

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandra D. Plavšić

**Značaj interleukina-5, interelukina-17,
interleukina-33, periostina i frakcije
izdahnutog azot monoksida kao biomarkera u
proceni fenotipova u bronhijalnoj astmi**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Aleksandra D. Plavšić

**Significance of interleukin-5, interleukin-17,
interleukin-33, periostin and fractional exhaled
nitric oxide in a bronchial asthma phenotype
evaluation**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Podaci o mentoru i komisiji

Mentor

Prof. dr Vesna Tomić Spirić

Redovni profesor na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu

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

Komisija

Prof. dr Aleksandra Perić Popadić

Redovni profesor na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu

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

Prof. dr Branka Bonači Nikolić

Redovni profesor na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu

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

Doc. dr Snežana Arandelović

Docent na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu

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

Doc. dr Rajica Stošović

Docent na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu

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

Prof. dr Ivana Stanković

Redovni profesor na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Nišu

Klinika za pulmologiju, Univerzitetski klinički centar Niš, Niš

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Zahvaljujem se svom mentoru, Prof. dr Vesni Tomić Spirić na profesionalnoj i ličnoj podršci, idejama, korisnim savetima i nepresušnoj energiji tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i tokom svih prethodnih godina.

Zahvalnost dugujem i članovima komisije: Prof. dr Aleksandri Perić Popadić na izuzetnoj saradnji, podršci i razumevanju tokom svih godina zajedničkog rada; Prof. dr Branki Bonači Nikolić na neizmernoj pomoći, stručnim i konstruktivnim savetima, dragocenim idejama, posvećenom vremenu tokom izrade ove disertacije i tokom svih proteklih godina; Doc. dr Snežani Arandelović na svemu što me je naučila predhodnih godina, na podršci, razumevanju i prijateljstvu; Doc. dr Rajici Stošoviću i Prof. dr Ivani Stanković na stručnim savetima i sugestijama u završnoj fazi izrade doktorske disertacije.

Svim kolegama, medicinskim sestrama i osoblju Klinike za alergologiju i imunologiju UKCS, zahvaljujem na kolegijalnosti i pruženom znanju ne samo u izradi ove disertacije, već tokom svih godina zajedničke saradnje. Ogromnu zahvalnost za svu pomoć i trud u svim koracima u izradi disertacije ukazujem medicinskim sestrama Polikliničkog-dijagnostičkog odeljenja Klinike za alergologiju i imunologiju UKCS, svim kolegama, a posebno Dr Nataši Kusić i Dr Milanu Dimitrijeviću. Kolegama i laboratorijskim tehničarima Odeljenja za visokospecijalizovanu dijagnostiku imunoloških i alergoloških oboljenja Klinike za alergologiju i imunologiju UKCS zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u realizaciji analize citokina.

Veliku zahvalnost u izradi ove doktorske disertacije dugujem Prof. dr Branslavi Milenković sa Klinike za pulmologiju UKCS na stručnim idejama i savetima, pomoći i podršci. Takođe se zahvaljujem i Kl. Ass Dr Ivani Buhi, kolegama i medicinskim sestrama Odeljenja za funkcionalnu dijagnostiku pluća Klinike za pulmologiju UKCS, kao i Kl. Ass Dr Katarini Milošević i Mariji Lazović sa Univerzitetske dečije klinike Tiršova.

Posebno se zahvaljujem Kl. Ass dr Radi Mišković na podršci u svakom smislu od početka našeg zajedničkog rada i saradnje, na uvek stručnim i konstruktivnim savetima i idejama, ogromnom entuzijazmu i spremnosti da mi uvek pomogne.

Zahvalnost dugujem i Prof. dr Mirijani Bogić na pruženom znanju, podršci, motivaciji u godinama zajedničkog rada. Hvala Prof. dr Sanvili Rašković na podršci i bodrenju, a Kl. Ass dr Žikici Jovičiću neizmerno hvala na svim savetima i razgovorima. Zahvalna sam prim Dr Jasminki Šojić Rajčić na podršci, iskrenim savetima i radovanju. Hvala Dr Neveni Savić na podršci i jedinstvenom duhu, a Doc. dr Slađani Andrejević zahvaljujem na podršci i deljenju znanja.

Neizmerno sam zahvalna mom najvećem učitelju, Dr Ljiljani Stefanović, koja je svoje ogromno znanje, profesionalne i životne vrednosti nesebično delila svih godina zajedničkog rada i koja mi je pokazala da je najbolji doktor i nabolji čovek.

Takođe se zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze koji su učestvovali u:

Kreiranju koncepta teze: Prof. dr Vesna Tomić Spirić

Prikupljanju podataka: Dr Nataša Kusić, Dr Milan Dimitrijević

Validaciji i formalnoj analizi: Prof. dr Vesna Tomić Spirić, Prof. dr Branka Bonači Nikolić, Prof. dr Branislava Milenković

Istraživanju: Doc. dr Snežana Arandelović, Kl. Ass dr Katarina Milošević, Kl. Ass dr Ivana Buha

Metodologiji: Prof. dr Vesna Tomić Spirić, Prof. dr Branka Bonači Nikolić

Superviziji: Prof. dr Vesna Tomić Spirić, Prof. dr Branka Bonači Nikolić

Pisanju -priprema nacрта: Kl. Ass Dr Rada Mišković

Pisanju- recenzija i uređivanje: Prof. dr Vesna Tomić Spirić, Prof dr. Branka Bonači Nikolić

Mojim prijateljima hvala što oplemenjuju, što podržavaju, veruju i što donose radost. Doc. dr Bojani Popović, hvala na ljubavi i podršci, na radosti, lepoti i dragocenosti našeg prijateljstva i što rastemo zajedno.

Najveću zahvalnost dugujem mom suprugu Jorgosu i mojoj porodici.

Zahvalna sam mom suprugu Jorgosu, na ljubavi, razumevanju, podršci, davanju, inspiraciji i što me čuva. Γιώργιο μου, σε ευχαριστώ για όλα. Που υπάρχεις και είσαι εκεί για μένα, για την αγάπη σου, που με κάνεις κάθε μέρα καλύτερο άνθρωπο και που μου έμαθες την ατέλειωτη αγάπη.

Zahvalna sam mojim roditeljima, ocu Dragošu i majci Moki, sestri Nataši i bratu Nikoli na bezuslovnoj ljubavi, veri i podršci koji mi daju svakog dana, koji razmeju uvek i sve i praštaju uvek i sve.

Hvala Katarini, mojoj snajki, na dobroti i toplini.

Hvala mom Dudiju, koji je doneo poseban smisao svemu.

Doktorsku disertaciju posvećujem mom Jorgosu i mojoj porodici.

Značaj interleukina-5, interelukina-17, interleukina-33, periostina i frakcije izdahnutog azot monoksida kao biomarkera u proceni fenotipova u bronhijalnoj astmi

Uvod: Astma je sindrom koji karakterišu inflamacija disajnih puteva, raznovrsnost i varijabilnost patofizioloških mehanizama, kliničke prezentacije i odgovora na terapiju. Sastoji se od različitih endotipova i fenotipova, u čijoj evaluaciji i identifikaciji značajnu ulogu imaju indukovani sputum i biomarkeri.

Ciljevi istraživanja: Ciljevi ovog istraživanja su odrediti inflamatorne fenotipove u astmi na osnovu analize indukovanog sputuma; ispitati povezanost potencijalnih biomarkera (eozinofili, IgE, periostin, frakcija izdahnutog azot monoksida (FeNO), IL-5, IL-6, IL-17A, IL-33) i inflamatornih fenotipova određenih analizom indukovanog sputuma i ispitati povezanost težine kliničke slike, težine i stepena kontrole astme sa biomarkerima i inflamatornim fenotipovima.

Materijal i metode: Sprovedena je studija preseka koja je obuhvatila 80 ispitanika, starijih od 18 godina, sa dijagnozom bronhijalne astme, koji su lečeni na Klinici za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja su bili primena sistemskih kortikosteroida, prisustvo respiratorne infekcije 4 nedelje pre istraživanja, prisustvo SARS-Cov-2 infekcije 3 meseca pre istraživanja. Svim pacijentima je u istom danu urađeno: detaljna evaluacija kliničkih karakteristika, evaluacija terapije, fizikalni pregled, testovi za procenu kontrole astme, kožne prick probe na standardne inhalacione alergene, FeNO, impulsna oscilometrija, spirometrija, analiza indukovanog sputuma, laboratorijske analize. Za procenu kontrole astme su korišćeni test o kontroli astme (engl. Asthma control test-ACT), upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire-ACQ), GINA (Global Initiative for Asthma) upitnik o kontroli simptoma. U uzorcima perifrene krvi su analizirani kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom, standardne biohemijske analize, C reaktivni protein, IgE, IL-6. Metodom enzimskog imunoseja (engl. enzyme linked immunoabsorbent test-ELISA) su određivani IL-5, IL-17A, IL-33, periostin, IL-8.

Rezultati: Ispitivanjem je obuhvaćeno 80 ispitanika sa bronhijalnom astmom, prosečne starosti 43.65 ± 12.72 godina, dominantno ženskog pola (71.3%), više od polovine su bili pušači (56.3%) i prekomerno uhranjeni (58.8%). Prosečno trajanje astme je bilo 7 godina, najčešće udružene bolesti su bile alergijski rinitis (79%), alergije na lekove (27%) i nealergijski rinitis (19%), a u porodičnoj anamnezi najzastupljenije bolesti su bile alergijski rinitis (48.8%) i bronhijalna astma (38.8%). Bilošku terapiju je primalo 17 pacijenata, omalizumab 10 pacijenata (58.8%), a benralizumab 7 pacijenata (41.2%). Nekontrolisana astma procenjena GINA upitnikom o kontroli simptoma, ACT i ACQ je utvrđena kod 41%, 36% i 47% ispitanika. Prema ACQ, broj leukocita i limfocita u krvi je bio značajno viši kod loše kontrolisanih pacijenata u poređenju sa dobro kontrolisanim ($p=0.009$ i $p=0.004$). Pacijenti sa lošom kontrolom bolesti su imali najviši broj limfocita u krvi shodno ACT ($p=0.050$). Kod 45%

ispitanka je detektovana povišena rezistencija malih disajnih puteva. Distribucija fenotipova indukovanim sputumom je pokazala da je 25 ispitanika (31%) imalo eozinofilnu astmu (EA), 24 (30%) mešovitu granulocitnu astmu (MGA), 19 (24%) paucigranulocitnu astmu (PGA) i 12 (15%) neutrofilnu astmu (NA). Inflammatorni fenotipovi bronhijalne astme su se značajno razlikovali prema MEF75, koji je bio najviši u MGA ($p=0.042$). Inflammatorni fenotipovi se nisu razlikovali prema biomarkerima (IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33) ni prema stepenu kontrole bolesti. Četiri inflamatorna fenotipa su se značajno razlikovala prema broju eozinofila ($p=0.002$). Broj eozinofila je bio najviši u EA, značajno viši nego u NA ($p=0.001$), MGA ($p=0.002$) i PGA ($p=0.042$). Vrednosti eozinofila u krvi od $\geq 240/\mu\text{L}$, sa 64% senzitivnosti i 72.7% specifičnosti su identifikovali EA (area under ROC curve=74.3%, $p=0.001$). Karakteristike koje su bile nezavisno povezane sa eozinofilnim inflamatornim fenotipom su bile dim kao okidač pogoršanja ($p=0.010$), niže vrednosti MEF25 ($p=0.019$) i viši CRP ($p=0.043$). IL-8 je bio nezavisno povezan sa NA ($p=0.025$), a viši MEF50 sa MGA ($p=0.023$). Broj eozinofila je bio značajno veći u EA odnosu na NA, MGA i PGA ($p=0.012$, $p=0.028$, $p=0.049$) kod ispitanika bez biološke terapije, a značajno veće vrednosti IL-17A su utvrđene u EA u odnosu na NA i PGA kod ove grupe ispitanika ($p=0.016$; $p=0.002$). Ustanovljena je značajna razlika u IL-5 kod pacijenata sa EA na biološkoj i EA bez biološke terapije ($p=0.043$), IL-5 je bio veći kod pacijenata na biološkoj terapiji. Koncentracije IL-5, IL-6 i IL-8 su bile veće kod pacijenta sa MGA na biološkoj terapiji ($p=0.012$, $p=0.032$, $p=0.03$), a broj leukocita i neutrofila je bio veći u MGA bez biološke terapije ($p=0.049$, $p=0.019$).

Zaključci: Najučestaliji inflamatorni fenotipovi u bronhijalnoj astmi su eozinofilni i mešoviti granulocitni. Eozinofili u serumu su potencijalni biomarker EA, kod ispitanika sa i bez biološke terapije. IL-17A je potencijalni biomarker EA bez biološke terapije, a IL-5 potencijalni biomarker kod EA na biološkoj terapiji. Pacijenti sa MGA fenotipom na biološkoj terapiji imaju povišene vrednosti IL-5, IL-6, IL-8, a sa MGA fenotipom bez biološke terapije imaju veći broj leukocita i neutrofila. Ova saznanja mogu doprineti razvoju personalizovanog pristupa pacijentima sa bronhijalnom astmom, a sa ciljem što ranijeg identifikovanja inflamatornih fenotipova metodom indukovanih sputuma, utvrđivanja kliničkih karakteristika i biomarkera, a u svrhu odabira adekvatnog terapijskog pristupa.

Ključne reči: astma, inflamatorni fenotipovi, indukovani sputum, biomarkeri

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Zapaljenje i autoimunost

UDK broj: _____

SUMMARY

Significance of interleukin-5, interleukin-17, interleukin-33, periostin and fractional exhaled nitric oxide in a bronchial asthma phenotype evaluation

Introduction: Asthma is a syndrome that is characterized by airway inflammation, diversity, and variability in pathophysiological mechanisms, clinical presentation, and therapy response. Asthma incorporates different endotypes and phenotypes, where induced sputum and biomarkers have an important part in its determination and evaluation.

Aims: The aim of this study was to determine the frequency of different inflammatory phenotypes based on induced sputum analysis, to evaluate the connection between inflammatory phenotypes and biomarkers (eosinophils, IgE, fractional exhaled nitric oxide (FeNO), serum periostin, IL-5, IL-6, IL-17A, IL-33) and to evaluate the association between asthma control and biomarkers in different asthma phenotypes.

Materials and methods: This was a cross-sectional study that included 80 asthma patients, ≥ 18 years of age, who were examined at the Clinic for Allergy and Immunology, University Clinical Centre of Serbia. The exclusion criteria were the use of systemic corticosteroid therapy, a history of respiratory tract infections in the past 4 weeks, and a documented COVID-19 infection less than 12 weeks before the study. All participants underwent a detailed evaluation of clinical characteristics, personal and family history, triggers of exacerbations, medical asthma history, physical examination, asthma control assessment, skin prick test, FeNO measurement, impulse oscillometry, blood tests, spirometry, induced sputum analysis on the same day, followed in this order. Asthma control was assessed by the Asthma control test (ACT); Asthma Control Questionnaire (ACQ) and GINA (Global Initiative for Asthma) asthma symptom control assessment. The complete blood count, routine blood test, total serum IgE, C-reactive protein (CRP), IL-6 were collected. Serum levels of IL-5, IL-17A, IL-33, IL-8 and periostin were measured using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Results: We investigated 80 asthma patients with an average age of 43.65 ± 12.72 years, mostly female (71.3%), more than half were smokers (56.3%) and overweight (58.8%). The median asthma duration was 7 years, the most common comorbidities were allergic rhinitis (79%), drug allergy (27%) and non allergic rhinitis (19%), with a family history of allergic rhinitis (48.8%) and asthma (38.8%) being the most common. Biological therapy was administered in 17 patients: omalizumab in 10 (58.8%), and benralizumab in 7 (41.2%). Uncontrolled asthma was recorded in 41%, 36% and 47% based on GINA asthma symptom control, ACT i ACQ, respectively. Number of blood leucocytes and lymphocytes was significantly higher in uncontrolled asthma based on ACQ, compared to well-controlled ($p=0.009$ and $p=0.004$, respectively). According to ACT, uncontrolled patients had the highest lymphocytes ($p=0.050$). Airway resistance was detected in 45% patients. Based on induced sputum, the distribution of asthma inflammatory phenotypes were: 25 (31%) patients had eosinophilic asthma (EA), 24 (30%) had mixed granulocytic asthma (MGA), 19 (24%) paucigranulocytic asthma (PGA) and 12 (15%) patients had neutrophilic asthma (NA). There was a significant difference in mean expiratory flow at 75% of vital capacity (MEF75) between four inflammatory asthma

phenotypes, the highest in MGA ($p=0.042$). There were no differences in biomarkers (IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33) and asthma control between different phenotypes. There was a significant difference in the number of blood eosinophils between four inflammatory asthma phenotypes ($p=0.002$). The number of eosinophils was significantly higher in EA than in NA ($p=0.001$), MGA ($p=0.002$), and PGA ($p=0.042$). The “cut-off” value of eosinophils $\geq 240/\mu\text{l}$, with 64% sensitivity and 72.7% specificity (Area under the ROC curve = 74.3% $p=0.001$) can identify EA. Characteristics that were independently associated with EA were smoke as an exacerbation trigger ($p=0.010$), lower MEF25 ($p=0.019$), and higher CRP ($p=0.043$). A higher level of IL-8 was independently associated with NA ($p=0.025$), and higher MEF50 was independently associated with MGA ($p=0.023$). Number of eosinophils was significantly higher in EA than in NA, MGA, and PGA phenotypes in asthma patients without biologics ($p=0.012$, $p=0.028$, and $p=0.049$, respectively), while IL-17 was significantly higher in EA than in NA and PGA ($p=0.016$ and $p=0.002$, respectively). There was a significant difference in IL-5 between EA biologic and EA non-biologic group ($p=0.043$), IL-5 was higher in those on biological medications. IL-5, IL-6 and IL-8 were higher in MGA biologic group ($p=0.012$, $p=0.032$, $p=0.03$, respectively), while leucocytes and neutrophils were higher in MGA non-biologic group ($p=0.049$, $p=0.019$, respectively).

Conclusions: EA and MGA are the most prevalent asthma phenotypes. Blood eosinophils are potential EA biomarker, both in patients with and without biologics. IL-17A is a potential EA biomarker in asthma patients without biologics, and IL-5 is a potential biomarker in EA patients with biologics. MGA patients on biologics have higher serum IL-5, IL-6, and IL-8, while higher neutrophils and leucocytes are associated with MGA patients without biological therapy. These findings can contribute to the development of a personalized approach to asthma patients, with the aim of early inflammatory phenotype recognition based on induced sputum analysis, clinical and biomarkers identifications and adequate treatment approach.

Keywords: asthma, inflammatory phenotypes, induced sputum, biomarkers

Scientific field: Medicine

Specialised scientific field: Inflammation and autoimmunity

UDK No: _____

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Definicija astme.....	1
1.2.	Podela astme.....	1
1.3.	Fenotipovi astme.....	1
	1.3.1. Definicija fenotipa.....	1
1.4.	Inflamacija u astmi.....	2
	1.4.1. Stečeni imunski odgovor u patogenezi inflamacije astme.....	3
	1.4.2. Urođeni imunski odgovor u patogenezi inflamacije astme	4
	1.4.3. T2 inflamacija.....	5
	1.4.4. Non T2 inflamacija	6
1.5.	Inflamatorni fenotipovi astme	9
	1.5.1. Inflamatorni fenotipovi astme analizom indukovano g sputuma	9
	1.5.2. Stabilnost i klinički značaj inflamatornih fenotipova.....	10
1.6.	Klinički fenotipovi u astmi.....	12
	1.6.1. Klaster analize	14
1.7.	Biomarkeri inflamatornih fenotipova.....	15
	1.7.1. Biomarkeri T2 inflamacije.....	16
	1.7.1.1. Eozinofili	17
	1.7.1.2. Frakcija izdahnutog azot monoksida	18
	1.7.1.3. Ostali T2 biomarkeri	19
	1.7.2. Biomarkeri non T2 inflamacije.....	21
	1.7.3. Kombinacija biomarkera	22
1.8.	Precizna i personalizovana medicina u fenotipovima	24
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	27
3.	MATERIJAL I METODE.....	28
3.1.	Kliničke i laboratorijske analize	28
	3.3.1. Doze inhalacionih kortikosteroida	30
	3.3.2. Testovi za procenu kontrole astme.....	30
	3.3.3. Kožne prick probe na standardne inhalacione alergene	31
	3.3.4. Spirometrijsko ispitivanje plućne funkcije.....	31
	3.3.5. Merenje frakcije izdahnutog azot monoksida	32
	3.3.6. Impulsna oscilometrija	32
	3.3.7. Uzorkovanje indukovano g sputuma.....	32
	3.3.8. Laboratorijske analize.....	32
3.2.	Statistička analiza podataka.....	37
4.	REZULTATI.....	39

4.1.	Karakteristike ispitanika.....	39
4.1.1.	Laboratorijski parametri ispitanika	42
4.1.2.	Procena kontrole bronhijalne astme ispitanika	42
4.1.3.	Spirometrijski parametri, disfunkcija malih disajnih puteva, frakcija izdahnutog azot monoksida.....	43
4.1.4.	Modaliteti terapije.....	44
4.1.5.	Biomarkeri.....	45
4.2.	Povezanost spirometrijskih parametara i biomarkera sa kontrolom bolesti procenjenom GINA upitnikom o kontroli simptoma, ACT i ACQ	45
4.3.	Inflamatorni fenotipovi bronhijalne astme ispitanika	48
4.4.	Karakteristike inflamatornih fenotipova ispitanika.....	49
4.5.	Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima i inflamatornim fenotipovima astme	62
4.5.1.	Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima kod pacijenata sa eozinofilnim inflamatornim fenotipom.....	62
4.5.2.	Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima kod pacijenata sa neutrofilnim inflamatornim fenotipom	63
4.5.3.	Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima kod pacijenata sa mešovitim granulocitnim inflamatornim fenotipom	65
4.5.4.	Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima kod pacijenata sa paugranulocitnim inflamatornim fenotipom	66
4.6.	Biomarkeri inflamatornih fenotipova kod pacijenta sa i bez biološke terapije.....	68
5.	DISKUSIJA.....	72
6.	ZAKLJUČCI.....	82
7.	LITERATURA.....	84

1. UVOD

1.1. Definicija astme

Astma je hronična inflamatorna bolest koja se karakteriše simptomima kao što su kratak dah, sviranje u grudima, osećaj nedostatka vazduha, kašalj, a patofiziološke odlike su inflamacija, bronhijalna hiperreaktivnost, reverzibilna opstrukcija i remodelovanje. Epidemiološki podaci ukazuju da od astme boluje preko 300 miliona ljudi u svetu (1). Pacijenti sa astmom imaju varijabilne karakteristike: astma se može javiti u različitim životnim dobima (rano detinjstvo, mlađe ili starije doba), karakteriše je raznovrsna klinička prezentacija (blaga astma, teška astma, astma teška za lečenje...), sa različitim odgovorima na terapiju i nepredvidivim egzacerbacijama. Promenljivost u različitim aspektima astme su posledica mnogobrojnih uticaja: genetike, epigenetike, molekularnih mehanizama, psiholoških faktora, hrane, mikrobioma, infekcija i faktora okoline, kao što su alergeni, zagađenje. U dijagnozu astme se ubraja više grupa pacijenta sa različitim patofiziološkim mehanizmima i kliničkom prezentacijom. Zato se danas astma definiše kao sindrom koji se sastoji od više različitih endotipova i fenotipova.

1.2. Podela astme

U prošlosti, astma se definisala kao jedan entitet koji su činile dve različite forme: alergijska (ekstrinzička) i nealergijska (intrinzička) (2). Međutim, kasnija istraživanja su pokazala da ova podela nije na adekvatan način opisala svu heterogenost i kompleksnost bronhijalne astme. Prema definiciji Globalne inicijative za astmu (engl. Global Initiative for Asthma-GINA), astma se definiše kao heterogena bolest koju uglavnom odlikuje hronična inflamacija disajnih puteva (3). Ova definicija sadrži ključne osobine astme: heterogenost i inflamaciju. Pošto je inflamacija uvek prisutna, onda je potrebno naći načine kako se ona može "izmeriti", a heterogenost u različitim aspektima treba prvo odvojiti, a zatim i grupisati. Grupisanje heterogenosti i inflamacije sa ciljem da se napravi podela astme predstavlja izazov. Zato danas ne postoji opšte prihvaćena i jedinstvena podela astme, već se astma deli u fenotipove i endotipove. Nakon što se postavi dijagnoza astme, cilj je da se za svakog pacijenta pojedinačno utvrdi fenotip i endotip bolesti na osnovu kojih se određuje terapijski pristup (4). Ovakav koncept predstavlja implementaciju personalizovane medicine u svakodnevnom radu, što nije nimalo jednostavan zadatak u astmi, jer iako klinička slika kod dva pacijenta sa astmom može da bude slična, ispod kliničke prezentacije se mogu kriti potpuno različiti patofiziološki procesi.

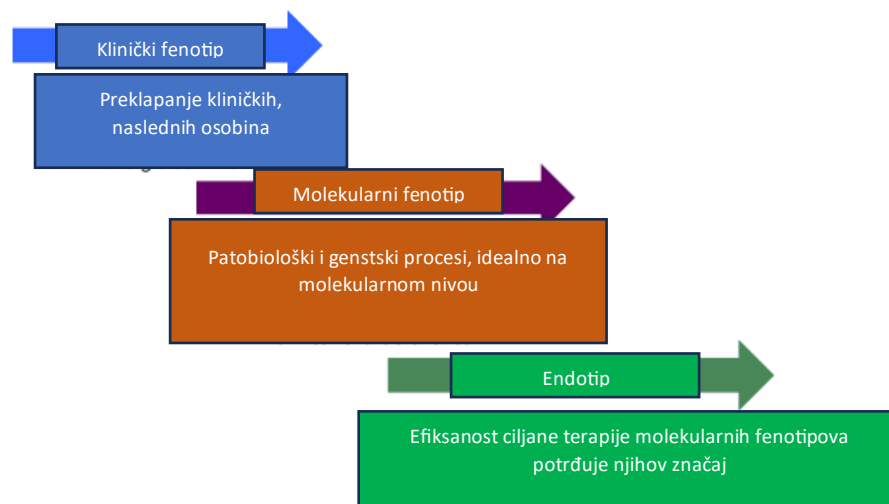
1.3. Fenotipovi astme

1.3.1. Definicija fenotipa

Fenotip se definiše kao "uočljive strukturne i funkcionalne karakteristike organizma determinisane genotipom i modulirane faktorima njegovog okruženja" (5). Koren reči

"fenotip" se nalazi u starogrčkim rečima φαίνω, što znači "pojaviti se ili pokazati" i τύπος, što znači "oznaka ili tip". Fenotip je opservirana karakteristika bolesti i odnosi se na kliničke, funkcionalne, vizualizovane i biološke osobine. To je skup karakteristika organizma koji je rezultat interakcije genotipa i okoline.

Opisani su različiti pristupi u definisanju fenotipova u astmi. Fenotipizacija se može zasnivati na analizi kliničkih parametara, trigeru pogoršanja, tipu inflamacije, vremenu postavljanja dijagnoze, prisustvu komorbiditeta (6). Sa druge strane, fenotipizacija uključuje inkorporaciju kliničkih fenotipova i molekularnih (inflamatornih) fenotipova, a sa ciljem da se identifikuje patofiziološki mehanizam koji je u osnovi fenotipa, odnosno da se definiše endotip bolesti (Slika 1) (7).



Slika 1. Tranzicija od fenotipa ka endotipu, preuzeto i adaptirano prema referenci 7

Kako fenotipovi u astmi zavise od uticaja genetike i faktora okoline, onda je moguće da se oni tokom vremena menjaju i preklapaju, jer se menjaju i uticaji faktora okoline tokom života (8). Fenotipovi zavise od genetskih i epigenetskih faktora, urođenog i stečenog imunskog odgovora, mikrobiote i infekcija, metaboličkih faktora, epitelnih barijera, psihosocijalnih činilaca, anatomskih faktora, ekspozoma, remodelovanja (9). Pošto određivanje fenotipova zavisi od povezanosti i interakcije više faktora, ne postoje opšte prihvaćene preporuke kako tačno utvrditi fenotipove astme. Fenotipove možemo posmatrati kao inflamatorne, kliničke i fenotipove koji obuhvataju obe ove komponente. Za definisanje inflamatornih fenotipova potrebno je poznavanje mehanizama inflamacije u astmi, a za kliničke fenotipove je potrebno uključiti, analizirati i povezati veliki broj kliničkih parametara.

