crimi C, Maglio A, Vatrella A, Pelaia G, et al. Interleukins 4 and 13 in Asthma: Key Pathophysiologic Cytokines and Druggable Molecular Targets. *Front Pharmacol*. 2022;13:851940.
135. Pelaia C, Paoletti G, Puggioni F, Racca F, Pelaia G, Canonica GW, et al. Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Front Physiol*. 2019;10:1514.
136. Whetstone CE, Ranjbar M, Omer H, Cusack RP, Gauvreau GM. The Role of Airway Epithelial Cell Alarmins in Asthma. *Cells*. 2022;11(7).
137. Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res*. 2001;2(3):150-6.

138. Wu LC. Immunoglobulin E receptor signaling and asthma. *J Biol Chem.* 2011; 286(38):32891-7.
139. Zissler UM, Esser-von Bieren J, Jakwerth CA, Chaker AM, Schmidt-Weber CB. Current and future biomarkers in allergic asthma. *Allergy.* 2016;71(4):475-94.
140. Wechsler ME. Current and Emerging Biologic Therapies for Asthma and COPD. *Respir Care.* 2018;63(6):699-707.
141. Canonica GW, Spanevello A, de Llano LP, Domingo Ribas C, Blakey JD, Garcia G, et al. Is asthma control more than just an absence of symptoms? An expert consensus statement. *Respir Med.* 2022;202:106942.
142. Lommatzsch M, Brusselle GG, Levy ML, Canonica GW, Pavord ID, Schatz M, et al. A(2)BCD: a concise guide for asthma management. *Lancet Respir Med.* 2023;11(6): 573-6.
143. Chen CY, Wu KH, Guo BC, Lin WY, Chang YJ, Wei CW, et al. Personalized Medicine in Severe Asthma: From Biomarkers to Biologics. *Int J Mol Sci.* 2023;25(1).
144. Principe S, Porsbjerg C, Bolm Ditlev S, Kjaersgaard Klein D, Golebski K, Dyhre-Petersen N, et al. Treating severe asthma: Targeting the IL-5 pathway. *Clin Exp Allergy.* 2021;51(8):992-1005.
145. Bagnasco D, Caminati M, Ferrando M, Aloe T, Testino E, Canonica GW, et al. Anti-IL-5 and IL-5Ra: Efficacy and Safety of New Therapeutic Strategies in Severe Uncontrolled Asthma. *Biomed Res Int.* 2018;2018:5698212.
146. Giossi R, Pani A, Schroeder J, Scaglione F. Exploring the risk of infection events in patients with asthma receiving anti-IL-5 monoclonal antibodies: A rapid systematic review and a meta-analysis. *Heliyon.* 2024;10(1):e23725.
147. Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2012;380(9842):651-9.
148. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* 2014;371(13):1198-207.
149. Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, Prazma CM, Keene ON, Yancey SW, et al. Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* 2014;371(13):1189-97.
150. Chapman KR, Albers FC, Chipps B, Munoz X, Devouassoux G, Bergna M, et al. The clinical benefit of mepolizumab replacing omalizumab in uncontrolled severe eosinophilic asthma. *Allergy.* 2019;74(9):1716-26.
151. Chupp GL, Bradford ES, Albers FC, Bratton DJ, Wang-Jairaj J, Nelsen LM, et al. Efficacy of mepolizumab add-on therapy on health-related quality of life and markers of asthma control in severe eosinophilic asthma (MUSCA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicentre, phase 3b trial. *Lancet Respir Med.* 2017;5(5):390-400.
152. Castro M, Zangrilli J, Wechsler ME, Bateman ED, Brusselle GG, Bardin P, et al. Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. *Lancet Respir Med.* 2015;3(5):355-66.
153. Bleecker ER, FitzGerald JM, Chanez P, Papi A, Weinstein SF, Barker P, et al. Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting beta(2)-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2016;388(10056):2115-27.

154. FitzGerald JM, Bleecker ER, Nair P, Korn S, Ohta K, Lommatzsch M, et al. Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor alpha monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2016;388(10056): 2128-41.
155. Nair P, Wenzel S, Rabe KF, Bourdin A, Lugogo NL, Kuna P, et al. Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Benralizumab in Severe Asthma. *N Engl J Med*. 2017;376(25):2448-58.
156. Busse WW, Bleecker ER, FitzGerald JM, Ferguson GT, Barker P, Sproule S, et al. Long-term safety and efficacy of benralizumab in patients with severe, uncontrolled asthma: 1-year results from the BORA phase 3 extension trial. *Lancet Respir Med*. 2019;7(1):46-59.
157. Lawrence MG, Steinke JW, Borish L. Cytokine-targeting biologics for allergic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018;120(4):376-81.
158. Kuang FL. Approach to Patients with Eosinophilia. *Med Clin North Am*. 2020; 104(1):1-14.
159. Rimkunas A, Januskevicius A, Vasyle E, Palacionyte J, Janulaityte I, Miliauskas S, et al. Blood Inflammatory-like and Lung Resident-like Eosinophils Affect Migration of Airway Smooth Muscle Cells and Their ECM-Related Proliferation in Asthma. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4).
160. Edris A, De Feyter S, Maes T, Joos G, Lahousse L. Monoclonal antibodies in type 2 asthma: a systematic review and network meta-analysis. *Respir Res*. 2019;20(1):179.
161. Molfino NA, Kuna P, Leff JA, Oh CK, Singh D, Chernow M, et al. Phase 2, randomised placebo-controlled trial to evaluate the efficacy and safety of an anti-GM-CSF antibody (KB003) in patients with inadequately controlled asthma. *BMJ Open*. 2016;6(1): e007709.
162. Liu D, Zhong M, Zhan D, Zhang Y, Liu S. Roles of the HGF/Met signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Focus on tumor immunity (Review). *Oncol Rep*. 2020;44(6):2337-44.
163. Ito Y, Correll K, Zemans RL, Leslie CC, Murphy RC, Mason RJ. Influenza induces IL-8 and GM-CSF secretion by human alveolar epithelial cells through HGF/c-Met and TGF- α /EGFR signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(11): L1178-88.
164. Yamauchi Y, Ueki S, Konno Y, Ito W, Takeda M, Nakamura Y, et al. The effect of hepatocyte growth factor on secretory functions in human eosinophils. *Cytokine*. 2016;88:45-50.
165. Kuo CS, Pavlidis S, Zhu J, Loza M, Baribaud F, Rowe A, et al. Contribution of airway eosinophils in airway wall remodeling in asthma: Role of MMP-10 and MET. *Allergy*. 2019;74(6):1102-12.
166. Blumchen K, Kallinich T, Hamelmann E. Interleukin-5: a novel target for asthma therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2001;1(3):433-53.
167. Dozor AJ. The role of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1203:133-7.
168. Doni A, Garlanda C, Mantovani A. Innate immunity, hemostasis and matrix remodeling: PTX3 as a link. *Semin Immunol*. 2016;28(6):570-7.
169. Liu S, Qu X, Liu F, Wang C. Pentraxin 3 as a prognostic biomarker in patients with systemic inflammation or infection. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:421429.

170. Zhang J, Shan L, Koussih L, Redhu NS, Halayko AJ, Chakir J, et al. Pentraxin 3 (PTX3) expression in allergic asthmatic airways: role in airway smooth muscle migration and chemokine production. *PLoS One*. 2012;7(4):e34965.
171. Kim MJ, Lee HS, Sol IS, Kim MN, Hong JY, Lee KE, et al. Sputum pentraxin 3 as a candidate to assess airway inflammation and remodeling in childhood asthma. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(51):e5677.
172. Gao P, Tang K, Wang M, Yang Q, Xu Y, Wang J, et al. Pentraxin levels in non-eosinophilic versus eosinophilic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2018;48(8):981-9.
173. Hoshino T, Okamoto M, Takei S, Sakazaki Y, Iwanaga T, Aizawa H. Redox-regulated mechanisms in asthma. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(4):769-83.
174. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Sakazaki Y, Kinoshita T, Okamoto M, et al. Effects of thioredoxin on established airway remodeling in a chronic antigen exposure asthma model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360(3):525-30.
175. Hanschmann EM, Berndt C, Hecker C, Garn H, Bertrams W, Lillig CH, et al. Glutaredoxin 2 Reduces Asthma-Like Acute Airway Inflammation in Mice. *Front Immunol*. 2020;11:561724.
176. Ito W, Kobayashi N, Takeda M, Ueki S, Kayaba H, Nakamura H, et al. Thioredoxin in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155 Suppl 1:142-6.
177. Yamada Y, Nakamura H, Adachi T, Sannohe S, Oyamada H, Kayaba H, et al. Elevated serum levels of thioredoxin in patients with acute exacerbation of asthma. *Immunol Lett*. 2003;86(2):199-205.
178. Grzela K, Litwiniuk M, Zagorska W, Grzela T. Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma: the Role of Matrix Metalloproteinase-9. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(1):47-55.
179. Nomura A, Uchida Y, Sakamoto T, Ishii Y, Masuyama K, Morishima Y, et al. Increases in collagen type I synthesis in asthma: the role of eosinophils and transforming growth factor-beta. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(6):860-5.
180. Burgess JK, Mauad T, Tjin G, Karlsson JC, Westergren-Thorsson G. The extracellular matrix - the under-recognized element in lung disease? *J Pathol*. 2016;240(4):397-409.
181. Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):127-33.
182. Matsuyama T, Tomioka Y, Matsuyama H, Kamenohara Y, Tanigawa K, Dotake Y, et al. Severe asthma remaining well-controlled after mepolizumab discontinuation: A case report and literature review. *Respirol Case Rep*. 2023;11(6):e01158.
183. Rodriguez-Garcia C, Blanco-Aparicio M, Nieto-Fontarigo JJ, Blanco-Cid N, Gonzalez-Fernandez C, Mosteiro-Anon M, et al. Efficacy of mepolizumab in usual clinical practice and characteristics of responders. *Respir Med*. 2021;187:106595.
184. Maglio A, Vitale C, Pellegrino S, Calabrese C, D'Amato M, Molino A, et al. Real-Life Effectiveness of Mepolizumab on Forced Expiratory Flow between 25% and 75% of Forced Vital Capacity in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *Biomedicines*. 2021;9(11).
185. Bolke G, Tong X, Zuberbier T, Bousquet J, Bergmann KC. Extension of mepolizumab injection intervals as potential of saving costs in well controlled patients with severe eosinophilic asthma. *World Allergy Organ J*. 2022;15(10):100703.
186. Hassani M, Tak T, van Aalst C, van Nederveen S, Tesselaar K, Vriskoop N, et al. Differential effects of short- and long-term treatment with mepolizumab on eosinophil kinetics in blood and sputum in eosinophilic asthma. *iScience*. 2021;24(8):102913.
187. Kalinauskaitė-Zukauskė V, Janulaityte I, Januskevicius A, Malakauskas K. Serum levels of epithelial-derived mediators and interleukin-4/interleukin-13 signaling after

- bronchial challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma. *Scand J Immunol*. 2019;90(5):e12820.
188. Contoli M, Santus P, Menzella F, Rocchi C, Radovanovic D, Baraldi F, et al. Effects of anti-IL5 biological treatments on blood IgE levels in severe asthmatic patients: A real-life multicentre study (BIONIGE). *Clin Transl Allergy*. 2022;12(4):e12143.
 189. Magnan A, Bourdin A, Prazma CM, Albers FC, Price RG, Yancey SW, et al. Treatment response with mepolizumab in severe eosinophilic asthma patients with previous omalizumab treatment. *Allergy*. 2016;71(9):1335-44.
 190. Pelaia C, Crimi C, Pelaia G, Nolasco S, Campisi R, Heffler E, et al. Real-life evaluation of mepolizumab efficacy in patients with severe eosinophilic asthma, according to atopic trait and allergic phenotype. *Clin Exp Allergy*. 2020;50(7):780-8.
 191. Pelletier G, Godbout K, Boulay ME, Boulet LP, Morissette MC, Cote A. Increase in FeNO Levels Following IL5/IL5R-Targeting Therapies in Severe Asthma: A Case Series. *J Asthma Allergy*. 2022;15:691-701.
 192. Maglio A, Vitale C, Pelaia C, D'Amato M, Ciampo L, Sferra E, et al. Severe Asthma Remissions Induced by Biologics Targeting IL5/IL5r: Results from a Multicenter Real-Life Study. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
 193. Calderon AA, Dimond C, Choy DF, Pappu R, Grimbaldeston MA, Mohan D, et al. Targeting interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin pathways for novel pulmonary therapeutics in asthma and COPD. *Eur Respir Rev*. 2023;32(167).
 194. Yuan Q, Peng N, Xiao F, Shi X, Zhu B, Rui K, et al. New insights into the function of Interleukin-25 in disease pathogenesis. *Biomark Res*. 2023;11(1):36.
 195. Peng B, Sun L, Zhang M, Yan H, Shi G, Xia Z, et al. Role of IL-25 on Eosinophils in the Initiation of Th2 Responses in Allergic Asthma. *Front Immunol*. 2022;13:842500.
 196. Angulo EL, McKernan EM, Fichtinger PS, Mathur SK. Comparison of IL-33 and IL-5 family mediated activation of human eosinophils. *PLoS One*. 2019;14(9):e0217807.
 197. 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(6):829-39.
 198. Tang W, Smith SG, Beaudin S, Dua B, Howie K, Gauvreau G, et al. IL-25 and IL-25 receptor expression on eosinophils from subjects with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163(1):5-10.
 199. Iwaszko M, Bialy S, Bogunia-Kubik K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells*. 2021;10(11).
 200. Noval Rivas M, Burton OT, Oettgen HC, Chatila T. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):801-11 e9.
 201. Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophils in the spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med*. 2013;19(8):977-9.
 202. Neilsen CV, Bryce PJ. Interleukin-13 directly promotes oesophagus production of CCL11 and CCL24 and the migration of eosinophils. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(3):427-34.
 203. Kelly EA, Esnault S, Liu LY, Evans MD, Johansson MW, Mathur S, et al. Mepolizumab Attenuates Airway Eosinophil Numbers, but Not Their Functional Phenotype, in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(11):1385-95.
 204. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, Vrtis RF, Gern JE, Kita H, et al. Decreased expression of membrane IL-5 receptor alpha on human eosinophils: I. Loss of membrane IL-5 receptor alpha on airway eosinophils and increased soluble IL-5 receptor alpha in the airway after allergen challenge. *J Immunol*. 2002;169(11):6452-8.

205. Messingham KN, Holahan HM, Frydman AS, Fullenkamp C, Srikantha R, Fairley JA. Human eosinophils express the high affinity IgE receptor, FcεRI, in bullous pemphigoid. *PLoS One*. 2014;9(9):e107725.
206. Gounni AS, Lamkhioued B, Delaporte E, Dubost A, Kinet JP, Capron A, et al. The high-affinity IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy? *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94(6 Pt 2):1214-6.
207. Monino-Romero S, Lexmond WS, Singer J, Bannert C, Amoah AS, Yazdanbakhsh M, et al. Soluble FcεRI: A biomarker for IgE-mediated diseases. *Allergy*. 2019;74(7):1381-4.
208. Pelaia G, Canonica GW, Matucci A, Paolini R, Triggiani M, Paggiaro P. Targeted therapy in severe asthma today: focus on immunoglobulin E. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:1979-87.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsnių, kuriuose buvo paskelbti disertacijos tyrimų rezultatai, sąrašas

1. **Palačionytė, Jolita;** Januškevičius, Andrius; Vasylė, Eglė; Rimkūnas, Airidas; Bajoriūnienė, Ieva; Miliauskas, Skaidrius; Malakauskas, Kęstutis. IL-5 and GM-CSF, but Not IL-3, Promote the Proliferative Properties of Inflammatory-like and Lung Resident-like Eosinophils in the Blood of Asthma Patients // *Cells*. Basel : MDPI, 2022, vol. 11, no. 23, p. 1-18. (Cit. rod.: 7.8, Q2 (2022. InCites JCR SCIE)).
2. **Palačionytė, Jolita;** Januškevičius, Andrius; Vasylė, Eglė; Rimkūnas, Airidas; Bajoriūnienė, Ieva; Vitkauskienė, Astra; Miliauskas, Skaidrius; Malakauskas, Kęstutis. Novel Serum Biomarkers for Patients with Allergic Asthma Phenotype // *Biomedicines*, 2024, t. 12, nr. 1, p. 1 – 18. (Cit. rod.: 4.7, Q1 (2022. InCites JCR SCIE)).
3. **Palačionytė, Jolita;** Januškevičius, Andrius; Vasylė, Eglė; Rimkūnas, Airidas; Miliauskas, Skaidrius; Malakauskas, Kęstutis. Clinical Remission Criteria and Serum Levels of Type 2 Inflammation Mediators during 24 Weeks of Treatment with the Anti-IL-5 Drug Mepolizumab in Patients with T2-High Severe Asthma // *Diagnostics*, 2024, 14, 1345. (Cit. rod.: 3.6, Q2 (2022. InCites JCR SCIE)).

Kiti straipsniai

1. **Palačionytė, Jolita;** Januškevičius, Andrius; Malakauskas, Kęstutis. The Role of eosinophilopoietins and integrins on eosinophils biology in asthma = : Eozinofilopoetinų ir integrinų vaidmuo eozinofilų biologinėms savybėms sergant astma // *Pulmonologija ir alergologija*. Kaunas : UAB „Vitae Litera“, 2020, t. 4, Nr. 2, p. 143-150.
2. **Palačionytė, Jolita;** Malakauskas, Kęstutis. 2 tipo kvėpavimo takų uždegimas ir jo slopinimas biologiniais vaistais sergant astma ir lėtine obstrukcine plaučių liga = : Type 2 airway inflammation and inhibition of biological drugs in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *Pulmonologija ir alergologija*. Kaunas : UAB „Vitae Litera“, 2021, t. 5, Nr. 2, p. 138-146.

Mokslinių konferencijų, kuriose buvo paskelbti disertacijos tyrimų rezultatai, sąrašas

1. **Palačionytė, Jolita**; Rimkūnas, Airidas; Vasylė, Eglė; Januškevičius, Andrius; Malakauskas, Kęstutis. Effect of eosinophilopoetins on proliferative properties of blood eosinophil subtypes in allergic asthma // ERJ Open Research (European respiratory journal open research) : 20th ERS Lung Science Conference (LSC) : 10-13 March 2022, Estoril, Portugal. Sheffield : European Respiratory Society, 2022, vol. 8, suppl. 8, March, p. 224-224.
2. **Palačionytė, Jolita**; Rimkūnas, Airidas; Vasylė, Eglė; Januškevičius, Andrius; Malakauskas, Kęstutis. Eozinofilopoetinų poveikis eozinofilų potipių proliferaciją skatinančioms savybėms sergant alergine astma = Effect of eosinophilopoetins on proliferative properties of eosinophil subtypes in allergic asthma // Pulmonologija ir alergologija = Pulmonology and Allergology : Mokslinės tezės. Kaunas : UAB „Vitae Litera“, 2022, t. 6, Nr. 1, p. 70-70.
3. **Palačionytė, Jolita**; Rimkūnas, Airidas; Vasylė, Eglė; Januškevičius, Andrius; Malakauskas, Kęstutis. Activation of blood eosinophil subtypes proliferative properties by eosinophilopoetins in severe non-allergic eosinophilic asthma // European respiratory journal : ERS International congress 2022 abstracts : Barcelona, Spain, 4-6 September, 2022 / European Respiratory Society (ERS). Sheffield : European Respiratory Society, 2022, vol. 60, suppl. 66, p. 1-1.
4. **Palačionytė, Jolita**; Rimkūnas, Airidas; Vasylė, Eglė; Januškevičius, Andrius; Malakauskas, Kęstutis. Effect of eosinophilopoetins on proliferative properties of blood eosinophil subtypes in allergic asthma // ERJ Open Research (European respiratory journal open research) : 20th ERS Lung Science Conference (LSC) : 10-13 March 2022, Estoril, Portugal. Sheffield : European Respiratory Society, 2022, vol. 8, suppl. 8, March, p. 224-224.
5. **Palačionytė, Jolita**; Rimkūnas, Airidas; Vasylė, Eglė; Januškevičius, Andrius; Miliauskas, Skaidrius; Malakauskas, Kęstutis. Thioredoxin-1 and soluble interleukin-5 receptor subunit alpha as biomarkers of allergic and non-allergic asthma // ERJ open research : [21st]. ERS Lung Science Conference 2023 [Post-viral lung diseases – from basic immunology to clinical phenotypes and therapy] : [9–12 March, 2023, Estoril, Portugal] / European Respiratory Society. Sheffield : European Respiratory Society, 2023, vol. 9, issue suppl. 10, p. 1-1.

6. **Palačionytė, Jolita;** Vasylė, Eglė; Rimkūnas, Airidas; Januškevičius, Andrius; Vitkauskienė, Astra; Miliauskas, Skaidrius; Malakauskas, Kęstutis. Blood biological active substances combined with fractional exhaled nitric oxide levels as potential biomarkers for type 2 asthma phenotyping // Health for All: 2023 - International Conference Health for All “Rare diseases” : abstract book : Kaunas, Lithuania, 19-20th April, 2023 / [organised: Council of LSMU Doctoral Students]. Kaunas : Lithuanian University of Health Sciences, 2023, p. 40-41.
7. **Palačionytė, Jolita;** Rimkūnas, Airidas; Vasylė, Eglė; Januškevičius, Andrius; Vitkauskienė, Astra; Malakauskas, Kęstutis. Biologiškai aktyvios medžiagos kaip potencialūs biologiniai žymenys 2 tipo kvėpavimo takų uždegimui atpažinti = Biologically active substances as potential biomarkers for the recognition of type 2 airway inflammation // Pulmologija ir alergologija = Pulmonology and Allergology : Mokslinės tezės. Kaunas : UAB „Vitae Litera“, 2023, t. 7, Nr. 1, p. 75-76.

Mokslinių publikacijų disertacijos tema kopijos

Norint pakartotinai naudoti MDPI paskelbtą straipsnį, įskaitant paveikslus ir lenteles, nereikia specialaus leidimo.



Article

IL-5 and GM-CSF, but Not IL-3, Promote the Proliferative Properties of Inflammatory-like and Lung Resident-like Eosinophils in the Blood of Asthma Patients

Jolita Palacionyte ^{1,*}, Andrius Januskevicius ², Egle Vasyle ², Airidas Rimkunas ², Ieva Bajoriuniene ³, Skaidrius Miliauskas ¹ and Kestutis Malakauskas ^{1,2}

¹ Department of Pulmonology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania

² Laboratory of Pulmonology, Department of Pulmonology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania

³ Department of Immunology and Allergology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania

* Correspondence: jolita.palacionyte@ismuni.lt; Tel.: +370-625-91727



Citation: Palacionyte, J.; Januskevicius, A.; Vasyle, E.; Rimkunas, A.; Bajoriuniene, I.; Miliauskas, S.; Malakauskas, K. IL-5 and GM-CSF, but Not IL-3, Promote the Proliferative Properties of Inflammatory-like and Lung Resident-like Eosinophils in the Blood of Asthma Patients. *Cells* **2022**, *11*, 3804. <https://doi.org/10.3390/cells11233804>

Academic Editors: Dale D. Tang and Steven S. An

Received: 24 October 2022

Accepted: 24 November 2022

Published: 28 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Blood eosinophils can be described as inflammatory-like (iEOS-like) and lung-resident-like (rEOS-like) eosinophils. This study is based on the hypothesis that eosinophilopoetins such as interleukin (IL)-3 and IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) alter the proliferative properties of eosinophil subtypes and may be associated with the expression of their receptors on eosinophils. We investigated 8 individuals with severe nonallergic eosinophilic asthma (SNEA), 17 nonsevere allergic asthma (AA), and 11 healthy subjects (HS). For AA patients, a bronchial allergen challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus* was performed. Eosinophils were isolated from peripheral blood using high-density centrifugation and magnetic separation methods. The subtyping of eosinophils was based on magnetic bead-conjugated antibodies against L-selectin. Preactivation by eosinophilopoetins was performed by incubating eosinophil subtypes with IL-3, IL-5, and GM-CSF, and individual combined cell cultures were prepared with airway smooth muscle (ASM) cells. ASM cell proliferation was assessed using an Alamar blue assay. The gene expression of eosinophilopoetin receptors was analyzed with a qPCR. IL-5 and GM-CSF significantly enhanced the proliferative properties of iEOS-like and rEOS-like cells on ASM cells in both SNEA and AA groups compared with eosinophils not activated by cytokines ($p < 0.05$). Moreover, rEOS-like cells demonstrated a higher gene expression of the IL-3 and IL-5 receptors compared with iEOS-like cells in the SNEA and AA groups ($p < 0.05$). In conclusion: IL-5 and GM-CSF promote the proliferative properties of iEOS-like and rEOS-like eosinophils; however, the effect of only IL-5 may be related to the expression of its receptors in asthma patients.

Keywords: asthma; eosinophil; IL-3; IL-5; GM-CSF; proliferation; airway smooth muscle cells; gene expression

1. Introduction

Eosinophils are terminally differentiated, bone-marrow-derived, granule-containing leukocytes [1]. Typically, these cells are present in relatively low numbers in peripheral blood, about one percent of all leukocytes [2]. Despite the low number, they are considered the most important inflammatory cells in asthma. Eosinophils have primarily been regarded as proinflammatory cells involved in host protection against parasite infection and the immunopathology of allergic diseases. It is now known that eosinophils contribute to a wide variety of physiological and pathological processes, including metabolism, tissue remodeling and development, epithelial regulation, and immunoregulation, indicating that these cells may play a crucial role in metabolic regulation and organ function and diseases [3,4].

Nearly half of asthma patients have predominant eosinophilic inflammation in their blood and airways [5]. A higher eosinophil count in the airway is associated with bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation, and airflow limitation. It is determinative of intense asthma symptoms, more frequent exacerbations, and a more severe disease course [4,6]. At least two subtypes of eosinophils have been identified and differ according to their role in asthma pathogenesis. One subtype is the lung-resident eosinophil (rEOS), and the other is the inflammatory eosinophil (iEOS) [5]. Eosinophil count in the blood or lungs, survival, maturation, and activation are promoted by cytokines called eosinophilopoetins, of which interleukin (IL) 3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) are examples. Eosinophilopoetins are also observed to affect eosinophil proliferative properties [7] and the hypertrophy and proliferation of pulmonary structural cells, including airway smooth muscle (ASM) cells [8].