1.4. Inflamacija u astmi

Inflamacija disajnih puteva je ključna karakteristika astme. Za astmu se dugo smatralo da je tipična Th2 posredovana bolest, koju odlikuje povezanost sa atopijom i alergijama, reakcije prema prvom tipu preosetljivosti i eozinofilna upala disajnih puteva. Patofiziološki Th2 posredovani procesi dovode do inflamacije, bronhijalne hiperreaktivnost, opstrukcije i remodelovanja (10). Međutim, danas se zna da je inflamacija znatno kompleksnija, da ulogu u patofiziološkim procesima pored stečenog imunskog odgovora, ima i urođeni imunski odgovor

i epitelne ćelije. Astma je posledica složenih intrrekcija između strukturnih ćelija organizma i imunskih ćelija, koje nastaju usled izloženosti faktorima okoline u različitim periodima života (11). Da bi se definisali fenotipovi koji korelišu sa inflamacijom disajnih puteva kao ključnom karakteristikom, potrebno je prvo shvatiti složene patofiziološke mehanizme astme.

1.4.1. Stečeni imunski odgovor u patogenezi inflamacije astme

Istorijski, astma se posmatrala kao deo stečenog imunskog odgovora sa poznatim konceptom alergijske astme. Antigen prezentujuće ćelije (engl. antigen presenting cells-APC), kao što su dendritske ćelije (DC), nakon kontakta sa alergenima spoljašnje sredine iniciraju sazrevanje T naivnih limfocita u Th2 ćelije koje sekretuju citokine IL-4, IL-5, IL-13. U daljem toku, pod dejstvom IL-4 i IL-13 aktiviraju se B limfociti koji se profilišu u plazma ćelije, dolazi do promene izotipa teškog IgM lanca i produkcije specifičnih IgE antitela. Spefična IgE se vezuju za površinu mastocita i bazofila preko visokoafinitetnih receptora za IgE (FcεRI), kao i za površinu monocita, eozinofila, DC, Lagerhansovih ćelija i trombocita preko niskoafinitetnih FcεRII receptora (CD23). Kada dođe do ponovnog kontakta za alergenom, unakrsno se povezuju dve susedne alfa subjedinice Fab fragmenata FcεRI, dolazi do aktivacije mastocita i bazofila. Oslobađa se veliki broj medijatora: vazoaktivni amini (histamin, proteaza, proteoglikani), hemokini (CXC-hemokinski ligand-8, CXCL10, CCL2, CCL4, CCL5), leukotrijeni, prostaglandini, tromboksan, faktor aktivacije trombocita, neuropeptidi (supstanca P i neurokin A), dovodeći do pojave simptoma. U daljem toku, dolazi do influksa IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, koji su zaduženi da se održava proces inflamacije. IL-4 je ključni citokin, indukuje ekspresiju adhezivnih molekula: intraćelijskog adhezivnog molekula 1 (engl. Intercellular Adhesion Molecule-ICAM-1) i vaskularnog ćelijskog adhezivnog molekula 1 (engl. Vascular cell adhesion molecule 1 - VCAM-1), koji dovode do hemotakse eozinofila, bazofila, monocita i T limfocita na mesto alergijske inflamacije (12). IL-5 i IL-13 imaju ulogu u eozinofilnoj inflamaciji, stvaranju mukusa i remodelovanju (13). IL-9, produkt Th9 limfocita, ima uloga u bronhijalnoj hiperraktivosti i sekreciji mukusa (14).

Eozinofili su vrlo bitne ćelije u patogenezi astme. Glavni citokin za njihovu aktivaciju, sazrevanje i kretanje iz kostne srži prema tkivima jeste IL-5, koga proizvode Th2 ćelije. Aktivirani eozinofili ostvaruju svoje efekte preko citotoksičnih proteina i lipidnih medijatora: glavnog baznog proteina (engl. major binding protein (MBP), eozinofilne peroksidaze (EPO), eozinofilnog katjonskog proteina (ECP), neurotoksina poreklom iz eozinofila (engl. eosinophil-derived neurotoxin-EDN), cisteinil leukotrijena, akutnih proinflamatornih citokina (tumor nekroze alpha-TNFα, IL-1b, IL-6, IL-8), hemokina. Sekrecijom ovih supstanci, eozinofili dovode do stalne upalne reakcije i oštećenja u plućima (15). Preko stvaranja cisteinil leukotrijena i transformišućeg faktora rasta beta (engl. transforming growth factor TGF-β), eozinofili imaju ulogu u remodelovanju (16). Novija istraživanja ukazuju da eozinofili mogu da stvore eozinofilne ekstraćelijske zamke, a da je njihovo stvaranje vezano za galektin 10 koji stvara Šarko-Lajden kristale koji su prisutni u mukusu pacijenta sa astmom (engl. Charcot-Leyden crystals-CLCs) (17, 18). Moguće je se da CLC zajedno sa ekstraćelijskim zamkama dovode do promene strukture mukusa, koji je kao takav znatno teži za iskašljavanje, i da mogu inicirati Th2 ćelijski odgovor (18). Pored Th2 ćelija, pokazano je i da CD4+ rezidualne

memorijske ćelije igraju ulogu u eozinofilnoj inflamaciji. Ove ćelije, koje se nalaze u tkivima, se aktiviraju vrlo brzo nakon reekspozicije alergenu i proizvode više Th2 citokina nego cirkulišući Th2 limfociti, ali nije poznat tačan način aktivacije ovih memorijskih ćelija (11).

1.4.2. Urođeni imunski odgovor u patogenezi inflamacije astme

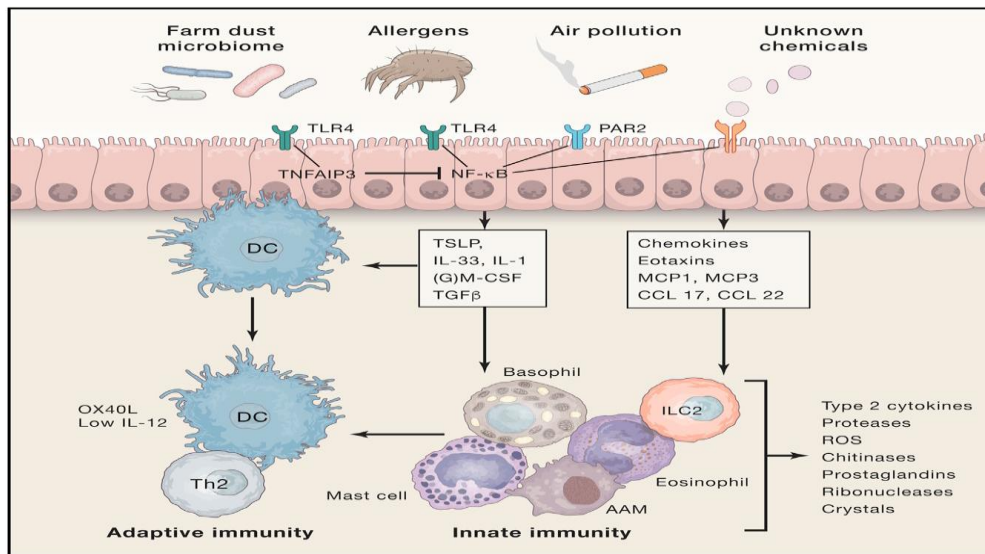
Otkriće da urođene limfoidne ćelije tipa 2 (engl. innate lymphoid cell-ILC2) proizvode klasične Th2 citokine je dovelo da pomeranja paradigme da u patogenezi astme ulogu ima isključivo stečeni imunski odgovor. Urođene limfoidne ćelije nemaju markere za antigen specifične T i B receptore niti za mijeloidne ćelije, pa kao takve pripadaju antigen negativnim limfocitima (19). To su uglavnom tkivne ćelije i čine ih tri subseta: ILC-1, ILC-2, ILC-3, koje na neki način imaju svoje paralele u ćelijama stečenog imunskog odgovora. Tako su ILC-1 slične Th1 limfocitima, ILC-2 slične Th2 limfocitima, a ILC-3 slične Th17 limfocitima (20). ILC-2 su tkivne ćelije koje produkuju citokine IL-4, IL-15, IL-13 i sadrže transkripcioni faktor GATA-3 (21,22). Ove ćelije se aktiviraju signalima koje vode poreklo od "alarmina": IL-33, IL-25 i timusnog stromalnog limfopoetina (engl. thymic stromal lymphopoietin-TSLP) (23,24). Alarminne stvaraju epitelne ćelije u kontaktu sa alergenima i nakon povrede epitela i produkuju citokine koje aktiviraju ILC-2 (25).

IL-33 je proinflamatorni citokin koji pripada familiji IL-1 citokina, a vezuje se za heteromerični receptor koji se sastoji od ST2 (engl. suppression of tumorigenicity, supresor tumorogeneze) i koreceptora: pomoćni receptorski protein za IL-1 (IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP), koji preko MyD88 and IL-1 receptor asociirane kinase (engl. IL-1R-associated kinase -IRAK) aktivira signalne puteve aktivacije ovog citokina (26). Mastociti, ILC-2, Th2 limfociti ekspimiraju ST receptor, tako da IL-33 vezivanjem za ove receptore aktivira ključne ćelije u astmi (24).

IL-25 pripada familiji IL-17 citokina, a vezuje se za receptore IL-17RB i IL-17RA, pa se preko adapterskog proteina Akt1 aktiviraju njegovi signalni aktivacioni putevi (27). Ćelije za koje se vezuje IL-25 su T limfociti, ILC-2, NK ćelije, fibroblasti, epitelne, endotelne mezenhimske ćelije, a glavni izvori IL-25 su mastociti, bazofili, eozinofili, alveolarni makrofagi, epitelne ćelije. Na mišijim modelima astme pokazano je da IL-25 ima ulogu i u angioneogenezi u plućima, kao i u povećanoj kontraktilnosti glatke muskulature (28, 29). TSLP pripada IL-2 familiji citokina, a vezuje za svoj receptor koji je ekspimiran na endotelnim i epitelnim ćelijama, T limfocitima, B limfocitima, NK ćelijama, monocitima, eozinofilima, bazofilima, ILC-2 (30). Pokazano je da TSLP promovise Th2 diferencijaciju i povećanu ekspresiju Th2 citokina (31-33).

Sumirajući imunološke mehanizme u astmi, Lambrecht i Hamad su dali shematski prikaz uloge urođenog imunskog odgovora u astmi (slika 2) (11). Alergeni i različiti trigeri preko aktivacije receptora sličnih Toll-u (engl. toll-like receptors-TLR) i proteaza aktiviranih receptora (engl. protease activated receptors- PAR) aktiviraju alarminne IL-33, TSLP, IL-25, faktor stimulacije granulocita-makrofaga (engl. colony-stimulating factor granulocyte-macrophage-CFGM), hemokine, eotoksine, koji imaju različite efektorske uloge u astmi. IL-33, IL-25, TSLP

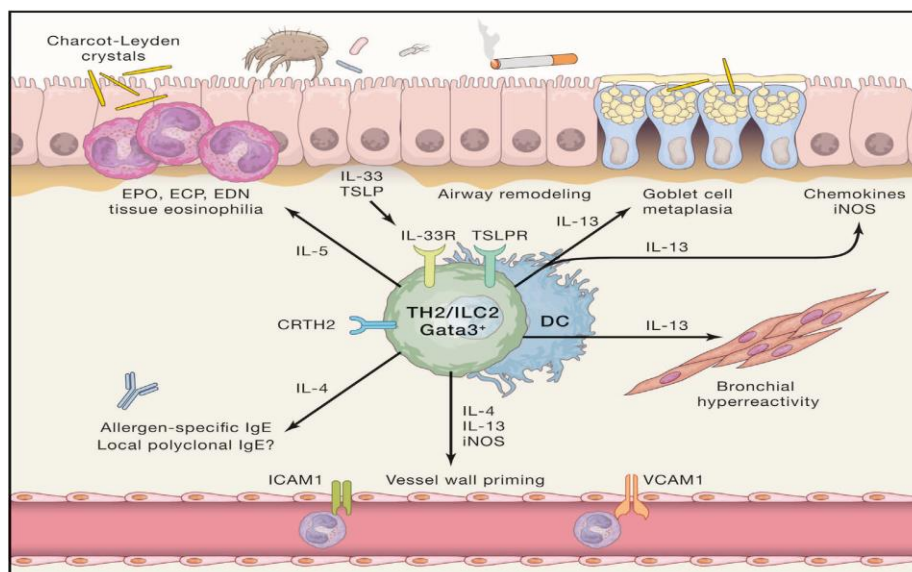
aktiviraju ILC-2 koje sekretuju IL-4, IL-5, IL-13 i dolazi do eozinofilne inflamacije putem različitih efektorskih mehanizama ovih citokina.



Slika 2. Uloga urođenog imunskog sistema u patogenezi astme, preuzeto i adaptirano prema referenci 11

1.4.3. T2 inflamacija

Promena shvatanja da je astma više od Th2 posredovane bolesti, jer i ćelije urođene imunosti, ILC-2, stvaraju tipične Th2 citokine, je dovela do toga da se inflamacija u astmi danas može podeliti na Tip 2 (T2) i non Tip2 (non T2). Tip 2 inflamacija u literaturi se može naći i pod nazivima Th2, Th2 “high”, a danas se uglavnom sreće pod imenom T2 inflamacija. T2 inflamaciju odlikuje aktivacija Th2 ćelija i ILC-2, koji preko različitih mehanizama dovode do eozinofilne upale u disajnim putevima. Ove ćelije proizvode iste citokine IL-4, IL-5, IL-13 i aktiviraju se preko transkripcionog faktora GATA3 i CRTH2 (engl. chemoattractant receptor-homologous molecule). Sumirano, nakon kontakta sa alergenom, Th2 memorijski limfociti se restimulišu preko DC, aktiviraju i sekretuju IL-4, IL-5, IL-13, a sa druge strane ILC-2 sekretuju ove iste citokine, nakon direktne aktivacije alarminima: IL-33, IL-25 i TSLP. Ključni aktivator eozinofilne maturacije i aktivacije jeste IL-5. Aktivacija eozinofila se odvija vezivanjem IL-5 za IL-5R α , stvara se kompleks IL-5R α / β , preko signalnih puteva JAK2, STAT1, STAT3, STAT5. Rezultat aktivacije je degranulacija eozinofila i oslobađanje toksičnih granula kao što su EPO, EDN koji dovode do inflamacije i oštećenja disajnih puteva. Eozinofili ekspresiraju IL-5R α . IL-13 dovodi do bronhijalne reaktivnosti, metaplazije peharastih ćelija i eozinofilne inflamacije, a IL-4 dovodi do produkcije IgE antitela i preko ICAM-1 i VCAM-1 promovise ekstravazaciju eozinofila (Slika 3, prema referenci 11). T2 inflamacija je prisutna u različitim fenotipovima astme, u alergijskoj i nealergijskoj astmi, pa astma može biti alergijska eozinofilna i nealergijska eozinofilna.



Slika 3. Patofiziološki mehanizmi T2 inflamacije, preuzeto i adaptirano prema referenci 11

1.4.4. Non T2 inflamacija

Klinička zapažanja da inhalaciona kortikosteroidna terapija, kao osnova terapije za astmu, ne dovodi uvek do kliničkog efekta kod svih pacijenta je dovela do razmišljanja da osim T2 inflamacije postoje i pacijenti koji nemaju dominantnu eozinofilnu inflamaciju u disajnim putevima. Ovaj tip inflamacije je neozinofilni, a u literaturi se može naći pod nazivima non Th2, Th2 “low”, neozinofilna astma, a danas se najčešće definiše kao non T2 inflamacija.

Više istraživanja je ukazalo na postojanje drugih mehanizama osim T2 inflamacije. Dve studije Woodruffa i saradnika su pokazale da postoje dva različita molekularna inflamatorna mehanizma u astmi (34, 35). Utvrđeno je da su tri bronhijalna epitelna gena: periostin (POSTN), regulator hloridnih kanala 1 (engl. chloride channel regulator 1-CLCA1) i inhibitor serpin peptaze (engl. serpin peptidase inhibitor, clade B, member 2 -SERPINB2) eksprimovani kod pacijenta sa astmom, da se in vitro mogu direktno stimulisati citokinom IL-13 i da kao takvi mogu biti markeri Th2 inflamacije (34). Međutim, u drugoj studiji, analizirajući 42 pacijenta sa astmom, pokazano je da ovi IL-13 povezani geni su prisutni kod 22 pacijenta, odnosno kod polovine, a da ih kod polovine nema (35). Autori su zaključili da postoje 2 tipa inflamacije: Th2 “high” i Th2 “low”.

Za razliku od T2 inflamacije koja je dosta proučavana, nisu dobro poznati svi non T2 mehanizmi. Predpostavlja se da se epitel disajnih puteva i alveolarni makrofagi aktiviraju pod uticajem različitih faktora okoline, kao što su mikrobi, pušenje ili zagađenje. Nakon aktivacije epitelnih ćelija i alveolarnih makrofaga, dolazi do stvaranja proinflamatornih citokina (IL-6, IL-1b, IL-8) koji dovode do hemoatrakcije neutrofila, a pod uticajem Th1 i Th17 dolazi do dalje neutrofilne aktivacije. Oštećenje epitelnih ćelija i mukusa nastaju usled produkata oslobođenih iz neutrofila: neutrofilnih elastaza, mijeloperoksidaze i reaktivnih kiseoničnih vrsta (11).

Potencijalni patofiziološki mehanizmi koji se vezuju za non T2 inflamaciju su: inflamacija u disajnim putevima sa neutrofilijom posredovanom IL-17 i interferonima; sistemska inflamacija udružena sa IL-6, gojaznošću i metaboličkim poremećajima, kao i paucigranulocitni neinflamatorni mehanizmi (36). Od svih navedenih mehanizama, najviše je proučavana uloga IL-17A. Ovaj citokin pripada IL-17 familiji i proizvode ga Th17, NK ćelije, CD8 + T limfociti, ILC-3. Predpostavljeni patološki efekat IL-17A u astmi jeste pojačana regulacija faktora stimulacije kolonija 3 i hemokinskih liganada, koji dovode do neutrofilije u disajnim putevima, zatim uloga u bronhijalnoj hiperreaktivnosti i rezistenciji na kortikosteroide (37-39). Međutim, primena brodalumaba, humanizovanog monoklonskog anti IL-17 R antitela, kod pacijenata sa umerenom do teškom nekontrolisanom astmom, nije dovela do kliničkih efekata (40).

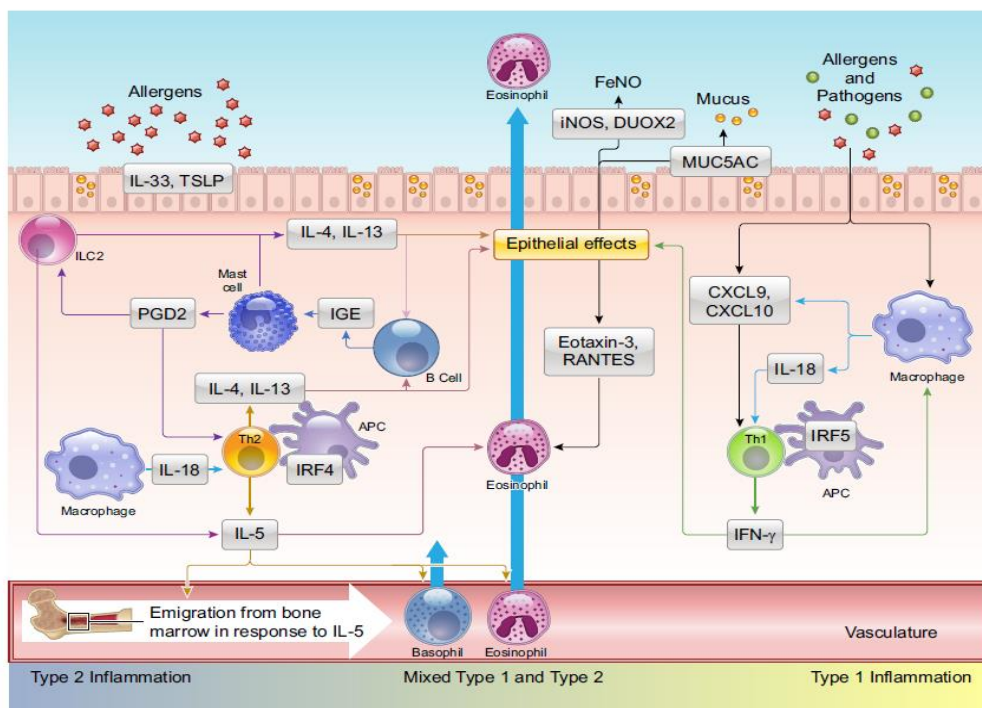
Na površini epitelnih ćelija, DC, granulocita, T limfocita se nalaze receptori prepoznavanja obrazaca (engl. pattern recognition receptors-PRR) koji prepoznaju molekulske obrasce oštećenja (engl. danger associated molecular patterns-DAMP) i molekulske obrasce patogena (engl. pathogen associated molecular patterns-PAMPs), pokretajući kaskadu reakcija stimulacije preko receptora sličnim NOD-u (engl. NOD-like receptors -NLRP). Poznato je da NLRP-3, stimuliše pojačanu produkciju inflamatornog citokina IL-1 β , a da kompleks NLRP-3, adapter i kaspaza-1 čine inflazom, koji je bitan u odbrani domaćina od infekcija, ali ima ulogu i u različitim bolestima, kao što ateroskleroza, reumatoidni artritis. IL-1 β ima ulogu u diferencijaciji Th17 limfocita i stvaranju IL-17A. Pokazano je da su IL-1 β , NLRP-3, kaspaza 1, povišeni kod pacijenta koji imaju tešku astmu (41). Ova saznanja ukazuju na ulogu ćelija urođenog imuniteta u astmi, pre svega svega u neutrofilnoj astmi. Sa druge strane, u mišijim modelima astme je uočeno da neutrofili iz pluća koji ekspresiraju hemokinski receptor CXCR4 i koji stvaraju ekstraćelijske zamke, mogu da budu okidač i za T2 inflamaciju (42). Stoga, jasna podjela na eozinofilnu i neutrofilnu inflamaciju se ne može uvek prihvatiti, jer dolazi do preklapanja patofizioloških mehanizama koji se striktno vezuju za jedan tip inflamacije.

Uloga Th1 imunskog odgovora u astmi je ranije shvatana kao protektivna za razvoj astme, imajući u vidu Th1/Th2 paradigmu, prema kojoj se razvijaju ili patološki (Th2) ili protektivni (Th1) odgovor u susretu sa alergenima. Međutim, istraživanja ukazuju da i Th1 odgovor može biti patološki u astmi. Th1 imunski odgovor, sa sekrecijom glavnog citokina, interferon gama (IFN- γ), je ključan u borbi sa intraćelijskim mikrobima, koji direktnom aktivacijom preko IL-12 sekretujućih DC dovode do Th1 diferencijacije. Istraživanje pacijenta sa teškom astmom, kao i na mišijem modelu teške astme je ukazalo na ulogu IFN- γ , odnosno da su veće vrednosti IFN- γ , a niže vrednosti sekretornog inhibitora leukocitarne proteaze (engl. secretory leukocyte protease inhibitor-SLPI) povezane sa bronhijalnom hiperreaktivnošću (43). SLPI stvaraju epitelne ćelije, a pokazano je da ova proteaza inhibira bronhijalnu hiperreaktivnost preko inhibicije triptaza koje aktiviraju PAR-2 (44). Autori ove studije na mišijem i humanom modelu su zaključili da pojačan Th1 odgovor, a smanjena SLPI ekspresija mogu imati značajnu ulogu u teškoj astmi. Pokazano je da su kod pacijenta sa teškom astmom povišeni nivoi IFN- γ povezani sa većom genskom ekspresijom CXCL10, koji je ključni hemoatraktant za kretanje

Th1 ćelija na mesto infekcije (44). Ove povišene vrednosti IFN- γ mogu biti odgovorne za stalno prisutnu Th1 inflamaciju kod kortikosteroidno zavisne teške astme, a kortikosteroidi kod ovih pacijenata ne dovode do supresije inflamacije, jer ne suprimiraju signalne puteve aktivacije IFN- γ (45).

Analizirajući i sumirajući saznanja o non T2 inflamaciji, grčki autori su predložili nekoliko mogućih patofizioloških scenarija (46). Različiti nealergijski stimuli (pušenje, virusne infekcije, zagađivači) dovode do Th1/Th17 imunskog odgovora u disajnim putevima. Aktivacija IL-17, ali i ILC-3, uzrokuje sintezu i sekreciju citokina IL-8 i CXCL sa posledičnom neutrofilnom inflamacijom disajnih puteva, hiperreaktivnosti i remodelovanja. Neinflamatorni (paucigranulocitni) mehanizmi su slabo proučavani. Ova non T2 inflamacija se odlikuje manjim brojem eozinofila i neutrofila. Mogući patofiziološki mehanizmi su disfunkcija glatkih mišićnih ćelija i neurogeni mehanizmi (36).

Heterogenost i plastičnost Th limfocita, posebno u in vivo uslovima, ukazuje na intreakcije i povezanost Th1, Th2, Th17 odgovora u astmi i dovodi u pitanje dominaciju isključivo jednog imunološkog mehanizma. U odnosu na aktuelni citokinski milje i u odnosu na vremenski okvir koji se posmatra, ovi subsetovi Th limfocita mogu imati međusobne reakcije u procesima koji dovode do inflamacije, mogu se preklapati, menjati dominantnu ulogu, uticati jedni na druge, što svakako otežava potpuno razumevanje patogenetskih mehanizama u astmi (47). Zbog ovih složenih imunoloških procesa, teško je ustanoviti koliko tačno ima fenotipova u astmi, tačno ih definisati i povezati fenotip sa kliničkom slikom. Ray i saradnici su ukazali na ovu kompleksnost i povezanost T2 i non T2 inflamacije (Slika 4) (48).



Slika 4. T2 i non T2 inflamacija, preuzeto i adaptirano prema referenci 48

1.5. Inflamatorni fenotipovi astme

Poznavanje različitih patofizioloških mehanizma inflamacije u astmi je bitno za definisanje inflamatornih fenotipova. Dve vrlo bitne studije 90-ih godina prošlog veka, koje su analizirale endobronhijalne bioptate pacijenata sa astmom, su upravo demonstrirale da postoji više inflamatornih fenotipova. Prva studija iz 1996. godine je ukazala da i alergijska i nealergijska astma imaju povećanu ekspresiju mRNA (engl. messenger RNA) koja kodira IL-4 i IL-5, ključne citokine alergijske astme, kao i povećane imunoreaktivne IL-4 i IL-5 ćelije, što navodi na zaključak da su i kod pacijenata sa nealergijskom astmom prisutni "tipični" alergijski mehanizmi (49). Druga značajna studija iz 1999. godine Sally Wenzel i saradnika je otkrila da postoje dva različita inflamatorna podtipa kod pacijenta sa teškom kortikosteroidno zavisnom astmom (50). U ovoj studiji, imunohistohemijska analiza 34 bronhijalna bioptata je utvrdila eozinofilni (20 pacijenata) i neozinofilni fenotip (14 pacijenata). Eozinofilna grupa je imala veću incidencu životno ugrožavajućih događaja koji su zahtevali mehaničku ventilaciju, a nije bilo razlike u upotrebi kortikosteroida, dužini trajanja astme, i u FEV1 između ova 2 fenotipa. To je bila jedna od prvih studija koja je ukazala na eozinofilni i neozinofilni inflamatorni fenotip i povezala ih sa određenim kliničkim karakteristikama, odnosno istakla koncept fenotipova i endotipova u astmi.

Inflamacija u astmi se može "meriti" na različite načine. Najpristupačniji i najviše korišćeni dijagnostički parametri, spirometrija i vršni ekspirijumski protok (PEF) ne pružaju podatke o inflamaciji. Ona se određuje analizom ćelijskog supstrata u disajnim putevima, a u tu svrhu se mogu koristiti analize endobronhijalnog bioptata, bronhoalveolarnog lavata (BAL), indukovano sputuma. Poređenje ćelijskih elemenata ove tri različite metode je pokazalo da postoje razlike: u indukovanom sputumu ima više neutrofila, u BAL-u makrofaga i limfocita, a u bioptatu pluća više limfocita, međutim, imajući u vidu da je broj eozinofila sličan u sve tri metode, došlo se do zaključka da je indukovani sputum neinvazivni metod za utvrđivanje plućne eozinofilije (51). Analiza bronhoalveolarnog bioptata i BAL su jako korisne metode, ali vrlo zahtevne i nemaju kliničku primenu u svakodnevnom radu. Metoda indukovano sputuma je danas metoda izbora za utvrđivanje inflamatornih fenotipova astme.

1.5.1. Inflamatorni fenotipovi astme analizom indukovano sputuma

Indukovani sputum se primenjuje od 90-ih godina prošlog veka u analizi inflamacije u astmi i kao metod za utvrđivanje ćelijskih elemenata je validiran i reproducibilan (52,53). Postoje različiti načini kolekcije indukovano sputuma, a princip je da se udisanjem hipertono rastvora sputum indukuje, zatim se pristupa analizi ćelijskih elemenata, koga čine eozinofili, neutrofilni, limfociti, makrofagi, a u odnosu prema ukupnom broju neskvamoznih ćelija. Takođe, u astmi ova metoda se može koristiti i za merenje i analizu i citokina, medijatora aktiviranih eozinofila, produkata azot oksida (54). Metoda je standardizovana i detaljno objašnjena u smernicama Evropskog respiratornog udruženja (engl. European Respiratory Society- ERS) (55, 56).

Istraživanja govore da postoje razlike u ćelijskim elementima kod zdravih i obolelih od astme i da pacijenti sa astmom imaju povećan broj eozinofila u odnosu na zdrave kontrole (54). Prva studija koja je definisala 4 inflamatorna fenotipa na osnovu analize indukovano g sputuma je bila studija Simsona i saradnika (57). Na osnovu vrednosti eozinofila i neutrofila koristeći 95. percentil zdravih kontrola kao graničnu vrednost, 93 pacijenata sa astmom su podeljeni u 4 inflamatorna fenotipa: eozinofilni, neutrofilni, mešoviti granulocitni i paucigranulocitni. Pacijenti sa >61% neutrofila su imali neutrofilni fenotip, oni sa >1.01% eozinofilni, mešoviti granulocitni fenotip su imali pacijenti sa >61% neutrofila i >1.01% eozinofila, a paucigranulocitni fenotip je karakterisan sa procentom eozinofila i neutrofila ispod ovih vrednosti. Prema ovim definisanim vrednostima za fenotipove, od 93 ispitanika, 38 pacijenta je imalo eozinofilni fenotip, 29 paucigranulocitni, 19 neutrofilni i 7 mešoviti granulocitni.

Međutim, u istraživanjima se koriste različite granične vrednosti za definiciju inflamatornih fenotipova i ne postoje tačno definisane i univerzalno prihvaćene vrednosti eozinofila i neutrofila na osnovu kojih se definišu fenotipovi. Vrednosti eozinofila se kreću 2 do 4% za definisanje eozinofilnog fenotipa, a za neutrofilni, vrednosti neutrofila u sputumu se kreću od 40-76% (46). Razmatrajući reproducibilnost različitih vrednosti eozinofila u sputumu, počev od 1%, pokazano je da "cut-off" vrednosti od 3% eozinofila u odnosu na 2% bolje korelišu za definisanje eozinofilnog fenotipa, odnosno za razlikovanje eozinofilnog i neozinofilnog fenotipa (58). Ovo je potvrđeno i u analizi Gibsona, prema kome je >3% eozinofila u sputumu granična vrednost za razlikovanje eozinofilne od neozinofilne astme za svakog individualnog pacijenta, a eozinofilni fenotip se karakteriše dobrim odgovorom na kortikosteroidnu terapiju (Tabela 1) (59). Iako analiza indukovano g sputuma pruža značajne informacije za svakog pacijenta, GINA vodiči je ne savetuju u rutinskom radu (2).

Tabela 1. Granične vrednosti za definisanje fenotipova, adaptirano prema referenci 57

Inflamatorni fenotip	Granične vrednosti u sputumu
Neutrofilna astma	Neutrofilni >61%
Eozinofilna astma	Eozinofili >3%
Mešovita granulocitna astma	Neutrofilni >61%, Eozinofili >3%
Paucigranulocitna astma	Neutrofilni <61%, Eozinofili <3%

1.5.2. Stabilnost i klinički značaj inflamatornih fenotipova

Fenotipovi u astmi su pod uticajem različitih faktora okoline i mogu se menjati tokom vremena (8,9). Stabilnost fenotipova zasnovanih na analizi indukovano g sputuma je bitna informacija, jer na osnovu nje se može odrediti terapijski pristup, naročito kod pacijenta sa teškom astmom. U studiji koja je po prvi put definisala 4 inflamatorna fenotipa pokazana je stabilnost neozinofilnog fenotipa tokom perioda od 5 godina (58). Stabilnost eozinofilnog fenotipa je takođe bila prisutna nakon 5 godina kod pacijenta sa astmom teškoj za lečenje i bila je povezana sa astmom kasnijeg početka, sinusitisom, stalnom opstrukcijom i eozinofilijom u serumu (60).

Međutim, nestabilnost fenotipova tokom vremenskog perioda, definisanih analizom indukovano sputuma, je proučavano u istraživanju koje se praktično sastojalo od dva klinička dela (61). U prvoj kliničkoj studiji, koja je analizirala sputume pacijenata nakon 4 nedelje bez inhalacionih kortikosteroida (IKS) i nakon 6 nedelja sa placebo, je pokazano da samo jedan pacijent od 8 sa inicijalnim neozinofilnim fenotipom je zadržao ovaj isti fenotip tokom praćenja. Drugi deo studije je analizirao 26 pacijenata 12 nedelja nakon placebo terapije. Svi pacijenti su promenili inicijalni fenotip. Autori su utvrdili da su fenotipovi u astmi nestabilni, da je nestabilnost posledica efekata kortikosteroidne terapije i da je upitno postojanje neozinofilnog fenotipa. Zaključuju da je neozinofilni fenotip deo širokog spektra eozinofilnog fenotipa i da, u stvari predstavlja dobro lečeni eozinofilni fenotip. Imajući u vidu da IKS mogu uticati na eozinofile u sputumu, dovodi se u pitanje postojanje drugih fenotipova. Prema Gibsonu, oko 30% pacijenata sa neutrofilnim fenotipom su oni pacijenti koji imaju u stvari eozinofilni fenotip i lečeni su IKS, a ostali pacijenti imaju "pravi" neutrofilni fenotip (59).

Značaj analize indukovano sputuma u kliničkoj praksi je pokazan pre više od 20 godina (62). Važnost određivanja indukovano sputuma se ogleda u tome da može da utvrdi adekvatnost potrebe za IKS, da se selektuju pacijenti koji nisu prikladni za kortikosteroidnu terapiju, odnosno da ova analiza treba da bude jedan od glavnih faktora na osnovu kojih se donose odluke o terapijskom pristupu (59). Studija Greena i saradnika je pokazala smanjenje egzacerbacija u grupi pacijenata sa umernom do teškom astmom koji su lečeni shodno nalazima sputuma, u odnosu na grupu koji su lečeni prema smernicama Britanskog torakalnog udruženja (engl. British Thoracic Society-BTS) (63). Odluke o terapiji u grupi pacijenata sa indukovanim sputumom su se odnosile na smanjenje antinflatatorne terapije: ako su vrednosti eozinofila u sputumu bile <1%, terapija nije menjana, a intenzivirana je ako su eozinofili bili >3%. Nakon godinu dana praćenja, kod pacijenata koji su lečeni shodno nalazima eozinofila u sputumu je pokazano smanjenje eozinofila u sputumu za 63% u odnosu na drugu grupu koja je lečena prema BTS vodičima. Takođe, zabeleženo je i manje egzacerbacija u grupi lečenoj prema analizi indukovano sputuma. I analiza 3 studije sa ukupno 221 pacijenata je pokazala smanjenje egzacerbacija ukoliko se za terapijske odluke koristi analiza indukovano sputuma u odnosu na kliničke simptome (64).

Klinički značaj metode indukovano sputuma je prisutan i u drugim aspektima. Rezultati praćenja 197 pacijenata sa 4 različita inflamatorna fenotipa (neutrofilni kod 33%, eozinofilni kod 23%, mešoviti granulocitni kod 22% i paucigranulocitni kod 24% pacijenata) tokom godinu dana su ukazali da pacijenti sa eozinofilnim i mešovitim granulocitnim fenotipom imaju više opstrukcija i egzacerbacija, lošiju kontrolu bolesti i disfunkciju malih disajnih puteva u odnosu na paucigranulocitni fenotip (65). Utvrđeno je da je stalno prisutan nalaz eozinofilije u sputumu nezavistan prediktor lošijeg FEV1 i parametara disfunkcije malih disajnih puteva. Ukazano je da eozinofilija u sputumu, zajedno sa frakcijom izdahnutog azot monoksida (engl. fractional exhaled nitric oxide-FENO), mogu biti prediktori poboljšanja plućne funkcije kod pacijenata koji uzimaju kortikosteroidnu terapiju, odnosno da pacijenti sa eozinofilnom

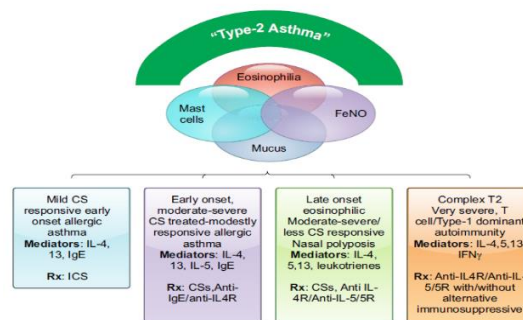
inflamacijom pokazuju dobar terapijski odgovor na oralne kortikosteroide (66). Eozinofili u sputumu mogu da budu dobar pokazatelj odgovara na IKS/LABA (engl. inhalation corticosteroid/long acting beta 2 agonist) terapiju, pošto je zapaženo da se vrednosti eozinofila kod pacijenata sa umerenom do teškom astmom smanjuju nakon godinu dana i korelišu sa boljom kontrolom bolesti (67). U ovom istraživanju 65 pacijenata sa astmom, na koraku 2 ili 3 prema GINI, su lečeni su salmeterolom/ flutikazonom (50 µg/250 µg) jednom ili 2 puta dnevno i praćeni tokom godinu dana. Nakon godinu dana je pokazano značajno smanjenje eozinofila u sputumu u odnosu na početne vrednosti, kao i smanjenje FeNO, a ovi parametri su korelisali sa boljom kontrolom bolesti. I pored toga što je etabrirana uloga i značaj indukovano g sputuma kao metode procene inflamacije u plućima, neki autori dovode u pitanje značaj ove metode, odnosno iskazuju sumnju u povezanost indukovano g sputuma sa kliničkim, funkcionalnim parametrima i sa bronhijalnom hiperreaktivnošću (68).

1.6. Klinički fenotipovi u astmi

Prva podela na kliničke fenotipove je bila na ekstrinzičku (alergijsku) i neektrinzičku (nealergijsku astmu) (2). Alergijsku astmu se karakterisali raniji početak bolesti, udružnost sa alergijskim bolestima, atopijom i porodičnom anamnezom alergijskih bolest. Nealergijsku astmu je odlikovalo starije životno doba, bez podataka o alergijskim bolestima u ličnoj i porodičnoj anamnezi, uz uredan nivo IgE i negativne kožne prick testove na standardne inhalacione alergene. Sametrova trijada je dobro poznati klinički fenotip, pacijenti imaju astmu, nazalnu polipozu i preosetljivost na acetilsalicilnu kiselinu (69). Analizirajući fenotipove u astmi, Sally Wenzel je 2012. godine definisala 5 različitih kliničkih fenotipova: alergijska astma ranog početka, eozinofilna astma kasnog početka, astma izazvana vežbanjem, astma povezana sa gojaznošću i neutrofilna astma (70). GINA navodi postojanje 5 kliničkih fenotipova: alergijska astma (najčešći fenotip, ranog početka, sa porodičnom anamnezom alergijskih bolesti, dobrim odgovorom na IKS i eozinofilnom inflamacijom u sputumu); nealergijska astma (eozinofilna i neutrofilna inflamacija u sputumu, slabiji odgovor na IKS); astma kasnijeg početka (uglavnom prisutna kod žena, bez alergija, počinje kasnije u životu, relativno refraktarna na IKS); astma sa perzistentnom fiksnom limitacijom disajnih puteva; astma udružena sa gojaznošću (3).

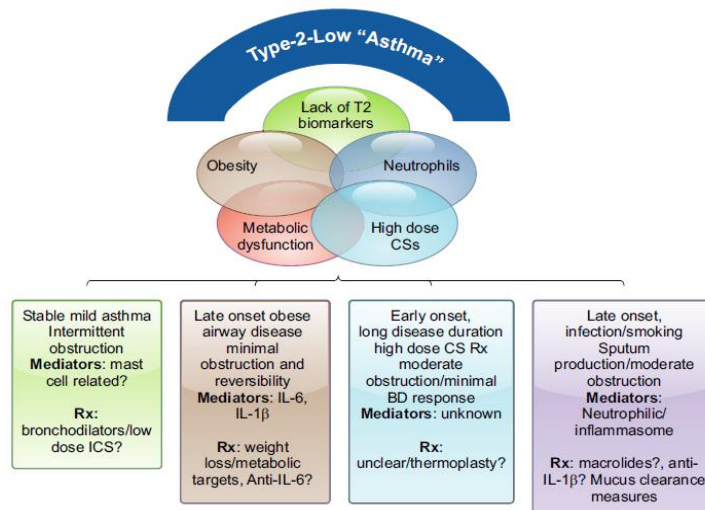
Povezanost kliničkih karakteristika sa patofiziološkim procesima, odnosno sa T2 i nonT2 inflamacijom jeste ključni cilj kada se određuju fenotipovi, jer se na taj način uzimaju u obzir, sveobuhvatno, mnoge karakteristike pacijenta sa astmom. Definisana su 2 klinička fenotipa: T2 i non T2 astma (48). Karakteristike T2 astme su eozinofilija u sputumu i serumu, povišen FeNO, povezanost sa atopijom/IgE, dobar odgovor na kortikosteroide, bronhodilatatorna reverzibilnost, sklonost ka egzacerbacijama i povećana produkcija mukusa (48). S obzirom na to da različiti patofiziološki procesi utiču na ekspresiju kliničkih parametra, postoje bar 4 klinička T2 fenotipa: blaga alergijska astma ranog početka sa dobrim odgovorom na kortikosteroide; umereno teška do teška alergijska astma ranog početka sa umerenim odgovorom na kortikosteroide; umerena do teška eozinofilna astma kasnog početka sa slabijim

odgovorom na kortikosteroide sa ili bez nosne polipoze; i kompleksna, teška astma sa dominantnim Tip1 odgovorom (slika 5) (48).



Slika 5. Klinički fenotipovi T2 astme, preuzeto i adaptirano prema referenci 48

Karakteristike T2 “low” astme su nepostojanje T2 biomarkera, neutrofilija, disfunkcije u metaboličkom sistemu, potreba za većim dozama kortikosteroida (36, 48). Klinički fenotipovi su teški za definisanje jer nisu sasvim poznati svi patofiziološki procesi ove inflamacije, a postoje i veća preklapanja između fenotipova. Definisani su sledeći klinički fenotipovi T2 ”low” astme: stabilna blaga astma sa intermitentnom opstrukcijom; astma gojaznih sa kasnim početkom, minimalnom opstrukcijom i reverzibilnošću; astma ranog početka i dugog trajanja sa visokom dozama kortikosteroida, umernom opstrukcijom i slabim odgovorom na bronhodilatatore; astma kasnog početka, kod pušača sa povećanim stvaranjem sputuma i umernom opstrukcijom (slika 6) (48).



Slika 6. Klinički fenotipovi T2 ”low” astme, preuzeto i adaptirano prema referenci 48

1.6.1. Klaster analize

Fenotipovi se mogu definisati i analizom klastera koji uzimaju u obzir različite varijable u statističkim modelima, a u cilju grupisanja pacijenata sa specifičnim kliničkim karakteristikama. Prva studija koja je definisala fenotipove u astmi na osnovu klaster analize je bila Haldara i saradnika (71). U istraživanju su analizirane različite varijable u tri kohorte: pacijenti sa blagom i umerenom astmom; pacijenti sa refraktornom astmom i pacijenti sa refraktornom astmom koja je terapijski modifikovana shodno eozinofilnoj inflamaciji u sputumu. Varijable su bile: godine postavljenja dijagnoze, pol, atopija, indeks telesne mase (engl. body mass index- BMI), varijabilnost u merenju PEF, broj eozinofila u indukovanom sputumu i simptomi. Identifikovana su tri klastera u grupi pacijenta sa blagom do umerenom astmom: atopijska astma ranog početka sa eozinofilijom; neozinofilna astma povezana sa gojaznošću i ženskim polom, i astma blagog toka bez eozinofilije. U okviru kohorte sa refraktornom astmom, definisana su 4 klastera: prva dva slična kao u kohorti blage astme, atopijska astma ranog početka sa eozinofilijom i neozinofilna astma gojaznih žena. Klaster 3 je simptomatska astma ranog početka bez eozinofilije, dok klaster 4 čini eozinofilna astma kasnog početka. Dakle, u različitim stepenima težine bolesti su bila prisutna dva ista klastera: atopijska astma ranog početka sa eozinofilima i neozinofilna astma gojaznih žena. Ovi klasteri su validirani u trećoj kohorti, gde su utvrđena tri klastera astme: klaster gojaznih žena, predominantni inflamatorni klaster i klaster ranog početka sa izraženim simptomima.

U kohorti koja je analizirala 34 varijable kod više od 700 pacijenta sa teškom astmom u istraživanju teške astme (engl. severe asthma research program- SARP), utvrđena su 5 različita klinička fenotipa: atopijska astma ranog početka sa normalnom plućnom funkcijom; atopijska astma ranog početka sa očuvanom plućnom funkcijom, ali većom potrebom za lekovima; neatopijska astma kasnog početka kod gojaznih starijih žena i 2 fenotipa teške opstrukcije sa razlikama u plućnoj funkciji i početku bolesti (72). U narednoj studiji, koja je bila na neki način nastavak predhodne, uključeno je 387 pacijenta sa astmom kao i zdrave kontrole, a pored varijabli iz predhodne studije, dodate su i inflamatorne varijable iz BAL-a, krvi i FeNO (73). Analizom 112 varijabli je definisano 6 različitih klastera: klaster 1 (zdrave kontrole); klaster 2 (alergijska astma ranog početka, umerene težine sa eozinofilima u BAL-u); klaster 3 (teška alergijska astma bez puno simptoma, sa normalnim FEV1, normalnim FeNO, predominantno kod žena hispanoameričkog porekla); klaster 4 (teška astma ranog početka, kod ženskog pola, sa čestim simptomima i posetama lekaru); klaster 5 (teška astma kasnog početka, udružena sa sinusitisom i nazalnom polipozom) i klaster 6 (teška astma ranog početka, sa najlošijom plućnom funkcijom, čestim pogoršanjima, najvećim FeNO i eozinofilijom u BAL-u). Kao ključne varijable za definisanje klastera autori navode: godine postavljanja dijagnoze, kvalitet života, simptome, primenu lekova, nazalne polipe, alergiju, disajnu funkciju, inflamatorne parametre i posete lekaru. Ukoliko se upoređuju klasteri ove dve studije, uočljivo je preklapanje klastera, ali i postojanje potpuno novog klastera teške astme kasnog početka udružene sa sinusitisom i nosnom polipozom.

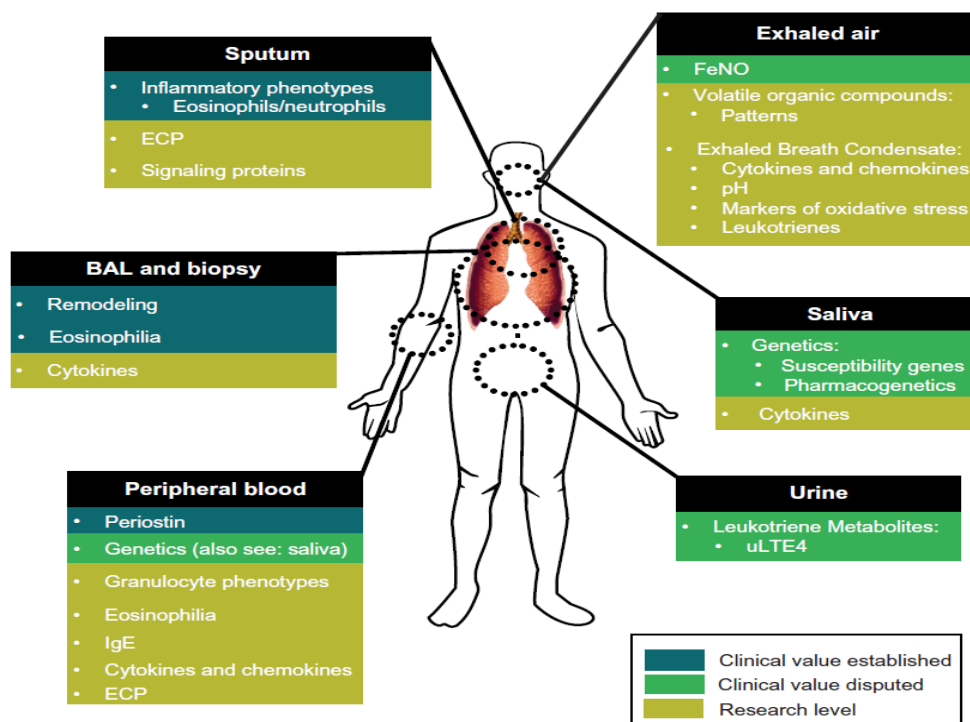
Velika analiza 266 pacijenta sa astmom, i validacijom kod 152 pacijenta, uključujući i pušače, sprovedena u 11 zemalja, nazvana U-BIOPRED (engl. Unbiased Biomarkers in Prediction of Respiratory Disease Outcome) je uključila 8 kliničkih varijabli, a zatim je poredila klasterne analizom podataka indukovanog sputuma (74). Varijable koje su analizirane su bile: godine početka simptoma, podaci o pušenju, BMI, FEV1, FEV1/FVC, prosečan skor upitnika za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire-ACQ), anamnestički podaci o egzacerbacijama u predhodnoj godini i dnevne doze oralnog prednizolona ili ekvivalenta. Ove varijable su dostupne u svakodnevnom kliničkom radu. Identifikovana su 4 klastera: 1. klaster (dobro kontrolisana umerena do teška astma); 2. klaster (teška astma kasnijeg početka sa istorijom pušenja i hroničnom opstrukcijom); 3. klaster (teška astma kasnijeg početka sa hroničnom opstrukcijom, ali bez pušenja); 4. klaster (predominantno gojazne žene sa nekontrolisanom teškom astmom, čestim pogoršanjima i normalnom plućnom funkcijom). Nakon analize indukovanog sputuma pokazano je da 2., 3., i 4. klaster imaju veću eozinofiliju u sputumu nego 1. klaster, ali da nema razlike u neutrofilima u sputumu, FeNO i IgE.

Studija Yana i saradnika je merila ekspresiju gena u sputumu i u krvi kod 100 pacijenta sa astmom i utvrdila 3 klastera: klaster 1 (pacijenti sa anamnezom životno ugrožavajućih napada astme, visokim FeNO, eozinofilijom u sputumu, nižim prebronhodilatatornim FEV1, sa najvećim nivoom genske ekspresije IL-4, IL-5, IL-13); klaster 2 (najveći broj hospitalizacija, heterogen) i klaster 3 (normalna plućna funkcija, nizak FeNO, niže doze IKS), bez značajnije ekspresije Th2 gena u klasterima 2 i 3 (75). Kaur i Chupp su sumirali rezultate SARP, U-BIOPRED, Haldarove i Yanove studije, kao i studije koja je prva definisala inflamatorne fenotipove, a uzeli su u obzir da se radi o različitim populacijama i različitim metodama klasteringa, sa različitim brojem ispitanika i parametrima koji su korišćeni (76). Autori su pokušali da na osnovu navedenih klaster studija sumiraju karakteristike, pa su definisali 4 fenotipa: blaga alergijska astma ranog početka, srednje teška do teška alergijska astma ranog početka, nealergijska eozinofilna astma kasnog početka i nealergijska neeozinofilna astma kasnog početka (76).

1.7. Biomarkeri inflamatornih fenotipova

Inflamacija disajnih puteva je ključna odlika astme, a određivanje tipa inflamacije je bitno da bi utvrdili fenotip pacijenata, na osnovu čega možemo doneti i odluke o načinu lečenja. Najbolji način utvrđivanje inflamatornih fenotipova u astmi je metoda indukovanog sputuma. Međutim, ona se ne primenjuje rutinski u svakodnevnom radu jer zahteva vreme, visokokvalifikovano osoblje, pa se uglavnom sprovodi u visokospecijalizovanim centrima koji se bave lečenjem astme ili se koristi u svrhu naučno istraživačkog rada. Zato je određivanje biomarkera koji korelišu sa inflamatornim fenotipovima dobijenim indukovanim sputumom značajno, pre svega u kliničkoj praksi. Biomarker je objektivno meren i evaluiran pokazatelj bioloških i patoloških procesa, kao i farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju (78). Biomarkeri imaju ulogu u dijagnostici, u stejdžingu i klasifikaciji rasprostranjenosti bolesti,

važni su indikatori prognoze bolesti i imaju ulogu u predviđanju i monitoringu kliničkog odgovora na intervenciju. Dakle, idealan biomarker je specifičan, senzitivan, reproducibilan i koreliše sa aktivnošću i prognozom bolesti (78). Istraživanja na polju biomarkera u astmi su poslednjih godina jako aktuelna. Idealan biomarker u astmi treba da odražava patofiziološki proces ili procese, da bude lako dostupan, da koreliše sa aktivnošću bolesti i da na osnovu njega možemo da određujemo terapijski pristup. Postoje dijagnostički, terapijski, prediktivni biomarkeri, koji su dostupni iz različitih bioloških supstrata, iz krvi, sputuma, izdahnutog vazduha, urina, BAL-a, pljuvačke, urina, bioptata pluća (slika 7) (79). Imajući u vidu dobro definisanu podelu na T2 i non T2 inflamaciju, biomarkere možemo svrstati u jednu od ovih grupa.



Slika 7. Biomarkeri prema kliničkom značaju i mestu uzorkovanja, preuzeto i adaptirano prema referenci 79

1.7.1. Biomarkeri T2 inflamacije

Glavni citokini T2 inflamacije su IL-4, IL-5, IL-13, koje stvaraju Th2 ćelije, preko IgE posredovane aktivacije mastocita i bazofila i posledične sekrecije mnogobrojnih medijatora, kao i ILC-2 ćelije, koje se aktiviraju u odgovoru na povredu epitela disajnih puteva, uz sekreciju IL-25, IL-33, TLSP. Glavne odlike T2 fenotipa su eozinofilna inflamacija koja može da bude alergijska i nealergijska, dobar odgovor na kortikosteroidnu i biološku terapiju (48, 80). Najveći broj istraživanja biomarkera T2 inflamacije se odnosi na eozinofile i FeNO, koji su označeni kao najbitniji pokazatelji ovog tipa inflamacije.

1.7.1.1. Eozinofili

Veliki broj istraživanja govori da eozinofili imaju bitnu ulogu u inflamaciji i remodelovanju u astmi i da je eozinofilna inflamacija prisutna kod polovine pacijenata sa astmom (80, 81). Eozinofilnu inflamaciju možemo utvrditi analizom indukovano g sputuma. Međutim, ne postoje preporučene, tačno definisane vrednosti koje ukazuju da se radi o eozinofilnom fenotipu, a u većini istraživanja i studija se koriste vrednosti preko 2 i 3% (58, 59). Pošto su serumski eozinofili lako dostupni u kliničkoj praksi, veliki broj istraživanja se bavio korelacijom između eozinofila u serumu i sputumu. Rezultati velikog broja studija ukazuju na jasnu povezanost između eozinofila u serumu i sputumu (82-86). Međutim, u istraživanjima su utvrđene različite granične vrednosti tj. različiti broj eozinofila u sputumu koji koreliše sa eozinofilnim fenotipom dobijenim analizom indukovano g sputuma. U velikoj kohorti sa preko 500 pacijenata, pokazano je da vrednost od 220/ μ L eozinofila u serumu koreliše sa eozinofilnim fenotipom koji je definisan kao $\geq 3\%$ eozinofila u sputumu, da je senzitivnost ove vrednosti bila 77%, a specifičnost 70% (85). U drugim istraživanjima su vrednosti 270/ μ L i 300/ μ L serumskih eozinofila označene kao korelati eozinofilije u sputumu (84, 86).