Eosinophils express receptors for multiple growth factors and cytokines on their surface [9]. Eosinophilopoetins may enhance the receptor expression of IL-3, IL-5, and GM-CSF, which can lead to excessive signal transduction and alter the disease course [10]. IL-3, IL-5, and GM-CSF are classified as β -chain cytokines because they share a common β -chain and have unique cytokine-specific α -chains [11–13]. Eosinophilopoetins possess unique characteristics for eosinophil activation; that way, different cytokines can differentially affect eosinophil functions, and eosinophil subtypes can exhibit different reactions to the same eosinophilopoetin [14]. The effects of eosinophilopoetins depend not only on the concentration of these cytokines but also on the number of receptors on the eosinophil surface [13]. For this reason, anticytokine receptor antibodies, in addition to anticytokines, may also be considered as an effective therapy for patients with asthma who are not responding to conventional treatment [15].

Eosinophils contain about 200 morphologically distinct cytoplasmic granules containing over 35 types of mediators [16]. They produce cytokines, chemokines, and growth factors that cause various structural changes in the airways in a process referred to as airway remodeling [17]. Airway remodeling is characterized by an increased ASM mass due to hyperplasia and hypertrophy, subepithelial fibrosis, goblet cell hyperplasia, submucosal mucus gland hypertrophy, and other pathological processes [18]. One of the main pathological processes that causes the clinical manifestation of asthma and severity of the disease is hyperplasia of ASM cells [9]. ASM cells usually maintain their airway diameter by modulating airway tone, so the dysfunction of ASM cells is an important component of obstructive pulmonary diseases, particularly asthma. External stimuli such as allergens, dust, air pollutants, and changes in environmental temperature provoke ASM cell hypertrophy and proliferation and cause ASM cell dysfunction [19].

Most patients achieve adequate symptom control through inhaled glucocorticoid-based treatment. However, a proportion of patients continue to experience persistent and severe disease despite good adherence to inhaled steroids, leading to frequent exacerbations requiring treatment with oral glucocorticoids. Regardless of the success of biologic anti-IL-5 therapy in severe eosinophilic asthma, a subset of patients continue to have uncontrolled symptoms and exacerbations [4]. It is therefore appropriate to continue to delve into the mechanisms of eosinophilic asthma to improve asthma treatment. The novelty of our study is that we activate blood eosinophil subtypes with eosinophilopoetins and use them in combined cultures with ASM cells in an attempt to demonstrate their different proliferative properties. We also hypothesize that the bronchial allergen challenge might enhance the response of certain eosinophil subtypes to activation by eosinophilopoetins. In this research, therefore, we aimed to investigate the effect of IL-3, IL-5, and GM-CSF on the proliferative properties of blood rEOS-like and iEOS-like cells that might be associated with the expression of their receptors in asthma patients.

2. Materials and Methods

2.1. Investigation Protocol

All subjects were introduced to the study and allowed sufficient time to familiarize themselves with the study protocol, and all questions were answered. The investigations were started after the person signed the investigation protocol, which was approved for use on humans by the regional biomedical ethics committee (BE-2-58). All data were anonymized by assigning unique numbers. The study was registered on ClinicalTrials.gov with the identification number NCT04542902.

2.2. Study Design

This study included 46 adults. Men and women aged 18–80 participated in the study. The subjects were divided into three groups: healthy subjects (HS), SNEA, and AA patients. Patients were recruited from the Department of Pulmonology at the Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kaunas Clinics. The inclusion and exclusion criteria are shown in Table 1.

Table 1. Inclusion and exclusion criteria.

	SNEA Group	AA Group	HS
Inclusion criteria	Asthma history ≥ 12 months	Asthma symptoms ≥ 12 months	No chronic respiratory or other lung diseases
	Negative skin prick test	Nonsevere course of the disease	
Exclusion criteria	Peripheral blood eosinophil $\geq 0.3 \times 10^9/L$	Inhaled steroids free period of at least 3 months	Negative skin prick test
	High doses of inhaled steroids + long-acting beta agonist + episodic use of oral steroids	Positive skin prick test to <i>D. pteronyssinus</i>	
		Positive metacholine challenge test / positive bronchial reversibility test	
		Clinically significant allergy symptoms	
		Active airway infection ≤ 1 months prior to study	
		Coronavirus infectious disease 2019 (COVID-19) ≤ 1 months prior to study	
		Asthma exacerbation ≤ 1 months prior to study	
		Use of oral steroids ≤ 1 months prior to study	
		Active smoking (at least one cigarette a day)	
		Former smoker (at least 100 cigarettes in lifetime)	

AA—allergic asthma; HS—healthy subjects; SNEA—severe nonallergic eosinophilic asthma.

All participants were invited to the study no later than four weeks after the approval of the inclusion or exclusion criteria. Participants were required to stay 30 min to 2 h from their arrival at the hospital. AA patients visited the hospital twice (at baseline and 24 h after the bronchial allergen challenge) and all other participants visited the hospital once. Before beginning the research, an informed consent form was given to each research subject, and research started after this was signed by the subject. The research plan is shown in Table 2.

Table 2. Research plan.

	SNEA Group (n = 18)	AA Group (n = 17)	HS (n = 11)
Screening visit (visit 1)			
Inclusion and exclusion criteria	✓	✓	✓
Written informed consent	✓	✓	✓
CBC	✓	✓	✓
Spirometry	✓	✓	✓
Metacholine challenge test/bronchial reversibility test	ND	✓	ND
Skin prick test	✓	✓	✓
Experimental day (visit 2)			

Table 2. Cont.

	SNEA Group (n = 18)	AA Group (n = 17)	HS (n = 11)
CBC	✓	✓	✓
IgE	✓	✓	✓
Fe _{NO} measurement	✓	✓	✓
Spirometry	✓	✓	✓
Bronchial challenge with <i>D. pteronyssinus</i>	ND	✓	ND
Experimental day 24 h after bronchial allergen challenge (visit 3)			
CBC	ND	✓	ND
IgE	ND	✓	ND
Fe _{NO} measurement	ND	✓	ND
Spirometry	ND	✓	ND

AA—allergic asthma; CBC—complete blood count; Fe_{NO}—fractional exhaled nitric oxide; HS—healthy subjects; IgE—immunoglobulin E; ND—not done; SNEA—severe nonallergic eosinophilic asthma.

A graphic of study design is shown in Figure 1.

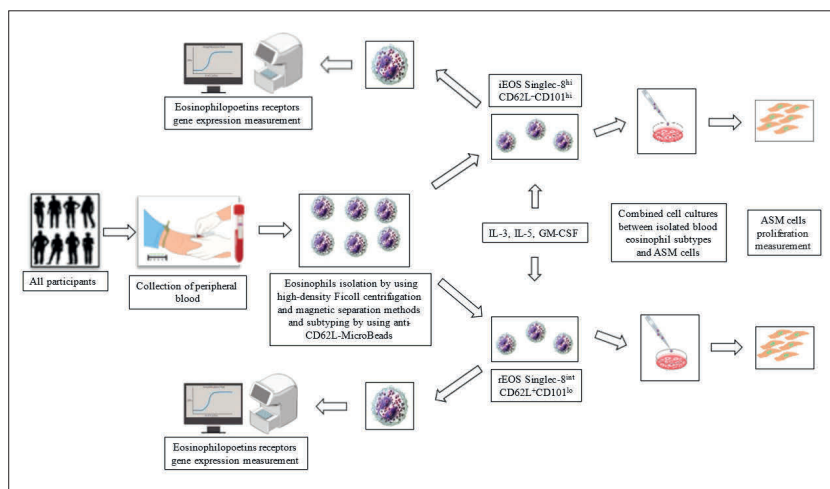


Figure 1. Graphical overview of the study design. ASM—airway smooth muscle; IL—interleukin; GM-CSF—granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; CD—cluster of differentiation.

2.3. Complete Blood Count and Immunoglobulin E

Peripheral blood samples of participants were drawn into vacutainers containing dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid (K2EDTA) (BD Vacutainer®, Becton Dickinson UK Ltd., Wokingham, UK). For all routine clinical chemistry assays, samples were directly transported to the laboratory of our hospital. XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan) and UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System automated hematology analyzer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA, JAV) was used for the complete blood count test. An AIA-2000 automated immunoassay analyzer (Tosoh Bioscience, South San Francisco, CA, USA, JAV)

was used for the immunoglobulin E (Ig E) level test. Blood tests were processed under tightly controlled and monitored conditions. A detailed blood analysis is described below.

2.4. Spirometry

Spirometry was performed on all participants at least three times. An ultrasonic spirometer was used to test the lung function (Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany). Details of the techniques for performing this procedure are described in [20].

2.5. Metacholine Challenge Test

A metacholine challenge test was performed on AA patients, except those with airflow limitations noted at the screening visit. For the inhalation of methacholine, a dosimeter was used (ProvoX, Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany), and lung function was checked every 2 min. The methacholine challenge test was completed when the forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) decreased by 20%. Details of the techniques for performing this procedure are described in [20].

2.6. Bronchial Reversibility Test

A bronchial reversibility test was performed only for 5 subjects in the AA group that had airflow limitations noted at the screening visit. This test was performed using a Ganshorn spirometer (Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany). Spirometry was performed before and 15 min after salbutamol inhalation (400 mcg). The procedure performance technique is described in [21].

2.7. Skin Prick Testing

All patients underwent skin prick allergy testing with *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, cat and dog dander, five mixed grass pollens, birch pollen, mugwort, *Alternaria*, *Aspergillus*, and *Cladosporium* using standardized allergen extracts (Stallergenes, S.A., Antony, France). Details of the techniques for performing this procedure are described in [20].

2.8. Fractional Exhaled Nitric Oxide Test

A fractional exhaled nitric oxide (Fe_{NO}) analysis was performed on all study participants. For subjects of the AA group, Fe_{NO} levels were recorded twice: before and 24 h after the bronchial challenge with the *D. pteronyssinus* allergen. We used a single exhalation and electrochemical assay (NIOX VERO, Circassia, UK) according to the methodology described in [20].

2.9. Bronchial Challenge with *D. pteronyssinus*

A bronchial challenge with the *D. pteronyssinus* allergen (DIATER, Madrid, Spain) was performed on all AA group participants who were sensitized to *D. pteronyssinus*. For the inhalation of this allergen, we used a dosimeter (ProvoX, Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany). The bronchial challenge with the *D. pteronyssinus* test was stopped when the FEV₁ decreased by 20%. The whole procedure is described in [20].

2.10. Peripheral Blood Cell Analysis

Approximately 40 mL of peripheral blood from each subject was collected into sterile vacutainer tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and delivered to the laboratory. In group AA patients, blood tests were repeated and tested 24 h after the bronchial challenge with *D. pteronyssinus*. Erythrocytes and granulocytes were isolated using high-density Ficoll centrifugation. Eosinophils were separated using magnetic separation methods. The phenotyping of eosinophils was based on magnetic bead-conjugated antibodies against L-selectin. These procedures are described in detail in [22].

2.11. Eosinophil Activation

Isolated eosinophil subtypes were transferred into separate Eppendorf® vacutainer tubes with different eosinophilopoetins: IL-3, IL-5, or GM-CSF (all three eosinophilopoetins were used at 10 ng/mL). We prepared 6 vacutinners and adjusted the volume to 500 µL using a DMEM cell culture. The samples were incubated in a thermostat for 3 h and then centrifugated for 10 min (speed 400 g). After centrifugation, the supernatant was decanted into a separate container. The eosinophils remaining in the tube were resuspended with the DMEM cell culture and were poured onto ASM cells.

2.12. Airway Smooth Muscle Cell Proliferation Assay

Healthy human ASM cells were isolated from one donor. For each study, individual combined cell cultures between isolated and affected by eosinophilopoetins blood eosinophil subtypes and ASM cells were prepared. We used 0.5×10^5 viable eosinophils and 2×10^5 ASM cells grown for 3 days for all experiments. ASM cell proliferation was assessed using an Alamar blue assay, with details described in [22].

2.13. Gene Expression Assessment

The expression levels of IL-3, IL-5, and GM-CSF genes were determined for both eosinophil subtypes with qPCR using the commercial Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The process is described in detail [22]. The gene expression changes were evaluated based on a fold change between different eosinophil subtypes in the same group and of the same eosinophil subtypes between different groups.

2.14. Statistical Analysis

A statistical analysis was performed using SPSS statistical software (IBM SPSS Statistics 20; Chicago, IL, USA). The Shapiro–Wilk test was used to test the assumption of normality in the data distribution. The data distribution did not pass the normality test, so a nonparametric Mann–Whitney two-sided U-test and Wilcoxon matched-pair, signed-rank, two-sided test were used. The minimal limit for a statistically significant difference in values was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Study Subject Characteristics

In this study, 18 SNEA patients, 17 steroid-free nonsevere AA patients, and 11 HS (a total of 46 adults) were included. Demographic and clinical characteristics of the study population are shown in Table 3. The SNEA patients were significantly older than the AA and HS groups, as SNEA usually manifests as a late-onset disease. A higher body mass index value was recorded for SNEA than for AA and HS. A significant decrease in FEV₁ was observed only in SNEA patients. The blood eosinophil counts were higher in SNEA and AA patients than HS patients, with a higher count in the SNEA group. No differences in Fe_NO levels were found in both asthma groups. The IgE levels in the serum were higher in SNEA and AA patients than HS patients, with the highest level in the AA group.

Table 3. Demographic and clinical characteristics of the study population.

	SNEA Patients	AA Patients	HS
Number, n	18	17	11
Sex, M/F	4/14	12/5	3/8
Age, years	57.8 ± 2.4 ^{*#}	28.1 ± 2.4	31.4 ± 3.2
BMI, kg/m ²	29.9 ± 1.6 ^{*#}	24.0 ± 0.9	25.3 ± 1.2
FEV ₁ , L	1.6 ± 0.1 ^{*#}	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2
FEV ₁ , % of predicted	58.9 ± 4.7 ^{*#}	86.8 ± 2.4 [#]	99.1 ± 3.5
PD _{20M} , mean (range), mg	ND	0.22 ± 0.34	ND
PD _{20A} , mean (range), HEP/mL	ND	14.12 ± 1.92	ND
Blood eosinophil count, ×10 ⁹ /L	0.63 ± 0.09 ^{*#}	0.39 ± 0.05 ^{#§}	0.17 ± 0.02
Blood eosinophil count 24 h after allergen challenge, ×10 ⁹ /L	ND	0.51 ± 0.06	ND
Fe _{NO} , ppb	49.1 ± 8.3 [#]	51.6 ± 8.9 ^{#§}	10.8 ± 1.9
Fe _{NO} , 24 h after allergen challenge, ppb	ND	78.2 ± 12.6	ND
IgE, IU/mL	158.8 ± 45.2 ^{*#}	837.3 ± 316.7 [#]	18.2 ± 5.0
IgE, 24 h after allergen challenge, IU/mL	ND	861.1 ± 323.1	ND

AA—allergic asthma; BMI—body mass index; F—female; Fe_{NO}—fractional exhaled nitric oxide; FEV₁—forced expiratory volume in 1s; IgE—immunoglobulin E; M—male; ND—not done; PD_{20A}—the *D. pteronyssinus* allergen provocation dose causing a 20% decrease in FEV₁; PD_{20M}—the provocation dose of methacholine causing a 20% decrease in FEV₁; SNEA—severe nonallergic eosinophilic asthma. Data presented as mean ± standard error of the mean. * $p < 0.05$ compared with AA group. # $p < 0.05$ compared with HS group. § $p < 0.05$ compared with AA group after allergen challenge.

3.2. Effect of IL-3, IL-5, GM-CSF on Eosinophil Subtypes Pro-Proliferative Properties

IL-3 did not affect the proliferative properties of any eosinophil subtypes in the SNEA group ($p > 0.05$); however, IL-5 and GM-CSF significantly enhanced the effect on the proliferative properties of iEOS-like and rEOS-like cells ($p < 0.05$). Compared with ASM cells incubated with nonactivated eosinophils, the ASM cell number increased by 47.6 ± 6.5% and 51.2 ± 7.3% after a 72 h coculture with iEOS-like cells and by 48.0 ± 5.8% and 62.4 ± 4.5% after a 72 h coculture with rEOS-like for activation with IL-5 and GM-CSF, respectively ($p < 0.05$). Compared with the SNEA group, there was no significant difference ($p > 0.05$) in ASM cell number for coculture with IL-3-, IL-5-, and GM-CSF-activated iEOS-like cells.

In the AA group, IL-5 and GM-CSF significantly enhanced the effect of iEOS-like and rEOS-like cells on ASM cell proliferation ($p < 0.05$). Compared with ASM cells incubated with nonactivated eosinophils, the ASM cell number increased by 26.6 ± 4.1% and 34.8 ± 4.3% after a 72 h coculture with iEOS-like cells and 38.3 ± 1.6% and 35.1 ± 3.7% for rEOS-like cells ($p < 0.05$) when activated with IL-5 and GM-CSF, respectively. At the same time, IL-3 had no significant impact on any eosinophil subtypes ($p > 0.05$). Compared with the AA group, there was no significant difference ($p > 0.05$) in ASM cell number for the coculture with IL-3-, IL-5-, and GM-CSF-activated iEOS-like cells ($p > 0.05$).

In the HS group, IL-5 had a significant effect on the proliferative properties of iEOS-like cells ($p < 0.05$). The ASM cell number after 72 h of incubation in a coculture with IL-5 activated iEOS-like cells increased by 18.6 ± 2.9% compared with ASM cells incubated with nonactivated eosinophils ($p < 0.05$). At the same time, IL-3 and GM-CSF had no significant impact on any eosinophil subtypes ($p > 0.05$). Compared with the HS group, there was no significant difference ($p > 0.05$) in ASM cell number for the coculture with IL-3-, IL-5-, and GM-CSF-activated iEOS-like cells ($p > 0.05$).

The effect of IL-5 on the proliferative properties of iEOS-like cells was higher in the SNEA group than in the AA group (ASM cell number increased by 47.6 ± 6.5% vs. 26.6 ± 4.1%). Mean-

while, the effect of GM-CSF on the proliferative properties of rEOS-like cells was higher compared with the AA group (ASM cell number increased by $62.4 \pm 4.5\%$ vs. $35.1 \pm 3.7\%$, $p < 0.05$).

The effect of IL-3 and GM-CSF on the proliferative properties of iEOS-like cells was higher in the AA group than the HS group (ASM cell number increased, respectively, by $19.6 \pm 3.6\%$; $34.8 \pm 4.3\%$ vs. $9.4 \pm 2.1\%$; $7.4 \pm 1.9\%$, $p < 0.05$) while the effect of IL-3, IL-5, and GM-CSF on the proliferative properties of rEOS-like cells was higher in the AA group than the HS group (ASM cell number increased by $29.3 \pm 4.9\%$, $38.3 \pm 1.6\%$, $35.1 \pm 3.7\%$ vs. $9.3 \pm 1.6\%$, $13.4 \pm 1.0\%$, $12.0 \pm 2.7\%$, respectively, $p < 0.05$). The effect of IL-3, IL-5, and GM-CSF on the proliferative properties of both eosinophil subtypes was higher in the SNEA group than the HS group (ASM cell number increased by $26.6 \pm 1.8\%$, $47.6 \pm 6.5\%$, and $51.2 \pm 7.2\%$, respectively, for iEOS-like cells and $32.1 \pm 3.8\%$, $48.0 \pm 5.8\%$, and $62.4 \pm 4.5\%$, respectively, for rEOS-like cells vs. $9.4 \pm 2.1\%$, $18.6 \pm 2.9\%$, and $7.4 \pm 1.9\%$, respectively, for iEOS-like cells and $9.3 \pm 1.6\%$, $13.4 \pm 1.0\%$, and $12.0 \pm 2.7\%$, respectively, for rEOS-like cells, $p < 0.05$, Figure 2).

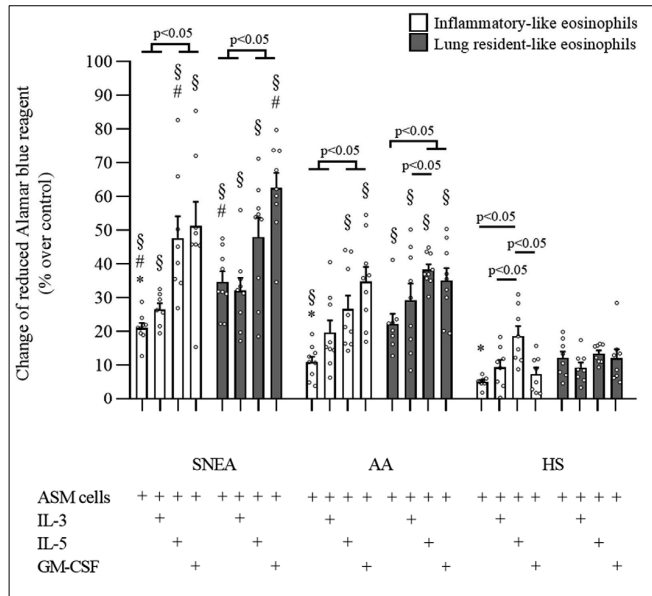


Figure 2. Effect of eosinophilopoetins on proliferative properties of blood eosinophil subtypes. ASM—airway smooth muscle; IL—interleukin; GM-CSF—granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Severe nonallergic eosinophilic asthma (SNEA) group $n = 10$, nonsevere allergic asthma (AA) group $n = 9$, healthy subjects (HS) group $n = 8$. Data presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ compared with appropriate rEOS-like cells in the same group. # $p < 0.05$ compared with appropriate eosinophil subtypes from AA group. § $p < 0.005$ compared with appropriate eosinophil subtypes from HS group. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test. Data presented as the mean \pm standard error of the mean.

3.3. Effect of Eosinophilopoietins on Pro-Proliferative Properties of Eosinophil Subtypes after Allergen Activation In Vivo

The effect on the proliferative properties of eosinophil subtypes following an in vivo provoked acute allergic asthma episode after the bronchial allergen challenge was determined by comparing the results before and 24 h after the allergen challenge of the same subject.

The bronchial allergen challenge significantly increased the effect of IL-5 and GM-CSF on the proliferative properties of rEOS-like cells ($p < 0.05$). After 72 h of incubation in coculture with IL-5- and GM-CSF-activated rEOS-like cells, the ASM cell number increased by $61.1 \pm 7.0\%$ and $66.2 \pm 7.3\%$, respectively, compared with the ASM cells incubated with nonactivated eosinophils, and by $38.3 \pm 1.6\%$ and $35.1 \pm 3.7\%$ ($p < 0.05$), respectively, compared with ASM cells incubated with IL-5- and GM-CSF-activated eosinophils before bronchial allergen challenge. Meanwhile, IL-3 had no significant effect on rEOS-like cells ($p > 0.05$).

The bronchial allergen challenge did not significantly change the ASM cell number after 72 h of incubation in coculture with IL-3-, IL-5-, and GM-CSF-activated iEOS-like cells compared with the same cells before the bronchial allergen challenge ($p > 0.05$) (Figure 3).

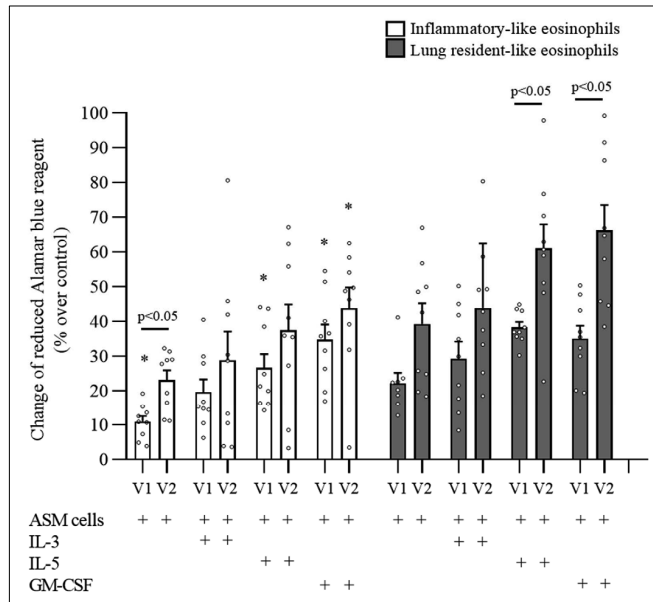


Figure 3. The effect of bronchial allergen challenge on proliferative properties of blood eosinophil subtypes in allergic asthma. ASM—airway smooth muscle; IL—interleukin; GM-CSF—granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, V1—visit 1 (before bronchial allergen challenge); V2—visit 2 (24 h after bronchial allergen challenge). Results from independent experiments of AA, n = 8. Data presented as the mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ compared with appropriate rEOS-like cells. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test. Data presented as the mean \pm standard error of the mean.

3.4. Gene Expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR

Compared with iEOS-like cells, rEOS-like cells isolated from the SNEA and AA groups showed a higher expression of the IL-3 receptor gene (respectively 1.2 ± 0.5 ; 2.1 ± 0.7 folds, $p < 0.05$). Meanwhile, in the HS group, the expression of the IL-3 receptor gene did not significantly differ ($p > 0.05$) between eosinophil subtypes. rEOS-like cells isolated from the SNEA, AA, and HS groups showed a higher expression of the IL-5 receptor gene compared with iEOS-like cells (5.1 ± 1.7 -, 1.7 ± 0.7 -, and 1.7 ± 0.8 -fold, respectively, $p < 0.05$). In the SNEA group, a higher expression of the GM-CSF receptor gene was observed in the isolated iEOS-like compared with rEOS-like cells (1.9 ± 0.5 -fold, $p < 0.05$). Meanwhile, in the AA and HS groups, the expression of the GM-CSF receptor gene did not significantly differ ($p > 0.05$) between the eosinophil subtypes (Figure 4).

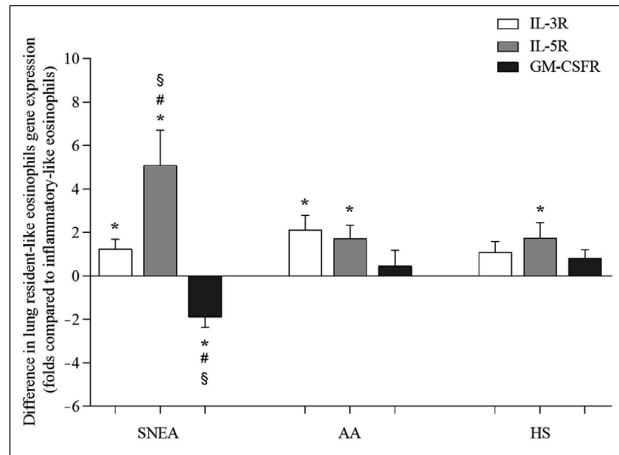
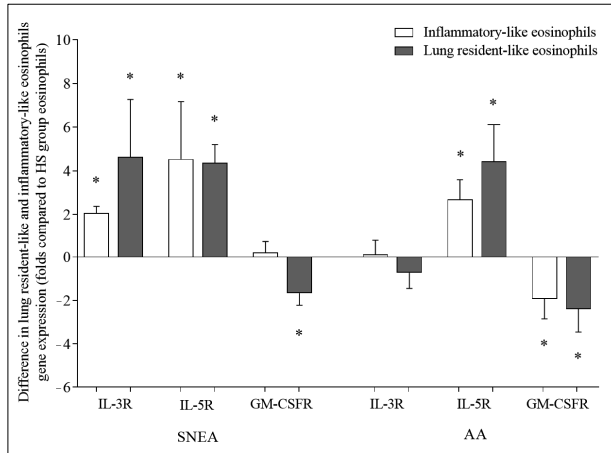
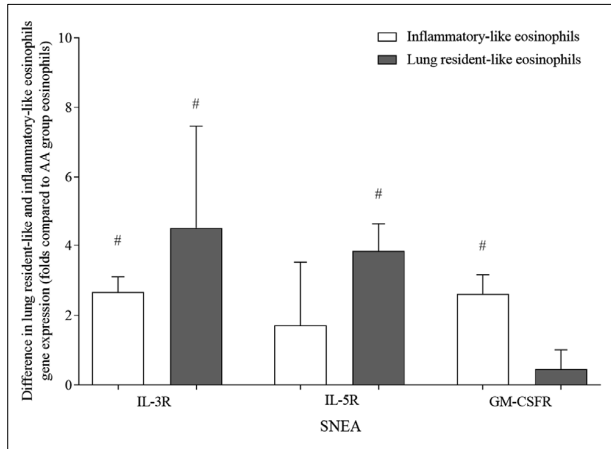


Figure 4. Differences in expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR genes between lung resident-like and inflammatory-like eosinophils in the same groups. IL-3R—interleukin 3 receptor; IL-5R—interleukin 5 receptor; GM-CSFR—granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. Severe nonallergic eosinophilic asthma (SNEA) group $n = 10$, nonsevere allergic asthma (AA) group $n = 8$, healthy subjects (HS) group $n = 11$. Data presented as the mean \pm standard error of the mean, fold change over expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR gene on inflammatory-like eosinophils. * $p < 0.05$ compared with inflammatory-like eosinophils; # $p < 0.05$ compared with AA group; § $p < 0.05$ compared with HS group. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test. Data presented as the mean \pm standard error of the mean.

A higher expression of the IL-3 receptor gene was observed in iEOS-like and rEOS-like cells isolated from the SNEA group than from the HS group (2.1 ± 0.3 - and 4.6 ± 2.6 -fold, respectively, $p < 0.05$). A higher expression of the IL-5 receptor gene was observed in the iEOS-like and rEOS-like cells isolated from the SNEA and AA groups than in the iEOS-like cells isolated from the HS group (4.5 ± 2.6 -, 4.3 ± 0.8 -, 2.7 ± 0.9 -, and 4.4 ± 1.7 -fold, respectively, $p < 0.05$). A higher expression of the GM-CSF receptor gene was observed in rEOS-like cells isolated from the HS group than from the SNEA group (1.7 ± 0.6 -fold, $p < 0.05$). Meanwhile, a higher expression of the GM-CSF receptor gene was observed in iEOS-like and rEOS-like cells isolated from the HS group than from the SNEA group (1.9 ± 0.9 - and 2.4 ± 1.1 -fold, respectively, $p < 0.05$) (Figure 5a).



(a)



(b)

Figure 5. Differences in expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR genes between eosinophil subtypes. Comparison of (a) SNEA and AA groups with HS group; (b) SNEA group with AA group. IL-3R—interleukin, 3 receptor; IL-5R—interleukin 5 receptor; GM-CSFR—granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. Severe nonallergic eosinophilic asthma (SNEA) group n = 10, nonsevere allergic asthma (AA) group n = 8, healthy subjects (HS) group n = 11. Data presented as the mean ± standard error of the mean, fold change over expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR gene in HS and AA groups. * $p < 0.05$ compared with HS group, # $p < 0.05$ compared with AA group. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test. Data presented as the mean ± standard error of the mean.

A higher expression of the IL-3 receptor gene was observed in iEOS-like and rEOS-like cells isolated from the SNEA group than from the AA group (2.6 ± 0.4 - and 4.5 ± 2.9 -fold, respectively, $p < 0.05$). Meanwhile, a higher expression of the IL-5 receptor gene was observed in the rEOS-like cells isolated from the SNEA group than from the AA group (3.8 ± 0.5 -fold, $p < 0.05$). A higher expression of the GM-CSF receptor gene was observed in iEOS-like cells isolated from the SNEA group than from the AA group (3.6 ± 0.5 -fold, $p < 0.05$) (Figure 5b).

3.5. Effect of Allergen Activation on Expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR Genes

The effect on expression of eosinophilopoietin receptors of an in vivo provoked acute allergic asthma episode after bronchial allergen challenge was determined by comparing the results before and 24 h after the bronchial allergen challenge of the same subject.

Bronchial allergen challenge significantly increased the expression of the IL-3 receptor genes on iEOS-like cells compared with the same cells before the bronchial allergen challenge (7.0 ± 5.4 folds, $p < 0.05$). Meanwhile, the expression of the IL-5 and GM-CSF receptor genes did not significantly differ for both eosinophil subtypes before and after the bronchial allergen challenge ($p > 0.05$). (Figure 6).

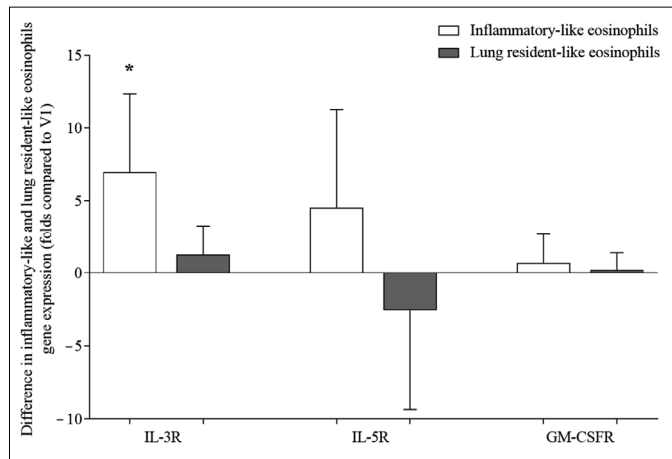


Figure 6. Differences in the expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR genes before and after bronchial allergen challenge. V2, visit 2 (24 h after bronchial allergen challenge). IL-3R—interleukin 3 receptor; IL-5R—interleukin 5 receptor; GM-CSFR—granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. Results from independent experiments of AA, $n = 8$. Data presented as the mean \pm standard error of the mean, fold change over expression of IL-3R, IL-5R, and GM-CSFR gene after bronchial allergen challenge. * $p < 0.05$ compared with V2. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test. Data presented as the mean \pm standard error of the mean.

4. Discussion

Eosinophilic inflammation predominates in half of asthmatic patients, and eosinophil counts in the airway and blood are associated with the severity of the disease. Eosinophils themselves as well as their maturation and activity in regulating cytokines called eosinophilopoietins are all prominent components of eosinophilic inflammation [6]. Our study results revealed that IL-5 and GM-CSF, but not IL-3, exhibited a significant effect on the proliferative properties

of eosinophil subtypes in asthma patients. Moreover, we found that after the *in vivo* activation of AA patients by a bronchial allergen challenge, only rEOS-like cells demonstrated a tendency to be more activated by IL-5 and GM-CSF, with no effect on iEOS-like cells. Furthermore, eosinophil subtypes differed in the expression of eosinophilopoietin receptors; however, only IL-5R might be related with an effect on the proliferative properties of eosinophil subtypes.

Eosinophil is an active inflammatory cell that produces diverse cytokines, chemokines, and growth factors. During chronic airway inflammatory diseases, such as asthma, eosinophil activity is triggered, leading to abnormal infiltration into the airways and the disturbance of local homeostasis. At least two subtypes of eosinophils have been identified, and they differ according to their role in asthma pathogenesis. Studies identifying these populations in mouse models suggest that rEOS and iEOS have distinct biological roles: rEOS are homeostatic cells with a primary function of maintaining tissue homeostasis, while iEOS are mainly involved in immune responses [23]. This allows us to speculate that their effect on the physiology of lung structural cells, such as proliferation, also differs, which may be related to different responses to elevated levels of proinflammatory cytokines in patient blood. Our study is based on the blood-circulating eosinophils. These cells are released into the bloodstream in an active form and express airway tissue eosinophil-specific markers. For this reason, blood-circulating eosinophils could give sufficient information about their behavior before infiltration into asthmatic lungs.

Eosinophil development and functions depend on several cytokines, including IL-3, IL-5, and GM-CSF [24]. IL-3 and IL-5 are expressed mainly by activated T lymphocytes and mast cells. GM-CSF is produced by T cells, epithelial cells, and macrophages [10]. All three cytokines have a common beta (β)-chain receptor subunit and different specificities for alpha (α)-chain subunits. These three cytokines can differentially affect eosinophil functions due to the regulation and trafficking of their specific α -chain receptors on the eosinophil surface, and their specific downstream intracellular signaling in a β -chain-independent manner [14].

Tai et al. demonstrated that any of the β c family cytokines increase blood eosinophil survival by preventing programmed cell death in human blood eosinophils [25]. Esnault et al. compared the effects of β -chain cytokines on eosinophil biology and demonstrated that IL-3 has a stronger effect than any other β c family cytokines in activating eosinophils [14]. However, despite the strong effect of IL-3 on eosinophil activity, the effects might be related to the stronger affinity to eosinophil IL-3 receptors rather than concentration in asthmatic patients' blood [22].

The role of eosinophils in the development of airway remodeling, including the proliferation of ASM cells, was established relatively early [26]. ASM cells control muscle tone and thus regulate the opening of the airway lumen and air passage. Evidence indicates that ASM cells participate in airway hyperresponsiveness and the inflammatory and remodeling processes observed in asthmatic subjects [27]. The contribution of eosinophils to airway remodeling in asthma depends not only on their increased infiltration but also their survivability in airways, which prolongs their effect on pulmonary structural cells [8]. Previously, we demonstrated that the inclusion of either eosinophil subtypes in a coculture significantly increased the proliferation of ASM cells; however, no studies have been conducted with eosinophilopoietin-activated eosinophil subtypes to date. In this study, we aimed to determine the effect of eosinophils on the proliferative properties of eosinophil subtypes. Our use of combined eosinophilopoietin-activated blood eosinophil subtypes and the ASM cell culture model by simulating the processes *in vivo* revealed that IL-5 and GM-CSF, but not IL-3, are important for their proliferative properties. Both these cytokines significantly enhanced the effect of both iEOS-like and rEOS-like cells on ASM cell proliferation in AA and SNEA groups. Moreover, it was disclosed that activation by IL-5 and GM-CSF was more pronounced for the eosinophils of asthma patients than for the control HS. Ryan and colleagues found that IL-3 is the cytokine among the β -chain receptor cytokines that produces the most distinct eosinophil gene expression program; from our

data, however, we can conclude that this dysregulation in the expression of this gene is not associated with the pro-proliferative properties of eosinophils.

People with asthma experience shortness of breath, cough, wheezing, and chest tightness. All these symptoms are associated with airway inflammation, obstruction, and airway remodeling [17]. This established correlation has prompted the development of eosinophil-targeting immunotherapies for decreasing eosinophilic count in the treatment of severe eosinophilic asthma. However, despite the biologic therapies, a subset of patients with severe eosinophilic asthma failed to achieve effective disease control [28]. The effect of IL-5 on the pro-proliferative properties of rEOS-like and iEOS-like cells might potentially be managed by anti-IL-5 antibodies; however, the condition remains poorly controlled by this treatment for some patients. A similar pro-proliferative effect of GM-CSF might be a suggestion for advanced and combined therapies targeting the main, eosinophils-related ASM remodeling in asthma. Moreover, the severe course of the disease, related to the group of SNEA patients with less control, indicates the enhanced response of iEOS-like cells to IL-5 and of rEOS-like cells to GM-CSF. This allows us to separate the responses between eosinophil subtypes and distinct eosinophilopoetins that, in combination with additional individual blood eosinophil subtypes-like cells quantity determination, could allow for the application of personalized treatment according to the disease phenotype.

The airways are constantly in contact with irritants, viruses, microbes, and allergens that can cause and exacerbate asthma [17]. During airway inflammation, when the airways are exposed to allergens, epithelial cells release signaling molecules that activate T helper 2 cells (Th2) or innate lymphoid type-2 cells (ILC2), which produce airway inflammatory cytokines [29,30]. To evaluate the effect of eosinophilopoetins in mimicking asthma exacerbations, we used the most common *D. pteronyssinus* house dust mite allergen with which humans constantly come into contact. iEOS-like cells are proinflammatory effector cells that are closely linked with immune responses. During a bronchial allergen challenge, these cells might be more strongly activated compared with resident eosinophils. However, our study revealed that in vivo activation after a bronchial allergen challenge enhances the proliferative properties of iEOS-like cells but does not increase their response to activation by any eosinophilopoetin. We can assume that iEOS-like cells are released in bone marrow in a more activated state or have a larger quantity of activated eosinophilopoetin receptors. Therefore, their pro-proliferative properties are less affected by increased levels of β -chain cytokines. However, Mesnil et al. (2016) described a distinct subtype of the eosinophil's population, called rEOS, in inflammatory conditions [5]. This allows us to assume that steady-state rEOS-like cells might be less activated, and the bronchial allergen challenge, related to an acute asthma episode and a release of various proinflammatory cytokines, enhanced their response to IL-5 or GM-CSF and proliferative effects on ASM cells. We can speculate that enhanced ASM remodeling in acute asthma might be related to switched homeostatic rEOS-like cell functions and may be related to activation by IL-5 and GM-CSF but not to the more pronounced proliferative properties of iEOS-like cells.

Eosinophil activation by IL-3, IL-5, or GM-CSF depends not only on the concentration but on these cytokines and the number of β -chain cytokine receptors on the eosinophil surface. IL-3, IL-5, and GM-CSF share a common β -chain and have cytokine-specific α -chains [7]. Despite all three cytokines sharing a standard β -chain receptor subunit, each differentially affects the eosinophil biology due to the alpha (α) chain subunit-specific properties [31]. We assumed that the expression of the eosinophilopoetin receptor gene in eosinophil subtypes could play an important role in regulating the eosinophil proliferative properties, ASM cell proliferation, and airway structural changes. We sought to determine the expression of IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor genes by focusing on expected eosinophilopoetin receptor counts on the eosinophil surface in different subject groups. Important differences between iEOS-like and rEOS-like cells were obtained regarding the expression of eosinophilopoetin receptor genes. rEOS-like cells were distinguished by a higher expression of the IL-3 receptor than in iEOS-like cells in both asthma groups. The IL-3 receptor gene expression of both eosinophil subtypes was significantly higher in the

SNEA group than in the AA and HS groups; however, we found no relation between IL-3 activation and the proliferative properties of eosinophil subtypes. Thus, an increase in IL-3 receptors could be related to the biological properties of other eosinophil subtypes, especially for iEOS-like cells during acute asthma episodes, which needs to be investigated. Evaluating the expression of the IL-5 receptor gene, we found strong upregulation in both eosinophil-like cell subtypes of asthma groups compared with the HS group. We can conclude that increased IL-5R gene expression might be related to the enhanced proliferative properties of iEOS-like and rEOS-like cells after activation by IL-5.

GM-CSF receptor gene expression, as well as the IL-3 receptor, might not be related to the proliferative properties of eosinophil-like cell subtypes. Differently to IL-3R and IL-5R, the expression of the GM-CSFR gene of both subtypes in AA and in rEOS-like cells of SNEA patients was significantly downregulated compared with the HS group. β -Chain cytokine receptors have a specific ligand-related cross-regulation mechanism. Whole eosinophilopoetins can downregulate IL-5 receptor and upregulate IL-3 receptor expression, while GM-CSF receptors are downregulated by GM-CSF itself in rEOS under inflammatory conditions. Blood-circulating IL-5 and especially GM-CSF levels are enhanced in asthma [21]; therefore, it might be related to significantly lower GM-CSFR mRNA levels in blood eosinophil subtype-like cells in asthma and less activation of eosinophil by GM-CSF in our *in vitro* model. However, the quantity of eosinophilopoetin receptors is not the main reason for signal transduction. The receptors of eosinophilopoetin exist as monomers on unstimulated cells—these are inactive, while signal transmission is possible only after activation. Eosinophilopoetins bind to their respective α -chain with low affinity, and the subsequent recruitment of the β -chain contributes to a conformational change with a significant association with binding in a complex. The enhancement of the proliferative properties of eosinophil subtypes after activation with GM-CSF might be due to more receptors being in an activated state. Moreover, iEOS-like cells of SNEA patients could be distinguished from the population of rEOS-like cells by enhanced GM-CSF receptor gene expression. This difference could be considered a characteristic feature of SNEA, which allowed us to predict the GM-CSF cytokine as a possible target to reduce the effect of iEOS-like cells on ASM remodeling.

We established that the effect of IL-5 and GM-CSF on the eosinophil subtypes significantly increased the ASM cell number. It leads to the thickening of the airway wall and plays an important role in airway remodeling. For this reason, ASM cell proliferation can be associated with a severe course of asthma and weakened lung function. The United States Food and Drug Administration (FDA) approved the first humanized monoclonal antibody, which blocks IL-5 (mepolizumab), to treat the severe asthma eosinophilic phenotype in 2015. After 2 years, the same institution approved the second humanized monoclonal antibody, which blocks IL-5 receptors (benralizumab). Anti-IL-5 and anti-IL-5 receptor antibody treatment significantly decrease the frequency of asthma exacerbations and the use of systemic glucocorticoids, improving lung function and quality of life [31–35].

Based on the data, we think that the GM-CSF block might be an alternative target in treating asthma. The first study in asthma patients with an anti-GM-CSF monoclonal antibody was performed in 2012–2014. This two-phase study's main aim to improve lung function was not met in the overall population; however, forced expiratory volume in 1 s (FEV1) significantly increased in the group of patients with >300 peripheral blood eosinophils/mL at baseline. No significant effect in reducing asthma exacerbations or improving asthma control was found in this study as well. It is being considered that the study population or study medication dose was not a good choice [36]. To date, no further clinical trials have been conducted with anti-GM-CSF antibodies.

Our study had several limitations. A potential restriction of the eosinophil subtype model used in the study is that after the isolation of the total blood eosinophil population from granulocytes, rEOS-like cells were isolated by positive selection against CD62L, keeping iEOS-like cells as CD62L negative cells. However, the isolated eosinophil population was not 100% pure, and other CD62L-negative blood cells can contaminate the popula-

tion of iEOS-like cells. Incidentally, not all the purified eosinophils remained viable after 72 h of incubation with ASM cells. Therefore, the proliferation data in this study may be related to residual viable eosinophils. However, we assessed that activated eosinophils can rapidly degranulate and release proliferative mediators that affect ASM cells even when eosinophils are nonviable. Moreover, in the AA group, eosinophils were assessed during the active allergic reaction after the bronchial allergen challenge but not during the late allergic reaction. We think eosinophils may have been more activated in the late allergic reaction due to more pronounced eosinophilic inflammation. We investigated the expression levels of IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor genes. As gene expression does not always reflect the levels of mature receptors, our conclusions based only on the expression of eosinophilopoietin receptor genes is limited.

In conclusion, IL-5 and GM-CSF demonstrated a significant effect on the proliferative properties of eosinophil subtypes in patients with asthma; the exposure of these eosinophilopoietins to eosinophil subtypes significantly increased the ASM cell number. However, ASM cell proliferation was associated with the expression of only the IL-5 receptor gene in eosinophil subtypes. Though we did not detect an IL-3 effect on eosinophil proliferative properties, IL-3 undoubtedly acts on the eosinophil by altering its other functions, but more research is needed to determine the details.

Author Contributions: Conceptualization: J.P., A.J., S.M. and K.M.; data curation, J.P., E.V., A.J., A.R., I.B., S.M. and K.M.; formal analysis, J.P., E.V., A.J. and K.M.; investigation, J.P., E.V., A.J., S.M., and A.R.; methodology, J.P., E.V., A.J., A.R., S.M. and K.M.; resources, J.P., E.V., A.J., A.R., I.B., S.M. and K.M.; supervision, K.M.; validation, J.P., E.V. and A.J.; visualization, J.P.; writing—original draft, J.P.; writing—review and editing, A.J. and K.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Research Council of Lithuania (project number S-MIP-21-17) and the Science Foundation of the Lithuanian University of Health Sciences.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee of the Lithuanian University of Health Sciences with permission no. BE-2-58. Furthermore, this research study was registered in the US National Institutes of Health trial registry ClinicalTrials.gov with identifier NCT04542902.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All the data presented in this study are included in this article.

Acknowledgments: We are grateful to Reinoud Gosens from Groningen University, the Netherlands, for providing human telomerase reverse transcriptase airway smooth muscle cells and valuable experimental advice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References




1. Weller, P.F.; Spencer, L.A. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 746–760. [CrossRef]
2. Park, Y.M.; Bochner, B.S. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **2010**, *2*, 87–101. [CrossRef]
3. Kita, H. Eosinophils: Multifunctional and distinctive properties. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2013**, *161* (Suppl. S2), 3–9. [CrossRef]
4. Wechsler, M.E.; Munitz, A.; Ackerman, S.J.; Drake, M.G.; Jackson, D.J.; Wardlaw, A.J.; Dougan, S.K.; Berdnikovs, S.; Schleich, F.; Matucci, A.; et al. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clin. Proc.* **2021**, *96*, 2694–2707. [CrossRef]
5. Mesni, L.C.; Raulier, S.; Paulissen, G.; Xiao, X.; Birrell, M.A.; Pirottin, D.; Janss, T.; Starkl, P.; Ramery, E.; Henket, M.; et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 3279–3295. [CrossRef]
6. Ilmarinen, P.; Kankaanranta, H. Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *114*, 109–117. [CrossRef]
7. Gregory, B.; Kirchem, A.; Phipps, S.; Gevaert, P.; Pridgeon, C.; Rankin, S.M.; Robinson, D.S. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 5359–5366. [CrossRef]

8. Januskevicius, A.; Janulaityte, I.; Kalinauskaite-Zukauske, V.; Gosens, R.; Malakauskas, K. The Enhanced Adhesion of Eosinophils Is Associated with Their Prolonged Viability and Pro-Proliferative Effect in Asthma. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1274. [CrossRef]
9. McBrien, C.N.; Menzies-Gow, A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front. Med.* **2017**, *4*, 93. [CrossRef]
10. Broughton, S.E.; Dhagat, U.; Hercus, T.R.; Nero, T.L.; Grimbaldston, M.A.; Bonder, C.S.; Lopez, A.F.; Parker, M.W. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: From ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol. Rev.* **2012**, *250*, 277–302. [CrossRef]
11. Lampinen, M.; Carlson, M.; Hakansson, L.D.; Venge, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* **2004**, *59*, 793–805. [CrossRef]
12. Panousis, C.; Dhagat, U.; Edwards, K.M.; Rayzman, V.; Hardy, M.P.; Braley, H.; Gauvreau, G.M.; Hercus, T.R.; Smith, S.; Sehmi, R.; et al. CSL311, a novel, potent, therapeutic monoclonal antibody for the treatment of diseases mediated by the common beta chain of the IL-3, GM-CSF and IL-5 receptors. *MAbs* **2016**, *8*, 436–453. [CrossRef]
13. Guthridge, M.A.; Stomski, F.C.; Thomas, D.; Woodcock, J.M.; Bagley, C.J.; Berndt, M.C.; Lopez, A.F. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* **1998**, *16*, 301–313. [CrossRef]
14. Esnault, S.; Kelly, E.A. Essential Mechanisms of Differential Activation of Eosinophils by IL-3 Compared to GM-CSF and IL-5. *Crit. Rev. Immunol.* **2016**, *36*, 429–444. [CrossRef]
15. Lin, S.C.; Shi, L.S.; Ye, Y.L. Advanced Molecular Knowledge of Therapeutic Drugs and Natural Products Focusing on Inflammatory Cytokines in Asthma. *Cells* **2019**, *8*, 685. [CrossRef]
16. Davoine, F.; Lacy, P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: Emerging roles in immunity. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 570. [CrossRef] [PubMed]
17. Holgate, S.T.; Wenzel, S.; Postma, D.S.; Weiss, S.T.; Renz, H.; Sly, P.D. Asthma. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2015**, *1*, 15025. [CrossRef]
18. Berair, R.; Saunders, R.; Brightling, C.E. Origins of increased airway smooth muscle mass in asthma. *BMC Med.* **2013**, *11*, 145. [CrossRef] [PubMed]
19. Chetty, A.; Nielsen, H.C. Targeting Airway Smooth Muscle Hypertrophy in Asthma: An Approach Whose Time Has Come. *J. Asthma Allergy* **2021**, *14*, 539–556. [CrossRef] [PubMed]
20. Januskevicius, A.; Jurkeviciute, E.; Janulaityte, I.; Kalinauskaite-Zukauske, V.; Miliuskas, S.; Malakauskas, K. Blood Eosinophils Subtypes and Their Survivability in Asthma Patients. *Cells* **2020**, *9*, 1248. [CrossRef]
21. Kalinauskaite-Zukauske, V.; Januskevicius, A.; Janulaityte, I.; Miliuskas, S.; Malakauskas, K. Expression of eosinophil beta chain-signaling cytokines receptors, outer-membrane integrins, and type 2 inflammation biomarkers in severe non-allergic eosinophilic asthma. *BMC Pulm. Med.* **2019**, *19*, 158. [CrossRef]
22. Jurkeviciute, E.; Januskevicius, A.; Rimkunas, A.; Palacionyte, J.; Malakauskas, K. alpha4beta1 and alphaMbeta2 Integrin Expression and Pro-Proliferative Properties of Eosinophil Subtypes in Asthma. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 829. [CrossRef] [PubMed]
23. Abdala-Valencia, H.; Coden, M.E.; Chiarella, S.E.; Jacobsen, E.A.; Bochner, B.S.; Lee, J.J.; Berdnikovs, S. Shaping eosinophil identity in the tissue contexts of development, homeostasis, and disease. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *104*, 95–108. [CrossRef] [PubMed]
24. Kuang, F.L. Approach to Patients with Eosinophilia. *Med. Clin. N. Am.* **2020**, *104*, 1–14. [CrossRef]
25. Tai, P.C.; Sun, L.; Spry, C.J. Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* **1991**, *85*, 312–316. [CrossRef] [PubMed]
26. Nakagome, K.; Nagata, M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2220. [CrossRef]
27. Camoretti-Mercado, B.; Lockey, R.F. Airway smooth muscle pathophysiology in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *147*, 1983–1995. [CrossRef]
28. Van Hulst, G.; Batugedara, H.M.; Jorssen, J.; Louis, R.; Bureau, F.; Desmet, C.J. Eosinophil diversity in asthma. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *179*, 113963. [CrossRef]
29. Fahy, J.V. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 57–65. [CrossRef]
30. KleinJan, A. Airway inflammation in asthma: Key players beyond the Th2 pathway. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2016**, *22*, 46–52. [CrossRef]
31. Pavord, I.D.; Korn, S.; Howarth, P.; Bleeker, E.R.; Buhl, R.; Keene, O.N.; Ortega, H.; Chanez, P. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): A multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2012**, *380*, 651–659. [CrossRef] [PubMed]
32. Chupp, G.L.; Bradford, E.S.; Albers, F.C.; Bratton, D.J.; Wang-Jairaj, J.; Nelsen, L.M.; Trevor, J.L.; Magnan, A.; Brinke, A. Efficacy of mepolizumab add-on therapy on health-related quality of life and markers of asthma control in severe eosinophilic asthma (MUSCA): A randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicentre, phase 3b trial. *Lancet Respir. Med.* **2017**, *5*, 390–400. [CrossRef] [PubMed]
33. Bleeker, E.R.; FitzGerald, J.M.; Chanez, P.; Papi, A.; Weinstein, S.F.; Barker, P.; Sproule, S.; Gilmartin, G.; Aurivillius, M.; Werkström, V.; et al. Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting beta 2-agonists (SIROCCO): A randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **2016**, *388*, 2115–2127. [CrossRef] [PubMed]

34. FitzGerald, J.M.; Bleecker, E.R.; Nair, P.; Korn, S.; Ohta, K.; Lommatzsch, M.; Ferguson, G.T.; Busse, W.W.; Barker, P.; Sproule, S.; et al. Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor α monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **2016**, *388*, 2128–2141. [CrossRef]
35. Edris, A.; De Feyter, S.; Maes, T.; Joos, G.; Lahousse, L. Monoclonal antibodies in type 2 asthma: A systematic review and network meta-analysis. *Respir. Res.* **2019**, *20*, 179. [CrossRef] [PubMed]
36. Molfino, N.A.; Kuna, P.; Leff, J.A.; Oh, C.K.; Singh, D.; Chernow, M.; Sutton, B.; Yarranton, G. Phase 2, randomised placebo-controlled trial to evaluate the efficacy and safety of an anti-GM-CSF antibody (KB003) in patients with inadequately controlled asthma. *BMJ Open* **2016**, *6*, e007709. [CrossRef]

Article

Novel Serum Biomarkers for Patients with Allergic Asthma Phenotype

Jolita Palacionyte ^{1,*}, Andrius Januskevicius ², Egle Vasyle ², Airidas Rimkunas ², Ieva Bajoriuniene ³, Astra Vitkauskiene ⁴, Skaidrius Miliauskas ¹ and Kestutis Malakauskas ^{1,2}

¹ Department of Pulmonology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania; skaidrius.miliauskas@lsmu.lt (S.M.); kestutis.malakauskas@lsmu.lt (K.M.)