Osim značaja serumskih eozinofila kao biomarkera inflamacije disajnih puteva, istraživana je njihova uloga i u drugim poljima astme. Pokazano je da je eozinofilija u serumu bitna za predikciju odgovora na kortikosteroidnu terapiju (66, 67, 87). Utvrđeno je da pacijenti koji imaju preko 400/ μ L eozinofila imaju značajno više pogoršanja astme i lošiju kontrolu bolesti, kada se uporede sa pacijentima koji imaju manji broj eozinofila od ove vrednosti (88). Sa druge strane, kod pacijenata sa teškom astmom nije pokazano da su egzacerbacije astme povezane sa eozinofilijom u serumu i sputumu (89). U eri biološke terapije u astmi, broj eozinofila u serumu se koristi kao marker koji određuje tip biološke terapije, ali se broj eozinofila može koristiti i kao prediktor odgovora na biološku terapiju. Ovo je možda i najznačajniji aspekt eozinofila u serumu kao biomarkera, s obzirom na to da je lako pristupačan. Različite vrednosti eozinofila selektuju pacijente sa teškom astmom kao biološkoj terapiji. Prema GINA smernicama, "cut off" vrednosti >150 i >300 / μ L pacijente sa teškom astmom selektuju za terapiju anti IL-5/anti IL-5R antitelima, a vrednosti ≥ 150 i ≤ 300 / μ L usmeravaju pacijente prema anti-IL4 R α antitelima (3). Preporuke ATS/ERS (engl. American Respiratory Society/ European Respiratory Society) definišu "cut off" ≥ 150 μ L za početnu anti IL-5 terapiju kod pacijenata koji imaju tešku astmu i pogoršanja astme (90). Terapija anti-IL-4/13 se preporučuje pacijentima sa teškom eozinofilnom astmom i teškom kortikosteroidnom zavisnom astmom, nevezano za broj eozinofila (90). Ove preporuke naglašavaju da nije dovoljno jednom odrediti broj eozinofila, jer je to varijabilan parametar koji zavisi od primene kortikosteroidne terapije, ali i da je upitno povezivanje eozinofila sa odgovorom na terapiju. Nije sasvim jasno da li su vrednosti eozinofila tokom pogoršanja bolesti bolji pokazatelji odgovora na terapiju od vrednosti tokom remisije (90). Varijabilnost eozinofila tokom petogodišnje primene biološke terapije je pokazana u retrospektivnoj analizi kod polovine od 241 pacijenta sa teškom astmom (91). U ovoj studiji je analizirano koliko pacijenata kontinuirano zadržava, odnosno ima iste vrednosti eozinofila tokom 5 godina. Analizirane su

vrednosti eozinofila 150/ μ L, 300/ μ L, 400/ μ L i 500/ μ L. Pokazano je da 33.9% pacijenta ima kontinuirano vrednosti eozinofila od 150/ μ L, a 22% pacijenta ima 300/ μ L. Samo 5.1 % ima stalno vrednosti preko 500/ μ L, a više od polovine, u nekom trenutku praćenja ima preko 500/ μ L eozinofila. Analiza velikog broja studija je pokazala da različite vrednosti serumskih eozinofila korelišu sa različitim vrednostima eozinofila u serumu (92).

1.7.1.2. Frakcija izdahnutog azot monoksida

Azot monoksid nastaje kao produkt katalizacije L-arginina u L-citrulin preko enzima azotne sintetaze. Postoje tri izoforme azotne sinteze, koje nastaju u odgovoru na inflamaciju i sekreciju IFN- γ , interferon 1- β i TNF- α . IL-13, reguliše i pojačava ekspresiju epitelnih ćelija koje stvaraju azotnu sintetazu. Pokazano je da je nivo azot monoksida u izdahnutom vazduhu i azotne sintetaze u epitelu disajnih puteva povišen kod pacijenta sa astmom (93). Imajući u vidu da se FeNO stvara u odgovoru na inflamaciju u disajnim putevima, veliki broj istraživanja se bavio ulogom FeNO kao biomarkera u različitim aspektima astme. Vodiči ATS ukazuju da FeNO >50ppb (engl. parts per billion, delova na milijardu) govore u prilog eozinofilne inflamacije i dobrog odgovora na kortikosteroidnu terapiju, da FeNO 25-50 ppb se interpretira u kliničkom kontekstu, a da vrednosti ispod 25ppb ne ukazuju na eozinofilnu inflamaciju (94). U istraživanju koje je uključilo više od 500 pacijenta sa astmom utvrđena je povezanost FeNO sa >3% eozinofila u sputumu (95). Pokazano je da je FeNO nezavistan faktor povezan sa eozinofilnom inflamacijom koja je definisana kao više od 3% eozinofila u sputumu (85). Isti rezultati su pokazani u populaciji od 869 asmaticara, gde je FeNO kao pojedničan marker bio dobar prediktor \geq 3% eozinofila u sputumu (96). Povezanost FeNO sa eozinofilnim fenotipom je uočena i kod drugih autora (83). Međutim, značaj FeNO kao biomarkera u fenotipizaciji inflamacije nije pokazan meta analizom (97). I drugi autori se odnose upitno prema značaju FeNO kao pojedničnog biomarkera u astmi (8,98). Ovi različiti pogledi na ulogu i značaj FeNO mogu se objasniti velikim brojem faktora koji mogu da utiču na FeNO, a to su: godine, atopija, pušenje, metabolički faktori. Prema GINI, iako je FeNO marker T2 inflamacije, ne preporučuje se u rutinskom radu za postavljanje dijagnoze astme, jer se povišene vrednosti sreću u alergijskom rinitisu, eczemima, eozinofilnom bronhitisu, virusnim infekcijama (3). Rezultati meta analize su pokazali da FeNO ima visoku specifičnost 82%, a malu senzitivnost 65% za dijagnostikovanje astme, ali da vrednosti preko 50 ppb govore u prilog dijagnoze astme i dobrog odgovora na kortikosteroide (99). Pokazane se i druge uloge FeNO u astmi. Visoke vrednosti FeNO mogu imati ulogu markera koji je povezan za smanjenjem bronhodilatatornog odgovora i smanjenja plućne funkcije, zatim FeNO kao marker odgovora na IKS i marker mogućeg odgovora na dupilumab (100, 101, 102).

FeNO kao biomarker je dostupan u kliničkom radu, ali nije sasvim jasna njegova uloga kao pojedinačnog markera u definiciji fenotipova i drugih kliničkih karakteristika astme. Iako vodiči ukazuju da su visoke vrednosti povezane sa eozinofilijom, nije jasno kako tumačiti rezultate pacijenata koje su u "sivoj zoni" vrednosti FeNO. Takođe, pacijenti sa astmom imaju i druge komorbiditete koje utiču na FeNO i u kojima je FeNO povišen, pa nije jasno koji "deo" od ukupnog FeNO pripada komorbiditetima, a koji samoj astmi.

1.7.1.3. Ostali T2 biomarkeri

Eozinofili i FeNO su dva najčešće istraživana biomarkera T2 inflamacije. Međutim, istraživana je i uloga drugih biomarkera, a sa ciljem da se utvrdi najbolja korelacija biomarkera sa kompleksnim patofiziološkim odlikama T2 inflamacije. Neki od tih biomarkera su IgE, periostin, IL-9, IL-17A, IL-33.

IgE je biomarker koji se vezuje sa atopijom i alergijom. Prema GINI, eozinofilija u serumu i povišen FeNO karakterišu T2 inflamaciju, ali se navodi da ona može biti povezana sa povišenim IgE u serumu i sa atopijom (3). Povišen IgE se vrlo često izjednačava sa atopijom. Međutim, iako je specifičan IgE potvrda senzibilizacije i alergijske astme, povišene vrednosti ukupnog IgE ne moraju uvek da budu prisutne kod pacijenata sa alergijskom astmom (103). To znači da normalan nivo IgE ne isključuje alergijsku senzibilizaciju i atopiju. Značaj povišenih vrednosti ukupnog IgE jeste u razlikovanju T2 i non T2 inflamacije, jer je pokazano da pacijenti sa Th2 "high" astmom imaju veći nivo IgE u odnosu na pacijenta sa Th2 "low" astmom (35). Istraživana je povezanost ukupnog IgE sa eozinofilima u sputumu. U studiji sa preko 300 pacijenata sa astmom nije pokazana povezanost ukupnog IgE sa $\geq 3\%$ eozinofila u sputumu (85). Takođe, u odnosu na eozinofile i FeNO, ukupan IgE je značajno manje povezan sa eozinofilima (82). Demarche i saradnici su analizirali povezanost različitih biomarkera sa inflamatornim fenotipovima u astmi kod 869 pacijenata i pokazali su da IgE kao pojedinačan biomarker ne može da bude prediktor eozinofilnog fenotipa (104). U drugoj studiji istih autora je utvrđeno da je eozinofilija prisutna i kod atopičara i neatopičara, odnosno da je eozinofilija nezavisna od statusa atopije (96). Rezultati ovih istraživanja pokazuju da je IgE, kao pojedinačan biomarker, upitan za definisanje eozinofilnog fenotipa. Uloga ukupnog IgE je istraživana kao prediktora odgovora na terapiju omalizumabom. Omalizumab je monoklonsko, humanizovano anti IgE antitelo koje se primenjuje u terapiji umereno teške do teške perzistentne IgE posredovane astme, a dozira se prema vrednostima ukupnog IgE i telesne težine. U studiji Gibsona i saradnika nije pokazano da vrednosti ukupnog ili specifičnog IgE mogu da predvide kakav će biti terapijski odgovor na anti IgE terapiju (105). Prospektivna studija sa 25 bolesnika koji su bili na terapiji omalizumabom 16 nedelja, je merila ukupan IgE pre početka terapije, u 4. nedelji, kao i odnos ukupnog IgE u 4. nedelji/početnog IgE (106). Pokazano je da su risponderi oni pacijenti čiji je odnos ukupnog IgE u 4. nedelji/početni IgE preko 2, sa senzitivnošću 100, specifičnošću 80%. Autori zaključuju da ovaj odnos može biti dobar pokazatelj odgovora na omalizumab, kao i faktor na osnovu koga se može nakon 16. nedelje odlučiti o nastavku terapije omalizumabom. Značaj IgE u predikciji odgovora na omalizumab je potvrđen i meta analizom kineskih autora (107).

Pojačana ekspresija POTSNA gena, gena koji kodira periostin, protein ekstraćelijskog matriksa, je pokazana u epitelnim ćelijama disajnih puteva kod pacijenata sa astmom (34). Takođe, pojačana ekspresija je prisutna u sputumu pacijenata sa astmom (108). Periostin sekretuju epitelne ćelije, pod uticajem IL-13 i može se detektovati u serumu asmatičara (109). S obzirom na bitnu ulogu IL-13 u T2 inflamaciji, serumski periostin se može razmatrati kao T2 biomarker. To je i demonstrirano u velikoj studiji sa preko 1000 pacijenata (110). Analizirajući različite

uloge periostina u astmi, a na osnovu velikog broja istraživanja, Matsumoto zaključuje da je periostin stabilan, lako dostupan biomarker T2 inflamacije i remodelovanja, koji ima terapijsku ulogu prediktivnog biomarkera u astmi (111). Pokazano je da periostin ima najbolju pojedinačnu povezanost sa eozinofilnim fenotipom u odnosu na FeNO, IgE, eozinofile (112). Sa druge strane, u istraživanju Wagenera i saradnika nije pokazana povezanost periostina sa eozinofilnom inflamacijom (84). Kod bolesnika sa dobro kontrolisanom astmom, na terapiji IKS, periostin koreliše sa eozinofilnom inflamacijom, ali može biti marker fiksne opstrukcije, definisane kao FEV1/FVC <70% (113). U klaster analizi japanskih autora je uočeno da najviši nivo serumskog periostina imaju bolesnici sa eozinofilnom astmom kasnog početka i da se kod njih beleži brz pad u FEV1 uprkos dobroj kontroli bolesti (114). Zaključuje se da periostin može biti dobar indikator pogoršanja plućne funkcije kod pacijenata sa eozinofilnom inflamacijom. Uloga periostina kao diskriminatornog T2 i non T2 markera nije pokazana kod 53 pacijenta sa astmom, niti je pokazana korelacija sa drugim T2 biomarkerima: FeNO, IgE, eozinofilima (115). Međutim, u ovom istraživanju je uočena značajna razlika u vrednostima periostina kada se posmatraju različiti endotipovi astme: alergijska astma, aspirinska astma, eozinofilna astma kasnog početka i neozinofilna astma, a pacijenti sa aspirinskom astmom su imali najvišu vrednost periostina (115). Autori ukazuju da ovaj rezultat može biti značajan kada se donosi odluka za biološku terapiju kod pacijenta sa aspirinskom astmom i eozinofilnim fenotipom, jer visoke vrednosti periostina mogu biti bitne za primenu anti IL-4/13, umesto anti IL-5 antitela. I pored važne uloge periostina kao markera T2 inflamacije, nisu konzistentni zaključci o njemu kao pojedinačnom biomarkeru, a takođe nema preporuka o njegovoj primeni u svakodnevnom radu.

IL-9 je produkt Th9 limfocita, koji takođe sekretuju IL-10 i IL-21. Pokazano je da IL-9 mogu da produkuju i eozinofili i neutrofili, a da je u BAL-u pacijenata sa astmom pojačana ekspresija IL-9 (11, 116). Kod dece sa alergijskom astmom su uočene više vrednosti IL-9 u odnosu na zdravu decu, ali i da IL-9 promovira sekreciju IgE (117). Istraživanje 28 pacijenta sa astmom je takođe potvrdilo da se povišene vrednosti IL-9 nalaze kod asmaticara u odnosu na zdrave kontrole, da postoji pozitivna povezanost Th9 sa eozinofilima i FeNO, kao i smanjenje serumskog IL-9 nakon terapije kortikosteroidima (118). Međutim, klinička istraživanja sa anti-IL-9 antitelima nisu pokazala efikasnost kod pacijenata sa umerenom do teškom astmom (119,120). Sumirajući rezultate o IL-9, američki autori ukazuju da IL-9 stvaraju ILC-2, CD4+Th2 ili Th9, da IL-9 indukuje akumulaciju mastocita ali i sekreciju arginase 2 od strane intersticijskih makrofaga, što je bitno za sekreciju CCL5 hemokina (121). Autori ukazuju da IL-9 može imati značaj kod određenog endotipa astme. Imajući u vidu pijelotropni efekat IL-9, ne može se sa sigurnošću utvrditi njegova uloga kao biomarkera astme, ali svakako je jako interesantan i nedovoljno istražen citokin.

Uloga ključnih citokina Th2 inflamacije je ispitivana i u analizi sputuma. Pokazano je da kod pacijenata sa alergijskom astmom povišen nivo IL-4, IL-5 sekretujući CD4+ ćelija u sputumu (122). U istraživanju koje je merio citokinski mRNA profil u sputumu ustanovljeno je da kod 55% od 66 asmaticara prisutan tipičan Th2 profil: IL-4 "visok" + IL-5 "visok" (123). Pokazano je da IL-13 u sputumu bolje koreliše da dobrom kontrolom astme u odnosu na eozinofile u

serumu i FeNO (124). Kod pacijenata sa astmom se beleži povišen IL-33 u sputumu, u odnosu na zdrave kontrole (125). Meta analiza je pokazala da IL-33 u sputumu povišen kod pacijenata sa astmom i to više kod onih koji imaju umerenu i tešku astmu, u odnosu na blagu (126). U preglednoj analizi biomarkera, Tiotui analizira prednosti i nedostatke biomarkere T2 fenotipa : serumskih eozinofila, eozinofila u sputumu, FeNO, periostina, serumskog IgE (Tabela 2) (127).

Tabela 2. Karakteristike T2 biomarkera, preuzeto i adaptirano prema referenci 127

Biomarker	Prednosti	Ograničenja	Značaj
Serumski eozinofili	-minimalno invazivni -dostupni -lako merljivi u kliničkom okruženju -korelišu sa eozinofilima u sputumu	-bolni za neke pacijente -varirajuće "cut off" vrednosti za kao prediktivne -mogu biti povišeni zbog drugih razloga, npr. infekcija	-definiše inflamatorni fenotip -prediktor pogoršanja, loše kontrole astme i opstrukcije -prediktor terapijskog odgovora na kortikosteroide i biološku terapiju
IgE	-lako merljiv -identifikuje pacijente koji su kandidati za anti IgE terapiju	-nije prediktor odgovora na anti IgE -manje značaj u odnosu na ostale T2 biomarkere	-povezan sa težinom astme i remodelovanjem
Periostin	-marker IL-13 i T2 inflamacije	-nije dostupan u kliničkoj praksi -povišen kod dece	-prediktor opstrukcije i pada plućne funkcije -prediktor odgovora na biološku terapiju
Eozinofili u sputumu	-neinvazivni -reflektuju inflamaciju disajnih puteva	-teški za kolekciju -nije izvodljiv kod svih pacijenata -nije univerzalno dostupan -potrebni specijalizovani uslovi, oprema i osoblje	-definiše inflamatorne fenotipove -prediktor terapijskog odgovora na kortikosteroide i biološku terapiju
FeNO	-neinvazivan -lako merljiv -dostupan u kliničkoj praksi	-multipli kofaunding faktori -potrebna specijalna oprema	-identifikuje inflamaciju disajnih puteva -prediktor pogoršanja i hiperreaktivnosti -prediktor terapijskog odgovora na kortikosteroide i određenu biološku terapiju

1.7.2. Biomarkeri non T2 inflamacije

Sa obzirom na to da patofiziološki mehanizmi non T2 inflamacije nisu dovoljno poznati, nisu ni definisani biomarkeri ovog fenotipa. Teži stepen bolesti, odsustvo povišenog broja eozinofila u serumu i sputumu kao i slabiji ili odsutan terapijski efekat i odgovor na kortikosteroidnu i biološku terapiju su glavne osobine ovog fenotipa (36, 48). Kada govorimo o korelatima ovog fenotipa u smislu biomarkera, najviše je istraživana povezanost sa neutrofilnim fenotipom.

Uočeno je da IL-17, IL-8, TNF α u serumu i u sputumu korelišu sa neutrofilnom inflamacijom disajnih puteva, kao i sa neutrofilima u teškoj astmi (46). Proučavana je uloga IL-17A kao biomarkera T2 inflamacije, imajuću u vidu njegovo mesto u patogenezi astme (38, 39). Ustanovljeno je da IL-17A u serumu i u sputumu koreliše sa neutrofilnim fenotipom (128, 129). I rezultati ostalih istraživanja konstatuju da se visoke vrednosti IL-17A prisutne u serumu,

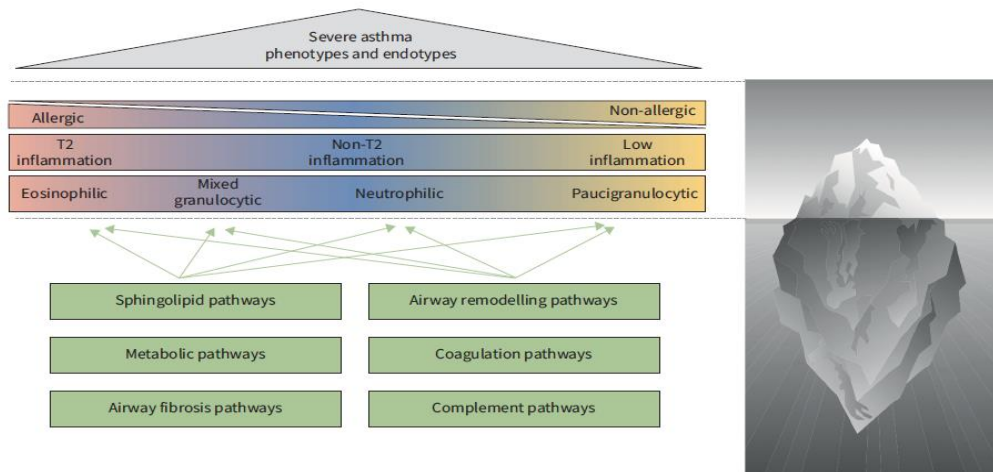
sputumu kod neozinofilne astme, uključujući i teške forme (130-134). Unutar samog neutrofilnog fenotipa postoji složenost i kompleksnost, jer je pokazano da je neutrofilna astma, koja se odlikuje CD8+, IL-17+, IL-22, povezana i sa IgE, senzibilizacijom na perenijalne alergene i kortikosteroidnom zavisnošću (128). Međutim, uloga IL-17A u kliničkom kontekstu lečenja astme se dovodi u pitanje, s obzirom na to da nije pokazan klinički benefit primene anti-IL-17R antitela u astmi (40).

Istraživanje 152 bolesnika sa stabilnom astmom i 83 zdravih kontrola je otkrilo da pacijenti sa neutrofilnom astmom (definisana kao $\geq 64\%$ neutrofila u sputumu), imaju povišen CRP i IL-6 u odnosu na neozinofilnu astmu, kao i povišenu gensku ekspresiju IL-8RA, IL-8RB, IL-8 u sputumu (135). Autori ukazuju na povezanost neutrofilnog fenotipa sa markerima sistemske inflamacije, koji je jedan od patofizioloških mehanizama u osnovi non T2 inflamacije (36, 46). I drugi autori su dokazali da su povišeni markeri inflamacije (CRP i fibrinogen) prisutni u neutrofilnoj astmi (96). Pokazano je da IL-8 u sputumu i u serumu koreliše, sa druge strane i sa eozinofilnim fenotipom (136).

Ne postoje opšte prihvaćeni i preporučeni biomarkeri za non T2 inflamatorni fenotip. Ovo saznanje govori o potrebi za boljim poznavanjem samih patofizioloških procesa ovog fenotipa, na kompleksnost preklapanja već postojećih i potrebu za daljim istraživanjima na ovom polju, s obzirom na to da se neutrofilni, mešoviti granulocitni i paucigranulocitni fenotipovi sreću kod oko polovine asmaticara.

1.7.3. Kombinacija biomarkera

Astma se sastoji od različiti endotipova i fenotipova, pa je vrlo teško striktno odrediti i identifikovati pojedničan biomarker koji jasno može da bude odraz jednog inflamatornog fenotipa. Može se reći da eozinofilija u sputumu najčešće koreliše sa eozinofilima u serumu, ali ne postoje preporučene i tačno definisane vrednosti niti eozinofila u serumu niti u sputumu koje tačno korelišu jedna sa drugim. Sa druge strane, različiti faktori tokom života, kao što su primena lekova, uključujući kortikosteroide, pridružene bolesti, navike tokom života, faktori okoline mogu uticati na biomarkere (92). Dodatno, jasna dihotomija na T2 i non T2 inflamaciju nije uvek prisutna, jer se ispod vrha ledenog brega krije čitav spektar različitih patofizioloških procesa, međusobno isprepletanih i povezanih (Slika 8) (137).



Slika 8. Kompleksnost fenotipova i endotipova, preuzeto i adaptirano prema referenci 137

Imajući u vidu kompleksnost inflamatornih fenotipova, većina istraživanja je ispitivala više biomarkera i pokušavala da utvrdi kombinaciju biomarkera koji najbolje korelišu i definišu inflamatorne fenotipove. Korevaar i saradnici su u meta analizi ispitivali FeNO, eozinofile i IgE i pokazali sledeću specifičnost i senzitivnost u definisanju eozinofilnog fenotipa: za eozinofile senzitivnost 71% i specifičnost 77%; FeNO senzitivnost 66%, specifičnost 76%; za IgE senzitivnost 64% i specifičnost 71%. Navedene vrednosti senzitivnosti i specifičnosti autori smatraju za umerenu dijagnostičku vrednost, sugerišu da oslanjanje na pojedinačne markere dovodi do lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata (138). Upotreba više markera može pomoći u boljoj definiciji inflamatornih fenotipova. GINA definiše T2 fenotip koristeći više biomarkera: eozinofili $\geq 150/\mu\text{L}$ i/ili $\text{FeNO} \geq 20\text{ppb}$, i/ili ili $\geq 2\%$ eozinofila u sputumu i da je astma alergijska (3). Kombinacija eozinofilije i FeNO koreliše sa eozinofilima u sputumu (83). Isto je utvrđeno preglednom analizom literature, prema kojima vrednosti preko 400 eozinofila u sputumu i $\text{FeNO} > 65\text{ppb}$ ukazuju da se radi o eozinofilnom fenotipu (139). CCL26 je najviše eksprimovan u IL-13 genskom miljeu i ima ulogu u infiltraciji eozinofila u plućima, pa se može razmatrati kao marker IL-13 i korelat eozinofilne inflamacije (140). Pokazano je da pojačana CCL26 ekspresija u mukozi najbolje definiše T2 fenotip i da sa 100% pozitivne prediktivne vrednosti koreliše sa serumskim biomarkerima: eozinofilima, CCL17, CCL26, FeNO (141). Međutim, u svakodnevnom kliničkom radu je često limitirana dostupnost složenijih biomarkera, kao što su CCL17, CCL26.

Na osnovu sistematskog pregleda literature, zaključeno je da rutinski i najčešće ispitivani biomarkeri: serumski eozinofili, FeNO i IgE, kada se primenjuju zajedno, ne mogu da kompletno ukažu na jasnu T2 inflamaciju, a naročito u teškoj astmi (92). Pošto se biološka terapija primenjuje u teškoj astmi, jasna je potreba za boljim surogat markerima T2 inflamacije. U neutrofilnoj, mešovitoj granulocitnoj i paucigranulocitnoj astmi, biomarkeri nisu dovoljno poznati i istraženi.

Preklapanje fenotipova dodatno komplikuje određivanje biomarkera koji bi trebalo da odražavaju tačno definisan patofiziološki proces. To se često sreće u kliničkom radu, kada pacijenti ne reaguju na terapiju, a imaju klasične T2 biomarkere. Velika studija sa preko 500 pacijenata sa astmom je pokušala da na osnovu dosadašnje literature sumira sve kliničke fenotipove astme i da utvrdi da li pripadaju T2 ili non T2 astmi (142). Utvrđeno je 10 kliničkih fenotipova astme (Tabela 3). T2 astma je definisana na osnovu prisustva 2 ili više biomarkera: eozinofili $\geq 0.14/\mu\text{L}$, IgE ≥ 100 IU/, FeNO ≥ 30 ppb. Pokazano je da više od 73% pacijenata ima više od 2 klinička fenotipa, a skoro polovina (47.5%) je imalo odlike i T2 i non T2 astme. Pacijenti sa mešovitim odlikama T2 i non T2 astme su imali lošiju kontrolu bolesti, lošije parametre plućne opstrukcije, više egzacerbacija, ali su imali u više nivoa eozinofila u sputumu, IgE i FeNO. Autori su definisali skor preklapanja fenotipa (POC- Phenotype Overlap Scor) za T2 i non T2 astmu, kao broj konkomitantnih fenotipova koju su najčešće udruženi sa T2 ili non T2 astmom. Rezultati su pokazali da je T2 POC pozitivno korelisao sa FeNO, eozinofilima, IgE, a negativno sa upitnikom o kvalitetu života (engl. asthma quality of life questionnaire-AQLQ), neutrofilima u sputumu, IL-17A, IL-8 i TNF α . Non T2 POC je pozitivno asociiran sa ACQ i sa neutrofilima i IL-8 u sputumu, a negativno sa AQLQ, FEV1, FeNO, IgE i eozinofilima. Zaključeno je da postoji veliko preklapanje između fenotipova i istaknuto da pacijenti sa mešovitom T2/nonT2 astmom mogu imati lošiji terapijski odgovor, zahvaljujući odlikama T2 inflamacije.