² Laboratory of Pulmonology, Department of Pulmonology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania; andrius.januskevicius@lsmu.lt (A.J.); egle.jurkeviciute@lsmu.lt (E.V.); airidas.rimkunas@lsmu.lt (A.R.)

³ Department of Immunology and Allergology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania; ieva.bajoriuniene@lsmu.lt

⁴ Department of Laboratory Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania; astra.vitkauskiene@lsmu.lt

* Correspondence: jolita.palacionyte@lsmu.lt; Tel.: +370-625-91727

Abstract: In distinguishing the allergic asthma (AA) phenotype, it has been identified that specific biomarkers could assist; however, none of them are considered ideal. This study aimed to analyze three groups of biologically active substances in the serum. Twenty steroid-free AA patients, sensitized to *Dermatophagoides pteronyssinus*, and sixteen healthy subjects (HSs) were enrolled in this study. Blood samples were collected from all patients. Additionally, all AA patients underwent a bronchial allergen challenge (BAC) with *Dermatophagoides pteronyssinus*, all of which were positive, and blood samples were collected again 24 h later. The concentrations of ten biologically active substances were measured in the serum samples, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the Luminex® 100/200™ System technology for bead-based multiplex and singleplex immunoassays. Descriptive and analytical statistical methods were used. A *p*-value of 0.05 or lower was considered statistically significant. The soluble interleukin 5 receptor subunit alpha (sIL-5R α) and thioredoxin 1 (TRX1) concentrations were significantly increased, whereas those of tyrosine-protein kinase Met (MET), pentraxin 3 (PTX3), and I C-telopeptide of type I collagen (ICTP) were decreased in the AA group compared with the HS group. A significant positive correlation was noted for sIL-5R α with fractional exhaled nitric oxide (FeNO), blood eosinophil (EOS) count, and total immunoglobulin E (IgE) levels, and a negative correlation was noted with forced expiratory volume in 1 s (FEV₁). Moreover, PTX3 showed negative correlations with blood EOS count and total IgE levels, whereas ICTP exhibited a negative correlation with the blood EOS count. In conclusion, this study demonstrated that the serum concentrations of MET, PTX3, TRX1, ICTP, and particularly sIL-5R α could potentially serve as biomarkers of the AA phenotype.

Keywords: allergic asthma; biomarker; serum biologically active substance; eosinophil; fraction of exhaled nitric oxide; total immunoglobulin E



Citation: Palacionyte, J.; Januskevicius, A.; Vasyle, E.; Rimkunas, A.; Bajoriuniene, I.; Vitkauskiene, A.; Miliauskas, S.; Malakauskas, K. Novel Serum Biomarkers for Patients with Allergic Asthma Phenotype. *Biomedicines* **2024**, *12*, 232. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010232>

Academic Editor: Claudia Landi

Received: 24 November 2023

Revised: 16 January 2024

Accepted: 17 January 2024

Published: 19 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Asthma is considered to be a chronic inflammatory disorder associated with airway hyper-responsiveness [1]. The recognition of asthma phenotypes is reasonably accurate in relation to gender, age, allergy, family history of allergic disease, commencement of asthma in childhood or adult life, response to inhaled corticosteroid treatment, and others. The most common asthma phenotypes are allergic and non-allergic asthma [2]. Allergic asthma (AA) typically begins in childhood. This particular phenotype is associated with sensitization to aeroallergens. The inhalation of allergens significantly contributes to

asthmatic symptoms, leading to acute bronchoconstriction and airway inflammation [3,4]. Therefore, the AA phenotype can be suspected based on the patient's allergic anamnesis; however, confirmation requires specific immunoglobulin E (IgE) and/or skin prick tests for allergens [4].

Understanding asthma pathophysiology is important for the selection of the best-performing personalized treatment for patients [5]. AA is a type 2 (T2) airway inflammation-driven process [6]; thus, this makes biomarkers of T2 inflammation highly valuable for AA diagnosis and management [7]. Biomarkers associated with the AA phenotype include elevated total IgE levels, sputum and blood eosinophil (EOS) counts, and exhaled nitric oxide (FeNO) [8]. One of the main biomarkers for T2 airway inflammation is the EOS numbers, which are usually analyzed in the blood and the sputum. These EOS counts are the most studied and most widely used biomarker in clinical practice. Increased EOS counts are associated with a higher prevalence of exacerbations and a lower possibility of controlling the disease [9]. Increased total IgE levels are seen in patients with atopic diseases; therefore, they are considered a marker of atopy. IgE has an established role in defining the asthma phenotype, and elevated IgE levels are associated with a more severe course of AA and determine worse symptom control [10]. Total IgE level in blood serum is important in selecting patients with severe AA, for which anti-IgE therapy is indicated [11]. FeNO is directly measurable in the exhaled breath of patients. It increases proportionally with the intensity of T2 airway inflammation and is linked to eosinophilia [9]. Although these biomarkers provide insights into the pathophysiologic mechanisms underlying AA, none of them are considered ideal and all of them have their flaws [8]. The level of biological markers in the patient can vary depending on the day or hour; moreover, the test results can be influenced by the patient's weight, exposure to allergens, medications, infection status, and smoking habit [11]. Blood and sputum EOS counts may not be diagnostic but can serve as prognostic biomarkers for treatment responses; serum total IgE levels closely correlate with the risk of AA and the severity of asthma [8]. For these reasons, the study of a single biomarker is not appropriate [12]. It is recommended to test at least two biological markers to increase the sensitivity and specificity of these tests and to better recognize T2 airway inflammation. It is also recommended to repeat tests rather than to rely on a single, one-time test response. The combination and re-examination of several biomarkers may be helpful in patient selection and predicting the efficacy of any treatment targeting T2 airway inflammation [13]. For this reason, it is necessary to identify novel biomarkers of T2 airway inflammation that can better represent allergic inflammation. There are biologically active substances in the serum, which play a role in the pathogenesis of AA, have the potential to serve as biomarkers, can reflect allergic inflammation, and can be used in clinical practice [14]. Based on the literature data, we chose less investigated biologically active substances involved in T2 airway inflammation [15–19]. We divided the substances into three groups via the role the biologically active substances play in AA pathophysiological pathways: circulating inflammatory biomarkers; blood oxidative stress markers; and extracellular matrix proteinases and degradation products. Chronic inflammation-related substances describe those molecules which play key roles in mediating and perpetuating inflammatory responses. We included blood oxidative stress indicators to reflect the cellular redox homeostasis that takes place under chronic airway inflammation conditions. Extracellular matrix proteinases and degradation products exhibit the ongoing extracellular matrix remodeling and collagen turnover associated with chronic inflammation and structural changes in the airways. We chose to investigate ten potential biomarkers for AA to enhance our understanding of allergic inflammation and accelerate the discovery of novel biomarkers.

Thus, this study aimed to analyze biologically active substances in the serum related to chronic inflammation, blood oxidative stress markers, and extracellular matrix factors as potential biomarkers for the AA phenotype and to compare them with validated biomarkers (total IgE levels, blood EOS counts, and FeNO). We performed a bronchial allergen challenge (BAC) using *Dermatophagoides pteronyssinus* to evaluate the value of these substances in

allergen-induced inflammatory responses. The evaluation of these bioactive substances may contribute to the discovery of new biomarkers of T2 airway inflammation and targeted treatments for asthma.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Population

The participants were recruited from the Department of Pulmonology at the Hospital of the Lithuanian University of Health Sciences (LSMU), from the Kaunas Clinics. Patients with AA were included in the study in two ways. The first was that eligible patients were selected through electronic hospital medical records, and then potentially eligible patients were contacted by telephone. The second was that eligible patients were selected as they arrived in the outpatients' clinic for an asthma consultation. AA was diagnosed based on asthma symptoms that last more than one year and airway hyperresponsiveness to methacholine or a positive bronchial reversibility test. The healthy subjects (HSs) consisted of healthy volunteers without lung diseases or allergies. The study lasted from the month of October 2020 to the month of December 2022 and included patients with AA and HSs (the inclusion and exclusion criteria are listed in Table 1).

Table 1. Inclusion and exclusion criteria.

Inclusion Criteria		Exclusion Criteria
AA Group	HSs	
Diagnosed with AA		Age < 18 years
Free of inhaled steroids at least 1 month	No symptoms of respiratory disease	Smoker
Positive skin prick test for at least <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> allergen	No clinical allergy symptoms	Active airway infection \leq 1 months prior to study
Positive methacholine challenge or bronchial reversibility test	All skin prick tests negative	Other clinically significant non-controlled disease

AA—allergic asthma; HSs—healthy subjects.

No later than four weeks after the approval of the inclusion and exclusion criteria, all eligible applicants were invited to participate in the study. Prior to initiation of the research, each subject was provided with ample time to review, comprehend, and sign the informed consent. The participants in the HS group visited the hospital twice—for the screening visit and on the experimental day (V1). Meanwhile, the participants in the AA group visited the hospital on three separate days: for the screening visit; then, for V1, the experimental day; and finally, for the experimental day—24 h after V1 (V2). Table 2 shows the research performed at each visit.

Table 2. Investigations at visits.

Screening Visit	V1	V2 *
Inclusion and exclusion criteria	CBC	CBC
Written informed consent	Total IgE	Total IgE
Spirometry	Fe _{NO} measurement	Fe _{NO} measurement
Methacholine challenge test/bronchial reversibility test *	Spirometry	Spirometry
Skin prick testing	BAC with <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> allergen *	

BAC—bronchial allergen challenge; CBC—complete blood count; Fe_{NO}—fractional exhaled nitric oxide; IgE—immunoglobulin E; V1—experimental day; V2—experimental day—24 h after V1. * only allergic asthma group.

Blood samples were collected from all study subjects on V1. AA patients' blood samples were also re-collected in V2. All collected blood samples were assigned a unique study number. Blood samples were tested for eosinophil count, total IgE, and biologically active substance concentrations. The biomarkers selected for this study are listed in Table 3.

Table 3. Biologically active substances included in study.

Circulating Inflammatory Biomarkers	Blood Oxidative Stress Markers	Extracellular Matrix Proteinases and Degradation Product
ATX MET Lp-PLA2 sIL-5R α	PTX-3 TRX1	MMP-7 MMP-9 MMP-10 ICTP

ATX—autotaxin; ICTP—I C-telopeptide of type I collagen; Lp-PLA2—lipoprotein-associated phospholipase A2; MET—tyrosine-protein kinase Met; MMP-7—matrix metalloproteinase-7; MMP-9—matrix metalloproteinase-9; MMP-10—matrix metalloproteinase-10; PTX-3—pentraxin 3; sIL-5R α —soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; TRX1—thioredoxin 1.

2.2. Pulmonary Function Tests

2.2.1. Spirometry

All participants underwent spirometry testing at least three times. For lung function testing, an ultrasonic spirometer was used (Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany). The performance of this procedure, including details of the techniques utilized, is described in [20].

2.2.2. Bronchial Reversibility Test

The bronchial reversibility test was performed for participants with bronchial obstruction, defined by Z-scores for FEV₁/FVC < −1.64, in the AA group. This test was performed using a Ganshorn spirometer (Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany) in which airflow limitations were framed during the screening visit. Beforehand, and 15 min following administration of a salbutamol inhalation (400 mcg), spirometry was performed. In [21], the authors describe the techniques used for performing the procedure.

2.2.3. Methacholine Challenge Test

For the subjects in the AA group, a methacholine challenge test was performed for those who did not show airflow limitations during the screening visit. A dosimeter (ProvoX; Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany) was used for the inhalation of methacholine. After inhalation, lung function was assessed every two minutes until the completion of the methacholine challenge test once the FEV₁ had decreased by 20%. The details of the technique for performance of this procedure are described in [20].

2.2.4. BAC with *Dermatophagoides pteronyssinus*

The BAC using the *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen (DIATER, Madrid, Spain) was performed for all AA group participants. A dosimeter (ProvoX; Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany) was used for allergen inhalation; thereafter, the BAC with *Dermatophagoides pteronyssinus* ended once FEV₁ had decreased by 20%. The details for the entirety of this procedure are set out in [20].

2.2.5. FeNO Test

FeNO analysis was performed for all study participants. The FeNO levels were recorded twice for the subjects in the AA group, before and 24 h following the BAC with the *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. FeNO was measured by a handheld Vivatmo-me device (Bosch Healthcare Solutions, Waiblingen, Germany). The measurements were obtained according to the instructions, and the test was repeated at least two times. Although the device used in the present study is considered easy to use (patients must blow at a specific strength for 10 s into the mouthpiece), three people were not able to successfully measure FeNO.

2.3. Skin Prick Testing

A skin prick allergy test with *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, dog and cat dander, five mixed grass pollens, birch pollen, mugwort, *Alternaria*, *Aspergillus*,

and *Cladosporium* was performed for all study participants. This testing was performed using standardized allergen extracts (Stallergenes, S.A., Antony, France). The technique details for the performance of this procedure are set out in [20].

2.4. Blood Tests

2.4.1. Complete Blood Count and Total IgE

All subjects had peripheral blood samples taken and drawn into vacutainers, which contained dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid (K2EDTA) (BD Vacutainer®; Becton Dickinson UK Ltd., Wokingham, UK). Samples of the routine clinical chemistry assay were directly transported to the hospital laboratory. For the complete blood count test, the XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan) and UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System automated hematology analyzer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) were utilized. For the total IgE level test, the AIA-2000 automated immunoassay analyzer (Tosoh Bioscience, South San Francisco, CA, USA) was utilized.

2.4.2. Serum Levels of Selected Analytes Measurement

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Five biomarkers—I C-telopeptide of Type I collagen (ICTP), autotaxin (ATX), interleukin-5 receptor α (IL-5R α), matrix metalloproteinase-10 (MMP-10), and thioredoxin 1 (TRX1)—in serum samples were detected using the ELISA. A lower limit of detection was identified for ICTP— <50 pg/mL (Abbexa Ltd., Cambridge, UK); ATX— <33 pg/mL (Abbexa Ltd., Cambridge, UK); IL-5R α — <0.15 ng/mL (Invitrogen, Waltham, MA, USA, USA); MMP-10— <3 pg/mL (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); and TRX1— <0.2 ng/mL (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Sample collection and the technical details for the performance of these procedures are set out in [22]. For technical reasons, several biologically active substance concentrations were below the sensitivity range; therefore, these results were treated as zero values.

Luminex Assay

Luminex® 100/200™ System was used to measure the biomarkers'—tyrosine-protein kinase Met (MET), matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), pentraxin 3 (PTX3), and lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2)—concentration in serum samples. First of all, serum samples were added to a mixture of color-coded beads, pre-coated with analyte-specific capture antibodies. Later, biotinylated detection antibodies specific to the analytes of interest were added and formed an antibody–antigen sandwich. The plates were then analyzed using a Luminex® 100 analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). The concentration values were obtained from the mean fluorescent intensity. Standard curves were generated from the reference cytokine gradient concentrations; the concentrations of these cytokines in serum samples were calculated from the standard curves. A lower limit of detection was identified for MET— <14.65 pg/mL (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); MMP-7— <5.18 pg/mL (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); MMP-9— <0.87 pg/mL (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); and PTX3— <42 pg/mL (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For technical reasons, several biologically active substance concentrations were below the sensitivity range; therefore, these results were treated as zero values.

2.5. Confirmation of Participation in the Study

All subjects signed the protocol, which was approved for human use by the regional biomedical Ethics Committee (BE-2-58; 19 June 2020). Unique numbers were allocated for all data in the interest of anonymization. Registration of this study with the identification number NCT04542902 was submitted on ClinicalTrial.gov.

2.6. Statistical Analysis

Using SPSS statistical software (IBM SPSS Statistics 20; Chicago, IL, USA), statistical analyses were performed. Descriptive and analytical statistical methods were used.

For the assumption of normality in data distribution, the Shapiro–Wilk test was utilized. Since the data distribution did not pass the normality test, we assessed the difference between two independent groups with low numbers of individuals in each group; therefore, we used a nonparametric Mann–Whitney two-sided U-test. We used a nonparametric Wilcoxon matched-pair, signed-rank, two-sided test with an employed pairs test to evaluate the difference between two dependent samples. Spearman’s rank correlation coefficient was used to estimate correlations between two sets of data. The sensitivity and specificity of the indicators were determined by analysis of the receiver operating characteristic (ROC) curve. The statistically significant difference minimal limit for values was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Study Subject Characteristics

A total of 36 subjects aged from 18 to 49 years old were included in the study (20 with AA and 16 HSs). Table 4 shows the demographic and clinical data descriptive statistics of each group of the study population. The AA and HS groups did not differ significantly in age, sex, or BMI. FEV₁ (L) also did not differ between the studied groups; however, the difference between the groups was evident when FEV₁ was expressed as a percentage. In the AA patients’ group blood, EOS counts, FeNO, and total IgE levels were significantly higher than those of the HS group. The FEV₁ (L) of the AA group decreased 24 h after BAC, while the blood EOS count and FeNO increased significantly. Meanwhile, total IgE levels did not change significantly after BAC.

Table 4. Demographic and clinical characteristics of the study population.

Characteristic	AA Patients		HSs
Number, n	20		16
Sex, M/F	11/9		6/10
Age, years	22 (19; 35)		27 (25; 30)
BMI, kg/m ²	22.4 (21.1; 28.7)		22.3 (20.1; 24.2)
Asthma control test, score	21 (12; 23)		NA
PD _{20M} , mg	0.27 (0.10; 0.45)		NA
PD _{20A} , HEP/mL (range)	10 (1; 10)		NA
	V1	V2	
FEV ₁ , L	3.75 (3.05; 3.94) #	3.41 (2.63; 3.88)	3.66 (3.21; 4.64)
FEV ₁ , % of predicted	87 (79; 102) * #	81 (65; 95) *	97 (89; 108)
FeNO, ppb	42 (23; 70) * #	64 (37; 108) *	13 (9; 18)
Blood EOS count, ×10 ⁹ /L	0.31 (0.19; 0.44) * #	0.41 (0.32; 0.57) *	0.10 (0.07; 0.13)
Total IgE, IU/mL	295 (122; 640) *	377 (104; 670) *	13 (4; 44)

AA—allergic asthma; BMI – body mass index; EOS—eosinophil; F—female; FeNO—fractional exhaled nitric oxide; FEV₁—forced expiratory volume in 1 s; IgE—immunoglobulin E; M—male; NA—not assessed; PD_{20A}—the *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen provocation dose causing a 20% decrease in FEV₁; PD_{20M}—the provocation dose of methacholine causing a 20% decrease in FEV₁; V1—experimental day; V2—experimental day—24 h after V1. Data are presented as the median with interquartile range. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test. * $p < 0.05$ comparing with the HS group. # $p < 0.05$ comparing with the AA group after BAC.

3.2. Biologically Active Chronic Inflammation-Related Substances as Biomarkers in Asthma

We investigated the serum levels of selected asthma-related proinflammatory substances as potential predictive and prognostic biomarkers. Table 5 provides the concentration data descriptive statistics of each biomarker from each group of the study population.

Table 5. The concentration of biologically active substances in asthma patients and HSs.

Biologically Active Substances	AA Patients		HSs
	V1	V2	
ATX (pg/mL)	206.8 (190.9; 286.3)	201.5 (180.3; 235.5)	233.3 (190.9; 243.9)
MET (pg/mL)	30.5 (14.0; 51.1) * #	19.8 (8.0; 46.6) *	54.3 (28.0; 80.3)
Lp-PLA2 (pg/mL)	451.4 (216.4; 755.1)	445.5 (199.9; 706.6)	629.3 (224.9; 980.8)
sIL-5Rα (ng/mL)	63.4 (55.9; 105.4) *	67.9 (54.9; 112.1) *	25.2 (11.3; 33.2)
PTX3 (pg/mL)	560.1 (326.1; 875.2) * #	498.9 (226.5; 651.1) *	1217.6 (919.8; 1580.1)
TRX1 (ng/mL)	131.2 (93.8; 173.6) * #	142.0 (89.4; 195.6) *	113.9 (67.4; 136.1)
MMP-7 (pg/mL)	332.9 (241.5; 421.3)	295.1 (272.1; 327.7)	278.3 (195.3; 379.2)
MMP-9 (pg/mL)	253.7 (151.4; 339.9)	211.9 (116.9; 293.7)	204.2 (94.8; 498.0)
MMP-10 (pg/mL)	896.1 (318.9; 1501.0)	971.0 (355.7; 1682.6)	502.7 (324.0; 1052.5)
ICTP (pg/mL)	523.0 (478.0; 552.0) *	476.3 (411.6; 531.4) *	589.0 (540.0; 693.0)

AA—allergic asthma; ATX—autotaxin; FeNO—fractional exhaled nitric oxide; HSs—healthy subjects; ICTP—I C-telopeptide of type I collagen; Lp-PLA2—lipoprotein-associated phospholipase A2; MET—tyrosine-protein kinase Met; MMP-7—matrix metalloproteinase-7; MMP-9—matrix metalloproteinase-9; MMP-10—matrix metalloproteinase-10; PTX3—pentraxin 3; sIL-5Rα—soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; TRX1—thioredoxin 1; V1—experimental day; V2—experimental day—24 h after V1. Data are presented as the median with interquartile range. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test. * $p < 0.05$ comparing with HS group, # $p < 0.05$ comparing with AA V2.

We found that serum circulating ATX levels in the control group were similar to AA patients before and after BAC (Figure 1A; Table 5). Evaluating the serum concentration of MET, significant differences between the study groups of AA patients and HSs were noted. The MET concentration in the AA group 24 h after the BAC reduced was significantly lower compared to before the BAC (Figure 1B; Table 5). According to ROC curve analysis, the AUC was 0.74, 0.8, and 0.58 (Figure 2A–C). Lp-PLA2 concentration in serum did not differ between healthy controls and both visits of the AA group (Figure 1C; Table 5). Finally, the chronic inflammation-related soluble interleukin 5 receptor subunit alpha (sIL-5Rα) concentration was elevated in AA patients compared to the HS group. Before BAC, circulating sIL-5Rα levels in AA patients remained similar after BAC. These levels were significantly higher compared to the HS group (Figure 1D; Table 5). According to ROC curve analysis, the AUC was 0.88, 0.88, and 0.51 (Figure 3A–C).

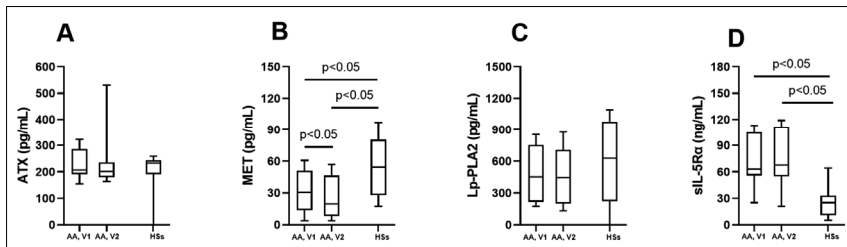


Figure 1. Serum levels of ATX (A), MET (B), Lp-PLA2 (C), and sIL-5Rα (D). AA—allergic asthma; ATX—autotaxin; HSs—healthy subjects; Lp-PLA2—lipoprotein-associated phospholipase A2; MET—tyrosine-protein kinase Met; sIL-5Rα—soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; V1—experimental day; V2—experimental day—24 h after V1. Data are presented as the median with interquartile range. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

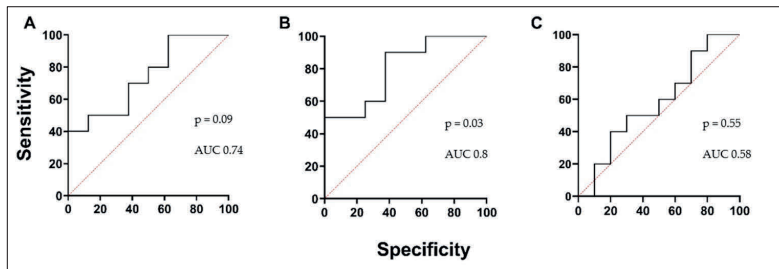


Figure 2. MET ROC curves. (A) AA V1 vs. HSs; (B) AA V2 vs. HSs; (C) AA V1 vs. AA V2. AUC—area under the curve.