Tabela 3. Najčešći fenotipovi u astmi, preuzeto i adaptirano prema referenci 142

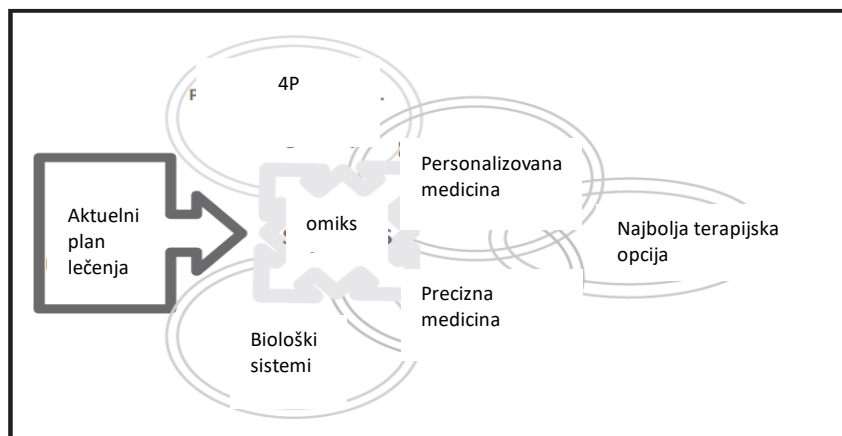
Fenotip	Definicija
Alergijska astma	Pozitivni kožni prick test i simptomi alergije
Astma ranog početka	Početak astme < 12 godine života
Eozinofilna astma	Eozinofili u sputumu $\geq 3\%$, eozinofili u krvi $\geq 300/\mu\text{l}$
Astma starijih	>65 godina
Astma gojaznih	Indeks telesne mase $\geq 30\text{kg}/\text{m}^2$
Profesionalna astma	Simptomi astme se pojavljuju ili pogoršavaju na radnom mestu, a poboljšanje ili remisija vikendom ili na odmoru
Astma pušača	Astma kod pušača i bivših pušača
Aspirin senzitivna astma	Simptomi astme se pogoršavaju nakon nesteroidnih antiinflamacionih lekova
Astma sa fiksnom opstrukcijom	FEV1/FVC < 70% nakon inhalacije bronhodilatatora
Neurofiziološka astma	Hospital Anxiety and depression scale (HADS) ≥ 8 HADS depresivni simptom skor ≥ 8

1.8. Precizna i personalizovana medicina u fenotipovima

U poslednjih 10 godina se značajno promenilo viđenje astme. Iako je astma kao termin sinonim za dijagnozu jedne bolesti, upravo raznovrsnost i složenost same dijagnoze astme je dovelo do promene u shvatanjima astme. Fenotipizacija i endotipizacija ukazuju da se pod “opštim” terminom astma svrstavaju pacijenti koji imaju različite patofiziološke i kliničke odlike. Sa

druge strane, primarni zadatak u astmi da se fenotipovi individualizuju, odnosno da se pojedinačno utvrdi fenotip, doveli su do toga da se govori o preciznoj i personalizovanoj medicini. Ova dva termina se često izjednačavaju, a neki autori ih zajedno koriste sa ciljem da se promeni generalni koncept posmatranja bolesti u medicini i da se pokuša sa implementacijom ovog koncepta u zdravstvene sisteme (143). Prema tom konceptu, cilj je da se koristeći dijagnostičke testove i biomarkere, uključujući i genetske, pronađe najbolji terapijski pristup za pacijenta. Međutim, u astmi, neki autori razdvajaju ova dva pojma (4). Precizna medicina nastoji da se utvrdi molekularni mehanizam bolesti pojedinačno (44). Zasniva se na istraživanjima biomarkera i različitih “omiks” studija (4). Sa druge strane, personalizovana medicina je širi pojam, koji sagledava bolest uzimajući u obzir sve odlike samog pacijenta, pa osim kliničkih, fenotipskih, uzima u obzir i psihološku i emotivnu komponentu (4,145). Ovaj koncept, gde se u okviru sagledavanja bolesti uzima u obzir i perspektiva samog pacijenta je definisan kao 4P: preventivna, prediktivna, personalizovana i parcipitirajuća medicina (146). Sagledavajući različite koncepte, Canonica i saradnici ukazuju na značaj novog pristupa, naročito u teškoj astmi, gde personalizovani pristup znači bolju selekciju pacijenta ka terapiji, a precizni znači terapijski pristup zasnovan na endotipovima i fenotipovima (4). Cilj je, ponovo, da se inkorporiranjem ovih principa odredi najbolja moguća individualna terapija (slika 9).

Koncept personalizovane i precizne medicine predstavlja ideal za sve lekare, uključujući i one koje se bave astmom. Međutim, pitanje je da li je moguće primeniti u svakodnevnom kliničkom radu kod pacijenata sa astmom. Ograničenje sredstava i vremena, limitiranost dijagnostičkih procedura, uključujući genetska istraživanja, ljudski resursi su neki od faktora koji otežavaju primenu koncepta personalizovane i precizne medicine u svakodnevnoj praksi.



Slika 9. Koraci prema najboljem terapijskom pristupu, preuzeto i adaptirano prema referenci 4

Nije jasno da li je astma predstavlja kliničku ekspresiju više različitih patofizioloških mehanizama ili skup različitih ali povezanih stanja. Augusti je 2016. godine definisao novi pristup u astmi, nazvan “treatable traits”, koji se definišu kao endotipske i fenotipske karakteristike bolesti, klinički značajne, prepoznatljive i koje se mogu lečenjem izmeniti (147).

Karakteristike moraju biti na neki način izmerene i povezane sa ishodom bolesti, odnosno da se mogu lečiti. Analiziraju se različiti domeni: pulmonalni, ekstrapulmonalni, domen ponašanja/faktora rizika. Više različitih "treatable traits" može da bude prisutno kod istog pacijenta, a cilj je da se individualno odredi tačan broj, da se evaluiraju i adekvatno leče, ne samo u astmi, već i u drugim respiratornim bolestima (148).

Savremeni vodiči u lečenju astme se zasnivaju na stepeničastom pristupu koji uzima u obzir simptome i kontrolu bolesti (3). Neki autori savetuje primenu koncepta "treatable traits" umesto stepeničastog pristupa u lečenju pacijenata sa nekontrolisanom astmom (149). Uzima se u obzir prisustvo ili odsustvo 2 glavna "treatable traits": T2 inflamacije i opstrukcije, uz faktor pušenja.

Svi napred navedni koncepti imaju isti prioritet: naći za svakog pacijenta najbolju terapiju. Različiti su načini koje vode do ovog cilja: istraživanja na murinim i humanim modelima, sabrana kroz vodiče i smernice, uz predlaganje novih koncepta u evaluaciji i lečenju- fenotip, endotip, personalizova i precizna medicina, treatable traits.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

1. Odrediti inflamatorne fenotipove u astmi na osnovu analize indukovanog sputuma
2. Ispitati povezanost potencijalnih biomarkera (eozinofili, IgE, periostin, FeNO, IL-5, IL-6, IL-17, IL-33) i inflamatornih fenotipova određenih analizom indukovanog sputuma
3. Ispitati povezanost težine kliničke slike, težine i stepena kontrole astme sa biomarkerima (Eo, IgE, periostin, FeNO, IL-5, IL-6, IL-17, IL-33) i inflamatornim fenotipovima dobijenih analizom indukovanog sputuma

3. MATERIJAL I METODE

Ispitanici

Ispitivanje je sprovedno kod 80 pacijenata sa dijagnozom bronhijalne astme koji su pregledani na Klinici za alergologiju i imunologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u periodu od 2020. do 2023. godine. Kriterijumi za uključenje ispitanika u istraživanje su bili:

- informisani pristanak pacijenta
- uzrast ispitanika preko 18 godina
- dijagnoza bronhijalne astme koja je potvrđena podacima iz medicinske dokumentacije, fizičkim nalazom, kliničkim ispitivanjima u skladu sa GINA smernicama (3)

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja su bili primena sistemskih kortikosteroida, prisustvo respiratorne infekcije 4 nedelje pre istraživanja, prisutvo SARS-Cov-2 infekcije 3 meseca pre istraživanja. Teška egzacerbacija je definisana kao hospitalizacija zbog astme koja je zahtevala primenu sistemskih kortikosteroida i/ili primena sistemskih kortikosteroida tokom 3 dana i/ili povećanje sistemskih kortikosteroida sa stabilne doze tokom 3 dana (3).

Protokol ispitivanja

Svim pacijentima je u istom danu urađeno: detaljna evaluacija kliničkih karakteristika, evaluacija terapije, fizikalni pregled, testovi za procenu kontrole astme, kožne prick probe na standardne inhalacione alergene, FeNO, impulsna oscilometrija (IOS), spirometrija, analiza indukovano sputuma, laboratorijske analize. Studija je odobrane od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta (1322/V-4) i svi ispitanici su potpisali informisani pristanak. Sve procedure su sprovedene u skladu sa etičkim preporukama sadržanim u Helsinškoj deklaraciji.

3.1. Kliničke i laboratorijske analize

Kod svih pacijenata zabeleženi su:

- antropometrijski i biološki podaci: pol, godine starosti, telesna visina, telesna masa, BMI
- podaci o bolesti: pušački status, dužina trajanja bolesti, trajanje simptoma bolesti pre postavljanja dijagnoze, broj teških egzacerbacija u poslednjih godinu dana, provera pravilne upotrebe inhalera, adherenca
- trigeri pogoršanja: alerogeni, zagađenje, infekcije, stres, hrana, vlaga, promena vremena, dim, fizički napor, mirisi, hemikalije

- pridružena oboljenja: alergijski rinitis, nealergijski rinitis, hronični rinosinusitis sa nazalnom polipozom, hronični rinosinusitis bez nazalne polipoze, ekzemi, urtikarija, alergija na lekove, gastritis, anksioznost, depresija, alergija na nesteroidne antiinflamatorne lekove (NSAIL), alergija na acetilsalicilnu kiselinu, polipektomija, kardiovaskularne bolesti, dijabetes melitus, maligniteti, autoimunske bolesti, operacija nosne devijacije, alergija na hranu, otitis
- porodična anamneza: alergijski rinitis, astma, kardiovaskularne bolesti, dijabetes melitus, maligniteti, autoimunske bolesti
- simptomi bolesti (kijanje, curenje nosa, svrab nosa, kratak dah, zapašen nos, kašalj, iskašljavanje) i znaci bolesti (auskultatorni nalaz na plućima)
- podaci o terapiji: antihistaminici, intranazalni kortikosterodi, alergenska imunoterapija, IKS, dugo delujući beta 2 agonisti (engl. long-acting beta 2 agonist-LABA), dugo delujući muskarinski antagonisti (engl. long-acting muscarinic antagonists-LAMA), antagonisti receptora leukotrijena (engl. leukotriene receptor antagonist-LTRA), krakodelujući beta 2 agonisti (engl. short acting beta 2 agonist-SABA), fiksna kombinacija inhalacionih kortikosteroida i dugodelujućih beta 2 agonista (ICS/LABA), niska doza ICS + formoterola prema režimu terapije održavanja i terapije za brzo olakšavanje simptoma (ICS+ formoterol prema engl. maintenance and reliever therapy-MART), oralni kortikosteroidi (u poslednjih godinu dana, isključeni mesec dana pre istraživanja), ksantini, biološka terapija (anti IgE monoklonsko antitelo, anti- IL5R monoklonsko antitelo).

Svi pacijent su popunili:

- Test o kontroli astme (engl. Asthma control test-ACT)
- Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire-ACQ)
- GINA upitnik o kontroli simptoma

Svim pacijentima je urađeno:

- Kožni prick test na standardne inhalacione alergene
- Spirometrijsko ispitivanje plućne funkcije
- Impulsna oscilometrija (IOS)
- Merenje FeNO
- Indukovani sputum
- Laboratorijske analize (krvna slika sa leukocitarnom formulom, C-reaktivni protein (CRP), biohemijske analize, IgE, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33, periostin)

3.3.1. Doze inhalacionih kortikosteroida

Doze IKS su podeljenje u male, srednje i visoke IKS dnevne doze, prema GINA smernicama (Tabela 1) (3).

Tabela 1. Male, srednje i visoke dnevne doze IKS prema GINA smernicama

IKS (samostalno ili u kombinaciji sa LABA)	Male doze (mcg)	Srednje doze (mcg)	Visoke doze (mcg)
Beklometazon dipropionate (pMDI, standardne partikule, HFA)	200-500	>500-1000	>1000
Beklometazon dipropionate (DPI ili pMDI, ekstrasfine partikule, HFA)	100-200	>200-400	>400
Budesonid (DPI, ili pMDI, standardne partikule, HFA)	200-400	>400-800	>800
Ciklezonid (pMDI, ekstrasfine partikule, HFA)	80-160	>160-320	>320
Flutikazon furoat (DPI)	100	100	200
Flutikazon propionat (DPI)	100-250	>250-500	>500
Flutikazon propionate (pMDI, standardne partikule, HFA)	100-250	>250-500	>500
Mometazon furoat (DPI)	Zavisi od	DPI	uređaja
Mometazon furoat (pMDI, standardne partikule, HFA)		200 - 400	>400

Skracnice: IKS: inhalacioni kortikosteroidi, GINA: Globalna inicijativa za astmu (engl. Global Initiative for Asthma- GINA), LABA: dugo delujući beta 2 agonisti (engl. long acting beta 2 agonist -LABA), pMDI: memo dozni inhaler pod pritiskom (engl. pressurized metered-dose inhaler), DPI: inhaleri suvog praha (engl. dry-powder inhaler), HFA: hidrofluoroakalani propelanti (engl. hydrofluoroalkalane propellant)

3.3.2. Testovi za procenu kontrole astme

Test o kontroli astme (engl. Asthma control test-ACT) sadrži pet pitanja koje se odnose na ometanje u svakodnevnom aktivnostima, nedostatak daha, buđenje ujutru ili noću zbog simptoma astme, potreba za pumpicom za brzim otklanjanjem simptoma ili aparata za inhalaciju i ocena kontrole astme, a sve u poslednje 4 nedelje. Sva pitanja su skorovana na skali od 1-5, a srednja vrednost svih odgovara predstavlja ukupni skor. Na osnovu ukupnog skora, vrednosti 20-25 ukazuju da je astma dobro kontrolisana; vrednosti 16-19 da astma nije dobro kontrolisana, a skor manji od 15 da je astma loše kontrolisana (Prilog 1) (150).

Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire-ACQ) se sastoji od 6 pitanja i bazira se na sećanju pacijenata u poslednjih 7 dana o postojanju noćnog buđenja zbog astme, težine simptoma prilikom jutarnjeg buđenja, ograničenja aktivnosti, nedostatka vazduha, sviranja u gudima i potrebe za SABA. Svih 6 mernih parametara su skorovani od 0–6 (0=nikada, 6=loša kontrola), a ukupni skor predstavlja srednju vrednost mogućih odgovora za

sva pitanja (rang, 0–6). Skor 0- 0.74 se klasifikuje kao dobro kontrolisana astma, > 1.5 kao loša kontrolisana astma, a vrednosti 0.75-1.5 kao “siva zona” (Prilog 2) (151).

GINA upitnik o kontroli simptoma (engl. asthma symptom control) sadrži 4 pitanja o kontroli simptoma u poslednje 4 nedelje, a odgovara se sa, da ili ne. Pitanja se odnose na prisutvo dnevnih simptoma više od 2 puta nedeljeno, noćna buđenja zbog astme, upotrebu SABA više od dva puta nedeljno i na limitiranu aktivnost zbog astme. Astma je dobro kontrolisana ako se na sva pitanja odgovori sa ne, delimično kontrolisna ako su 1 do 2 odgovora potvrdna, a nekontrolisana ako se na 3 ili 4 pitanja odgovori sa da (Prilog 3) (3).

Sve upitnike su pacijenti popunjavali samostalno pre razgovora sa lekarom i pre ispitivanja plućne funkcije.

3.3.3. Kožne prick probe na standardne inhalacione alergene

Kožne prick probe na standardne inhalacione alergene (dermatophagoides pteronissimus, kućna prašina, mešavina polena drveća, mešavina polena trava, mešavina polena korova), pozitivna (histamin) i negativna kontrola (fiziološki rsatvor) su urađene prema preporukama Evropske Akademije za Alergologiju i kliničku imunologiju (152) . Za testiranje su se koristili standardni rastvori inhalacionih alergena pripremljeni od strane Instituta za alergologiju i virusologiju „Torlak “. Test se izvodi tako što se na volarnu stranu nadlaktice pipetom nanosi kap alergena, a zatim se lancetom izvrši skarifikacija kože. Rezultati su se očitavali nakon 15 minuta tako što je merena veličina papule na mestu skarifikacije. Pozitivnom reakcijom se smatrala reakcija koja je za 3 mm veća od negativne kontrole

3.3.4. Spirometrijsko ispitivanje plućne funkcije

Ispitivanje plućne funkcije je urađeno na spirometru marke VyntusSPIRO, proizvođač Jaeger, Nemačka, prema smernicama ATS (153). Analizirani su sledeći parametri:

- Forsirani vitalni kapacitet (FVC) - volumen vazduha koji se može izdahnuti iz pluća forsiranim ekspirijumom posle maksimalnog inspirijuma
- Forsirani ekspirijumski volumen u prvoj sekundi (FEV1) - volumen vazduha izdahnut u prvoj sekundi forsiranog vitalnog kapaciteta
- Tiffeneau indeks - odnos FEV1 prema VC X 100 (FEV1%/VC x100)
- MEF 25-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 25% VC
- MEF50-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 50% VC
- MEF75-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 75% VC
- MMEF-srednji-maksimalani ekpirijumski protok vazduha

3.3.5. Merenje frakcije izdahnutog azot monoksida

Izdahnut FeNO prezentuje se brzinom izdahnutog NO (VNO), a izračunava se kao proizvod NO koncentracije u nL/L i brzine ekspiratornog protoka izražene u L/min: $VNO (nL/min) = NO(nL/L) \times \text{brzina protoka (L/min)}$. Merenje FeNO je učinjeno prema preporukama ATS/ERS na aparatu Medisoft (Belgija), a rezultat je izražen u ppb (154).

3.3.6. Impulsna oscilometrija

Impulsna oscilometrija je urađena prema ART/ERS smernicama, a povišeni otpori u disajnim putevima (R5Hz- 20Hz, KPa/L/s) su definisali disfunkciju malih disajnih puteva (155).

3.3.7. Uzorkovanje indukovano sputuma

Procedura je urađena prema preporukama ERS (55,56). Indukovani sputum je prikupljen u ranim jutarnjim satima, a pre izvođenja procedure svim ispitanicima je urađeno spirometrijsko ispitivanje. Imajući u vidu da udisanje hipertono rastvora može dovesti do bronhokonstrikcije, pacijenti su dobili 200 µg kratkodjelujućeg beta 2 agonista i nakon 10 minuta je ponovljeno spirometrijsko merenje. Zatim su inhalirali hipertoni rastvor istih koncentracija (4,5%) preko ultrazvučnog nebulizatora u istim vremenskim intervalima na 5 minuta, u ukupno 20 minuta. Test je prekidano ukoliko je došlo do simptoma opstrukcije i pada FEV1 ispod 20% bazalnih vrednosti na kraju svakog petominutnog intervala. Sputumi su skupljeni u sterilne čaše, a zatim je dodavan 0.1 % dithiotreitol radi razbijanja i homogenizovanja uzorka, a zatim je uzorak filtriran. Nakon toga, 500 mikrolitara uzorka je stavljano na 800/obrta u minuti, tokom 5 minuta, a radi ravnomerne disperzije ćelijskih elemenata. Brojanje ukupnog preparata ćelije je vršeno na preparatima bojenim prema standardnoj May Grünwald Giemsa metodi, a rezultati su izraženi u relativnom broju eozinofila, neutrofila, limfocita, makrofaga, bronijlanih epitelnih ćelija, izražen kao procenat na 500 neskvamoznih ćelija.

Na osnovu analize indukovano sputuma, broja eozinofila i neutrofila u sputumu, definisana su 4 inflamatorna fenotipa (57, 58)

- **Eozinofilna astma (EA)** sa $\geq 3\%$ eozinofila i $< 61\%$ neutrofila
- **Neutrofilna astma (NA)** sa $< 3\%$ eozinofila i $\geq 61\%$ neutrofilma
- **Mešovita granulocita astma (MGA)** sa $\geq 3\%$ eozinofila i $\geq 61\%$ neutrofila
- **Paucigranulocitna astma (PGA)** sa $< 3\%$ eozinofila i $< 61\%$ neutrofila

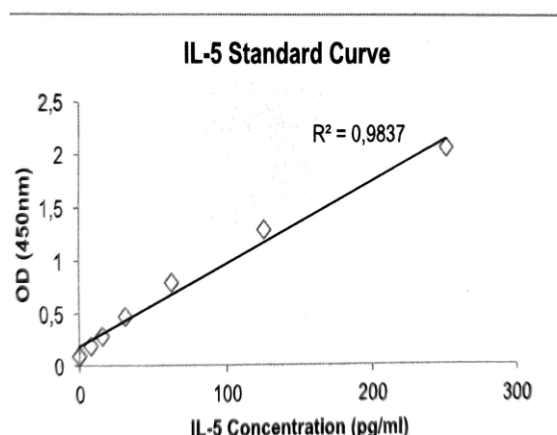
3.3.8. Laboratorijske analize

U uzorcima perifrene krvi su analizirani sledeći parametri: kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom, standardne biohemijske analize, CRP (imunoturbidimetrijski, ARCHITECT), ukupni IgE (imunofelometrijski, ARCHITECT), IL-6 (elektrohemi-luniscentni esej, Cobas, Elecsys IL-6, Roche). Krv je nakon vađenja centrifugirana, a izdvojeni serumi

zamrzivani na -70°C do momenta kada su se određivali IL-5, IL-17A, IL-33, periostin, IL-8, metodom enzimskog imunoseja (engl. enzyme linked immunoabsorbent test- ELISA).

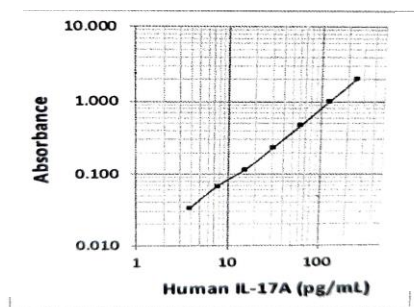
Standardne laboratorijske analize: svim ispitanicima su urađene dodatne laboratorijske analize: sedimentacija (SE), D-dimer, ukupni holesterol, LDL holesterol, HDL holesterol, trigliceridi, gvožđe, ukupni kapacitet vezivanja gvoždja, feritin, kao i 25 (OH) vitamin D (hemiluminiscentno imunoodređivanje-CMIA, ARCHITECTc;8200 ABBOT)), tireostimulišući hormon (TSH) (Hemiluminiscentno imunoodređivanje-CMIA, ARCHITECTc;8200 ABBOT), slobdan T4 (free T4, Hemiluminiscentno imunoodređivanje-CMIA, ARCHITECTc;8200 ABBOT), IgG, IgA, IgM (turbidimetrijski, ARCHITECT).

Serumski nivo IL-5 (pg/ml): analiza je urađena na Odeljenju za visokospecijalizovanu in vitro dijagnostiku imunoloških i alergoloških oboljenja, Klinike za alergologiju i imunologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, ELISA testom, komercijalnog naziva Human IL5 PharmaGenie ELISA kit, proizvođač AssayGenie, Dublin, Ireland. Pre početka analize, svi reagensi i uzorci seruma su odmrznuti do sobne temperature, a svi postupci su sprovedeni prema upustu proizvođača. Standardni rastvor je dobijen posle rekonstrukcije bočice standarda IL-5 sa destilovanom vodom, a zatim je napravljena serija od 6 standardnih rastvora različitih razblaženje u nizu, sa koncentracijama od 7.81 do 250 pg/ml. U pojedinačna udubljenja mikrotitracione ploče, koja su obložena specifičnim anti IL-5 antitelima su pipetirani serumi ispitanika, standardi i kontrole, a u njima se prisutni IL-5 vezao za ploče. Zatim je sprovedena inkubacija na sobnoj temperaturi ($18-25^{\circ}\text{C}$), pa je urađeno ispiranje nevezanog seruma. U daljem inkubacionom periodu je dodavano anti IL-5 sekundarno antitelo (biotinylated), pa je urađena inkubacija na sobnoj temperaturi tokom jednog sata, a zatim ispiranje. Potom je u svako udubljenje mikroploče dodat enzimski supstrat (Streptavidin-HRP), zatim je izvršena inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi i ponovljen postupak ispiranja. Hromogeni supstrat je dodat u svako udubljenje mikroploče rezultirajući bojenom reakcijom sa konjugatom. Razvoj bojene reakcije je prekinut dodavanjem sumporne kiseline. Intenzitet bojene reakcije je direktno proporcionalan koncentraciji IL-5 u uzorcima i standardima. Fotometrijsko merenje optičke gustine intenziteta boje je izvršeno na 450nm. Standardna kriva, sa koje se utvrđuje koncentracija antitela u uzorku, dobija se nanošenjem vrednosti optičke gustine na x osu za poznate vrednosti serijski razblaženog rastvora, a na y osu nanošenjem vrednosti samih uzoraka (optičke gustine) i spajanjem tačaka (Slika 1). Na osnovu standardne krive je određena vrednost IL-5 za svakog ispitanika.



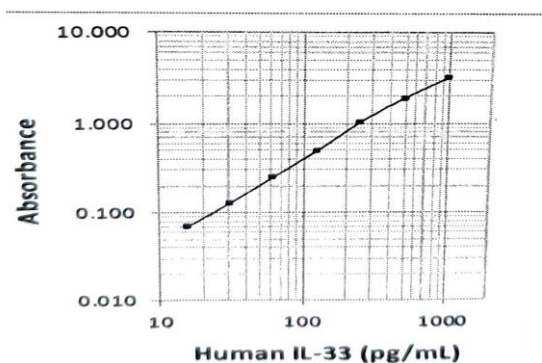
Slika 1. Standardna kriva za određivanje humanog IL-5 kod ispitanika

Serumski nivo IL-17 A (pg/ml): analiza je urađena na Odeljenju za visokospecijalizovanu in vitro dijagnostiku imunoloških i alergoloških oboljenja, Klinike za alergologiju i imunologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, ELISA testom, komercijalnog naziva LEGEND MAX™ Human IL-17A ELISA Kit, Biolegend, San Diego, California. Prema upustvu proizvođača, standardne vrednosti IL-17A u serumu iznose 3.9-250 pg/ml. Pre početka analize svi reagensi i uzorci seruma su odmrznuti do sobne temperature, a svi postupci su sprovedeni prema upustvu proizvođača. U pojedinačna udubljenja mikrotitracione ploče, koja su obložena specifičnim anti IL-17 A antitelima, se pipetiraju serumi ispitanika i standardi, a u njima se prisutni IL-17 vezuje za ploče. Nakon rekonstrukcije bočice koja sadrži IL-17 A, dodaje se 0.645ml test rasvor A da bi se dobilo 20ng/ml standardnog rastvora koji se inkubira na sobnoj temperaturi 15- 20 minuta. Nakon toga se priprema 500µl standardnog rastvora koncentracije 250pg/ml, tako što se 6.25 ml standardnog rastvora doda u 493.8µl test rastvora A. Nakon toga je napravljena serija od 6 standardnih rastvora različitih razblaženje u nizu, a test rastvor A služi kao nulti standard (0 pg/ml). Nakon toga se vrši razblaženje standarda i seruma, a zatim se serumi i standardi inkubiraju 2 sata. Onda se vrši ispiranje, pa se dodaje se anti IL-17A detekciono antitelo i inkubira se 1 sat, mešajući. Zatim se vrši ispiranje, dodaje se Avidin – HRP D rastvor. Inkubira se 30 minuta. Vrš se ispiranje, dodaje se hromogeni supstrat (Supstrat Solution F) u svako udubljenje, pa se inkubira pola sata u mraku. Dodatak hromogenog supstrata dovodi do bojene reakcije sa konjugatom. Razvoj bojene reakcije prekinut dodavanjem stop rastvora. Intenzitet bojene reakcije je direktno proporcionalan koncentraciji IL-17A u uzorcima i standardima. Fotometrijsko merenje optičke gustine intenziteta boje je izvršeno na 450nm i 570nm. Standardna kriva, sa koje se utvrđuje koncentracija antitela u uzorku, dobija se nanošenjem vrednosti optičke gustine na x osu za poznate vrednosti serijski razblaženog rastvora, a na y osu nanošenjem vrednosti samih uzoraka (optičke gustine) i spajanjem tačaka (Slika 2). Na osnovu standardne krive je određena vrednost IL-17A za svakog ispitanika.