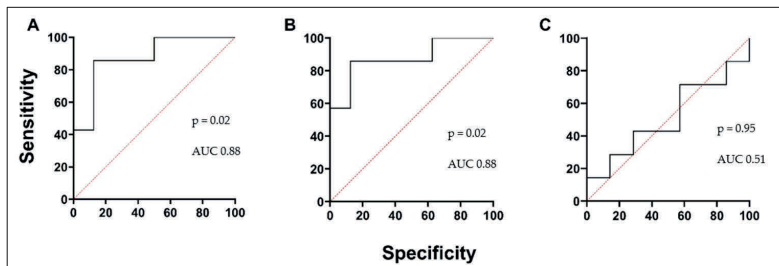


Figure 3. sIL-5R α ROC curves. (A) AA V1 vs. HSs; (B) AA V2 vs. HSs; (C) AA V1 vs. AA V2. AUC—area under the curve.

3.3. Blood Oxidative Stress Indicators as Biomarkers in Asthma

We investigated circulating PTX3 and TRX1 levels to predict oxidative stress in asthmatic patients' serum and investigate them as a potential biomarker in asthma. A lower concentration of PTX3 was found in the AA group and was significantly different compared to the HS group. The PTX3 concentration in the AA group decreased 24 h after the BAC and was significantly lower compared to the concentration before the BAC (Figure 4A; Table 5). According to the ROC curve analysis, the AUC was 0.89, 0.97, and 0.73 (Figure 5A–C). In the AA group, serum levels of TRX1 were significantly higher than in the HSs. Moreover, concentrations were significantly elevated in the AA group 24 h after the BAC, compared to the results before the BAC (Figure 4B; Table 5). According to the ROC curve analysis, the AUC was 0.7, 0.7, and 0.61 (Figure 6A–C).

3.4. MMPs and ICTP Degradation Product as Biomarkers in Asthma

We investigated the serum levels of selected MMPs and ICTP degradation products as potential predictive and prognostic biomarkers in asthma. MMP-7 remained similar between both investigated groups, indicating no potential prognostic value (Figure 7A; Table 5). AA patients were not able to be distinguished from the HS group by the serum MMP-9 concentration. BAC had no effect on MMP-9 concentration in the AA group (Figure 7B; Table 5). The results of MMP-10 did not differ among the asthma groups; serum concentrations of MMP-10 were similar during both visits of the AA patients. No significant differences were observed compared to the HS group (Figure 7C; Table 5). Finally, we investigated the collagen degradation indicating marker, ICTP. Serum levels of ICTP in the AA group were significantly lower compared to the HS group (Figure 7D; Table 5).

Moreover, BAC did not affect the ICTP concentration in the AA group (Figure 7D; Table 5). According to ROC curve analysis, the AUC was 0.79, 0.84, and 0.66 (Figure 8A–C).

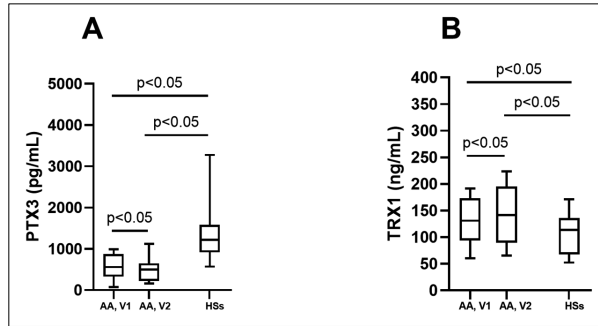


Figure 4. Serum levels of PTX3 (A) and TRX1 (B). AA—allergic asthma; HSs—healthy subjects; PTX3—pentraxin 3; TRX1—thioredoxin 1; V1—experimental day; V2—experimental day—24 h after V1. Data are presented as the median with interquartile range. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

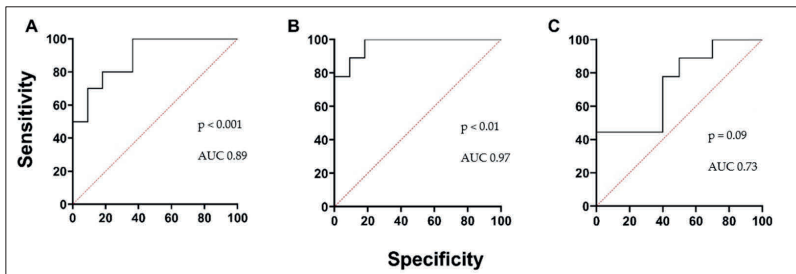


Figure 5. PTX3 ROC curves. (A) AA V1 vs. HSs; (B) AA V2 vs. HSs; (C) AA V1 vs. AA V2. AUC—area under the curve.

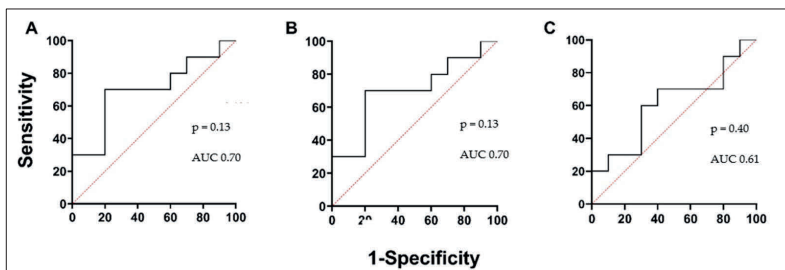


Figure 6. TRX1 ROC curves. (A) AA V1 vs. HSs; (B) AA V2 vs. HSs; (C) AA V1 vs. AA V2. AUC—area under the curve.

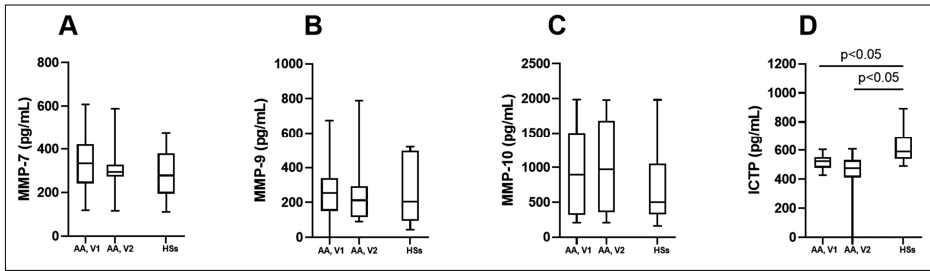


Figure 7. Serum levels of MMP-7 (A), MMP-9 (B), MMP-10 (C), and ICTP (D). AA—allergic asthma; HsS—healthy subjects; ICTP—I C-telopeptide of type I collagen; MMP-7—matrix metalloproteinase-7; MMP-9—matrix metalloproteinase-9; MMP-10—matrix metalloproteinase-10; V1—experimental day; V2—experimental day—24 h after V1. Data are presented as the median with interquartile range. Statistical analysis: between investigated groups, Mann–Whitney two-sided U-test; within one study group, Wilcoxon matched-pair signed-rank two-sided test.

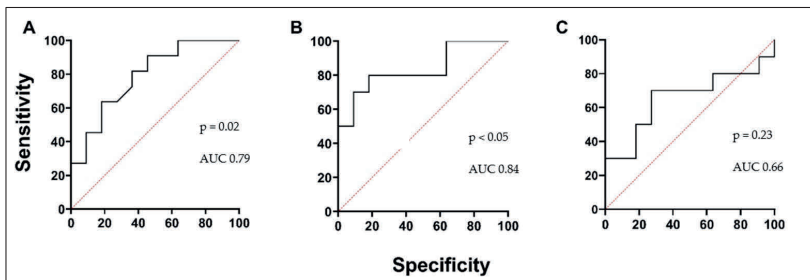


Figure 8. ICTP ROC curves. (A) AA V1 vs. HsS; (B) AA V2 vs. HsS; (C) AA V1 vs. AA V2. AUC—area under the curve.

3.5. Biologically Active Substances in Correlation with Validated Asthma Biomarkers, Lung Function, and in Comparison with Each Other

We tested the correlation of validated asthma biomarkers (Fe_{NO}, blood EOS count, total IgE) and lung function (FEV₁) with biologically active substances whose concentrations were different between the researched group and which can indicate their potential prognostic value in asthma. Evaluating the concentration of MET with Fe_{NO}, blood EOS count, total IgE, and FEV₁, no significant correlations were found between the obtained levels (Table 6). A significant positive correlation was observed between sIL-5Rα and Fe_{NO}, blood EOS count, and total IgE (Table 6; Figure 9A–C). Moreover, a strong negative correlation between sIL-5Rα and FEV₁ was obtained (Table 6; Figure 9D). PTX3 had a strong negative correlation with blood EOS count and total IgE (Table 6; Figure 9E,F); however, no significant correlations were found with Fe_{NO} and FEV₁ (Table 6). No significant correlations were found with PTX3 levels, Fe_{NO}, blood EOS count, total IgE, and FEV₁ (Table 6). ICTP showed a significant negative relationship with blood EOS count (Table 6; Figure 9G); meanwhile, ICTP in correlation with Fe_{NO}, total IgE, and FEV₁ counts were not statistically different (Table 6).

Table 6. Correlations between biologically active substance and Fe_{NO}, blood EOS count, total IgE, and FEV₁.

	Fe _{NO} (ppb)	Blood EOS (×10 ⁹ /L)	Total IgE (IU/mL)	FEV ₁ , % of Predicted
MET (pg/mL)	r = 0.02 p = 0.47	r = −0.07 p = 0.39	r = −0.06 p = 0.41	r = −0.07 p = 0.40
sIL-5Rα (ng/mL)	r = 0.57 p = 0.03	r = 0.58 p = 0.02	r = 0.52 p = 0.04	r = −0.90 p < 0.0001
PTX3 (pg/mL)	r = −0.32 p = 0.10	r = −0.46 p = 0.02	r = −0.49 p = 0.01	r = 0.23 p = 0.17
TRX1 (ng/mL)	r = 0.25 p = 0.18	r = 0.19 p = 0.23	r = 0.35 p = 0.06	r = −0.23 p = 0.18
ICTP (pg/mL)	r = −0.02 p = 0.46	r = −0.48 p = 0.02	r = −0.11 p = 0.32	r = 0.17 p = 0.24

EOS—eosinophil; Fe_{NO}—fractional exhaled nitric oxide; FEV₁—forced expiratory volume in 1 s; ICTP—I C-telopeptide of type I collagen; IgE—immunoglobulin; MET—tyrosine-protein kinase Met; PTX3—pentraxin 3, r—correlation coefficient; sIL-5Rα—soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; TRX1—thioredoxin 1. Statistical analysis: Spearman’s rank correlation.

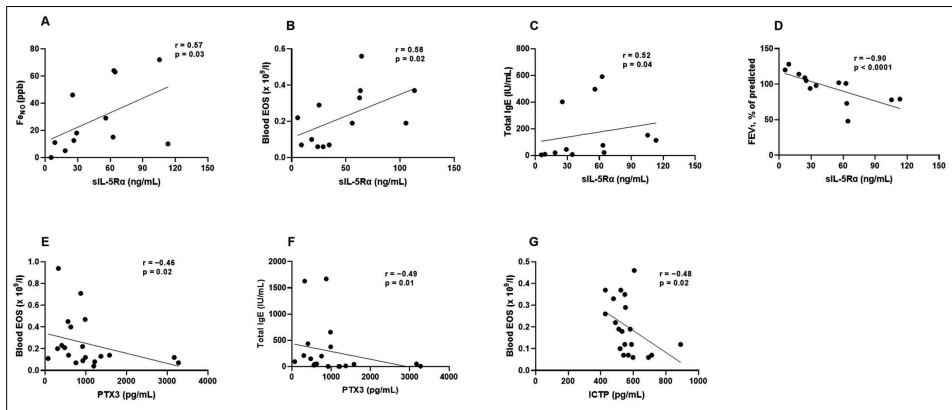


Figure 9. Correlations between sIL-5Rα and Fe_{NO} (A), sIL-5Rα and blood EOS (B), sIL-5Rα and total IgE (C), sIL-5Rα and FEV₁ (D), PTX3 and blood EOS (E), PTX3 and total IgE (F), ICTP and blood EOS (G). EOS—eosinophil; Fe_{NO}—fractional exhaled nitric oxide; FEV₁—forced expiratory volume in 1 s; ICTP—I C-telopeptide of type I collagen; IgE—immunoglobulin E; sIL-5Rα—soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; TRX1—thioredoxin 1; PTX3—pentraxin 3; r—correlation coefficient. Statistical analysis: Spearman’s rank correlation.

We tested the intercorrelation of those biologically active substances whose concentrations differed between the AA and HS groups. We found that sIL-5Rα had a significant positive correlation with TRX, while PTX3 had a significant negative correlation with TRX1 (Table 7; Figure 10). No other significant correlations were found between different biologically active substance groups (Table 7).

Table 7. Correlations between biologically active substance groups.

	MET (pg/mL)	sIL-5Rα (ng/mL)	PTX3 (pg/mL)	TRX1 (ng/mL)	ICTP (pg/mL)
MET (pg/mL)	–	$r = -0.27$ $p = 0.45$	$r = 0.09$ $p = 0.75$	$r = -0.35$ $p = 0.22$	$r = -0.16$ $p = 0.55$
sIL-5Rα (ng/mL)	$r = -0.27$ $p = 0.45$	–	$r = -0.38$ $p = 0.20$	$r = 0.62$ $p = 0.01$	$r = -0.06$ $p = 0.85$
PTX3 (pg/mL)	$r = 0.09$ $p = 0.75$	$r = -0.38$ $p = 0.20$	–	$r = -0.49$ $p = 0.02$	$r = 0.31$ $p = 0.19$
TRX1 (ng/mL)	$r = -0.35$ $p = 0.22$	$r = 0.62$ $p = 0.01$	$r = -0.49$ $p = 0.02$	–	$r = -0.05$ $p = 0.86$
ICTP (pg/mL)	$r = -0.16$ $p = 0.55$	$r = -0.06$ $p = 0.85$	$r = 0.31$ $p = 0.19$	$r = -0.05$ $p = 0.86$	–

ICTP—I C-telopeptide of type I collagen; MET—tyrosine-protein kinase Met; PTX3—pentraxin 3; r—correlation coefficient; sIL-5Rα—soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; TRX1—thioredoxin 1. Statistical analysis: Spearman’s rank correlation.

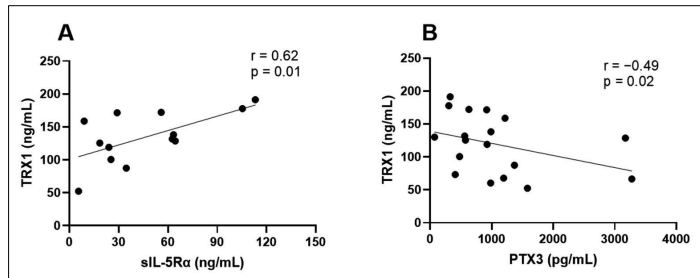


Figure 10. Correlations between sIL-5Rα and TRX1 (A), PTX3, and TRX1 (B). sIL-5Rα—soluble interleukin 5 receptor subunit alpha; TRX1—thioredoxin 1; PTX3—pentraxin 3; r—correlation coefficient.

4. Discussion

In our study, elevated concentrations of sIL-5Rα and TRX1, alongside decreased levels of MET, PTX3, and ICTP, were identified in the AA group compared to the HSs. Notably, sIL-5Rα showed positive correlations with Fe_{NO}, blood EOS count, and total IgE levels. PTX3 exhibited negative correlations with blood EOS count and total IgE levels, while ICTP showed a negative correlation with blood EOS count. Thus, MET, PTX3, TRX1, ICTP, and particularly sIL-5Rα serum concentrations might be associated with the AA phenotype.

Asthma is a heterogeneous disease with various distinct phenotypes. Early recognition of these asthma phenotypes can increase the probability of successful asthma treatment, improve disease outcomes, and prolong survival. Biomarkers or a suite of biomarkers are needed to recognize the AA phenotype as their combined detection can enhance sensitivity. Our study was based on novel circulating biologically active substances involved in T2 airway inflammation, which were divided into three groups: those related to chronic inflammation (ATX, MET, Lp-PLA2, sIL-5Rα), blood oxidative stress (PTX3, TRX1), and MMPs (MMP-7, MMP-9, MMP-10), along with ICTP. All of the researched substances have been linked with asthma; however, our study stands out in several aspects: first, we studied a total of 10 new biomarkers at one time; second, we tested biomarkers in blood serum, a readily available biological medium; third, to our knowledge, these substances have not yet been studied after an allergen challenge.

Asthma-related proinflammatory substances refer to molecules or compounds associated with the inflammatory processes occurring in asthma patients. They play a crucial role

in promoting and sustaining airway inflammation in asthma patients. Among these substances, ATX and Lp-PLA2 hold importance in asthma. In vitro studies have demonstrated that ATX activates various cell types implicated in airway inflammation [23]; meanwhile, Lp-PLA2 is an enzyme associated with inflammation and has been implicated in the pathogenesis of various diseases, including asthma [9]. However, our study did not find these proinflammatory substances to have prognostic value.

MET signaling is closely linked to the activation of immune cells and the production of cytokines and chemokines implicated in the pathogenesis of asthma [24]. Experimental studies have demonstrated that MET activation can enhance the recruitment and activation of inflammatory cells in the airway, such as EOS and T lymphocytes. Moreover, MET-induced cytokine release, including interleukin-8 and interleukin-13, can promote airway inflammation and contribute to disease severity [25,26]. A few years ago, a study was conducted to examine MET gene expression in airway biopsies of asthma patients, which confirmed increased MET expression in bronchial epithelial cells and subepithelial inflammatory and resident cells in asthmatic biopsies [27]. In our study, we evaluated serum concentrations of MET as potential biomarkers in AA. Our findings indicated a significant reduction in MET concentration both at baseline and 24 h after the BAC, indicating a potential role for MET in AA and its response to allergen exposure. MET acts as a receptor for hepatocyte growth factor, and when hepatocyte growth factor binds to the MET receptor, it initiates intracellular signaling events that are crucial in asthma [26]. The decrease in MET concentrations in the serum of AA patients might indicate a suppression in the proteolytic cleavage of these receptors, suggesting a more pronounced MET-related signaling and immune cell activation.

The shedding of the extracellular domain of IL-5R α generates sIL-5R α , which can be detected in the circulation. Interleukin-5 (IL-5) is a vital cytokine, a signaling molecule that plays a crucial role in regulating the immune system, particularly in allergic and inflammatory responses. It is primarily known for its role in the differentiation, maturation, and activation of EOS, a type of white blood cell involved in immune responses against parasitic infections and allergic reactions [28]. IL-5 binds to its cell surface receptor to initiate signaling cascades that lead to the activation of EOS. Although sIL-5R can still interact with IL-5, it lacks the same signaling capabilities as the cell-bound receptor [29]. Elevated serum concentrations of sIL-5R α have been noted in asthma patients and in patients with nasal polyposis and have been suggested to play a role in the down-modulation of the eosinophilic inflammatory response [30]. Our findings demonstrate that AA patients exhibit significantly higher concentrations of sIL-5R α than HSs. Furthermore, these sIL-5R α concentrations in AA patients are not significantly altered by, but remain elevated after, BAC, suggesting long-term IL-5 signaling and persistent eosinophilic inflammation. The exact mechanisms and factors influencing the shedding and release of sIL-5R α may vary under different physiological and pathological conditions. sIL-5R serves as a regulatory factor in immune responses involving IL-5. It can bind to IL-5, potentially modulating its effects on EOS activation and inflammation. Measuring sIL-5R concentrations in the bloodstream can offer insights into immune system activity and may hold diagnostic and therapeutic implications in conditions characterized by eosinophilic responses [31]. Moreover, serum concentrations of sIL-5R significantly correlate with FeNO, blood EOS count, total IgE concentrations, and FEV₁. Combining well-known asthma markers with sIL-5R as a potential biomarker could enhance its predictive value.

PTX3 and TRX1 have been identified as potential markers of oxidative stress in asthma [19,32]. Oxidative stress plays a crucial role in asthma, and these markers have been shown to have associations with oxidative damage and airway inflammation [33]. They provide valuable insights into both systemic and local oxidative stress concentrations in asthma. Measuring these markers in serum provides a noninvasive approach to assess the oxidative stress burden and monitor disease progression. PTX3 is a soluble pattern-recognition receptor that plays a crucial role in the immune response and inflammatory processes [34,35]. In the context of asthma, PTX3 regulates airway inflammation, airway

remodeling, and oxidative stress, making it a potential biomarker for asthma severity and a therapeutic target [36]. PTX3 concentrations in sputum have been studied in both pediatric and adult populations with asthma, where it was found to be elevated compared with levels in healthy controls [37,38]. However, investigations into the serum concentrations of PTX3 are currently lacking. Our results demonstrated lower serum concentrations of PTX3 in AA patients, significantly differing from the findings in the HS group. Moreover, the BAC led to a reduction in PTX3 concentrations in AA patients, compared with the levels before BAC. Several factors could explain the decrease in serum PTX3 concentrations in AA patients. PTX3 concentrations in serum can fluctuate during asthma, reflecting the inflammatory processes associated with this respiratory condition. Beyond its role in immunity, PTX3 contributes to tissue repair and regeneration. It helps modulate the inflammatory response, which is crucial for healing damaged tissues. Moreover, we found a significant negative correlation between PTX3 concentration and blood EOS count, indicating a decrease in PTX3 concentrations in highly eosinophilic patients. The immune response in AA is complex, involving activating various immune cells, such as EOS, and releasing inflammatory mediators. As an immune modulator, PTX3 may be influenced by altered immune responses in asthma, with decreased concentrations potentially indicating a shift in the immune profile in favor of other immune molecules or pathways.

TRX1 exerts its antioxidant function by reducing oxidized proteins and maintaining their active state. In the context of asthma, there is accumulating evidence suggesting the involvement of TRX1 in the regulation of airway inflammation and oxidative stress. Studies have shown the altered expression and activity of TRX1 in bronchial epithelial cells, airway smooth muscle cells, and immune cells in asthma patients [39–41]. Notably, one study reported that plasma TRX1 concentrations were significantly higher in AA patients than in the study's HSs [42,43]. This finding suggests that systemic oxidative stress and inflammation in asthma are associated with an increased release of TRX1 into the bloodstream. Moreover, the immune system overreacts to allergens in asthma, leading to inflammation and bronchoconstriction. TRX1 potentially modulates immune cell activities, cytokine production, and the overall immune response in the airways, which can impact the severity and duration of AA symptoms. Our findings highlight the importance of TRX1 in AA. In the AA group, serum TRX1 concentrations were significantly higher than in the HS group, indicating a potential association between TRX1 and AA. This finding suggests that TRX1 might play a role in allergic reactions and could serve as a biomarker for this specific asthma phenotype. Furthermore, TRX1 concentration in the AA group increased significantly 24 h after BAC. This suggests that the allergen exposure triggers a response that leads to the increased production or release of TRX1 into the bloodstream. Such changes in TRX1 concentrations in the serum may indicate a role for oxidative stress and inflammation in asthma, helping clinicians in assessing disease severity and treatment response.

MMPs are a family of enzymes involved in the remodeling of extracellular matrix components, such as collagens and elastin, which play a crucial role in asthma [44]. MMP-7, MMP-9, and MMP-10 are important in asthma, particularly in airway remodeling and extracellular matrix alterations. Although the roles of MMP-7 and MMP-10 in asthma are still being elucidated, MMP-9 has shown consistent associations with disease severity and airway remodeling processes [45]. A key observation in our study was that MMP-7, MMP-9, and MMP-10 concentrations remained similar across all the investigated groups, indicating that they may not possess any prognostic value in asthma.

Additionally, we investigated the collagen degradation marker, ICTP, which showed interesting results. Although ICTP does not directly measure airway remodeling, it serves as a marker for collagen breakdown, which is a key component of the connective tissue in the body, including the airway walls. In theory, increased collagen breakdown contributes to alterations in the airway tissue structure. A previous study examined ICTP concentrations in the sputum of asthma patients and found lower concentrations in these patients than in the HSs in the study [46]. No studies have examined ICTP concentrations in the serum. In our study, the AA group had significantly lower ICTP concentrations than

the HS group. In asthma, airway remodeling is characterized by increased production of extracellular matrix proteins [47]. This increased airway tissue mass can result from either heightened extracellular matrix protein production or reduced degradation. The lower ICTP concentrations we observed might explain reduced collagen degradation in the airway tissue. Moreover, ICTP concentrations significantly correlate with blood EOS count—a higher blood EOS count correlates with decreased ICTP concentration. EOSs are a significant source of transforming growth factor $\beta 1$, which promotes extracellular matrix protein production via airway smooth muscle cells and pulmonary fibroblasts [48]. Combining serum ICTP concentrations and EOS count could offer valuable prognostic information, not only for the AA phenotype, but also for assessing the severity of the disease and degree of airway remodeling.

This study has several potential limitations. First, our investigation was limited to biologically active substances in the serum, and their concentrations in sputum remain unknown. Second, a large-scale study involving a larger number of AA patients and HSs is needed to examine the correlation of AA asthma biomarkers. Third, in this study, we included patients with AA who were allergic to house dust mites, regardless of the presence or absence of allergy to other allergens. Fourth, HSs were not sensitized to allergens, which may have some sensitization effect on T2 biomarkers levels.

5. Conclusions

This study highlights the heterogeneity of asthma and the importance of identifying potential asthma biomarkers to enhance treatment effectiveness and outcomes. The identification of novel biomarkers and correlation with validated biomarkers is crucial for accurately diagnosing and characterizing AA phenotypes. The AA group can be better characterized by distinct serum concentrations of MET, sIL-5R α , PTX3, TRX1, and ICTP as the concentrations of these biologically active substances significantly differ from those in HSs. Moreover, sIL-5R α displayed significant associations with validated asthma biomarkers, such as FeNO, blood EOS count, and total IgE, in the AA group, indicating its potential role in allergic airway inflammation, thereby making it a potential biomarker. Other biologically active substances, such as PTX3 and ICTP, might also prove valuable in characterizing the AA phenotype. These findings underscore the potential utility of these biomarkers in understanding the molecular underpinnings of AA. Future studies should explore the longitudinal dynamics of these biomarkers, evaluate their specificity and sensitivity in larger cohorts, and assess their potential as prognostic indicators. Additionally, mechanistic investigations into the interplay of these biomarkers in the context of AA pathogenesis may unveil novel therapeutic targets.