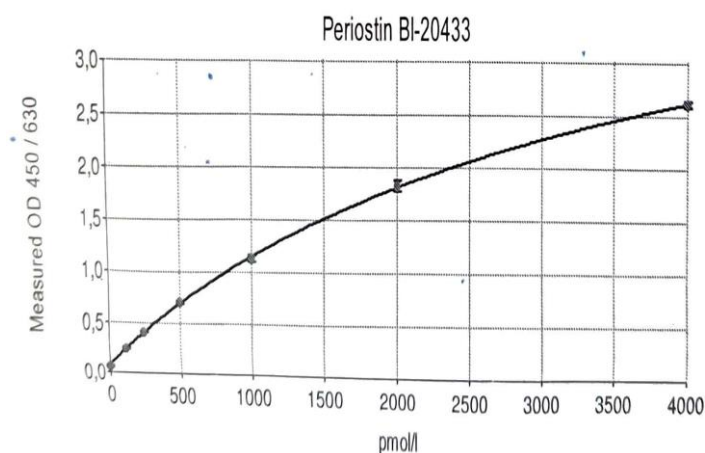
Slika 2. Standardna kriva za određivanje serumskog IL-17A kod ispitanika

Serumski nivo IL-33 (pg/ml): analiza je urađena na Odeljenju za visokospecijalizovanu in vitro dijagnostiku imunoloških i alergoloških oboljenja, Klinike za alergologiju i imunologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, ELISA testom, komercijalnog naziva LEGEND MAX™ Human IL-33 ELISA Kit, Biolegend, San Diego, California. Prema upustu proizvođača, standardne vrednosti IL-33 u serumu iznose 15.6 -1000 pg/ml. Pre početka analize svi reagensi i uzorci seruma su odmrznuti do sobne temperature, a svi postupci su sprovedeni prema upustu proizvođača. U pojedinačna udubljenja mikrotitracione ploče, koja su obložena specifičnim anti IL-33 antitelima se pipetiraju serumi ispitanika i standardi, a u njima se prisutni IL-33 vezuje za ploče. Nakon rekonstrukcije bočice koja sadrži IL-33, dodaje se 0.84ml test rastvor B da bi se dobilo 20ng/ml standardnog rastvora koji se inkubira na sobnoj temperaturi 15-20 minuta. Nakon toga se priprema 500µl standardnog rastvora koncentracije 1000pg/ml, tako što se u 25 ml standardnog rastvora doda u 475µl test rastvora B. Nakon toga je napravljena serija od 6 standardnih rastvora različitih razblaženja u nizu, a test rastvor B služi kao nulti standard (0 pg/ml). Zatim se razblaženi serumi i standardi inkubiraju tokom noći. Onda se vrši ispiranje, dodaje se anti IL-33 detekciono antitelo i inkubira se 1 sat, mešajući. Zatim se dodaje Avidin – HRP B rastvor. Inkubira se 30 minuta mešajući. Zatim se vrši se ispiranje i dodaje se hromogeni supstrat (Supstrate Solution F) u svako udubljenje, pa se inkubira pola sata u mraku. Dodatak hormogenog supstrata rezultira bojenom reakcijom sa konjugatom. Razvoj bojene reakcije je prekinut dodavanjem stop rastvora. Intenzitet bojene reakcije je direktno proporcionalan koncentraciji IL 33 u uzorcima i standardima. Fotometrijsko merenje optičke gustine intenziteta boje je izvršeno na 450 nm i 570 nm. Standardna kriva, sa koje se utvrđuje koncentracija antitela u uzorku, dobija se nanošenjem vrednosti optičke gustine na x osu za poznate vrednosti serijski razblaženog rastvora, a na y osu nanošenjem vrednosti samih uzoraka (optičke gustine) i spajanjem tačaka (Slika 3). Na osnovu standardne krive je određena vrednost IL-33 za svakog ispitanika.



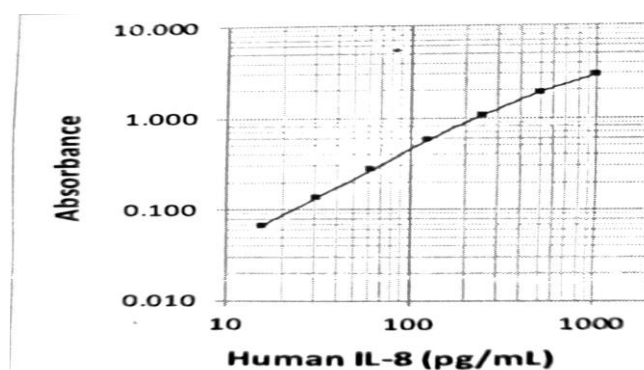
Slika 3. Standardna kriva za utvrđivanje nivoa serumskog IL-33 kod ispitanika

Periostin (pmol/l): analiza je urađena na Odeljenju za visokospecijalizovanu in vitro dijagnostiku imunoloških i alergoloških oboljenja, Klinike za alergologiju i imunologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, ELISA testom, komercijalnog naziva PERIOSTIN, Biomedica Medizineprodukte GmbH, Wien. Pre početka analize svi reagensi i uzorci seruma su odmrznuti do sobne temperature, a svi postupci su sprovedeni prema uputstvu proizvođača. U pojedinačna udubljenja mikrotitracione ploče, koja su obložena specifičnim anti periostin antitelima se pipetiraju serumi ispitanika, standardi i kontrola, a u njima se prisutni periostin vezuje za ploče. Zatim se vrši inkubacija 2 sata na sobnoj temperature (18-26°C). Zatim se vrši ispiranje i dodaje se specifično biotinlovano anti periostin antitelo, pa se inkubira 2 sata na sobnoj temepraturi (18-26 °C). Zatim se vrši ispiranje i dodaje se konjugat, pa se inkubira jedan sat na sobnoj temperature (18-26 °C). Ponovo se vrši ispiranje, a zatim se dodaje hromogeni supstrat u svako udubljenje mikroploče, inkubira se u mraku tokom pola sata. Dalji razvoj bojene reakcije prekinut je dodavanjem stop rastvora. Intenzitet bojene reakcije je direktno proporcionalan koncentraciji periostina u uzorcima i standardima. Fotometrijsko merenje optičke gustine intenziteta žute boje je izvršeno na 450nm i 630nm. Standardna kriva, sa koje se utvrđuje koncentracija antitela u uzorku, dobija se nanošenjem vrednosti optičke gustine na x osu za poznate vrednosti serijski razblaženog rastvora, a na y osu nanošenjem vrednosti samih uzoraka (optičke gustine) i spajanjem tačaka (Slika 4). Na osnovu standardne krive je određena vrednost periostina za svakog ispitanika.



Slika 4. Standardna kriva za utvrđivanje periostina kod ispitanika

Serumski nivo IL-8 (pg/ml): analiza je urađena na Odeljenju za visokospecijalizovanu in vitro dijagnostiku imunoloških i alergoloških oboljenja, Klinike za alergologiju i imunologiju, Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije, ELISA testom, komercijalnog naziva LEGEND MAX™ Human IL-8 ELISA Kit, Biologend San Diego, California. Prema uputstvu proizvođača, standardne vrednosti IL-8 u serumu iznose 15.6 -1000 pg/ml. Pre početka analize svi reagensi i uzorci seruma su odmrznuti do sobne temperature, a svi postupci su sprovedeni prema uputstvu proizvođača. U pojedinačna udubljenja mikrotitracione ploče, koja su obložena specifičnim anti IL-8 antitelima se pipetiraju serumi ispitanika, standardi, a u njima se prisutni IL-8 vezuje za ploče. Nakon rekonstrukcije bočice koja sadrži IL-8, dodaje se 0.04ml test rastvor A da bi se dobila 20ng/ml standardnog rastvora koji se inkubira na sobnoj temperaturi 15 do 20 minuta. Nakon toga se priprema 500µl standardnog rastvora koncentracije 1000pg/ml, tako što se 25 ml standardnog rastvora doda u 475µl test rastvora A. Nakon toga je napravljena serija od 6 standardnih rastvora različitih razblaženja u nizu, a test rastvor A služi kao nulti standard (0 pg/ml). Dodaje se Matrix A u standardne mikroločice, a test rastvor A u pločice sa uzorcima, pa se inkubira 2 sata mešajući. Onda se vrši ispiranje, dodaje se anti IL-8 detekciono antitelo i inkubira se 1 sat, mešajući. Zatim se vrši ispiranje, dodaje se Avidin – HRP A rastvor. Inkubira se 30 minut mešajući. Vrš se ispiranje, dodaje se hromogeni supstrat (Supstrate Solution F) u svako udubljenje, pa se inkubira pola sata u mraku. Dodatak hromogenog supstrata dovodi do bojene reakcije sa konjugatom, a dalji razvoj bojene reakcije prekinut je dodavanjem stop rastvora. Intenzitet bojene reakcije je direktno proporcionalan koncentraciji IL -8 u uzorcima i standardima. Fotometrijsko merenje optičke gustine intenziteta boje je izvršeno na 450 nm i 570 nm. Standardna kriva, sa koje se utvrđuje koncentracija antitela u uzorku, dobija se nanošenjem vrednosti optičke gustine na x osu za poznate vrednosti serijski razblaženog rastvora, a na y osu nanošenjem vrednosti samih uzoraka (optičke gustine) i spajanjem tačaka (Slika 5). Na osnovu standardne krive je određena vrednost IL-8 za svakog ispitanika.



Slika 5. Standardna kriva za utvrđivanje IL- 8 kod ispitanika

3.2. Statistička analiza podataka

Za deskripciju kategorijalnih podataka su korišćeni apsolutni i relativni brojevi u formi n (%). Numerički podaci su opisani aritmetičkom sredinom sa standardnom devijacijom ili

medijanom, sa opsegom vrednosti od minimuma do maksimuma u zavisnosti od distribucije podataka. Normalna raspodela je evaluirana matematičkim (*Shapiro-Willk test*) i grafičkim metodama (histogram, dijagram kutije- *box-plot*). Četiri nezavisne grupe (EA, NA, MGA i PGA) su upoređivane prema kategorijalnim podacima pomoću hi-kvadrat ili Fišerovog testa tačne verovatnoće. Uz to, grupe su upoređivane prema numeričkim parametrima jednofaktorskom analizom varijanse *One-way ANOVA* sa međugrupnim poređenjem *Tuckey* metodom, ili *Kruskal- Wallis* testom sa *Mann- Whitney* testom za međugrupno poređenje, u zavisnosti od distribucije podataka.

Za ispitivanje povezanosti faktora sa različitim inflamatornim fenotipovima astme korišćena je logistička regresiona analiza (*Backward Wald* metod). Prvo je izvedena univarijantna, a zatim multivarijantna analiza tako što su svi značajni faktori iz univarijantnog bili uključeni u multivarijantni model uz vođenje računa o multikolinearnosti nezavisnih varijabli. Za utvrđivanje eozinofila kao potencijalnog biomarkera EA, korišćena je ROC (*engl. Receiver-Operating Characteristic curve*) kriva, a granična (*cut-off*) vrednost je izabrana u prema najvećoj vrednosti Youdenovog indeksa. Sve statističke metode su smatrane značajnim ukoliko je dobijena p vrednost bila $\leq 0,05$.

Za potrebe analize podataka je korišćen je program IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp

4. REZULTATI

Ova studija preseka je uključila ukupno 80 ispitanika starijih od 18 godina, oba pola, sa dijagnozom bronhijalne astme postavljenom prema smernicama GINA.

4.1. Karakteristike ispitanika

Oboleli od bronhijalne astme su bili prosečne starosti 43.65 ± 12.72 godina, sa odnosom polova 2:1 u korist ženskog pola. Nešto više od polovine su bili pušači sa srednjim trajanjem pušačkog statusa od 14 godina (od najmanje 1 do najviše 50 godina). Prosečan index telesne mase je bio 26.43. Više od polovine ispitanika (58.8%) je bilo prekomerno uhranjeno ($BMI > 25$). Detaljne karakteristike obolelih od bronhijalne astme su prikazane u Tabeli 1.

Tabela 1. Osnovne karakteristike ispitanika

Karakteristika	Deskripcija
Pol, n (%)	
Muški	23 (28.8)
Ženski	57 (71.3)
Starost (godine), $\bar{x} \pm sd$	43.65±12.72
Pušački status, n (%)	
Pušač	45 (56.3)
Nepušač	35 (43.8)
Dužina pušačkog statusa (godine), med (min-max)	14 (1-50)
BMI, $\bar{x} \pm sd$	26.43±4.64
Uhranjenost, n (%)	
Normalno uhranjeni	33 (41.3)
Prekomerno uhranjeni	47 (58.8)

Skraćenice: BMI- indeks telesne mase (BMI, eng. body mass index)

Senzibilizacija na alergene je prikazana u Figuri 1. Više od polovine svih obolelih od bronhijalne astme je bilo senzibilisano na polene i to na polen korova u 61%, polen trava u 56% i polen drveća u 45% slučajeva. Senzibilizacija na grinje je bila prisutna kod 44% obolelih dok je najmanje bilo senzibilisano na kućnu prašinu (17%).

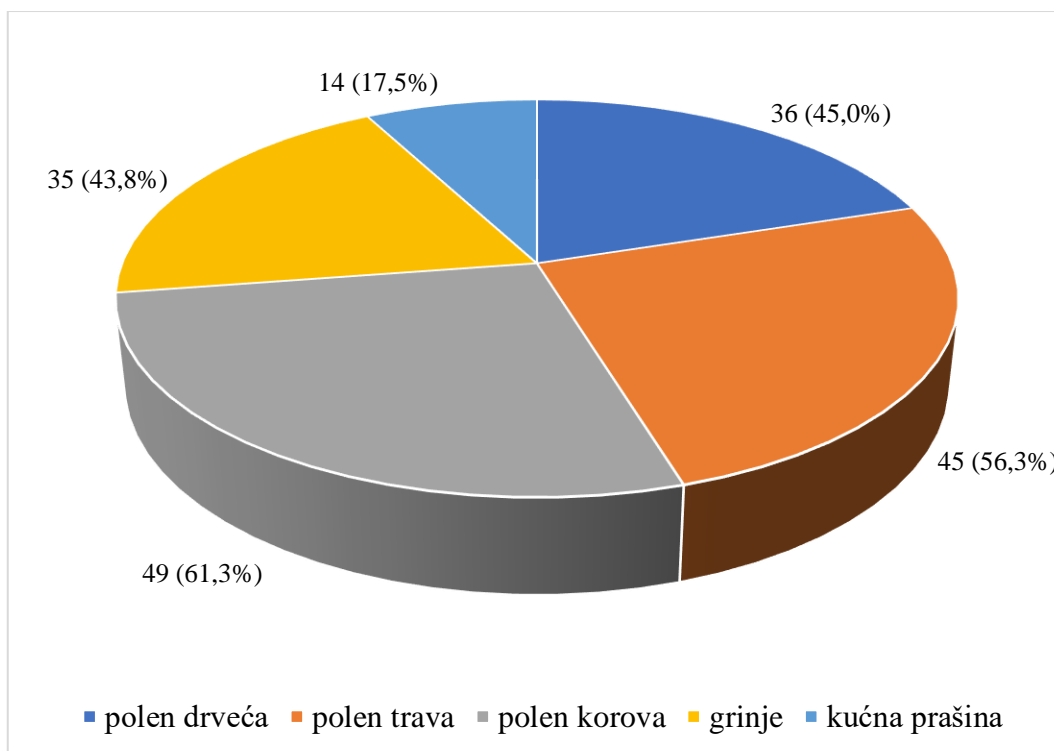


Figura 1. Senzibilizacija na alergene

Najčešća udružena oboljenja su bili alergijski rinitis (79%), alergije na lekove (27%) i nealergijski rinitis (19%). U porodičnoj anamnezi, najzastupljenije bolesti su bile alergijski rinitis (48.8%), bronhijalna astma (38.8%) i alergija na lekove (27.5%) (Tabela 2).

Tabela 2. Komorbiditeti i porodična anamneza ispitanika

Komorbiditeti, n (%)	Deskripcija
Alergijski rinitis	63 (78.8)
Nealergijski rinitis	15 (18.8)
Hronični rinosinuzitis sa nazalnom polipozom	12 (15.0)
Hronični rinosinuzitis bez nazalne polipoze	10 (12.5)
Atopijski dermatitis	4 (5.0)
Urtikarija	4 (5.0)
Alergija na lekove	22 (27.5)
Alergija na hranu	1 (1.3)
GERB/gastritis	10 (12.5)
Anksioznost	2 (2.5)
Depresija	0 (0.0)
Polipektomija	10 (12.5)
Operacija devijacije nosne pregrade	3 (3.8)
Otitis	1 (1.3)
Kardiovaskularno oboljenje	14 (17.5)
Dijabetes melitus	3 (3.8)
Autoimunska oboljenja	10 (12.5)
Malignitet	0 (0.0)
Alergija na nesteroidne antiinflamatorne lekove	8 (10.0)

Alergija na acetilsalicilnu kiselinu	5 (6.3)
Porodična anamneza, n (%)	
Alergijski rhinitis	39 (48.8)
Bronhijalna astma	31 (38,8)
Kardiovaskularne bolesti	5 (6.3)
Dijabetes melitus	2 (2.5)
Malignitet	8 (10.0)
Autoimunsko oboljenje	2 (2.5)

Skraćenice: GERB-gastroezofagealna bolest

U Tabeli 3 su prikazane karakteristike bronhijalne astme ispitanika, kao i okidači pogoršanja. Prosečno trajanje bronhijalne astme je iznosilo 7 godina. Simptomi bolesti su bili prisutni prosečno 15 godina pre postavljanja dijagnoze. Auskultatorni nalaz na plućima u vreme pregleda je kod većine pacijenta bio uredan (81%). Najčešći simptomi su bili zapašenost nosa (66%) i kratak dah (62%), a kod oko polovine ispitanika su bili prisutni curenje nosa, svrab nosa, sviranje u grudima i dispnea (50%, 46%, 46% i 45%). Kijanje i kašalj su bili prisutni kod 39% i 36% obolelih, a najređi simptom je bio iskašljavanje u svega 11% slučajeva. Najčešći okidači pogoršanja bronhijalne astme su bili alergeni (60%) i zagađenje (41%), a kod petine su okidači respiratorne infekcije i promena vremenskih prilika.

Tabela 3. Karakteristike bronhijalne astme i okidači pogoršanja

Karakteristika	Deskripcija
Trajanje bronhijalne astme (godine), med (min-max)	7 (0-52)
Trajanje simptoma pre postavljanja dijagnoze (godine), med (min-max)	15 (1-50)
Broj teških egzacerbacija u poslednjih godinu dana, med (min-max)	0 (0-10)
Nalaz na plućima u vreme pregleda, n (%)	
Uredan	65 (81.3)
Wheezing (zviždanje)	15 (18.8)
Simptomi, n (%)	
Kijanje	31 (38.8)
Curenje nosa	40 (50.0)
Svrab nosa	37 (46.3)
Kratak dah	50 (62.5)
Zapašenost nosa	53 (66.3)
Iskašljavanje	9 (11.3)
Osećaj nedostatka vazduha (dispnea)	36 (45.0)
Sviranje u grudima	37 (46.3)
Kašalj	29 (36.3)
Okidači pogoršanja, n (%)	
Alergeni	48 (60.0)
Zagađenje	33 (41.3)
Respiratorne infekcije	16 (20.0)
Stres	2 (2.5)
Hrana	2 (2.5)
Vlaga	19 (23.8)
Promena vremenskih uslova	21 (26.3)
Dim	16 (20.0)
Fizički napor	7 (8.8)

Mirisi	11 (13.8)
Hemikalije	3 (3.8)

4.1.1. Laboratorijski parametri ispitanika

Laboratorijski parametri obolelih od bronhijalne astme su prikazani u Tabeli 4. Prosečna vrednost 25 (OH) vitamina D je iznosila 50.5 nmol/L (13-115nmol/L). Nisu zabeležena odstupanja u ostalim analiziranim parametrima.

Tabela 4. Laboratorijski parametri ispitanika

Parametar	Deskripcija
Sedimentacija (mm/h), med (min-max)	12 (2-52)
CRP (mg/L), med (min-max)	1.5 (1.0-18.0)
Broj eritrocita, (*10 ¹² /L) $\bar{x} \pm sd$,	4.78±0.41
Hgb (g/L) $\bar{x} \pm sd$	136.90±18.94
MCV, $\bar{x} \pm sd$	89.51±4.57
Broj leukocita (*10 ⁹ /L), med (min-max)	6.3 (3.9-11.7)
Broj neutrofila (*10 ⁹ /L), med (min-max)	3.3 (1.8-7.9)
Broj limfocita (*10 ⁹ /L), med (min-max)	2.1 (0.3-4.8)
D-dimer (mg/L), med (min-max)	0.27 (0.14-2.05)
Ukupan holesterol (mmol/L), $\bar{x} \pm sd$	5.16±1.21
Holesterol HDL (mmol/L), $\bar{x} \pm sd$	1.51±0.34
Holesterol LDL (mmol/L), $\bar{x} \pm sd$	3.15±1.01
Trigliceridi (mmol/L), med (min-max)	0.9 (0.4-3.2)
Serumsko gvožđe (umol/L), med (min-max)	16.5 (2.7-36.5)
TIBC (umol/L), $\bar{x} \pm sd$	55.66±8.49
Feritin (ug/L), med (min-max)	46.6 (2.5-337.9)
25 (OH)vitamin D (nmol/L), med (min-max)	50.5 (13-115)
TSH (mIU/L), med (min-max)	1.74 (0,08-12,52)
FT4 (pmol/L), $\bar{x} \pm sd$	12.33±2.43
IgG (g/L), $\bar{x} \pm sd$	11.18±2.20
IgA (g/L) (min-max)	1.89 (0.72-4.76)
IgM (g/L) med (min-max)	1.10 (0.20-3.90)

Skraćenice: TIBC- ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (engl. total iron binding capacity); TSH- tiroidni stimulišući hormon; FT4- slobodni tiroksin; CRP- C reaktivni protein

4.1.2. Procena kontrole bronhijalne astme ispitanika

Kontrola bronhijalne astme procenjena GINA upitnikom o kontroli simptoma, ACT i ACQ kriterijumima je prikazana na Figuri 2. Dobro kontrolisana bolest je bila prisutna kod 21%, 44% i 29% prema GINA upitniku kontroli simptoma, ACT, odnosno ACQ upitnika. Nekontrolisana bolesti je utvrđena kod 41%, 36% i 47% ispitanika prema ova tri kriterijuma redom.

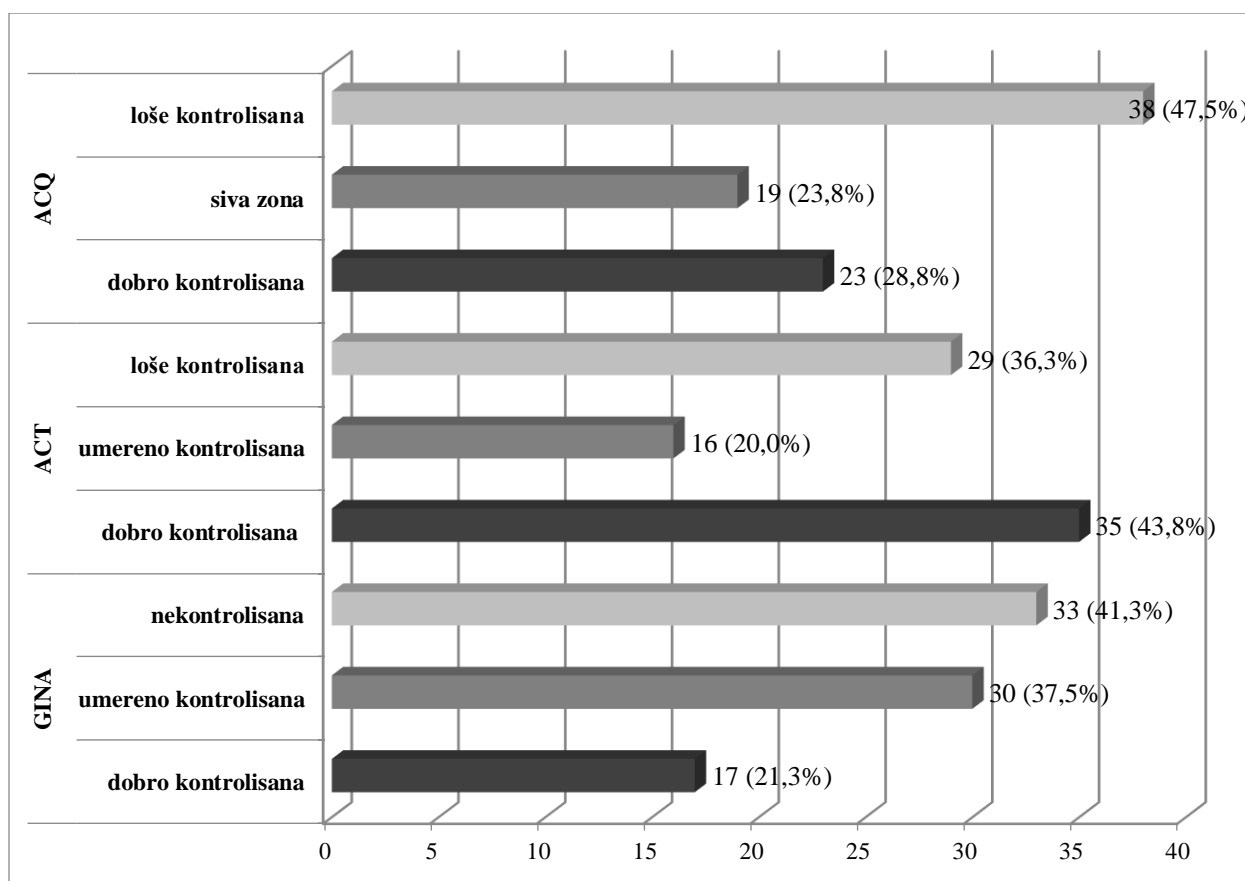


Figura 2. Procena kontrole bronhijalne astme

Skraćenice: GINA upitnik o kontroli simptoma (engl. Global Initiative for Asthma); ACT- Test o kontroli astme (engl. Asthma control test); ACQ- Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire)

4.1.3. Spirometrijski parametri, disfunkcija malih disajnih puteva, frakcija izdahnutog azot monoksida

Spirometrijski parametri i disfunkcija malih disajnih puteva su prikazani u Tabeli 5. Prosečan FEV1 je iznosio 92.6%, a FEV1/FVC 71.36%. Kod 45% ispitanika je detektovana povišena rezistencija malih disajnih puteva, tj. disfunkcija malih disajnih puteva.

Tabela 5. Spirometrijski parametri i parametri disfunkcije malih disajnih puteva

Parametar	Deskripcija
FVC (%), mean±sd	107.39±14.08
FEV1 (%), mean±sd	92.60±14.54
FEV1/FVC (%), mean±sd	71.36±8.54
MEF25 (%), med (min-max)	50.0 (37.2-62.7)
MEF50 (%), med (min-max)	70.0 (56.0-87.7)
MEF75 (%), med (min-max)	9.0 (76.2-109.0)
MMEF, med (min-max)	67.92 (36-119)
Povišena rezistencija disajnih puteva, n (%)	36 (45.0)

Skraćenice: FVC- forsirani vitalni kapacitet; FEV1-forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi; FEV1/FVC- forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi/ forsirani vitalni kapacitet; VC-vitalni kapacitet; MEF25-srednji ekspirijumski protok

vazduha pri 25% VC; MEF50-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 50%VC; MEF75-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 75% VC; MMEF-srednji-maksimalni ekspirijumski protok vazduha

FeNO, kao neinvazivni biomarker inflamacije disajnih puteva kod obolelih od bronhijalne astme, među pacijentima uključenim u ovu studiju je prikazan na Figuri 3. Prosečna vrednost FeNO je iznosila 23.46 ppb (3.06-192.44ppb).

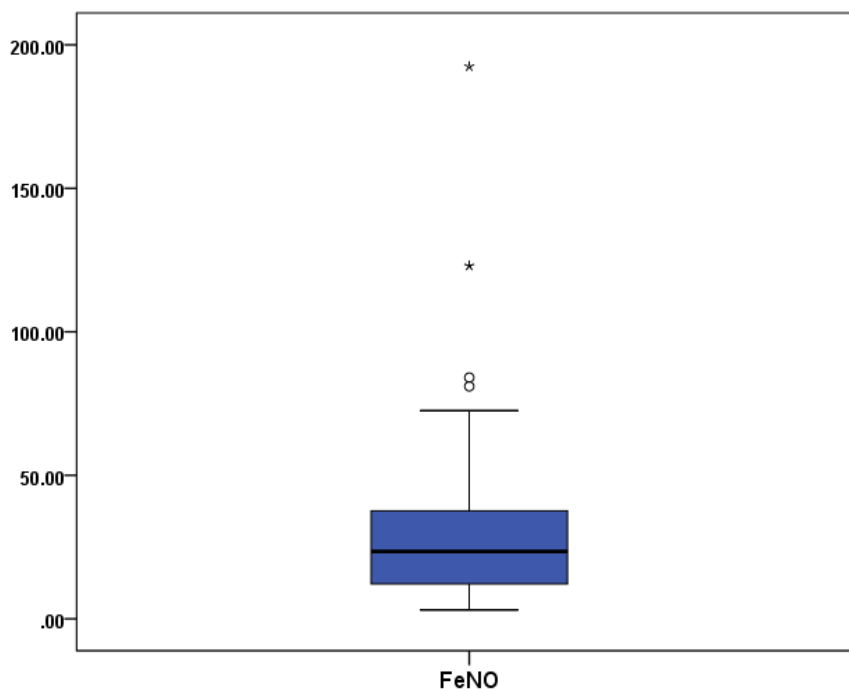


Figura 3. FeNO kod obolelih od bronhijalne astme
Skraćenice: FeNO- frakcija izdahutog azot monoksida

4.1.4. Modaliteti terapije

Primenjeni modaliteti terapije u lečenju obolelih od bronhijalne astme su prikazani u Tabeli 6. Najčešće primenjivani lekovi su bili: antihistaminici (72.5%), nazalni kortikosteroidi (58.8%), LTRA (57.5%), a u terapiji astme: SABA kod 41.3%, dok je 37.5% bilo na ICS/LABA terapiji prema MART protokolu, a 36.3% ICS/LABA. Bilošku terapiju je primalo 17 pacijenata, omalizumab 10 pacijenata (58.8%), a benralizumab je primenjen kod 7 (41.2%). Više od polovine je uzimalo srednju dnevnu dozu IKS, shodno GINA smernicama.

Tabela 6. Primenjena terapija u lečenju bronhijalne astme

Terapija, n (%)	Deskripcija
Antihistaminici	58 (72.5)
Intranazalni kortikosteroidi	47 (58.8)
Alergenska imunoterapija	12 (15.0)
IKS	10 (12.5)
LAMA	9 (11.3)
Oralni kortikosteroidi	8 (10.0)

Aminofilin	3 (3.8)
LTRA	46 (57.5)
SABA	33 (41.3)
IKS/LABA	29 (36.3)
IKS/LABA MART	30 (37.5)
Biološka terapija (omalizumab+ benralizumab)	17 (21.3)
Dnevne doze IKS prema GINA smernicama	
Male (mcg)	18 (25.7)
Srednje (mcg)	37 (52.9)
Visoke (mcg)	15 (21.4)
Adherenca	79 (98.8)

Skraćenice: IKS- inhalacioni kortikosteroidi, LABA- dugo delujući beta 2 agonisti (engl. long acting beta 2 agonist), LAMA- dugo delujući muskarinski antagonisti (engl. longacting muscarinic antagonists), LTRA-antagonisti receptora leukotrijena (engl. leukotriene receptor antagonist), SABA- kratkodelujući beta 2 agonisti (engl. short acting beta 2 agonist), IKS/LABA- fiksna kombinacija inhalacionih kortikosteroida i dugodelujućih beta 2 agonista, IKS/LABA MART- niska doza IKS + formoterola prema režimu terapije održavanja i terapije za brzo olakšavanje simptoma (IKS+ formoterol prema engl. maintenance and reliever therapy- MART)

4.1.5. Biomarkeri

Ispitali smo biomarkere: broj eozinofila, IgE, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33. Prosečan broj eozinofila je bio $200 \cdot 10^9/L$ ($0.1-0.4 \cdot 10^9/L$), a ukupan IgE 121 IU/ml (56.2-364.5 IU/ml). Ostali serumski biomarkeri astme su prikazani u Tabeli 7.

Tabela 7. Biomarkeri ispitanika

Biomarkeri, med (min-max)	Deskripcija
Broj eozinofila, ($\cdot 10^9/L$)	0.2 (0.1-0.4)
IgE (IU/ml)	121.5 (56.2-364.5)
Periostin (pmmol/l)	924.4 (697.5-1325.9)
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)
IL-6 (pg/ml)	0.0 (0.0-11.5)
IL-8 (pg/ml)	21.0 (3.8-122.1)
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)
IL-33 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)

4.2. Povezanost spirometrijskih parametara i biomarkera sa kontrolom bolesti procenjenom GINA upitnikom o kontroli simptoma, ACT i ACQ

U cilju utvrđivanja razlika u vrednostima spirometrijskih parametara i biomarkera u zavisnosti od stepena kontrole bronhijalne astme, ove karakteristike su upoređene prema ACQ, ACT i GINA upitnikom. Rezultati su prikazani u Tabelama 8-10.

U okviru klasifikacije obolelih od bronhijalne astme prema ACQ na loše kontrolisane, sivu zonu kontrole i dobro kontrolisane (Tabela 8), utvrđeno je da su pacijenti u sivoj zoni kontrole

imali najviše vrednosti FEV1 i VC u poređenju sa dobro i loše kontrolisanim pacijentima ($p=0.040$ i $p=0.045$), dok su loše kontrolisani pacijenti imali najviši broj leukocita i limfocita u krvi u poređenju sa sivom zonom i dobro kontrolisanim pacijentima ($p=0.022$ i $p=0.013$). FEV1 i VC su bili značajno viši kod obolelih od bronhijalne astme u sivoj zoni nego kod loše kontrolisanih ($p=0.037$ i $p=0.035$), dok se ovi parametri nisu značajno razlikovali između dobro i loše kontrolisanih ($p=0.309$ i $p=0.571$), kao ni između dobro kontrolisanih i sive zone ($p=0.565$ i $p=0.326$). Broj leukocita i limfocita u krvi je bio značajno viši kod loše kontrolisanih pacijenata u poređenju sa dobro kontrolisanim ($p=0.009$ i $p=0.004$), dok se njihov broj nije razlikovao u poređenju sa sivom zonom ($p=0.686$ i $p=0.330$), niti je bilo razlike u ovim parametrima između sive zone i loše kontrolisanih ($p=0.070$ i $p=0.093$).

Tabela 8. Spirometrijski parametri i biomarkeri ispitanika prema ACQ

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACQ			P*
	Loše kontrolisana n=38	Siva zona n=19	Dobro kontrolisana n=23	
Spirometrijski parametri				
FVC, $\bar{x} \pm sd$	104.56±15.08	113.39±14.72	107.12±10.36	0.082£
FEV1, $\bar{x} \pm sd$	88.65±14.02	98.15±14.34	94.15±14.34	0.040£
FEV1/FVC, $\bar{x} \pm sd$	70.09±8.54	71.75±6.56	73.12±9.89	0.400£
VC, $\bar{x} \pm sd$	100.12±12.66	108.05±10.40	103.09±8.66	0.045£
MEF25, med (min-max)	44.5 (19-123.6)	58.0 (31-92)	51.0 (11-108)	0.253¥
MEF50, med (min-max)	69.5 (17-116)	70.0 (34-121)	70.0(25-123)	0.699¥
MEF75, med (min-max)	90 (30-119)	99 (42-112)	94 (39-113)	0.454¥
Povišena rezistencija malih disajnih puteva, n (%)	19 (50.0)	7 (36.8)	10 (43.5)	0,632§
Biomarkeri, med (min-max)				
Sedimentacija (mm/h)	12 (2-52)	12 (6-48)	10 (2-48)	0.798¥
C-reaktivni protein (mg/L)	1.6 (1.0-12.4)	1.2 (1.0-8.3)	1.2 (1.0-18.0)	0.288¥
Broj leukocita (*10 ⁹ /L)	6.4 (4.9-11.7)	6.0 (3.9-10.7)	5.8 (4.7-11.1)	0.022¥
Broj neutrofila (*10 ⁹ /L)	3.5 (1.8-7.9)	3.0 (1.9-4.9)	3.2 (2.0-7.7)	0.057¥
Broj limfocita (*10 ⁹ /L)	2.2 (0.4-4.8)	2.1 (0.3-4.5)	1.8 (1.1-3.3)	0.013¥
Broj eozinofila, (*10 ⁹ /L)	0.2 (0.0-3.9)	0.2 (0.0-0.9)	0.2 (0.0-1.1)	0.385¥
IgE (IU/ml)	156 (6-850)	114 (8-832)	87 (4.7-965)	0.722¥
FeNO (ppb)	23.3 (3.9-192.4)	23.4 (6.7-72.5)	24.1 (3.1-84.1)	0.766¥
Periostin (pmol/l)	870.1 (214.8-2314.4)	950.8 (493.6-2651.9)	940.9 (515.3-2424.4)	0.587¥
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-13.9)	0.0 (0.0-2.3)	0.0 (0.0-91.2)	0.281¥
IL-6 (pg/ml)	2.6 (1.5-8.0)	2.8 (1.5-5.0)	2.9 (1.0-14.2)	0.722¥
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-212.7)	0.0 (0.0-328.2)	0.0 (0.0-304.1)	0.601¥
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-8.7)	0.0 (0.0-2.7)	0.0 (0.0-2.9)	0.476¥
IL-33 (pg/ml)	38.25 (0.0-906.7)	28.6 (0.0-1006.1)	7.2 (0.0-838.6)	0.723¥

* za nivo značajnosti od 0.05 prema jednofaktorskoj ANOVA-i£, hi-kvadrat testu§ ili Kruskal-Wallis testu¥

Skraćenice: ACQ- Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire); FVC- forsirani vitalni kapacitet; FEV1- forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi; FEV1/FVC-forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi/ forsirani vitalni kapacitet; VC- vitalni kapacitet; MEF25-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 25% VC; MEF50-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 50%VC; MEF75-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 75% VC; FeNO- frakcija izdahutog azot monoksida

U okviru klasifikacije obolelih od bronhijalne astme prema ACT kriterijumima na loše, umereno i dobro kontrolisane (Tabela 9), utvrđeno je da su pacijenti sa lošom kontrolom bolesti imali najviši broj limfocita u krvi u poređenju sa pacijentima sa umerenom i dobrom kontrolom bronhijalne astme ($p=0.050$). Broj limfocita u krvi je bio značajno viši kod pacijenata sa lošom nego kod pacijenata sa dobrom kontrolom bronhijalne astme ($p=0.013$), dok se ovaj parametar nije razlikovao između dobro i umereno, kao ni između umereno i loše kontrolisanih pacijenata ($p=0.276$ i $p=0.447$).

Tabela 9. Spirometrijski parametri i biomarkeri ispitanika prema ACT

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACT			p*
	Loše kontrolisana n=35	Umereno kontrolisana n=16	Dobro kontrolisana n=29	
Spirometrijski parametri				
FVC, $\bar{x} \pm sd$	106.31±12.06	108.26±21.56	108.20±11.46	0.838£
FEV1, $\bar{x} \pm sd$	90.20±15.05	94.86±13.11	94.26±14.72	0.429£
FEV1/FVC, $\bar{x} \pm sd$	70.34±7.22	71.17±9.11	72.68±9.74	0.553£
VC, $\bar{x} \pm sd$	104.18±11.36	98.76±13.59	103.52±10.05	0.272£
MEF25, med (min-max)	46 (19-92)	52 (24-123.6)	51 (11-108)	0.772¥
MEF50, med (min-max)	70 (17-116)	78.5 (32-113.2)	68 (25-123)	0.559¥
MEF75, med (min-max)	90 (30-113)	96.5 (52-119)	94 (39-113)	0.457¥
Povišena rezistencija malih disajnih puteva, n (%)	16 (45.7)	6 (37.5)	14 (48.3)	0.780§
Biomarkeri med (min-max)				
Sedimentacija (mm/h)	14 (2-52)	11 (4-44)	10 (2-48)	0.346¥
C-reaktivni protein (mg/L)	1.9 (1.0-12.4)	1.1 (1.0-3.9)	1.3 (1.0-18.0)	0.094¥
Broj leukocita (*10 ⁹ /L)	6.4 (4.1-11.7)	6.3 (4.0-10.7)	6.0 (3.9-11.1)	0.122¥
Broj neutrofila (*10 ⁹ /L)	3.4 (1.8-7.9)	3.5 (1.9-5.1)	3.2 (2.0-7.7)	0.349¥
Broj limfocita (*10 ⁹ /L)	2.2 (0.3-4.8)	2.0 (1.0-4.5)	1.9 (1.1-3.3)	0.050¥
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.3 (0.0-0.7)	0.1 (0.0-3.9)	0.2 (0.0-1.1)	0.745¥
IgE (IU/ml)	140 (10-730)	119.5 (6-850)	120 (4.7-965)	0.895¥
FeNO (ppb)	23.4 (3.9-192.4)	19.8 (6.7-123.0)	25.0 (3.1-84.1)	0.731¥
Periostin (pmol/l)	924.2 (214.8-2651.9)	877.7 (445.3-2018.0)	940.9 (515.3-2445.4)	0.272¥
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-2.5)	0.0 (0.0-13.9)	0.0 (0.0-91.2)	0.206¥
IL-6 (pg/ml)	2.6 (1.0-8.0)	2.8 (1.6-4.6)	2.9 (1.5-14.2)	0.721¥
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-212.7)	0.0 (0.0-328.2)	0.0 (0.0-304.1)	0.368¥
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-3.3)	0.0 (0.0-8.7)	0.0 (0.0-2.9)	0.277¥
IL-33 (pg/ml)	31.5 (0.0-1006.1)	44.3 (0.0-906.7)	8.7 (0.0-838.6)	0.501¥

* za nivo značajnosti od 0.05 prema jednofaktorskoj ANOVA-i£, hi-kvadrat testu§ ili Kruskal-Wallis testu¥

Skraćenice: ACT- test o kontroli astme (engl. Asthma Control Test); FVC-forsirani vitalni kapacitet; FEV1-forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi; FEV1/FVC forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi/ forsirani vitalni kapacitet; VC-vitalni kapacitet; MEF25-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 25% VC; MEF50-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 50%VC; MEF75-srednji ekspirijumski protok vazduha 75% VC; FeNO-frakcija izdahutog azot monoksida

U okviru klasifikacije obolelih od bronhijalne astme prema GINA upitniku o kontroli simptoma na nekontrolisane, delimično i dobro kontrolisane (Tabela 10), utvrđeno je da se pacijenti sa nekontrolisanom, delimično i dobro kontrolisanom formom bolesti nisu značajno razlikovali ni u jednom spirometrijskom parametru niti biomarkeru.

Tabela 10. Spirometrijski parametri i biomarkeri ispitanika prema GINA upitniku o kontroli simptoma

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema GINA upitniku o kontroli simptoma			p*
	Nekontrolisana n=17	Delimično kontrolisana n=30	Dobro kontrolisana n=33	
Spirometrijski parametri				
FVC, $\bar{x} \pm sd$	108.88±12.55	106.93±15.01	107.03±14.32	0.888£
FEV1, $\bar{x} \pm sd$	93.35±12.92	95.24±14.11	89.82±15.60	0.330£
FEV1/FVC, $\bar{x} \pm sd$	73.32±7.39	72.30±9.96	69.48±7.50	0.241£
VC, $\bar{x} \pm sd$	102.82±10.88	101.87±12,29	103.77±11.17	0.810£
MEF 25, med (min-max)	52 (20-89)	55.5 (11-123.6)	46 (19-92)	0.495¥
MEF 50, med (min-max)	71 (25-121)	76.3 (30-123)	68 (17-116)	0.620¥
MEF 75, med (min-max)	99 (39-111)	96.5 (48-119)	90 (30-113)	0.332¥
Povišena rezistencija malih disajnih puteva, n (%)	11 (64.7)	10 (33.3)	15 (45.5)	0.115§
Biomarkeri med (min-max)				
Sedimentacija (mm/h)	12 (2-48)	11 (2-52)	14 (4-36)	0.617¥
C-reaktivni protein (mg/L)	1.9 (1.0-8.3)	1.2 (1.0-18.0)	1.7 (1.0-10.2)	0.304¥
Broj leukocita (*10 ⁹ /L)	5.8 (3.9-7.8)	6.4 (4.0-11.3)	6.3 (4.1-11.7)	0.390¥
Broj neutrofila (*10 ⁹ /L)	3.1 (2.0-4.6)	3.4 (1.9-7.7)	3.3 (1.8-7.9)	0.221¥
Broj limfocita (*10 ⁹ /L)	1.9 (1.1-3.8)	2.1 (1.0-4.8)	2.2 (0.3-3.4)	0.419¥
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.1 (0.0-0.9)	0.2 (0.0-3.9)	0.2 (0.0-0.7)	0.610¥
IgE (IU/ml)	137 (4.7-965)	118.5 (8-850)	112 (6-681)	0.464¥
FeNO (ppb)	33.2 (3.1-123.0)	22.1 (6.3-70.2)	23.5 (3.9-192.4)	0.392¥
Periostin (pmol/l)	970.2 (515.3-2445.4)	915.2 (493.6-2226.7)	881.7 (241.8-2651.9)	0.348¥
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-13.9)	0.0 (0.0-91.2)	0.0 (0.0-2.5)	0.511¥
IL-6 (pg/ml)	3.2 (1.5-14.2)	2.7 (1.0-10.0)	2.5 (1.5-8.0)	0.181¥
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-73.8)	0.0 (0.0-304.1)	0.0 (0.0-328.2)	0.431¥
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-1.2)	0.0 (0.0-8.7)	0.0 (0.0-3.3)	0.676¥
IL-33 (pg/ml)	8.7 (0.0-838.6)	30.1 (0.0-1006.1)	18.4 (0.0-794.9)	0.578¥

* za nivo značajnosti od 0.05 prema jednofaktorskoj ANOVA-i, hi-kvadrat testu§ ili Kruskal-Wallis testu¥

Skraćenice: GINA- globalna inicijativa o astmi (engl. Global Initiative for Asthma); FVC- forsirani vitalni kapacitet; FEV1- forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi; FEV1/FVC-forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi/ forsirani vitalni kapacitet; VC-vitalni kapacitet; MEF25-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 25% VC; MEF50-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 50%VC; MEF75-srednji ekspirijumski protok vazduha 75% VC; FeNO- frakcija izdahutog azot monoksida

4.3. Inflamatorni fenotipovi bronhijalne astme ispitanika

Na osnovu kriterijuma za određivanje inflamatornih fenotipa metodom indukovanog sputuma, u grupi od 80 obolelih, bilo je 25 (31%) sa eozinofilnom (EA), 12 (15%) sa neutrofilnom (NA),

24 (30%) sa mešanom granulocitnom (MGA) i 19 (24%) sa paugranulocitnom bronhijalnom astmom (Figura 4).

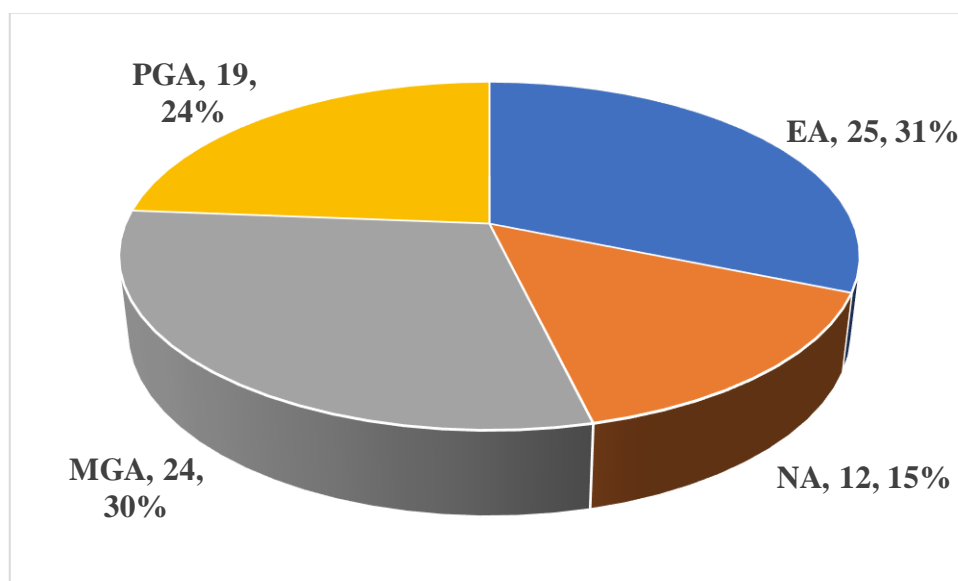


Figura 4. Inflamatorni fenotipovi ispitanika

Skraćenice: EA- eozinofilna astma; NA- neutrofilna astma, MGA- mešovita granulocitna astma, PGA- paucigranulocitna astma

4.4. Karakteristike inflamatornih fenotipova ispitanika

Ispitanici podeljeni u 4 inflamatorna fenotipa bronhijalne astme se nisu značajno razlikovali ni po jednoj od evaluiranih osnovnih karakteristika. Bili su iste prosečne starosti, jednakog odnosa polova, zastupljenosti pušača i nepušača, dužine trajanja pušačkog statusa, uhranjenosti, kao i zastupljenosti komorbiditeta i oboljenja u porodičnoj anamnezi. Detaljne karakteristike obolelih od bronhijalne astme prema četiri inflamatorna fenotipa su prikazane u Tabeli 11.

Tabela 11. Osnovne karakteristike ispitanika prema inflamatornim fenotipovima bronhijalne astme

Karakteristika	Inflamatorni fenotip				p*
	EA n=25	NA n=12	MGA n=24	PGA n=19	
Pol, n (%)					
Muški	8 (32.0)	3 (25.0)	7 (29.2)	5 (26.3)	0.966§
Ženski	17 (68.0)	9 (75.0)	17 (70.8)	14 (73.7)	
Starost (godine), $\bar{x} \pm sd$	45.44±13.62	41.67±12.46	41.71±13.78	45.00±10.56	0.677£
Pušački status, n (%)					
Pušač	15 (60.0)	8 (66.7)	13 (54.2)	9 (47.4)	0,724§
Nepušač	10 (40.0)	4 (33.3)	11 (45,8)	10 (52,6)	
Dužina pušačkog statusa (godine), med (min-max)	15 (3-27)	15 (10-20)	10 (5-50)	20 (1-30)	0.817¥
BMI, $\bar{x} \pm sd$	26.52±2.80	24.67±4.46	27.26±6.24	26.39±4.36	0.483£

Uhranjenost, n (%)					
Normalno uhranjeni	9 (36.0)	7 (58.3)	10 (41.7)	7 (36.8)	0.597§
Predgojazni i gojazni	16 (64.0)	5 (41.7)	14 (58.3)	12 (63.2)	
Komorbidity, n (%)					
Alergijski rinitis	18 (72.0)	10 (83.3)	20 (83.3)	15 (78.9)	0.769§
Nealergijski rinitis	6 (24.0)	2 (16.7)	4 (16.7)	3 (15.8)	0.882§
Hronični rinosinuzitis sa nazalnim polipozom	5 (20.0)	2 (16.7)	3 (12.5)	2 (10.5)	NA
Hronični rinosinuzitis bez nazalne polipoze	2 (8.0)	1 (8.3)	3 (12.5)	4 (21.1)	NA
Atopijski dermatitis	1 (4.0)	0 (0.0)	1 (4.2)	2 (10.5)	NA
Urtikarija	3 (12.0)	0 (0.0)	1 (4.2)	0 (0.0)	NA
Alergija na lekove	6 (24.0)	4 (33.3)	7 (29.2)	5 (26.3)	0.939§
Alergija na hranu	1 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
GERB/gastritis	4 (16.0)	0 (0.0)	3 (12.5)	3 (15.8)	NA
Anksioznost	1 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	NA
Depresija	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
Polipektomija	4 (16.0)	1 (8.3)	3 (12.5)	2 (10.5)	NA
Operacija devijacije nosne pregrade	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (12.5)	0 (0.0)	NA
Otitis	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
Kardiovaskularno oboljenje	5 (20.0)	2 (16.7)	4 (16.7)	3 (15.8)	NA
Dijabetes melitus	2 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	NA
Autoimunsko oboljenje	3 (12.0)	2 (16.7)	3 (12.5)	2 (10.5)	NA
Malignitet	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
Reakcija na nesteroidne antiinflamatorne lekovi	4 (16.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	3 (15.8)	NA
Reakcija na Aspirin	4 (16.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	NA
Porodična anamneza, n (%)					
Alergijski rinitis	9 (36.0)	4 (33.3)	16 (66.7)	10 (52.6)	0.113§
Bronhijalna astma	9 (36.0)	6 (50.0)	9 (37.5)	7 (36.8)	0.858§
Kardiovaskularne bolesti	2 (8.0)	2 (16.7)	0 (0.0)	1 (5.3)	NA
Dijabetes melitus	1 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	NA
Malignitet	1 (4.0)	1 (8.3)	2 (8.3)	4 (21.1)	NA
Autoimunsko oboljenje	1 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	NA

* za nivo značajnosti od 0.05 prema hi-kvadrat testu§, jednofaktorskoj ANOVA-i¶ ili Kruskal-Wallis testu¶

Skraćenice: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA-mešovita granulocitna astma, PGA- paucigranulocitna astma; BMI-index telesne mase (engl. Body mass index); GERB-gastroezofagealna bolest; NA- nije primenljivo (engl. not applicable)

U Tabeli 12 su prikazane karakteristike bolesti, kao i njihovi okidači prema četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme. Prosečno trajanje bolesti, kao i simptoma pre postavljanja dijagnoze je trajalo jednako dugo bez obzira na fenotip. Broj egzacerbacija u poslednjih godinu dana se kretao od ni jednog do najviše 10, a jednako često u odnosu na četiri inflamatorna fenotipa bolesti. Auskultatorni nalaz na plućima u vreme pregleda je kod većine obolelih bio uredan bez obzira na fenotip. Najčešći simptomi su bili jednako zastupljeni za četiri fenotipa bolesti. Najčešći okidači pogoršanja bronhijalne astme su bili alergeni i zagađenje kod svih tipova astme.

Tabela 12. Karakteristike bronhijalne astme ispitanika prema inflamatornim fenotipovima

Karakteristika	Inflamatorni fenotip				p*
	EA n=25	NA n=12	MGA n=24	PGA n=19	
Trajanje bronhijalne astme (godine), med (min-max)	10 (1-45)	3.5 (0-23)	6.5 (0-50)	7 (1-52)	0.155¥
Trajanje simptoma pre postavljanja dijagnoze (godine), med (min-max)	1 (0-10)	2 (0-10)	1.5 (0-15)	2 (0-6)	0.461¥
Broj egzacerbacija u poslednjih godinu dana, med (min-max)	1 (0-8)	0 (0-7)	0 (0-4)	0 (0-10)	0.134¥
Nalaz na plućima u vreme pregleda					
Uredan	19 (76.0)	10 (83.3)	20 (83.3)	16 (84.2)	0.882§
Wheezing (zviždanje)	6 (24.0)	2 (16.7)	4 (16.7)	3 (15.8)	
Simptomi, n (%)					
Kijanje	14 (56.0)	7 (58.3)	14 (58.3)	14 (73.7)	0.647§
Curenje nosa	13 (52.0)	6 (50.0)	12 (50.0)	9 (47.4)	0.993§
Svrab nosa	13 (52.0)	4 (33.3)	13 (54.2)	7 (36.8)	0.490§
Kratak dah	17 (68.0)	7 (58.3)	12 (50.0)	14 (73.7)	0.388§
Zapušenost nosa	15 (60.0)	8 (66.7)	17 (70.8)	13 (68.4)	0.872§
Iskašljavanje	3 (12.0)	1 (8.3)	2 (8.3)	3 (15.8)	0.959#
Osećaj nedostatka vazduha (dispnea)	13 (52.0)	4 (33.3)	11 (45.8)	8 (42.1)	0.747§
Sviranje u grudima	13 (52.0)	5 (41.7)	9 (37.5)	10 (52.6)	0.686§
Kašalj	10 (40.0)	5 (41.7)	6 (25.0)	8 (42.1)	0.593§
Okidači pogoršanja					
Alergeni	13 (52.0)	8 (66.7)	17 (70.8)	10 (52.6)	0.477§
Zagađenje	12 (48.0)	6 (50.0)	7 (29.2)	8 (42.1)	0.512§
Respiratorne infekcije	4 (16.0)	3 (25.0)	4 (16.7)	5 (26.3)	NA
Stres	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	1 (5.3)	NA
Hrana	1 (4.0)	0 (0.0)	1 (4.2)	0 (0.0)	NA
Vlaga	8 (32.0)	4 (33.3)	4 (16.7)	3 (15.8)	0.411§
Promena vremenskih uslova	9 (36.0)	3 (25.0)	6 (25.0)	3 (15.8)	0.507§
Dim	9 (36.0)	2 (16.7)	4 (16.7)	1 (5.3)	NA
Fizički napor	1 (4.0)	0 (0.0)	5 (20.8)	1 (5.3)	NA
Mirisi	2 (8.0)	3 (25.0)	2 (8.3)	4 (21.1)	NA
Hemikalije	1 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (10.5)	NA

*za nivo značajnosti od 0.05 prema hi-kvadrat testu§, Fišerovom testu tačne verovatnoće# ili Kruskal-Wallis testu¥

Skraćenice: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA- mešovita granulocitna astma, PGA-paucigranulocitna astma; NA- nije primenljivo (engl. not applicable)

Senzibilizacija na alergene je prikazana na Figuri 5. Distribucija senzibilisanih pacijenata obolelih od bronhijalne astme u zavisnosti od inflamatornog fenotipa se nije razlikovala niti za polene korova ($p=0.535$), niti za polene trave ($p=0.724$), kao ni za polene drveća ($p=0.630$). Takođe, nije utvrđena statistički značajna razlika u senzibilizaciji na grinje u zavisnosti od inflamatornog fenotipa bronhijalne astme ($p=0.798$).