Author Contributions: Conceptualization: J.P., E.V., A.J., A.V., I.B., S.M., and K.M.; data curation, J.P., E.V., A.J., A.R., I.B., A.V., S.M., and K.M.; formal analysis, J.P., E.V., A.J., and K.M.; investigation, J.P., E.V., A.J., I.B., A.V., S.M., and A.R.; methodology, J.P., E.V., A.J., A.R., S.M., and K.M.; resources, J.P., E.V., A.J., A.R., I.B., A.V., S.M., and K.M.; supervision, K.M.; validation, J.P., E.V., and A.J.; visualization, J.P.; writing—original draft, J.P.; writing—review and editing, A.J. and K.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the Research Council of Lithuania (project number S-MIP-21-17) and the Science Foundation of the Lithuanian University of Health Sciences.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee of the Lithuanian University of Health Sciences with permission no. BE-2-58. Furthermore, the research study was registered in the US National Institutes of Health trial registry ClinicalTrials.gov with identifier NCT04542902.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

AA	allergic asthma
ATX	autotaxin
BAC	bronchial allergen challenge
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EOS	eosinophil
F _{ENO}	fractional exhaled nitric oxide
FEV ₁	forced expiratory volume in 1 s
Hs	healthy subjects
ICTP	I C-telopeptide of type I collagen
IgE	immunoglobulin E
IL-5	interleukin-5
Lp-PLA2	lipoprotein-associated phospholipase A2
LSMU	Lithuanian University of Health Sciences
MMP-10	matrix metalloproteinase-10
MMP-7	matrix metalloproteinase-7
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
PTX3	pentraxin 3
ROC	receiver operating characteristic
sIL-5R α	soluble interleukin 5 receptor subunit alpha
T2	type 2
TRX1	thioredoxin 1
V1	experimental day
V2	experimental day—24 h after V1.

References

- Alsharairi, N.A. Antioxidant Intake and Biomarkers of Asthma in Relation to Smoking Status-A Review. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 5099–5117. [CrossRef] [PubMed]
- Levy, M.L.; Bacharier, L.B.; Bateman, E.; Boulet, L.P.; Brightling, C.; Buhl, R.; Brusselle, G.; Cruz, A.A.; Drazen, J.M.; Duijts, L.; et al. Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. *NPJ Prim. Care Respir. Med.* **2023**, *33*, 7. [CrossRef] [PubMed]
- Papi, A.; Brightling, C.; Pedersen, S.E.; Reddel, H.K. Asthma. *Lancet* **2018**, *391*, 783–800. [CrossRef] [PubMed]
- Akar-Ghibril, N.; Casale, T.; Custovic, A.; Phipatanakul, W. Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2020**, *8*, 429–440. [CrossRef]
- Maspero, J.; Adir, Y.; Al-Ahmad, M.; Celis-Preciado, C.A.; Colodenco, F.D.; Giavina-Bianchi, P.; Lababidi, H.; Ledanoio, O.; Mahoub, B.; Perng, D.-W.; et al. Type 2 inflammation in asthma and other airway diseases. *ERJ Open Res.* **2022**, *8*, 1–19. [CrossRef]
- Henry, E.K.; Inclan-Rico, J.M.; Siracusa, M.C. Type 2 cytokine responses: Regulating immunity to helminth parasites and allergic inflammation. *Curr. Pharmacol. Rep.* **2017**, *3*, 346–359. [CrossRef]
- Wan, X.C.; Woodruff, P.G. Biomarkers in Severe Asthma. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **2016**, *36*, 547–557. [CrossRef] [PubMed]
- Tiotiu, A. Biomarkers in asthma: State of the art. *Asthma Res. Pract.* **2018**, *4*, 10. [CrossRef]
- Puzzovio, P.G.; Levi-Schaffer, F. Latest Progresses in Allergic Diseases Biomarkers: Asthma and Atopic Dermatitis. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 747364. [CrossRef]
- Rath, N.; Rajee, N.; Rosenwasser, L. Immunoglobulin E as a Biomarker in Asthma. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **2018**, *38*, 587–597. [CrossRef]
- Narendra, D.; Blixt, J.; Hanania, N.A. Immunological biomarkers in severe asthma. *Semin. Immunol.* **2019**, *46*, 101332. [CrossRef] [PubMed]
- Nixon, J.; Newbold, P.; Mustelin, T.; Anderson, G.P.; Kolbeck, R. Monoclonal antibody therapy for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease with eosinophilic inflammation. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *169*, 57–77. [CrossRef] [PubMed]
- Coumou, H.; Bel, E.H. Improving the diagnosis of eosinophilic asthma. *Expert Rev. Respir. Med.* **2016**, *10*, 1093–1103. [CrossRef] [PubMed]
- Vijverberg, S.J.; Hilvering, B.; Raaijmakers, J.A.; Lammers, J.W.; Maitland-van der Zee, A.H.; Koenderman, L. Clinical utility of asthma biomarkers: From bench to bedside. *Biologics* **2013**, *7*, 199–210. [PubMed]
- Kelly, E.A.; Jarjour, N.N. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2003**, *9*, 28–33. [CrossRef] [PubMed]
- Ronnow, S.R.; Sand, J.M.B.; Staunstrup, L.M.; Bahmer, T.; Wegmann, M.; Lunding, L.; Burgess, J.; Rabe, K.; Sorensen, G.L.; Fuchs, O.; et al. A serological biomarker of type I collagen degradation is related to a more severe, high neutrophilic, obese asthma subtype. *Asthma Res. Pract.* **2022**, *8*, 2. [CrossRef]
- Kuczia, P.; Mastalerz, L.; Potaczek, D.P.; Cybulska, A.; Zareba, L.; Bazan-Socha, S.; Undas, A. Increased activity of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in non-severe asthma. *Allergol. Int.* **2019**, *68*, 450–455. [CrossRef]

18. Park, G.Y.; Lee, Y.G.; Berdyshev, E.; Nyenhuis, S.; Du, J.; Fu, P.; Gorshkova, I.A.; Li, Y.; Chung, S.; Karpurapu, M.; et al. Autotaxin production of lysophosphatidic acid mediates allergic asthmatic inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 928–940. [CrossRef]
19. Koussih, L.; Atoui, S.; Tliba, O.; Gounni, A.S. New Insights on the Role of pentraxin-3 in Allergic Asthma. *Front. Allergy* **2021**, *2*, 678023. [CrossRef]
20. Januskevicius, A.; Jurkeviciute, E.; Janulaityte, I.; Kalinauskaite-Zukauske, V.; Miliauskas, S.; Malakauskas, K. Blood Eosinophils Subtypes and Their Survivability in Asthma Patients. *Cells* **2020**, *9*, 1248. [CrossRef]
21. Kalinauskaite-Zukauske, V.; Januskevicius, A.; Janulaityte, I.; Miliauskas, S.; Malakauskas, K. Expression of eosinophil beta chain-signaling cytokines receptors, outer-membrane integrins, and type 2 inflammation biomarkers in severe non-allergic eosinophilic asthma. *BMC Pulm. Med.* **2019**, *19*, 158. [CrossRef] [PubMed]
22. Kalinauskaite-Zukauske, V.; Janulaityte, I.; Januskevicius, A.; Malakauskas, K. Serum levels of epithelial-derived mediators and interleukin-4/interleukin-13 signaling after bronchial challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma. *Scand. J. Immunol.* **2019**, *90*, e12820. [CrossRef] [PubMed]
23. Georas, S.N. LPA and Autotaxin: Potential Drug Targets in Asthma? *Cell Biochem. Biophys.* **2021**, *79*, 445–448. [CrossRef] [PubMed]
24. Liu, D.; Zhong, M.; Zhan, D.; Zhang, Y.; Liu, S. Roles of the HGF/Met signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Focus on tumor immunity (Review). *Oncol. Rep.* **2020**, *44*, 2337–2344. [CrossRef] [PubMed]
25. Ito, Y.; Correll, K.; Zemans, R.L.; Leslie, C.C.; Murphy, R.C.; Mason, R.J. Influenza induces IL-8 and GM-CSF secretion by human alveolar epithelial cells through HGF/c-Met and TGF- α /EGFR signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2015**, *308*, L1178–L1188. [CrossRef] [PubMed]
26. Yamauchi, Y.; Ueki, S.; Konno, Y.; Ito, W.; Takeda, M.; Nakamura, Y.; Nishikawa, J.; Moritoki, Y.; Omokawa, A.; Saga, T.; et al. The effect of hepatocyte growth factor on secretory functions in human eosinophils. *Cytokine* **2016**, *88*, 45–50. [CrossRef] [PubMed]
27. Kuo, C.S.; Pavlidis, S.; Zhu, J.; Loza, M.; Baribaud, F.; Rowe, A.; Pandis, I.; Gibeon, D.; Hoda, U.; Sousa, A.; et al. Contribution of airway eosinophils in airway wall remodeling in asthma: Role of MMP-10 and MET. *Allergy* **2019**, *74*, 1102–1112. [CrossRef] [PubMed]
28. Principe, S.; Porsbjerg, C.; Bolm Ditlev, S.; Kjaersgaard Klein, D.; Golebski, K.; Dyhre-Petersen, N.; van Dijk, Y.E.; van Bragt, J.J.; Dankelman, L.L.; Dahlen, S.; et al. Treating severe asthma: Targeting the IL-5 pathway. *Clin. Exp. Allergy* **2021**, *51*, 992–1005. [CrossRef]
29. Fernandez-Botran, R. Soluble cytokine receptors: Novel immunotherapeutic agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2000**, *9*, 497–514. [CrossRef]
30. Wilson, T.M.; Maric, I.; Shukla, J.; Brown, M.; Santos, C.; Simakova, O.; Khouri, P.; Fay, M.P.; Kozich, A.; Kolbeck, R.; et al. IL-5 receptor alpha levels in patients with marked eosinophilia or mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128*, 1086–1092.e3. [CrossRef]
31. Blumchen, K.; Kallinich, T.; Hamelmann, E. Interleukin-5: A novel target for asthma therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2001**, *1*, 433–453. [CrossRef]
32. Wang, J.; Zhou, J.; Wang, C.; Fukunaga, A.; Li, S.; Yodoi, J.; Tian, H. Thioresdoxin-1: A Promising Target for the Treatment of Allergic Diseases. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 883116. [CrossRef] [PubMed]
33. Dozor, A.J. The role of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1203*, 133–137. [CrossRef] [PubMed]
34. Doni, A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. Innate immunity, hemostasis and matrix remodeling: PTX3 as a link. *Semin. Immunol.* **2016**, *28*, 570–577. [CrossRef] [PubMed]
35. Liu, S.; Qu, X.; Liu, F.; Wang, C. Pentraxin 3 as a prognostic biomarker in patients with systemic inflammation or infection. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 421429. [CrossRef] [PubMed]
36. Zhang, J.; Shan, L.; Koussih, L.; Redhu, N.S.; Halayko, A.J.; Chakir, J.; Gounni, A.S. Pentraxin 3 (PTX3) expression in allergic asthmatic airways: Role in airway smooth muscle migration and chemokine production. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34965. [CrossRef] [PubMed]
37. Kim, M.J.; Lee, H.S.; Sol, I.S.; Kim, M.N.; Hong, J.Y.; Lee, K.E.; Kim, Y.H.; Kim, K.W.; Sohn, M.H.; Kim, K.-E. Sputum pentraxin 3 as a candidate to assess airway inflammation and remodeling in childhood asthma. *Medicine* **2016**, *95*, e5677. [CrossRef] [PubMed]
38. Gao, P.; Tang, K.; Wang, M.; Yang, Q.; Xu, Y.; Wang, J.; Zhao, J.; Xie, J. Pentraxin levels in non-eosinophilic versus eosinophilic asthma. *Clin. Exp. Allergy* **2018**, *48*, 981–989. [CrossRef]
39. Hoshino, T.; Okamoto, M.; Takei, S.; Sakazaki, Y.; Iwanaga, T.; Aizawa, H. Redox-regulated mechanisms in asthma. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 769–783. [CrossRef]
40. Imaoka, H.; Hoshino, T.; Takei, S.; Sakazaki, Y.; Kinoshita, T.; Okamoto, M.; Kawayama, T.; Yodoi, J.; Kato, S.; Iwanaga, T.; et al. Effects of thioresdoxin on established airway remodeling in a chronic antigen exposure asthma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *360*, 525–530. [CrossRef]
41. Hanschmann, E.M.; Berndt, C.; Hecker, C.; Garn, H.; Bertrams, W.; Lillig, C.H.; Hudemann, C. Glutaredoxin 2 Reduces Asthma-Like Acute Airway Inflammation in Mice. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 561724. [CrossRef] [PubMed]
42. Ito, W.; Kobayashi, N.; Takeda, M.; Ueki, S.; Kayaba, H.; Nakamura, H.; Yodoi, J.; Chihara, J. Thioresdoxin in allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2011**, *155* (Suppl. 1), 142–146. [CrossRef] [PubMed]

43. Yamada, Y.; Nakamura, H.; Adachi, T.; Sannohe, S.; Oyamada, H.; Kayaba, H.; Yodoi, J.; Chihara, J. Elevated serum levels of thioredoxin in patients with acute exacerbation of asthma. *Immunol. Lett.* **2003**, *86*, 199–205. [CrossRef] [PubMed]
44. Habib, N.; Pasha, M.A.; Tang, D.D. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells* **2022**, *11*, 2764. [CrossRef] [PubMed]
45. Grzela, K.; Litwiniuk, M.; Zagorska, W.; Grzela, T. Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma: The Role of Matrix Metalloproteinase-9. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2016**, *64*, 47–55. [CrossRef]
46. Nomura, A.; Uchida, Y.; Sakamoto, T.; Ishii, Y.; Masuyama, K.; Morishima, Y.; Hirano, K.; Sekizawa, K. Increases in collagen type I synthesis in asthma: The role of eosinophils and transforming growth factor-beta. *Clin. Exp. Allergy* **2002**, *32*, 860–865. [CrossRef]
47. Burgess, J.K.; Mauad, T.; Tjin, G.; Karlsson, J.C.; Westergren-Thorsson, G. The extracellular matrix—The under-recognized element in lung disease? *J. Pathol.* **2016**, *240*, 397–409. [CrossRef]
48. Halwani, R.; Al-Muhsen, S.; Al-Jahdali, H.; Hamid, Q. Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2011**, *44*, 127–133. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Clinical Remission Criteria and Serum Levels of Type 2 Inflammation Mediators during 24 Weeks of Treatment with the Anti-IL-5 Drug Mepolizumab in Patients with T2-High Severe Asthma

Jolita Palacionyte ^{1,*}, Andrius Januskevicius ², Egle Vasyle ², Airidas Rimkunas ², Skaidrius Miliauskas ¹ and Kestutis Malakauskas ^{1,2}

¹ Department of Pulmonology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania; skaidrius.miliauskas@lsmu.lt (S.M.); kestutis.malakauskas@lsmu.lt (K.M.)

² Laboratory of Pulmonology, Department of Pulmonology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania; andrius.januskevicius@lsmu.lt (A.J.); egle.jurkeviciute@lsmu.lt (E.V.); airidas.rimkunas@lsmu.lt (A.R.)

* Correspondence: jolita.palacionyte@lsmu.lt; Tel.: +370-625-91727

Abstract: Anti-interleukin (IL) 5 is an effective treatment modality for inhibiting eosinophilic inflammation in patients with T2-high severe asthma. The aim of this study was to determine the clinical efficacy and serum levels of type 2 inflammatory mediators during 24 weeks of mepolizumab treatment in patients with T2-high severe asthma. Eighteen patients with T2-high severe asthma were enrolled in this study. All patients received 100 mg of mepolizumab subcutaneously every 4 weeks and were retested at 4, 12, and 24 weeks. A clinical examination, asthma control test (ACT), and spirometry were performed; fractional exhaled nitric oxide (F_{ENO}) levels were evaluated; and blood samples were drawn at every visit. Type 2 inflammation mediator levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The blood eosinophil level significantly decreased, the ACT score and FEV₁ increased after 4 weeks of mepolizumab treatment with the same tendency after 12 and 24 weeks ($p < 0.05$), and the F_{ENO} level did not change ($p > 0.05$). A total of 27.8% of patients reached clinical remission criteria after 24 weeks of mepolizumab treatment. IL-33 and eotaxin significantly increased ($p < 0.05$) while IL-5, IL-13, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), soluble IL-5 receptor subunit alpha (sIL-5R α), and soluble high-affinity immunoglobulin E receptor (sFc ϵ RI) decreased, with the same tendency after 12 and 24 weeks ($p < 0.05$). The serum levels of immunoglobulin (Ig) E and IL-4 and IL-25 levels did not change during mepolizumab treatment compared to baseline ($p > 0.05$). In conclusion, treatment with mepolizumab over 24 weeks improved lung function and asthma control in T2-high severe asthma patients, with nearly one-third achieving clinical remission criteria, and affected the balance of type 2 inflammatory mediators.

Keywords: T2-high severe asthma; eosinophils; clinical remission; type 2 inflammation mediators; mepolizumab

Citation: Palacionyte, J.; Januskevicius, A.; Vasyle, E.; Rimkunas, A.; Miliauskas, S.; Malakauskas, K. Clinical Remission Criteria and Serum Levels of Type 2 Inflammation Mediators during 24 Weeks of Treatment with the Anti-IL-5 Drug Mepolizumab in Patients with T2-High Severe Asthma. *Diagnostics* **2024**, *14*, 1345. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14131345>

Academic Editor: Padukudru Anand Mahesh

Received: 23 April 2024

Revised: 19 June 2024

Accepted: 21 June 2024

Published: 25 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Eosinophilic asthma is an asthma phenotype characterized by eosinophilic airway inflammation [1]. This phenotype is predominant in approximately half of asthma patients [2]. During eosinophilic airway inflammation, when the airways come into contact with irritants, viruses, and microbes, the epithelial cells release cytokines that activate inflammatory cells and initiate an inflammatory response and eosinophilopoiesis [3]. The role of interleukin (IL)-5 is highly significant as it is one of the main cytokines that

affect eosinophils [4]. Eosinophils play a critical role in supporting the inflammatory process by synthesizing a variety of mediators. Increased eosinophil levels in the airways and blood are associated with disease severity [5]. Eosinophilic airway inflammation eventually leads to smooth muscle contraction and structural changes in the airway, leading to reduced lung function and repeated exacerbations [6,7].

The goal of asthma treatment is to achieve good control of symptoms and minimize the future risk of asthma-related mortality, exacerbations, persistent airflow limitation, and side effects of treatment. However, attention has increasingly turned to clinical remission as a treatment goal [8]. Clinical remission is characterized by a high level of disease control, including the absence of asthma symptoms, no exacerbations, and no need for systemic corticosteroids to treat exacerbations, as well as optimal lung function. The possibility of achieving clinical remission appeared more than a decade ago with the development of asthma treatment and the advent of biological medications [9].

Monoclonal antibodies directed against type 2 inflammatory cytokines and their receptors effectively treat T2-high severe asthma [10]. IL-5 is often selected as a priority target for reducing eosinophilia due to its broad effects on eosinophil physiology [11]. Blocking IL-5 prevents it from binding to receptors on the surface of eosinophils, thus inhibiting the biological activity of this cytokine [12]. Our hypothesis for this study is that anti-IL-5-directed treatment affects not only IL-5 but also other inflammation mediators. We chose to study epithelium-derived alarmin cytokines, which play a crucial role in the initiation of inflammation; the main type 2 inflammation cytokines, which promote airway eosinophilia; eotaxins, which stimulate the migration of eosinophils; and soluble receptors involved in the pathogenesis of type 2 inflammation.

The aim of this study was to determine the clinical efficacy and serum levels of type 2 inflammatory mediators during 24 weeks of mepolizumab treatment in patients with SEA.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

The participants in this study were recruited from the Department of Pulmonology at the Hospital of Lithuanian University Health Sciences Kaunas Clinics. Eligible patients were selected as they arrived at the outpatient clinic for a T2-high severe asthma treatment consultation. This study lasted from December 2020 to August 2023. Table 1 shows the inclusion and exclusion criteria for subject participation.

Table 1. Inclusion and exclusion criteria.

Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
Severe asthma history ≥ 12 months	Age < 18 years
High doses of inhaled steroids + long-acting beta agonist + episodic use of oral steroids ≥ 12 months	Asthma exacerbation ≤ 1 months prior to study
Uncontrolled asthma ≥ 12 months	Supported asthma therapy of oral corticosteroid (>30 days)
Two or more asthma exacerbations per year, which require short-term systemic corticosteroids (≤ 14 days).	Active airway infection ≤ 1 months prior to study
Peripheral blood eosinophil $\geq 0.15 \times 10^9/L$	Active smoking (at least one cigarette a day), former smoker (at least 100 cigarettes in lifetime)
	Clinically significant non-controlled other organs disease

Once the inclusion and exclusion criteria were approved, all eligible applicants were invited to the study no later than four weeks afterward. Before the initiation of research, each subject was given ample time to review, comprehend, and sign the informed consent. Once all subjects signed the informed consent form, the investigation began. After arrival at the hospital, participants were required to stay 30–60 min. All participants visited the hospital four times: before starting mepolizumab treatment (V1), 4 weeks after starting treatment (after 1 dose of mepolizumab, V2), 12 weeks after starting treatment (after 3

doses of mepolizumab, V3), and 24 weeks after starting treatment (after 6 doses of mepolizumab, V4). Figure 1 depicts the research design.

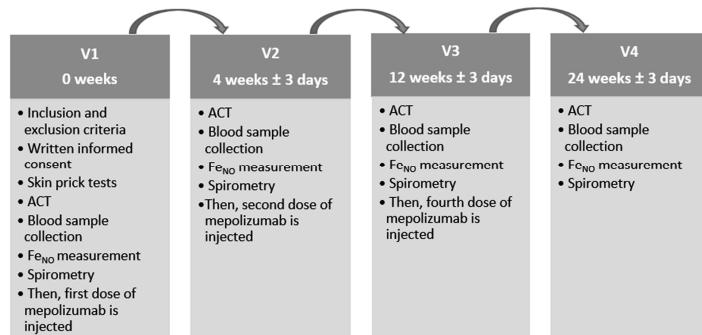


Figure 1. Research design. ACT, asthma control test; Fe_{NO}, fractional exhaled nitric oxide; V1, visit before starting mepolizumab treatment; V2, visit 4 weeks after starting mepolizumab treatment (after 1 mepolizumab dose); V3, visit 12 weeks after starting mepolizumab treatment (after 3 mepolizumab doses); V4, visit 24 weeks after starting mepolizumab treatment (after 6 mepolizumab doses).

In this analysis, we used a four-component clinical remission definition that required patients to meet all these criteria for the following 24 weeks: short-term (≤ 14 days) oral corticosteroid free; exacerbation free; an asthma control test (ACT) score of ≥ 20 ; and a percent predicted post-bronchodilator forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) of $\geq 80\%$ [13].

2.2. Pulmonary Function Tests

2.2.1. Spirometry

Spirometry was carried out on all participants at least three times. Of the results collected, the highest of the three independent measurements was considered. An ultrasonic spirometer was utilized for lung function testing (Ganshorn Medizin Electronic, Niederlauer, Germany). The description of this performance, including the procedure used and technique details, can be found in [14].

2.2.2. Fractional Exhaled Nitric Oxide (Fe_{NO}) Test

Fe_{NO} analysis was performed during every encounter for all participants involved in this study. A handheld Vivatomo-me device (Bosch Healthcare Solutions, Waiblingen, Germany) was used for the aforementioned Fe_{NO} analysis, with measurements produced according to the manufacturer's instructions. The details and techniques employed for the performance of this procedure are described in [15].

2.3. Blood Tests

2.3.1. Complete Blood Count and IgE

Peripheral blood samples were collected from all participants and added to vacutainers containing dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid (K2EDTA) (BD Vacutainer®, Becton Dickinson UK Ltd., Wokingham, UK). After collection, the routine clinical chemistry assay samples were promptly sent to the hospital laboratory. An XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan) and a UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System automated hematology analyzer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) were employed for the complete blood count test. An AIA-2000 automated immunoassay analyzer (Tosoh

Bioscience, South San Francisco, CA, USA) was employed for the immunoglobulin (Ig) E test. During processing, the samples were rigorously controlled and monitored. More detail on the description technique used can be found in [15].

2.3.2. Measurement of Blood Levels of Selected Analytes

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Most biomarkers in blood samples were detected using an ELISA. All assays were performed according to the manufacturer's instructions. Firstly, blood serum and standard curve samples were added to the assay plates pre-coated with analyte-specific capture antibodies. After incubation and washing steps, antibody–horseradish peroxidase conjugates specific to the analytes of interest were added to form an antibody–antigen sandwich. Finally, the HRP substrate was added. After incubation, the reaction was stopped, and the color intensity was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm. The investigated biomarker concentrations were calculated from standard curves. The sensitivity for ELISA kits was as follows: IL-4, 1.3 pg/mL; IL-5, 1.45 pg/mL; IL-13, 0.7 pg/mL; IL-25, 0.4 ng/mL; IL-33, 0.9 pg/mL; thymic stromal lymphopoietin (TSLP), 3 pg/mL; soluble IL-5 receptor subunit alpha (sIL-5R α), 150 pg/mL; eotaxin, 2.2 pg/mL; and soluble high-affinity IgE receptor (sFc ϵ RI), 68 pg/mL.

2.4. Skin Prick Testing

The subjects' sensitization to allergens was evaluated by performing skin prick tests with *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, dog and cat dander, five mixed grass pollens, birch pollen, mugwort, *Alternaria*, *Aspergillus*, and *Cladosporium*. This testing was performed using standardized allergen extracts (Stallergenes, S.A., Antony, France).

2.5. Confirmation of Participation in the Study

This study was initiated after obtaining prior approval from the bioethics committee (BE-2-58, 19 June 2020). All subjects were required to sign an informed consent form before this study began. A sufficient amount of time was allotted for subjects to become familiar with the aspects of the study protocol, wherein all of their relevant questions were addressed. After the subjects signed the protocol, investigations were initiated. In the interest of anonymization, unique numbers were allocated for all data. The subject's safety, dignity, and well-being were ensured throughout the investigation; the interests of the subjects were considered more important than all other interests. Registration of this study with the identification number NCT04542902 was submitted on ClinicalTrial.gov.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed utilizing SPSS statistical software (IBM SPSS Statistics 20; Chicago, IL, USA). The Shapiro–Wilk test was applied to assess the assumption of normality in data distribution. It was found that the data distribution did not pass the normality test; therefore, the nonparametric Mann–Whitney two-sided U-test and Wilcoxon matched-pairs signed-rank two-sided test were applied. It is noted that the threshold value for statistically significant differences was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Study Subject Characteristics

A total of 18 subjects aged from 37 to 80 years old with T2-high severe asthma participated in the study. Few patients self-reported chronic sinusitis with nasal polyps and none reported eosinophilic granulomatosis with polyangiitis or eosinophilic pneumonia. We examined patients at four timepoints: before starting treatment with a 100 mg subcutaneous injection of mepolizumab every 4 weeks (V1) and 4 (V2), 12 (V3), and 24 (V4) weeks after starting mepolizumab treatment.

Most study subjects were women (77.8%) without allergies (55.6%) and tended to be overweight. Before add-on treatment with a 100 mg subcutaneous injection of mepolizumab, 100% of patients had a recurrent exacerbation. After the first dose of mepolizumab, no asthma exacerbations were observed; however, after the second dose of mepolizumab, one patient experienced an asthma exacerbation. Subsequent continuation of mepolizumab treatment did not increase the number of patients experiencing asthma exacerbations.

Four weeks after starting treatment with mepolizumab, the ACT and FEV₁ significantly increased; however, the blood eosinophil level significantly decreased, an effect that remained throughout the treatment ($p < 0.05$) (Table 2, Figure 2A–C,E).

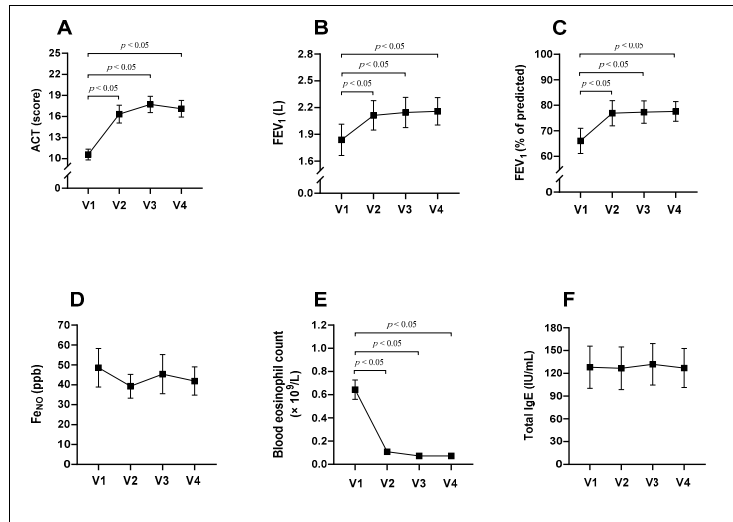


Figure 2. ACT scores (A), FEV₁ (B,C), Feno (D), blood eosinophil count (E), and total IgE (F) levels during 24 weeks of treatment with the anti-IL-5 drug mepolizumab. ACT, asthma control test; Feno, fractional exhaled nitric oxide; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; Ig, immunoglobulin; V1, visit before starting mepolizumab treatment; V2, visit 4 weeks after starting mepolizumab treatment (after 1 mepolizumab dose); V3, visit 12 weeks after starting mepolizumab treatment (after 3 mepolizumab doses); V4, visit 24 weeks after starting mepolizumab treatment (after 6 mepolizumab doses). Data presented as the mean ± standard error of the mean. Statistical analysis—Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

The Feno level was not significantly different either before or during treatment ($p > 0.05$). It should be noted that for several times, this measurement result was not registered because the patient was unable to control the strength of the breath during the measurement despite the control visualization help on the device screen. The IgE level was also not significantly different before or during treatment ($p > 0.05$) (Table 2, Figure 2D,F).

Table 2. Demographic and clinical characteristics of the study population.

Characteristic	T2-High Severe Asthma			
Number, n	18			
Sex, M/F	4/14			
Age, years	57.6 ± 2.2			
BMI, kg/m ²	30.3 ± 1.7			
Number of patients with positive skin prick test/negative skin prick test	8/10			
	V1	V2	V3	V4
Number of patients who had asthma exacerbations	18	0	1	0
ACT, score	10.6 ± 0.8 ^{***} ‡	16.3 ± 1.3	17.7 ± 1.2	17.1 ± 1.2
FEV ₁ , L	1.84 ± 0.18 ^{***} ‡	2.11 ± 0.16	2.15 ± 0.17	2.16 ± 0.15
FEV ₁ , % of predicted	66.0 ± 4.9 ^{***} ‡	76.9 ± 4.9	77.3 ± 4.4	77.6 ± 3.8
Feno, ppb	48.6 ± 9.7	39.3 ± 6.0	45.3 ± 9.8	41.9 ± 7.1
Blood eosinophil level, ×10 ⁹ /L	0.64 ± 0.08 ^{***} ‡	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Total IgE, IU/mL	128.1 ± 27.9	126.7 ± 28.0	131.9 ± 27.3	127.0 ± 25.7

ACT, asthma control test; F, female; F_{ENO}, fractional exhaled nitric oxide; FEV₁, forced expiratory volume in 1s; Ig, immunoglobulin; M, male; V1, visit before starting mepolizumab treatment; V2, visit 4 weeks after starting mepolizumab treatment (after 1 mepolizumab dose); V3, visit 12 weeks after starting mepolizumab treatment (after 3 mepolizumab doses); V4, visit 24 weeks after starting mepolizumab treatment (after 6 mepolizumab doses). Data presented as the mean ± standard error of the mean. Statistical analysis—Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. * $p < 0.05$ compared with V2; † $p < 0.05$ compared with V3; ‡ $p < 0.05$ compared with V4.

3.2. Severe Asthma Clinical Remissions Criteria at 24 Weeks of Mepolizumab Treatment

In the 18 patients analyzed, after 24 weeks of mepolizumab treatment, the number of exacerbation-free patients and short-term systemic corticosteroid-free patients increased from 0 (0%) to 17 (94.4%), the number of patients with an ACT score of ≥ 20 increased from 0 (0%) to 9 (50%), and the number of patients with an FEV₁ of $\geq 80\%$ post-bronchodilator increased from 4 (22.2%) to 7 (38.9%) (Figure 3A). After 24 weeks of treatment with mepolizumab, five patients (27.8%) fulfilled the four-component clinical remission definition, and six patients (33.3%) fulfilled the three-component definition. Before starting mepolizumab treatment, zero patients (0%) met these criteria. Moreover, after 24 weeks of treatment with mepolizumab, six patients (33.3%) fulfilled the two-component clinical remission definition, and one patient (5.6%) fulfilled the one-component definition. Before starting mepolizumab treatment, four and zero patients (0%; 22.2%), respectively, met these criteria (Figure 3B).

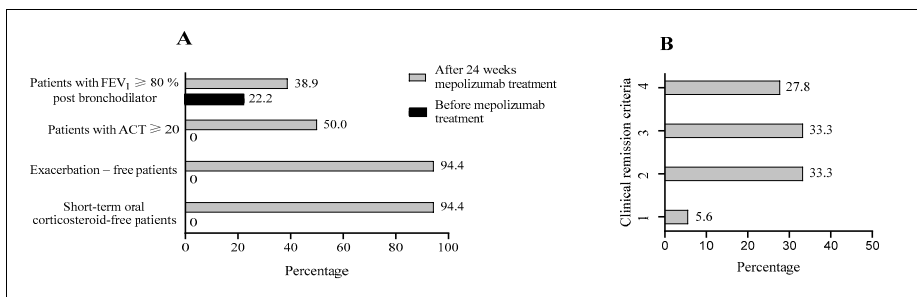


Figure 3. Number of patients meeting individual criteria for clinical remission in asthma after 24 weeks of mepolizumab treatment (A). Number of patients meeting one, two, three, or four criteria

for clinical remission following 24 weeks of mepolizumab treatment (B). ACT, asthma control test; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s.

3.3. Serum Levels of Type 2 Inflammation Mediators during 24 Weeks of Treatment with the Anti-IL-5 Drug Mepolizumab

This study found that after 4 weeks of mepolizumab treatment, the serum levels of IL-4 and IL-25 significantly did not change ($p > 0.05$) (Table 3, Figure 4A,D). Meanwhile, the serum levels of IL-5, IL-13, TSLP, sIL-5R α , and sFceRI significantly decreased ($p < 0.05$), and this effect remained throughout the treatment (Table 3, Figure 4B,C,H,I). The serum levels of IL-33 and eotaxin significantly increased considerably after 4 weeks of mepolizumab treatment ($p < 0.05$), and this effect remained throughout the treatment (Table 3, Figure 4E,G).

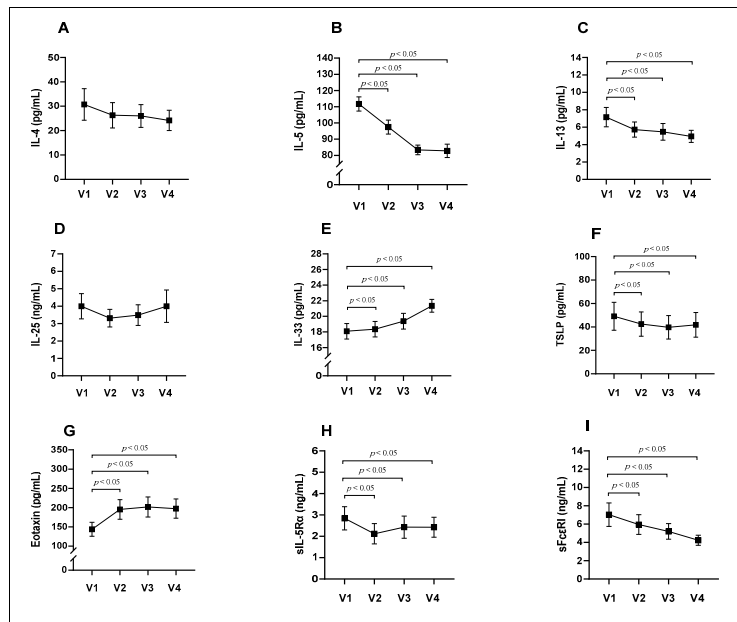


Figure 4. Serum levels of IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), IL-25 (D), IL-33 (E), TSLP (F), eotaxin (G), sIL-5R α (H), sFceRI (I) during 24 weeks of treatment with the anti-IL-5 drug mepolizumab. IL, interleukin; sFceRI, soluble high-affinity IgE receptor; sIL-5R α , soluble IL-5 receptor subunit alpha; TSLP, thymic stromal lymphopietin; V1, visit before starting mepolizumab treatment; V2, visit 4 weeks after starting mepolizumab treatment (after 1 mepolizumab dose); V3, visit 12 weeks after starting mepolizumab treatment (after 3 mepolizumab doses); V4, visit 24 weeks after starting mepolizumab treatment (after 6 mepolizumab doses). Data presented as the mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis—Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

Table 3. Serum levels of type 2 inflammation mediators during 24 weeks of treatment with the anti-IL-5 drug mepolizumab.

	T2-High Severe Asthma			
	V1	V2	V3	V4
IL-4 (pg/mL)	30.7 ± 6.5	26.3 ± 2.2	26.0 ± 4.7	24.2 ± 4.2
IL-5 (pg/mL)	111.7 ± 4.4 * [‡] €	97.5 ± 4.3	83.5 ± 3.0	82.8 ± 4.1
IL-13 (pg/mL)	7.2 ± 1.1 * [‡] €	5.7 ± 0.9	5.5 ± 1.0	4.9 ± 0.8
IL-25 (ng/mL)	4.0 ± 0.7	3.3 ± 0.5	3.5 ± 0.6	4.0 ± 0.9
IL-33 (pg/mL)	18.1 ± 1.0 * [‡] €	18.4 ± 1.0	19.4 ± 1.0	21.3 ± 0.8
TSLP (pg/mL)	49.1 ± 11.9 * [‡] €	42.4 ± 10.3	39.7 ± 10.0	41.8 ± 10.5
sIL-5Rα (ng/mL)	2.84 ± 0.55 * [‡] €	2.11 ± 0.47	2.43 ± 0.52	2.42 ± 0.47
Eotaxin (pg/mL)	143.9 ± 18.2 * [‡] €	195.3 ± 25.5	201.7 ± 25.9	197.5 ± 24.8
sFcεRI (ng/mL)	7.0 ± 1.3 * [‡] €	5.9 ± 1.1	5.2 ± 0.9	4.2 ± 0.6

IL, interleukin; sFcεRI, soluble high-affinity IgE receptor; sIL-5Rα, soluble IL-5 receptor subunit alpha; TSLP, thymic stromal lymphopoietin; V1, visit before starting mepolizumab treatment; V2, visit 4 weeks after starting mepolizumab treatment (after 1 mepolizumab dose); V3, visit 12 weeks after starting mepolizumab treatment (after 3 mepolizumab doses); V4, visit 24 weeks after starting mepolizumab treatment (after 6 mepolizumab doses). Data presented as the mean ± standard error of the mean. Statistical analysis—Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. * $p < 0.05$ compared with V2; † $p < 0.05$ compared with V3; ‡ $p < 0.05$ compared with V4.

4. Discussion

In this study, an initial 100 mg dose of mepolizumab administered subcutaneously in patients with T2-high severe asthma significantly increased ACT scores and improved lung function, and this effect was sustained throughout all 24 weeks of treatment. Almost one-third of the subjects reached clinical remission criteria after 24 weeks of mepolizumab treatment. This study highlights the effects of mepolizumab treatment on various serum type 2 mediators in patients with T2-high severe asthma. It was observed that after 4 weeks of treatment with mepolizumab, the serum levels of IL-5, IL-13, TSLP, sIL-5Rα, and sFcεRI experienced a significant decrease that persisted throughout the treatment period. In contrast, the levels of IL-4 and IL-25 remained unchanged. Conversely, the serum levels of IL-33 and eotaxin showed a notable increase from the beginning of the treatment, a trend that continued over time. This indicates a specific and targeted effect of mepolizumab on certain type 2 inflammatory markers and immune responses.

In this study, a significant increase in ACT scores was observed. These results demonstrate the severity of disease in T2-high severe asthma despite receiving standard-of-care treatment in line with the Global Initiative for Asthma (GINA) recommendations up to the initiation of biologic therapy. This study demonstrated that mepolizumab elicited long-lasting improvements in lung function (increased FEV₁) and eosinophilic inflammation attenuation (decreased eosinophils level). This effect is closely related to the mepolizumab-mediated improvement in asthma control. The results of our study are consistent with those of other studies [16–20]. In this study, we found that mepolizumab did not change IgE levels, which is in agreement with the results of other studies [21,22]. This is because mepolizumab blocks IL-5 and may not affect other components of type 2 inflammation, such as IgE. F_{ENO} also remained largely unchanged during treatment with mepolizumab, which is consistent with findings from other studies [20,23]; in contrast, one study observed a significant increase in the F_{ENO} level [24]. We hypothesize that although mepolizumab blocks the IL-5 pathway and thus inhibits type 2 inflammation, the F_{ENO} levels are not significantly altered because this biomarker is not directly related to the IL-5 pathway. Note that all inflammatory pathways are interrelated. It is possible that blocking the IL-5 upregulates IL-13 and IL-4 pathways, which increases F_{ENO} through compensatory mechanisms.

Asthma remission is defined as a sustained absence of signs and symptoms and normalizing and optimizing lung function. The biologics achieve multiple criteria for asthma remission on treatment [25]. Our results showed that after 24 weeks of treatment with mepolizumab, almost two-thirds of patients met three or four criteria for asthma remission. We also evaluated each criterion separately before and after 24 weeks of mepolizumab treatment. No patient before mepolizumab treatment did not meet the following criteria: corticosteroid-free, exacerbation-free, and with an ACT score of ≥ 20 . After 24 weeks of mepolizumab treatment, these results significantly improved. Many studies have shown that mepolizumab reduces the number of asthma exacerbations, improves lung function and asthma control, and reduces the frequency of systemic corticosteroid use [26–29]. The results of our study are consistent with those of previously published studies. We believe that patients have been appropriately selected and that the treatment effectively inhibits eosinophilic inflammation.

IL-5 is one of the most important cytokines in type 2 asthma pathogenesis. This cytokine is involved in the recruitment, activation, and survival of eosinophils. IL-5 inhibition reduces eosinophilic airway inflammation [25]. Although treatment effectively decreases eosinophil numbers, thereby alleviating asthma-related manifestations, it does not render the patients completely cured. It is not known how anti-IL-5 treatment affects the blood levels of pro-inflammatory biological active substances and how organisms react to a reduction in eosinophils. Instead, organisms' homeostatic mechanisms may compensate by modulating the levels of various blood cytokines. Specifically, it is hypothesized that not all cytokine levels will decrease post-treatment. Some proinflammatory cytokines may remain elevated or even increase as the body seeks to maintain a balanced immune response.

The bronchial epithelium secretes IL-25, IL-33, and TSLP. These cytokines initiate intracellular signal transduction and are called alarmins. Alarmins stimulate the release of IL-4, IL-5, and IL-13 and 2-type inflammation development [3,30]. A previous study already found changes in serum levels of alarmins after a single dose of mepolizumab, in patients with severe non-allergic eosinophilic asthma [31]. Although mepolizumab blocks IL-5, our results show that the inhibition of type 2 inflammation reduced the serum TSLP and increased the IL-33 levels. Meanwhile, the IL-25 levels did not change. We can attribute this to the fact that not only do alarmins stimulate the release of cytokines, but there is also a feedback relationship involving the effects of type 2 cytokines on the epithelium. While eosinophils possess receptors for all three alarmins, evaluating their primary functions, only IL-25 and IL-33 are identified as directly acting on eosinophils after binding to IL-17RB and ST2 receptors on eosinophils [32–34]. Instead, TSLP's role is more upstream in the allergic inflammation cascade, where it helps shape the immune environment towards a type 2 response, indirectly leading to eosinophil activation and recruitment through the actions of other cytokines produced by Th2 cells [35]. Despite the targeted reduction in eosinophils through biological therapy, our findings suggest a complex compensatory response within the cytokine network, highlighting the resilience of the immune system's regulatory mechanisms. Not only do epithelial cells produce IL-25, but eosinophils are also a significant source of this alarmin [36]. Notably, while the direct impact of biological therapy led to expected reductions in eosinophil counts, the anticipated decrease in IL-25 levels was not observed. This discrepancy suggests that other cellular contributors, potentially including the epithelium, may compensate for the reduced eosinophilic production of IL-25, maintaining its serum levels. Such a compensatory mechanism underscores the intricate balance between eosinophil activity and cytokine production, with IL-33 levels rising, possibly as a direct response to the diminished eosinophil count. Furthermore, our analysis extends to the role of TSLP, which diverges from the actions of IL-25 and IL-33 by primarily activating dendritic cells, not eosinophils. The reduction in eosinophil counts appears to attenuate the aggressive nature of dendritic cells, potentially disrupting the TSLP-mediated activation pathway. This observation aligns with discussions on the compensatory mechanisms within the immune

system, where a decrease in one cytokine due to targeted therapy does not necessarily lead to a straightforward decrease in associated inflammatory markers due to the complex feedback loops and interdependencies within the immune network.

IL-4 and IL-13 are among the most important type 2 inflammation cytokines [37]. The main cellular sources of IL-4 and IL-13 include T-helper (Th) lymphocytes, T follicular helper (T_{fh}) cells and type 2 innate lymphoid (ILC2) cells; eosinophils, basophils, mast cells, natural killer cells, and clusters of differentiation 8 (CD8⁺) T lymphocytes also significantly contribute to the production of these two cytokines [38]. While IL-4 is described to be more important in allergic asthma cases, it also plays a significant role in non-allergic phenotypes. Alarmins-activated ILC2 and Th2 cells produce enhanced levels of IL-4 [39]. IL-33 is a particularly important alarmin that affects IL-4 production [40]. In our study, although serum IL-33 levels increased during mepolizumab treatment, there was no significant effect on IL-4 levels. The unchanged IL-4 level in serum during treatment indicates the compensatory mechanisms of IL-4.

IL-4 and IL-13 affect many cells, such as B cells, eosinophils, basophils, monocytes, and fibroblasts [37]. They both share a receptor component with each other and directly contribute to the tissue inflammation and remodeling seen in diseases such as asthma; they also play a significant role in recruiting eosinophils to the site of inflammation. Both cytokines synergize to amplify allergic responses. Differently from IL-4, the IL-13 levels continuously decreased after the inhibition of type 2 inflammation by mepolizumab treatment. While most IL-4-producing cells can express IL-13, a reduced eosinophil count is related to a reduction in IL-13, with no compensatory mechanisms seen with IL-4. This may suggest that IL-13 production is more associated with eosinophilic activity and inflammation as it is the main cytokine produced by Th2 and ILC2 cells and directly targets eosinophils [41].

Both cytokines IL-4 and IL-13 are associated with the induction of eosinophil chemotaxis, which stimulates the production of eotaxin [42]. Eotaxin is a small protein that is synthesized by a number of different cell types (e.g., epithelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts). Eotaxin is stimulated by IL-4 and IL-13, produced by T-helper lymphocytes. Eotaxin stimulates the recruitment of eosinophils from the airway micro vessels into the lung tissue [43]. We detected that the serum's eotaxin levels significantly increased during mepolizumab treatment. The mepolizumab treatment reduced the number of eosinophils in the blood as well as in the lung tissue [44]. Eosinophils themselves can modulate the production of chemokines, including eotaxins, through direct interactions with other cells or through the cytokines they release. The absence or reduction in such regulatory functions may lead to the overproduction of eotaxins by other cells in the immune system, such as epithelial cells, endothelial cells, and fibroblasts. Furthermore, the body, recognizing the decreased number of available eosinophils, initiates a compensatory mechanism to recruit more eosinophils to the sites where they are typically needed, such as inflamed airways. To achieve this, the body increases the production of eotaxin, a potent chemokine responsible for eosinophil recruitment. This response is a natural attempt by the organism to maintain homeostasis and manage inflammatory processes effectively, especially under the threat or actual presence of inflammation, where eosinophils play a critical defensive role.

We investigated the blood levels of two soluble receptors—IL-5 receptor sIL-5R α and IgE receptor Fc ϵ R1. The IL-5R is a high-affinity receptor expressed on eosinophils, basophils, and mast cells [45]. This receptor complex is intricately composed of two subunits: IL-5R α and β c. While IL-5R α uniquely engages with IL-5, facilitating a specific interaction, the β c subunit does not directly bind to IL-5 but is essential for downstream signaling processes [46]. sIL-5R α emerges through either alternative splicing of the mRNA transcript or proteolytic cleavage of the membrane-bound receptor. This soluble receptor variant retains the ability to bind IL-5, albeit without initiating traditional cell signaling due to its lack of attachment to the cell surface. The production of sIL-5R α via these mechanisms allows it to function in several ways, such as acting as a decoy receptor that

can bind to IL-5, thereby regulating its availability and activity in the extracellular environment. This can modulate the biological effects of IL-5, influencing immune responses and inflammation. We found that the serum levels of soluble IL-5R α significantly decreased during treatment with mepolizumab. If sIL-5R α performs a regulatory function for IL-5, after mepolizumab treatment, the organism may attempt to maintain the current IL-5 levels; thus, sIL-5R α will not be secreted into the blood.

Moreover, we investigated the serum concentrations of the soluble receptor Fc ϵ RI, a high-affinity IgE Fc receptor that is expressed on many cell types; eosinophil is also characterized as a cell that expresses this receptor [47,48]. A truncated version of the IgE-binding sFc ϵ RI in human serum [49]. sFc ϵ RI is generally found in two main forms in the blood: the free form and the complexed form, where it is associated with IgE. Although the transmembrane form of Fc ϵ RI is primarily expressed by immune cells such as mast cells and basophils, eosinophils have also been suggested as a potential source of the soluble receptor variants, particularly in pathological conditions such as asthma where eosinophil activity is heightened. Our findings indicate that mepolizumab therapy leads to a reduction in circulating levels of sFc ϵ RI. This reduction could be explained by several mechanisms: first, the decrease in eosinophil numbers may directly lower the production of sFc ϵ RI if eosinophils are a contributing source. Second, the reduction in IL-5 activity may lead to a broader downregulation of immune activation, including the pathways involved in sFc ϵ RI production or shedding from the cell surface. Furthermore, with fewer eosinophils and reduced IgE receptor engagement, there may be less cleavage or shedding of the receptor into its soluble form. IgE regulates the expression of high-affinity receptors [50]; moreover, sFc ϵ RI can interfere with IgE detection in serum, which might be of importance in regard to interference in sIgE detection and diagnosis [49]. This nuanced understanding of sFc ϵ RI dynamics offers potential insights into the immunomodulatory effects of IL-5 targeted therapies in asthma, highlighting not only the direct impact on eosinophil viability but also its broader implications for the patient's immunological landscape. The investigated IL-5 level in patients' serum during mepolizumab treatment significantly decreased; however, there was still a significant amount of circulating IL-5.

This study has several potential limitations. Firstly, this study had a relatively short observation period spanning only 24 weeks, limiting the evaluation of clinical remission criteria. To assess clinical remission, this research should be continued for 12 months. Secondly, only clinically stable T2-high severe asthma patients free of systemic steroids for at least 1 month before the study were considered; therefore, it remains unclear whether systemic glucocorticoids can affect the level of type 2 inflammatory mediators during treatment with anti-IL-5 mepolizumab. Thirdly, whether patients' asthma was allergic or non-allergic was not considered.

5. Conclusions

The results of this study confirm the efficacy of biologics in the treatment of T2-high severe asthma. Add-on therapy with mepolizumab, an anti-IL-5 treatment, resulted in significant functional and clinical changes. Our study results demonstrate that mepolizumab significantly improved the ACT score and FEV₁ after the first four weeks of treatment, with the effect persisting during the continuation of treatment. Meanwhile, there was a significant decrease in the number of eosinophils in the blood. Treatment with mepolizumab helped to achieve clinical remission criteria nearly in one-third of the patients with T2-high severe asthma. In addition, the serum levels of type 2 inflammation mediators such as IL-13, IL-33, TSLP, sIL-5R α , and sFc ϵ RI were significantly altered during treatment. These findings indicate that mepolizumab has a broader impact on T2-high severe asthma pathophysiology.

Author Contributions: Conceptualization: J.P., E.V., A.J., S.M. and K.M.; data curation, J.P., E.V., A.J., A.R., S.M. and K.M.; formal analysis, J.P., E.V., A.J. and K.M.; investigation, J.P., E.V., A.J., S.M. and A.R.; methodology, J.P., E.V., A.J., A.R., S.M. and K.M.; resources, J.P., E.V., A.J., A.R., S.M. and K.M.; supervision, K.M.; validation, J.P., E.V. and A.J.; visualization, J.P.; writing—original draft, J.P.; writing—review and editing, A.J. and K.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by The Future Biomedicine Foundation (project number 2017) and the Science Foundation of the Lithuanian University of Health Sciences.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee of the Lithuanian University of Health Sciences with permission no. BE-2-58. Furthermore, this study was registered in the US National Institutes of Health trial registry ClinicalTrials.gov with identifier NCT04542902.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

ACT	asthma control test
CD8 ⁺	cluster of differentiation 8
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
F _{ENO}	fractional exhaled nitric oxide
FEV ₁	forced expiratory volume in 1 s
GINA	Global Initiative for Asthma
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
ILC2	type 2 innate lymphoid
sFcεRI	soluble high-affinity immunoglobulin E receptor
sIL-5Rα	soluble IL-5 receptor subunit alpha
Tfh	T follicular helper
Th	T-helper
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
V1	visit before starting mepolizumab treatment
V2	visit 4 weeks after starting mepolizumab treatment (after 1 mepolizumab dose)
V3	visit 12 weeks after starting mepolizumab treatment (after 3 mepolizumab doses)
V4	visit 24 weeks after starting mepolizumab treatment (after 6 mepolizumab doses)

References

- Hussain, M.; Liu, G. Eosinophilic Asthma: Pathophysiology and Therapeutic Horizons. *Cells* **2024**, *13*, 384. <https://doi.org/10.3390/cells13050384>.
- Ilmarinen, P.; Kankaanranta, H. Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *114*, 109–117. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12163>.
- Hong, H.; Liao, S.; Chen, F.; Yang, Q.; Wang, D.Y. Role of IL-25, IL-33, and TSLP in triggering united airway diseases toward type 2 inflammation. *Allergy* **2020**, *75*, 2794–2804. <https://doi.org/10.1111/all.14526>.
- Pelaia, C.; Paoletti, G.; Puggioni, F.; Racca, F.; Pelaia, G.; Canonica, G.W.; Heffler, E. Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1514. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01514>.
- Fahy, J.V. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 57–65. <https://doi.org/10.1038/nri3786>.
- Ueki, S.; Tokunaga, T.; Fujieda, S.; Honda, K.; Hirokawa, M.; Spencer, L.A.; Weller, P.F. Eosinophil ETOsis and DNA Traps: A New Look at Eosinophilic Inflammation. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2016**, *16*, 54. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0634-5>.
- Farne, H.A.; Wilson, A.; Powell, C.; Bax, L.; Milan, S.J. Anti-IL5 therapies for asthma. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, *9*, CD010834. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010834.pub3>.
- Busse, W.W.; Chupp, G.; Corbridge, T.; Stach-Klysh, A.; Oppenheimer, J. Targeting Asthma Remission as the Next Therapeutic Step Toward Improving Disease Control. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2024**, *12*, 894–903. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2024.01.044>.

9. Thomas, D.; McDonald, V.M.; Pavord, I.D.; Gibson, P.G. Asthma remission: What is it and how can it be achieved? *Eur. Respir. J.* **2022**, *60*, 2102583. <https://doi.org/10.1183/13993003.02583-2021>.
10. Lin, S.C.; Shi, L.S.; Ye, Y.L. Advanced Molecular Knowledge of Therapeutic Drugs and Natural Products Focusing on Inflammatory Cytokines in Asthma. *Cells* **2019**, *8*, 685. <https://doi.org/10.3390/cells8070685>.
11. Krings, J.G.; McGregor, M.C.; Bacharier, L.B.; Castro, M. Biologics for Severe Asthma: Treatment-Specific Effects Are Important in Choosing a Specific Agent. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2019**, *7*, 1379–1392. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.03.008>.
12. Cusack, R.P.; Whetstone, C.E.; Xie, Y.; Ranjbar, M.; Gauvreau, G.M. Regulation of Eosinophilia in Asthma—New Therapeutic Approaches for Asthma Treatment. *Cells* **2021**, *10*, 817. <https://doi.org/10.3390/cells10040817>.
13. Pavord, I.; Gardiner, F.; Heaney, L.G.; Domingo, C.; Price, R.G.; Pullan, A.; Oppenheimer, J.; Brusselle, G.; Nagase, H.; Chupp, G.; et al. Remission outcomes in severe eosinophilic asthma with mepolizumab therapy: Analysis of the REDES study. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1150162. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1150162>.
14. Januskevicius, A.; Jurkeviciute, E.; Janulaityte, I.; Kalinauskaite-Zukauske, V.; Miliauskas, S.; Malakauskas, K. Blood Eosinophils Subtypes and Their Survivability in Asthma Patients. *Cells* **2020**, *9*, 1248. <https://doi.org/10.3390/cells9051248>.
15. Palacionyte, J.; Januskevicius, A.; Vasyle, E.; Rimkunas, A.; Bajoriuniene, I.; Vitkauskiene, A.; Miliauskas, S.; Malakauskas, K. Novel Serum Biomarkers for Patients with Allergic Asthma Phenotype. *Biomedicines* **2024**, *12*, 232. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010232>.
16. Rodriguez-Garcia, C.; Blanco-Aparicio, M.; Nieto-Fontarigo, J.J.; Blanco-Cid, N.; Gonzalez-Fernandez, C.; Mosteiro-Anon, M.; Calvo-Alvarez, U.; Perez-De-Llano, L.; Corbacho-Abelaira, M.D.; Lourido-Cebreiro, T.; et al. Efficacy of mepolizumab in usual clinical practice and characteristics of responders. *Respir. Med.* **2021**, *187*, 106595. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2021.106595>.
17. Maglio, A.; Vitale, C.; Pellegrino, S.; Calabrese, C.; D'Amato, M.; Molino, A.; Pelaia, C.; Triggiani, M.; Pelaia, G.; Stellato, C.; et al. Real-Life Effectiveness of Mepolizumab on Forced Expiratory Flow between 25% and 75% of Forced Vital Capacity in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1550. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111550>.
18. Bolke, G.; Tong, X.; Zuberbier, T.; Bousquet, J.; Bergmann, K.C. Extension of mepolizumab injection intervals as potential of saving costs in well controlled patients with severe eosinophilic asthma. *World Allergy Organ. J.* **2022**, *15*, 100703. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2022.100703>.
19. Hassani, M.; Tak, T.; van Aalst, C.; van Nederveen, S.; Tesselaar, K.; Vriskoop, N.; Koenderman, L. Differential effects of short- and long-term treatment with mepolizumab on eosinophil kinetics in blood and sputum in eosinophilic asthma. *iScience* **2021**, *24*, 102913. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102913>.
20. Kalinauskaite-Zukauske, V.; Janulaityte, I.; Januskevicius, A.; Malakauskas, K. Serum levels of epithelial-derived mediators and interleukin-4/interleukin-13 signaling after bronchial challenge with Dermatophagoides pteronyssinus in patients with allergic asthma. *Scand. J. Immunol.* **2019**, *90*, e12820. <https://doi.org/10.1111/sji.12820>.
21. Contoli, M.; Santus, P.; Menzella, F.; Rocchi, C.; Radovanovic, D.; Baraldi, F.; Martelli, C.; Casanova, S.; Barbetta, C.; Micheletto, C.; et al. Effects of anti-IL5 biological treatments on blood IgE levels in severe asthmatic patients: A real-life multicentre study (BIONIGE). *Clin. Transl. Allergy* **2022**, *12*, e12143. <https://doi.org/10.1002/ctt2.12143>.
22. Magnan, A.; Bourdin, A.; Prazma, C.M.; Albers, F.C.; Price, R.G.; Yancey, S.W.; Ortega, H. Treatment response with mepolizumab in severe eosinophilic asthma patients with previous omalizumab treatment. *Allergy* **2016**, *71*, 1335–1344. <https://doi.org/10.1111/all.12914>.
23. Pelaia, C.; Crimi, C.; Pelaia, G.; Nolasco, S.; Campisi, R.; Heffler, E.; Valenti, G.; Crimi, N. Real-life evaluation of mepolizumab efficacy in patients with severe eosinophilic asthma, according to atopic trait and allergic phenotype. *Clin. Exp. Allergy* **2020**, *50*, 780–788. <https://doi.org/10.1111/cea.13613>.
24. Pelletier, G.; Godbout, K.; Boulay, M.E.; Boulet, L.P.; Morissette, M.C.; Cote, A. Increase in FeNO Levels Following IL5/IL5R-Targeting Therapies in Severe Asthma: A Case Series. *J. Asthma Allergy* **2022**, *15*, 691–701. <https://doi.org/10.2147/JAA.S358877>.
25. Matsuyama, T.; Tomioka, Y.; Matsuyama, H.; Kamenohara, Y.; Tanigawa, K.; Dotake, Y.; Hagihara, Y.; Takagi, K.; Machida, K.; Inoue, H. Severe asthma remaining well-controlled after mepolizumab discontinuation: A case report and literature review. *Respirol. Case Rep.* **2023**, *11*, e01158. <https://doi.org/10.1002/rccr.2.1158>.
26. Ortega, H.G.; Liu, M.C.; Pavord, I.D.; Brusselle, G.G.; FitzGerald, J.M.; Chetta, A.; Humbert, M.; Katz, L.E.; Keene, O.N.; Yancey, S.W.; et al. Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1198–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1403290>.
27. Pavord, I.D.; Korn, S.; Howarth, P.; Bleecker, E.R.; Buhl, R.; Keene, O.N.; Ortega, H.; Chanez, P. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): A multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2012**, *380*, 651–659. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60988-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60988-X).
28. Bel, E.H.; Wenzel, S.E.; Thompson, P.J.; Prazma, C.M.; Keene, O.N.; Yancey, S.W.; Ortega, H.G.; Pavord, I.D.; Investigators, S. Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1189–1197. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1403291>.
29. Maglio, A.; Vitale, C.; Pelaia, C.; D'Amato, M.; Ciampo, L.; Sferra, E.; Molino, A.; Pelaia, G.; Vatrella, A. Severe Asthma Remissions Induced by Biologics Targeting IL5/IL5r: Results from a Multicenter Real-Life Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2455. <https://doi.org/10.3390/ijms24032455>.
30. Calderon, A.A.; Dimond, C.; Choy, D.F.; Pappu, R.; Grimbaldston, M.A.; Mohan, D.; Chung, K.F. Targeting interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin pathways for novel pulmonary therapeutics in asthma and COPD. *Eur. Respir. Rev.* **2023**, *32*, 2455. <https://doi.org/10.1183/16000617.0144-2022>.

31. Kalinauskaitė-Zukauske, V.; Januskevicius, A.; Janulaityte, I.; Miliauskas, S.; Malakauskas, K. Serum Levels of Epithelial-Derived Cytokines as Interleukin-25 and Thymic Stromal Lymphopoietin after a Single Dose of Mepolizumab in Patients with Severe Non-Allergic Eosinophilic Asthma: A Short Report. *Can. Respir. J.* **2019**, *2019*, 8607657. <https://doi.org/10.1155/2019/8607657>.
32. Yuan, Q.; Peng, N.; Xiao, F.; Shi, X.; Zhu, B.; Rui, K.; Tian, J.; Lu, L. New insights into the function of Interleukin-25 in disease pathogenesis. *Biomark. Res.* **2023**, *11*, 36. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00474-9>.
33. Peng, B.; Sun, L.; Zhang, M.; Yan, H.; Shi, G.; Xia, Z.; Dai, R.; Tang, W. Role of IL-25 on Eosinophils in the Initiation of Th2 Responses in Allergic Asthma. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 842500. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.842500>.
34. Angulo, E.L.; McKernan, E.M.; Fichtinger, P.S.; Mathur, S.K. Comparison of IL-33 and IL-5 family mediated activation of human eosinophils. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217807>.
35. Al-Shami, A.; Spolski, R.; Kelly, J.; Keane-Myers, A.; Leonard, W.J. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 829–839. <https://doi.org/10.1084/jem.20050199>.
36. Tang, W.; Smith, S.G.; Beaudin, S.; Dua, B.; Howie, K.; Gauvreau, G.; O'Byrne, P.M. IL-25 and IL-25 receptor expression on eosinophils from subjects with allergic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2014**, *163*, 5–10. <https://doi.org/10.1159/000355331>.
37. Iwaszko, M.; Bialy, S.; Bogunia-Kubik, K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells* **2021**, *10*, 3000. <https://doi.org/10.3390/cells10113000>.
38. Pelaia, C.; Heffler, E.; Crimi, C.; Maglio, A.; Vatrella, A.; Pelaia, G.; Canonica, G.W. Interleukins 4 and 13 in Asthma: Key Pathophysiologic Cytokines and Druggable Molecular Targets. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 851940. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.851940>.
39. Zhu, J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* **2015**, *75*, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.010>.
40. Noval Rivas, M.; Burton, O.T.; Oettgen, H.C.; Chatila, T. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 801–811 e809. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.030>.
41. Brusselle, G.G.; Maes, T.; Bracke, K.R. Eosinophils in the spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 977–979. <https://doi.org/10.1038/nm.3300>.
42. Neilsen, C.V.; Bryce, P.J. Interleukin-13 directly promotes oesophagus production of CCL11 and CCL24 and the migration of eosinophils. *Clin. Exp. Allergy* **2010**, *40*, 427–434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03419.x>.
43. Conroy, D.M.; Williams, T.J. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir. Res.* **2001**, *2*, 150–156. <https://doi.org/10.1186/tr52>.
44. Kelly, E.A.; Esnault, S.; Liu, L.Y.; Evans, M.D.; Johansson, M.W.; Mathur, S.; Mosher, D.F.; Denlinger, L.C.; Jarjour, N.N. Mepolizumab Attenuates Airway Eosinophil Numbers, but Not Their Functional Phenotype, in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2017**, *196*, 1385–1395. <https://doi.org/10.1164/rccm.201611-2234OC>.
45. Wilson, T.M.; Maric, I.; Shukla, J.; Brown, M.; Santos, C.; Simakova, O.; Khoury, P.; Fay, M.P.; Kozhich, A.; Kolbeck, R.; et al. IL-5 receptor alpha levels in patients with marked eosinophilia or mastocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128*, 1086–1092.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.05.032>.
46. Liu, L.Y.; Sedgwick, J.B.; Bates, M.E.; Vrtis, R.F.; Gern, J.E.; Kita, H.; Jarjour, N.N.; Busse, W.W.; Kelly, E.A. Decreased expression of membrane IL-5 receptor alpha on human eosinophils: I. Loss of membrane IL-5 receptor alpha on airway eosinophils and increased soluble IL-5 receptor alpha in the airway after allergen challenge. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 6452–6458. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6452>.
47. Messingham, K.N.; Holahan, H.M.; Frydman, A.S.; Fullenkamp, C.; Srikantha, R.; Fairley, J.A. Human eosinophils express the high affinity IgE receptor, FcεpsilonRI, in bullous pemphigoid. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107725>.
48. Gounni, A.S.; Lamkhioued, B.; Ochiai, K.; Tanaka, Y.; Delaporte, E.; Capron, A.; Kinet, J.P.; Capron, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* **1994**, *367*, 183–186. <https://doi.org/10.1038/367183a0>.
49. Monino-Romero, S.; Lexmond, W.S.; Singer, J.; Bannert, C.; Amoah, A.S.; Yazdanbakhsh, M.; Boakye, D.A.; Jensen-Jarolim, E.; Fiebiger, E.; Szepefalusi, Z. Soluble FcεpsilonRI: A biomarker for IgE-mediated diseases. *Allergy* **2019**, *74*, 1381–1384. <https://doi.org/10.1111/all.13734>.
50. Pelaia, G.; Canonica, G.W.; Matucci, A.; Paolini, R.; Triggiani, M.; Paggiaro, P. Targeted therapy in severe asthma today: Focus on immunoglobulin E. *Drug Des. Dev. Ther.* **2017**, *11*, 1979–1987. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S130743>.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**Lietuvos sveikatos mokslų universiteto
Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto
leidimai atlikti biomedicininį tyrimą**



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. (+370) 37 32 68 89; el. paštas: kaunorbtek@ismuni.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2015-06-05 Nr. BE-2-13

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas"	
Protokolo Nr.:	PSUL-010/2015
Data:	2015-01-09
Versija:	1.0
Asmens informavimo forma	Versija: 1.1, data: 2015-03-05
Pagrindinis tyrėjas:	Prof. Kęstutis Malakauskas
Biomedicininio tyrimo vieta:	LSMUL VŠĮ Kauno klinikos
Įstaigos pavadinimas:	Eivenių g. 2, LT-50009, Kaunas
Adresas:	

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio 2015 m. kovo mėn. 3 d. (protokolo Nr. BE-10-3) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininų Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Prof. Romaldas Mačiulaitis	Klinikinė farmakologija	taip
2.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija	taip
3.	Doc. Eimantas Peičius	Filosofija	taip
4.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Kalbotyra	taip
5.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija	taip
6.	Agnė Krušinskaitė	Teisė	taip
7.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Pulmonologija, vidaus ligos	taip
8.	Med. dr. Rokas Bagdonas	Chirurgija	ne
9.	Eglė Vaižgelienė	Visuomenės sveikata	ne

Kauno regioninis biomedicininų tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininų tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkas



Prof. Romaldas Mačiulaitis



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas, tel. +370 37 32 68 89, e-mail: kaunorbtek@ismuni.lt

PRITARIMAS
BIOMEDICININIO TYRIMO PAPILDYMU/PRAKEITIMUI

2018-07-17 Nr. P1-BE-2-13/2015

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas" (leidimo atlikti biomedicininį tyrimą leidimas 2015.06.05 Nr. BE-2-13).	
Pagrindinis tyrėjas:	Prof. Kęstutis Malakauskas
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninė Kauno klinikos, Pulmonologijos klinika, Eivenių g. 2, LT-50161, Kaunas.

Peržiūrėti šie [✓] su minėtu tyrimu susiję dokumentai:

[✓] Biomedicininio tyrimo: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas" pagrindinio tyrėjo prašymas dėl biomedicininio tyrimo papildymo / pakeitimo.

[✓] Biomedicininio tyrimo: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas" paraiška.

[✓] Biomedicininio tyrimo: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas" protokolas nr. PSUL-010/2015, versija 2.0, data 2018-06-12.

[✓] Biomedicininio tyrimo: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas" protokolo santrauka parengta pagal protokolą nr. PSUL-010/2015, versija 2.0, data 2018-06-12.

[✓] Biomedicininio tyrimo: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas" informuoto asmens sutikimo forma parengta pagal protokolą nr. PSUL-010/2015, versija 2.1, data 2018-07-10.

[✓] Biomedicininio tyrimo: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas" tyrėjų prof. Skaidriaus Miliausko, levos Janulaitytės, gyvenimo aprašymai.

[✓] Biomedicininio tyrimo: "Plaučių struktūros ląstelių sąveikos su uždegimo ląstelėmis sergant lėtinėmis plaučių ligomis tyrimas" vykdymo ataskaitos santrauka.

[✓] **Nutarta:**

[✓] **Pritarti biomedicininio tyrimo papildymui / pakeitimui.**

Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto nariai		
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis
1.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija
2.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Chirurgija
3.	Prof. Kęstutis Petrikonis	Neurologija
4.	Doc. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija
5.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija
6.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Kalbotyra
7.	Aušra Degutytė	Visuomenės sveikata
8.	Žydrūnė Luneckaitė	Filosofija
9.	Jurgita Laurinaitytė	Teisė

Kauno regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininių tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininką pavaduojantis ekspertas



Doc. Gintautas Gumbrevičius



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. (+370) 37 32 68 89; el.paštas: kaunorbtek@ismuni.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2020-06-19 Nr. BE-2-58

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“	
Protokolo Nr.:	1
Data:	2020-04-24
Versija:	1
Asmens informavimo forma	Versija 1, data 2020-04-24
Pagrindinis tyrėjas:	Med. m. dr. Prof. Kęstutis Malakauskas
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos Sveikatos mokslų Universiteto ligoninė Kauno
Įstaigos pavadinimas:	klinikos
Adresas:	Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininis tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio **2020 m. birželio mėn. 2 d.** (protokolo Nr. BE-10-6) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininis Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininis tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija	Taip
2.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Pulmonologija, vidaus ligos	Taip
3.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija	Taip
4.	Doc. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija	Taip
5.	Prof. Kęstutis Petrikonis	Neurologija	Taip
6.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Filologija	Taip
7.	Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata	Taip
8.	Aušra Degutytė	Visuomenės sveikata	Taip
9.	Jurgita Laurinaitytė	Teisė	Ne

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininis tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Kauno RBTEK pirmininkas

Prof. Edgaras Stankevičius





KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. +370 37 32 72 29; el. paštas: kaunorbtek@ismuni.lt

PRITARIMAS

BIOMEDICININIO TYRIMO PAPILDYMU/PRATĖSIMUI

2023-09-28 Nr. P3-BE-2-58/2020

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“	
Pagrindinis tyrėjas:	Prof. dr. Kęstutis Malakauskas
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninė Kauno klinikos Pulmunologijos klinika
Adresas:	Eivenių g. 4, LT-50161 Kaunas

Peržiūrėti šie [✓] su minėtu tyrimu susiję dokumentai:

[✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ pagrindinio tyrėjo prašymas dėl leidimo papildyti biomedicininį tyrimą;

[✓] Paraiška biomedicininiam tyrimui „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“;

[✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ protokolas (nr. 1 versija: 5 data: 2023-05-29);

[✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ protokolo santrauka (nr. 1 versija: 5 data: 2023-05-29);

[✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ informuoto asmens sutikimo forma sveikiems asmenims (versija nr. 5, data 2023-05-29);

[✓] Biomedicininio tyrimo „Eozinofilų potipių nekoduojančių RNR analizė ir jų pokyčių reikšmė kvėpavimo takų remodeliacijai sergant astma“ informuoto asmens sutikimo forma sergantiems (versija nr. 5, data 2023-05-29);

[✓] Oscilometrijos aparato CE sertifikatas.

[✓] **Nutarta: Pritarti biomedicininio tyrimo papildymui/pratėsimui**

Kauno regioninio biomedicininis tyrimų etikos komiteto nariai		
Nr.	Vardas, pavardė	Veiklos sritis
1.	Doc. dr. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija
2.	Prof. dr. Kęstutis Petrikonis	Neurologija
3.	Dr. Saulius Raugėlė	Chirurgija
4.	Dr. Lina Jankauskaitė	Pediatrija
5.	Prof. dr. Džilda Veličkienė	Endokrinologija
6.	Doc. dr. Eimantas Peičius	Visuomenės sveikata
7.	Aušra Degutytė	Visuomenės sveikata
8.	Dr. Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata
9.	Viktorija Bučinskaitė	Teisė

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininis tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkas



doc. dr. Gintautas Gumbrevičius

Astmos kontrolės testas

1 klausimas									
Kaip dažnai per pastarąsias keturias savaites jūsų astma jums kliudė atlikti įprastus darbus, kuriuos atliekate darbe, mokykloje, universitete ar namuose?									
Atsakymas									
Visą laiką	1	Dažnai	2	Kartais	3	Retai	4	Niekada	5
2 klausimas									
Kaip dažnai per pastarąsias keturias savaites jūs dusote?									
Atsakymas									
Dažniau nei kartą per parą	1	Kartą per parą	2	Nuo trijų iki šešių kartų per savaitę	3	Vieną ar du kartus per savaitę	4	Nei karto	5
3 klausimas									
Kaip dažnai per pastarąsias keturias savaites jūsų astmos simptomai (švokštimas, kosulys, dusulys, spaudimas krūtineje arba skausmas) prikeldavo jus naktį arba anksčiau nei įprastai ryte?									
Atsakymas									
Keturias arba daugiau naktų per savaitę	1	Du arba tris naktis per savaitę	2	Kartą per savaitę	3	Vieną arba du kartus	4	Niekada	5
4 klausimas									
Kaip dažnai per pastarąsias keturias savaites jūs naudojote pirmosios pagalbos inhaliatorių arba srovinį purkštuvą (tokį kaip salbutamol)?									
Atsakymas									
Tris arba daugiau kartų per parą	1	Vieną arba du kartus per parą	2	Du arba tris kartus per savaitę	3	Kartą per savaitę arba rečiau	4	Niekada	5
5 klausimas									
Kaip jūs įvertintumėte savo astmos kontrolę per pastarąsias keturias savaites?									
Atsakymas									
Visiškai nekontroliuojama	1	Prastai kontroliuojama	2	Trupučių kontroliuojama	3	Gerai kontroliuojama	4	Visiškai kontroliuojama	5

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Jolita Palačionytė
Address: Hospital of Lithuanian University of Health Sciences
Kauno klinikos, Department of Pulmonology, Eivenių 2,
LT-50009 Kaunas, Lithuania
Phone number: +370 625 91727
E-mail: jolita.palacionyte@lsmu.lt

Professional Qualifications

2019–2023 PhD student, Lithuania University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania
2015–2019 Medical doctor, Lithuanian University of Health
Sciences, Kaunas, Lithuania
2009–2015 Master of medicine, Lithuania University of Health
Sciences, Kaunas, Lithuania

Qualification:

Medical doctor, medical licence MPL-20480, dated 29 JUN 2015
Pulmonologist, licence MPL-23900, dated 26 JUN 2019

Experience/Current and Previous Positions

2019–till now Pulmonologist, Hospital of Lithuanian University of
Health Sciences Kauno klinikos, Department of
Pulmonology, Eivenių 2, LT-50009 Kaunas, Lithuania
2015–2019 Pulmonology resident, Hospital of Lithuanian
University of Health Sciences Kauno klinikos,
Department of Pulmonology, Eivenių 2, LT-50009
Kaunas, Lithuania
2019–2023 Younger scientific worker, Lithuanian University of
Health Sciences Kauno klinikos, Faculty of Medicine,
Department of Pulmonology, Eivenių 2, LT-50009
Kaunas, Lithuania

Memberships

2017–present Member of the Lithuanian Society of Pulmonology and
Allergy (LSPA)
2019–present Member of the European Respiratory Society (ERS)

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju:

- Mokslinio darbo vadovui prof. dr. Kęstučiui Malakauskui už pasitikėjimą, drąsinančius postūmius, dalinimąsi žiniomis ir patirtimi.
- Pulmonologijos klinikos vadovui prof. dr. Skaidriui Miliauskui už galimybę dirbti ir tobulėti Pulmonologijos klinikoje.
- Dr. Andriui Januškevičiui už visapusišką pagalbą studijuojant doktorantūrą.
- Doc. Ievai Bajoriūnienei už pagalbą renkant tiriamųjų grupes ir vykdant jų alergologinį ištyrimą.
- Pulmonologijos laboratorijos darbuotojams, Pulmonologijos klinikos gydytojams, funkcinės diagnostikos kabineto slaugytojoms už pagalbą atliekant tiriamųjų paiešką ir vykdant jų ištyrimą.
- Visiems tyrimo dalyviams už geranoriškumą ir skirtą laiką.