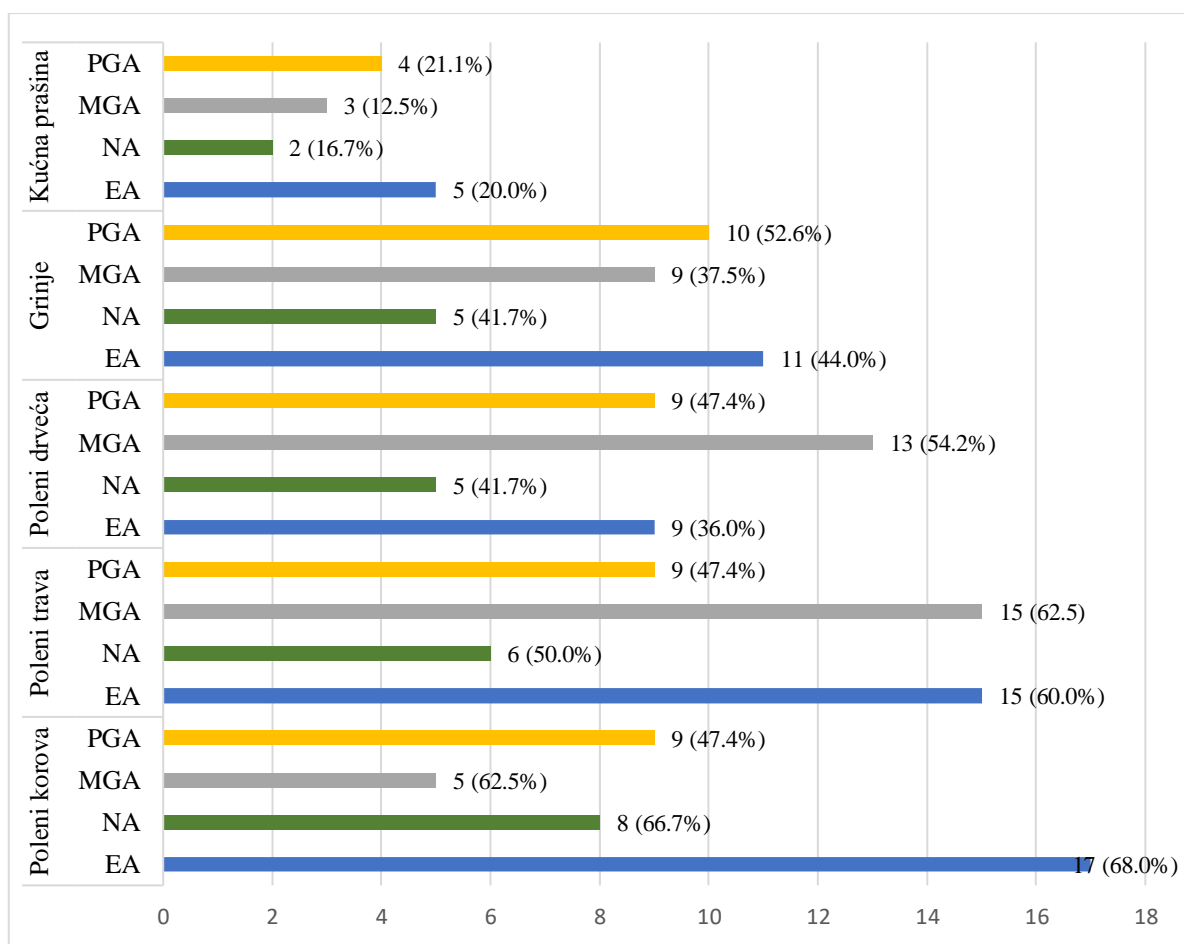


Figura 5. Senzibilizacija na alergene u zavisnosti od četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme

Skrćenice: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA-mešovita granulocitna astma, PGA-paucigranulocitna astma

Laboratorijski parametri ispitanika prema četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme su prikazani u Tabeli 13. Ispitanici četiri fenotipa se nisu značajno razlikovali ni prema jednom od ispitivanih biohemijskih parametara.

Tabela 13. Laboratorijski parametri ispitanika prema četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme

Parametar	Inflamatorni fenotip				p*
	EA n=25	NA n=12	MGA n=24	PGA n=19	
Sedimentacija (mm/h), med (min-max)	12.0 (9.0-22.0)	11.0 (8.0-28.0)	13.0 (10.0-19.0)	12.0 (8.0-16.0)	0.967¥
C-reaktivni protein (mg/L) med (min-max)	1.9 (1.4-3.6)	1.0 (1.0-1.9)	1.5 (1.0-4.1)	1.2 (1.0-2.9)	0.070¥
Broj eritrocita (*10 ¹² /L), $\bar{x} \pm sd$	4.9±0.4	4.6±0.4	4.8±0.4	4.7±0.4	0.341£
Hgb(g/L), $\bar{x} \pm sd$	134.2±26.9	135.7±16.0	140.8±14.4	136.2±12.4	0.666£

MCV, $\bar{x} \pm sd$	87.9±5.9	89.2±4.3	89.6±3.1	89.7±4.4	0.538€
Broj leukocita (*10 ⁹ /L), med (min-max)	6.5 (6.0-7.8)	6.4 (5.1-7.2)	5.7 (5.3-6.8)	6.3 (5.6-7.2)	0.315¥
Broj neutrofila (*10 ⁹ /L), med (min-max)	3.5 (3.0-4.1)	3.3 (3.1-4.7)	2.9 (2.6-3.6)	3.3 (2.4-4.5)	0.209¥
Broj limfocita (*10 ⁹ /L), med (min-max)	2.2 (1.9-2.6)	1.7 (1.2-2.6)	2.1 (1.7-2.6)	2.1 (1.7-2.3)	0.328¥
D-dimer (mg/L) med (min-max)	0.3 (0.2-1.5)	0.3 (0.2-0.4)	0.3 (0.2-0.5)	0.4 (0.1-2.0)	0.852¥
Ukupan holesterol (mmol/L), $\bar{x} \pm sd$	5.2±1.3	5.2±1.4	5.0±1.0	5.3±1.3	0.920€
HDL (mmol/L), $\bar{x} \pm sd$	1.5±0.4	1.6±0.3	1.5±0.3	1.5±0.4	0.808€
LDL (mmol/L), $\bar{x} \pm sd$	3.2±1.0	3.3±1.1	3.0±0.9	3.2±1.1	0.815€
Trigliceridi (mmol/L), med (min-max)	0.9 (0.6-2.9)	1.0 (0.4-1.8)	1.3 (0.4-3.2)	0.9 (0.4-1.8)	0.748¥
Serumko gvožđe (umol/L), med (min-max)	14.4 (5.1-36.5)	15.3 (2.7-26.6)	16.7 (5.4-29.6)	17.4 (5.7-28.7)	0.245¥
TIBC (umol/L), $\bar{x} \pm sd$	55.4±8.9	60.4±8.4	54.6±8.1	54.4±8.0	0.205€
Feritin (ug/L), med (min-max)	44.9 (5.7-209.8)	51.7 (2.5-263.3)	74.9 (9.0-337.9)	49.4 (6.6-263.2)	0.388¥
25 (OH)vitamin D (nmol/L), med (min-max)	51.0 (17.0-113.0)	41.5 (13.0-65.0)	49.5 (25.0-99.0)	52.0 (16.0-115.0)	0.084¥
TSH (mIU/L), med (min-max)	1.7 (0.1-4.5)	1.5 (0.6-2.9)	1.9 (0.8-12.5)	1.9 (0.4-4.9)	0.428¥
FT4 (pmol/L) $\bar{x} \pm sd$	12.5±1.2	11.9±1.3	12.0±1.7	12.7±4.3	0.724€
IgG (g/L) $\bar{x} \pm sd$	11.3±2.4	10.9±2.2	11.2±2.1	11.1±2.1	0.954€
IgA (g/L) med (min-max)	2.0 (1.0-3.0)	1.9 (1.2-3.0)	1.6 (0.7-4.8)	2.3 (0.9-1.0)	0.831¥
IgM (g/L) med (min-max)	1.1 (0.2-3.0)	1.2 (0.2-3.9)	1.0 (0.4-2.9)	1.3 (0.3-2.3)	0.587¥

* za nivo značajnosti od 0,05 prema jednofaktorskoj ANOVA-i sa Tuckey međugrupnim poređenjem ili Kruskal-Wallis testu sa Mann-Whitney testom za međugrupno poređenje

Skraćenice: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA-mešovita granulocitna astma, PGA- paucigranulocitna astma; TIBC- ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (engl. total iron binding capacity); TSH-tiroidni stimulišući hormon; FT4-slobodni tiroksin

Primenjeni modaliteti terapije u lečenju obolelih od bronhijalne astme u zavisnosti od inflamatornog fenotipa prikazani su u Tabeli 14. Modaliteti terapije su jednako često primenjivani u sva četiri inflamatorna fenotipa. Najčešće su primenjivani antihistaminici bez obzira na fenotip.

Tabela 14. Primenjena terapija kod ispitanika prema četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme

Terapija	Inflamatorni fenotip				p*
	EA n=25	NA n=12	MGA n=24	PGA n=19	
Antihistaminici	21 (84.0)	9 (75.0)	17 (70.8)	11 (57.9)	0.288
Nazalni glikokortikoidi	19 (76.0)	6 (50.0)	15 (62.5)	7 (36.8)	0.062
Alergenska imunoterapija	3 (12.0)	0 (0.0)	7 (29.2)	2 (10.5)	NA
Intranazalni glukokortikoidni	4 (16.0)	1 (8.3)	4 (16.7)	1 (5.3)	NA
LAMA	3 (12.0)	1 (8.3)	4 (16.7)	1 (5.3)	NA
Oralni glukokortikoidni	3 (12.0)	1 (8.3)	2 (8.3)	2 (10.5)	NA
Aminofilin	2 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	NA
LTRA	18 (72.0)	7 (58.3)	12 (50.0)	9 (47.4)	0.320
SABA	8 (32.0)	6 (50.0)	11 (45.8)	8 (42.1)	0.688
IKS/LABA	9 (36.0)	4 (33.3)	8 (33.3)	8 (42.1)	0.937
IKS/LABA MART	11 (44.0)	4 (33.3)	9 (37.5)	6 (31.6)	0.844
Biološka terapija	7 (28.0)	2 (16.7)	6 (25.0)	2 (10.5)	0.505
Omalizumab	6 (85.7)	1(50)	2 (33.3)	1 (50)	NA
Benralizumab	1 (41.3)	1(14.3)	4(66.7)	1 (50)	NA
Dnevne doze glikokortikoida					
Mala	6 (26.1)	2 (22.2)	6 (26.1)	4 (26.7)	NA
Srednja	12 (52.2)	6 (66.7)	14 (60.9)	5 (33.3)	
Visoka	5 (21.7)	1 (11.1)	3 (13.0)	6 (40.0)	

* za nivo značajnosti od 0,05 prema hi kvadrat testu

Skracenicne: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA-mešovita granulocitna astma, PGA- paucigranulocitna astma; IKS- inhalacioni kortikosteroidi, LABA- dugo delujući beta 2 agonisti (engl. long acting beta 2 agonist), LAMA- dugo delujući muskarinski antagonisti (engl. long acting muscarinic antagonists), LTRA-antagonisti receptora leukotrijena (engl. leukotriene receptor antagonist), SABA- krakodelujući beta 2 agonisti (engl. short acting beta 2 agonist), IKS/LABA-fiksna kombinacija inhalacionih kortikosteroida i dugodelujućih beta 2 agonista, IKS/LABA MART- niska doza IKS + formoterola prema režimu terapije održavanja i terapije za brzo olakšavanje simptoma (IKS+ formoterol prema engl. maintenance and reliever therapy-MART; NA- nije primenljivo (engl. not applicable)

Kontrola bronhijalne astme procenjena ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma u četiri inflamatorna fenotipa je prikazana na Figurama 6-9. Najveći broj obolelih od bronhijalne astme eozinofilnog inflamatornog fenotipa je bilo dobro kontrolisano prema ACT, zatim prema ACQ i najmanje prema GINA kriterijumima (32%, 24% i 16%) (Figura 6). Najveći broj loše kontrolisane forme bronhijalne astme eozinofilnog tipa je bilo prema ACQ, zatim prema ACT i GINA kriterijumima (56%, 44% i 44%) (Figura 6).

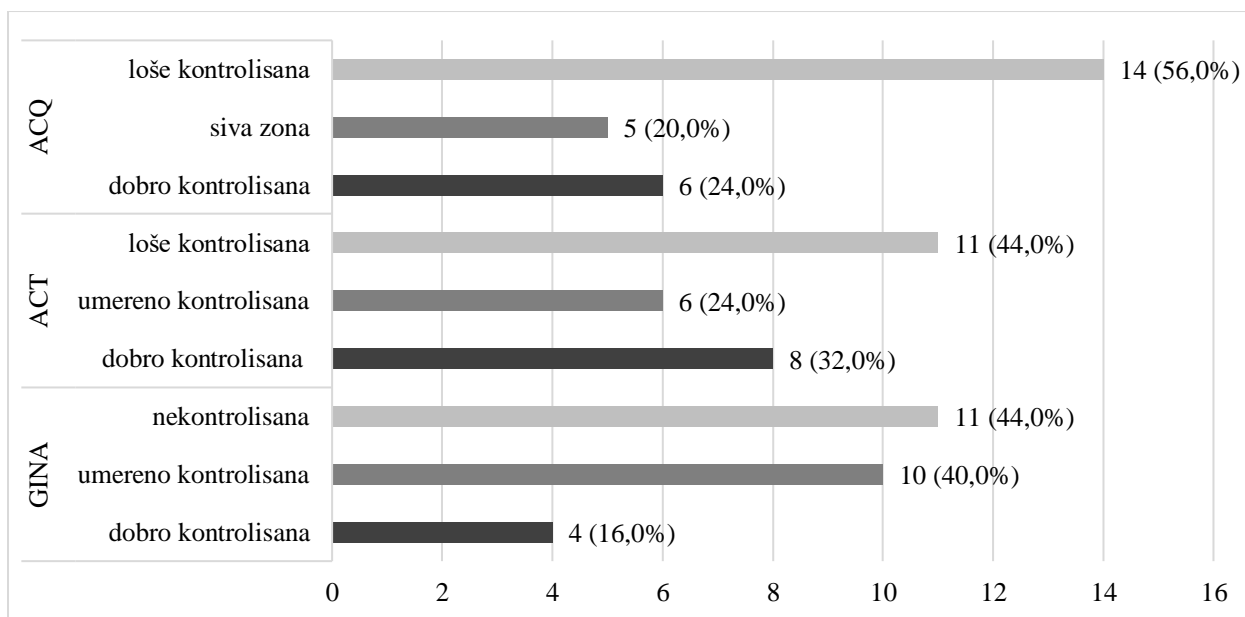


Figura 6. Procena kontrole bronhijalne astme procenjena ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma u okviru eozinofilnog inflamatornog fenotipa

Skraćenice: GINA upitnik o kontroli simptoma (engl. Global Initiative for Asthma); ACT- Test o kontroli astme (engl. Asthma control test); ACQ- Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire)

Najveći broj obolelih od bronhijalne astme neutrofilnog inflamatornog fenotipa je bilo dobro kontrolisano prema ACT, zatim prema ACQ i najmanje prema GINA kriterijumima (42%, 33% i 17%) (Figura 7). Najveći broj loše kontrolisane NA je bilo prema ACT i GINA, a zatim prema ACQ kriterijumima (50%, 50% i 33%) (Figura 7).

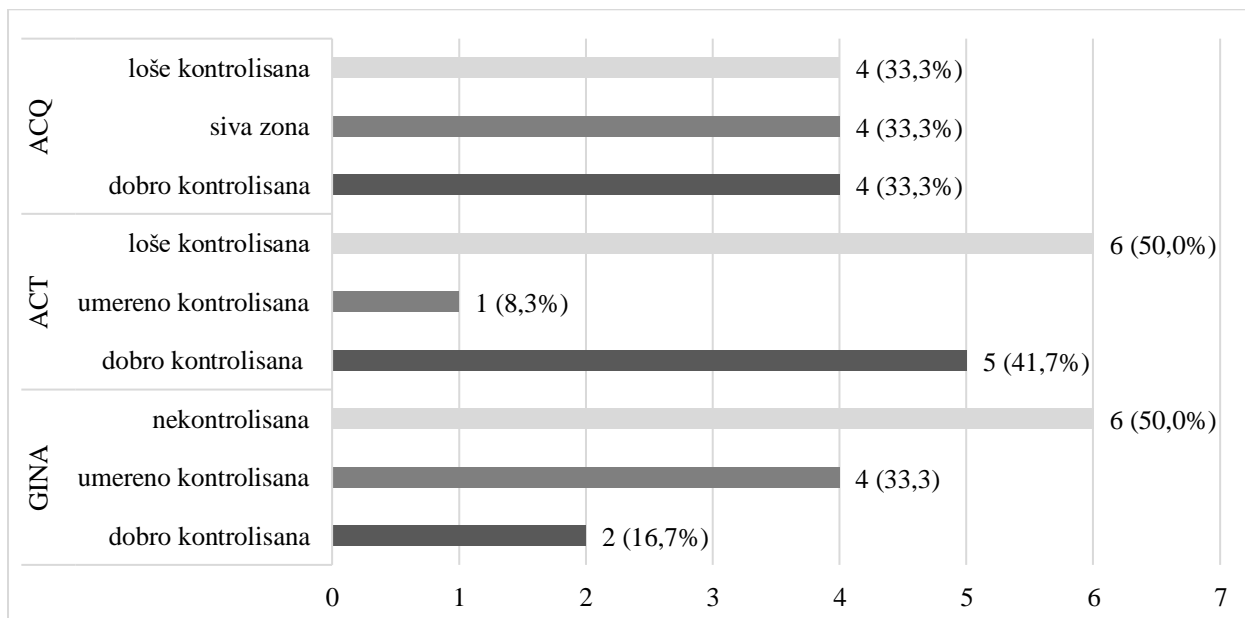


Figura 7. Procena kontrole bronhijalne astme procenjena ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma u okviru neutrofilnog inflamatornog fenotipa

Skraćenice: GINA upitnik o kontroli simptoma (engl. Global Initiative for Asthma); ACT-Test o kontroli astme (engl. Asthma control test); ACQ-Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire)

Najveći broj MGA inflamatornog fenotipa je bilo dobro kontrolisano prema ACT, zatim prema ACQ i najmanje prema GINA kriterijumima (46%, 37% i 29%) (Figura 8). Najveći broj loše kontrolisane forme bronhijalne astme eozinofilnog tipa je bilo prema ACQ, a zatim GINA i ACT kriterijumima (42%, 37% i 37%) (Figura 8).

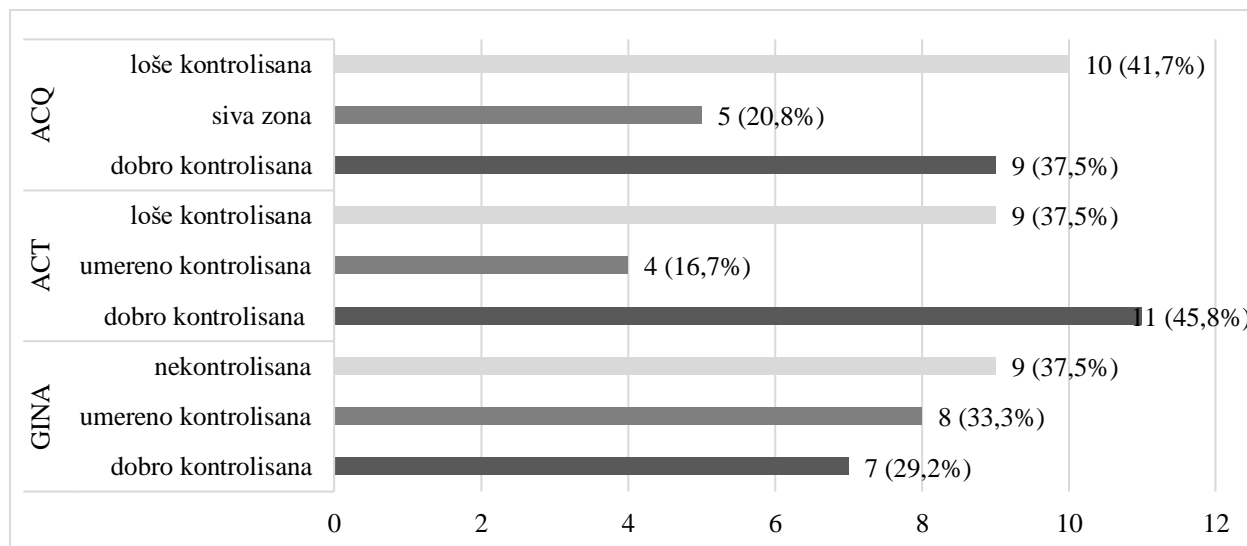


Figura 8. Procena kontrole bronhijalne astme procenjena ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma u okviru mešovitog granulocitnog inflamatornog fenotipa

Skraćenice: GINA upitnik o kontroli simptoma (engl. Global Initiative for Asthma); ACT-Test o kontroli astme (engl. Asthma control test); ACQ-Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire)

Najveći broj PGA fenotipa je bilo dobro kontrolisano prema ACT, zatim prema ACQ i GINA kriterijumima (26%, 21% i 21%) (Figura 9). Najveći broj loše kontrolisane forme bronhijalne astme eozinofilnog tipa je bilo prema ACQ, a zatim ACT i najmanje prema GINA kriterijumima (53%, 47% i 37%) (Figura 9).

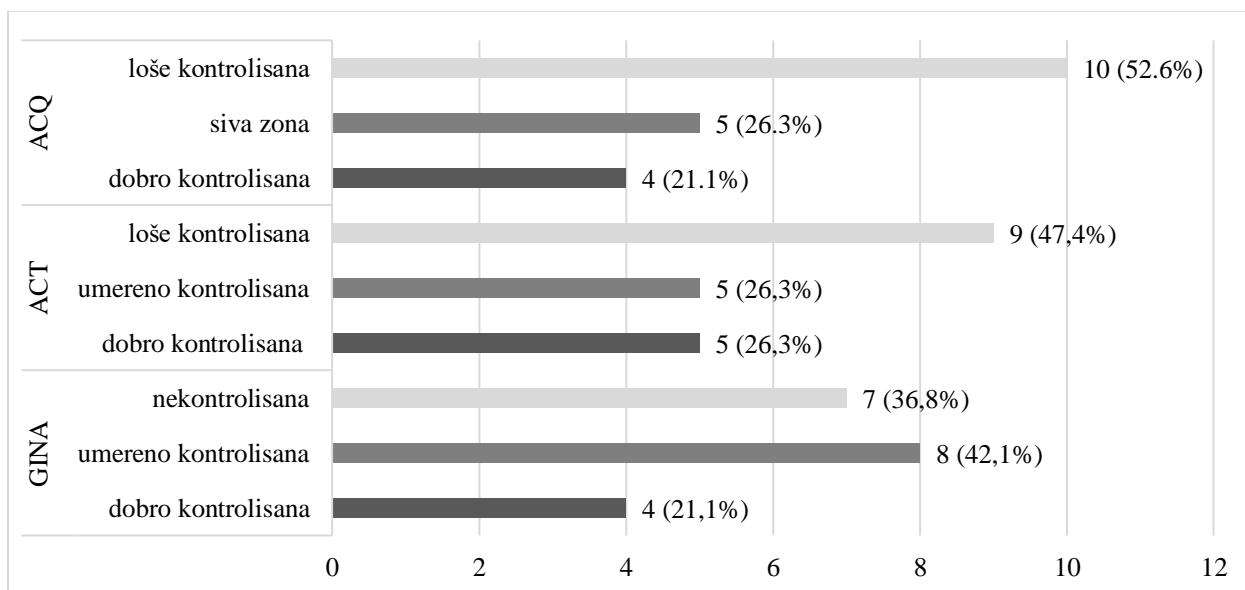


Figura 9. Procena kontrole bronhijalne astme procenjena ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma kriterijumima u okviru paucigranulocitnog inflamatornog fenotipa

Skraćenice: GINA upitnik o kontroli simptoma (engl. Global Initiative for Asthma); ACT- Test o kontroli astme (engl. Asthma control test); ACQ- Uputnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionare)

Spirometrijski parametri i parametri disfunkcije malih disajnih puteva, procenjih prema povišenoj rezistenciji malih disajnih puteva, u četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme su prikazani u Tabeli 15. Inflamatorni fenotipovi bronhijalne astme su se značajno razlikovali jedino prema MEF75 parametru koji je bio najviši u mešovitom granulocitnom fenotipu ($p=0.042$). MEF75 je bio značajno viši u MGA nego u EA i PGA inflamatornim fenotipovima ($p=0.025$ i $p=0.019$), dok se među svim ostalim fenotipovima nije razlikovao.

Tabela 15. Spirometrijski parametri i parametri disfunkcije malih disajnih puteva ispitanika prema četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme

Parametar	Inflamatorni fenotip				p*
	EA n=25	NA n=12	MGA n=24	PGA n=19	
FVC, $\bar{x} \pm sd$	107.08±14.26	104.58±11.50	105.92±14.49	111.40±14.99	0.522£
FEV1, $\bar{x} \pm sd$	90.56±17.09	91.42±14.58	95.86±11.98	91.92±14.30	0.619£
FEV1/FVC, $\bar{x} \pm sd$	69.78±64.5	71.46±9.25	74.59±10.68	69.28±6.67	0.142£
VC, $\bar{x} \pm sd$	103.53±12.48	99.25±7.36	102.71±11.34	104.43±12.51	0,658£
MEF25, med (min-max)	45.0 (30.9-55.5)	48.0 (40.5-72.22)	52.5 (36.0-63.0)	56.0 (38.0-68.0)	0.230¥
MEF50, med (min-max)	68.0 (37.4-77.0)	69.0 (53.5-69.0)	79.0 (61.0-95.0)	74.7 (53.0-82.0)	0.185¥
MEF75, med (min-max)	98.0 (55.8-109.0)	87.5 (73.5-97.7)	105.0 (81.7-111)	86.9 (71.0-99.0)	0.042¥
Povišena rezistencija malih disajnih puteva, n (%)	14 (56.0)	3 (25.0)	11 (45.8)	8 (42.1)	0.357§

* za nivo značajnosti od 0,05 prema jednofaktorskoj ANOVA-i sa Tuckey međugrupnim poređenjem ili Kruskal-Wallis testu sa Mann-Whitney testom za međugrupno poređenje i hi kvadrat testu

Skraćenice: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA- mešovita granulocitna astma, PGA-paucigranulocitna astma; FVC- forsirani vitalni kapacitet; FEV1/FVC- forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi; forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi/forsirani vitalni kapacitet; VC- vitalni kapacitet; MEF25-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 25%VC; MEF50-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 50%VC; MEF75-srednji ekspirijumski protok vazduha 75% VC

Ispitivani biomarkeri u zavisnosti od inflamatornog fenotipa bronhijalne astme su prikazani u Tabeli 16. Četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme su se značajno razlikovala prema broju eozinofila u krvi od svih evaluiranih biomarkera ($p=0.002$). Broj eozinofila je bio najviši u eozinofilnom fenotipu, značajno viši nego u neutrofilnom ($p=0.001$), mešovitom granulocitnom ($p=0.002$) i paugranulocitnom ($p=0.042$) fenotipu, dok se ovaj parametar nije razlikovao između neutrofilnog i mešovitog granulocitnog ili paugranulocitnog ($p=0.376$ i $p=0.114$), niti između mešovitog i paugranulocitnog ($p=0.402$) (Figura 10).

Tabela 16. Biomarkeri ispitanika prema četiri inflamatorna fenotipa bronhijalne astme

Biomarker, med (min-max)	Inflamatorni fenotip				p*
	EA	NA	MGA	PGA	
Broj eozinofila(*10 ⁹ /L)	0.4 (0.2-0.6)	0.1 (0.02-0.2)	0.1 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.3)	0.002
IgE (IU/l)	186.0 (75.5-414.5)	105.0 (63.0-274.2)	116.0 (37.2-353.2)	78.0 (18.0-270.0)	0.224
Periostin (pmol/l)	95.8 (747.3-1819.5)	661.4 (517.4-1038.8)	907.8 (699.2-1212.1)	1049.6 (858.4-1397.6)	0.116
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.3)	0.0 (0.0-1.8)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.133
IL-6 (pg/ml)	26.6 (15.0-48.0)	21.3 (11.9-31.8)	20 (8.6-37.5)	22.1 (12.0-35.0)	0.349
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-5.8)	0.5 (0.0-173.8)	0.0 (0.0-7.4)	0.0 (0.0-15.9)	0.200
IL-17A (pg/ml)	28.6 (4.9-145.7)	31.9 (6.6-250.8)	16.8 (0.5-78.9)	22.9 (8.7-138.1)	0.703
IL-33 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.3)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.2)	0.0 (0.0-0.0)	0.115

* za nivo značajnosti od 0,05 prema Kruskal-Wallis testu sa Mann-Whitney testom za međugrupno poređenje

Skraćenice: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA-mešovita granulocitna astma, PGA-paucigranulocitna astma

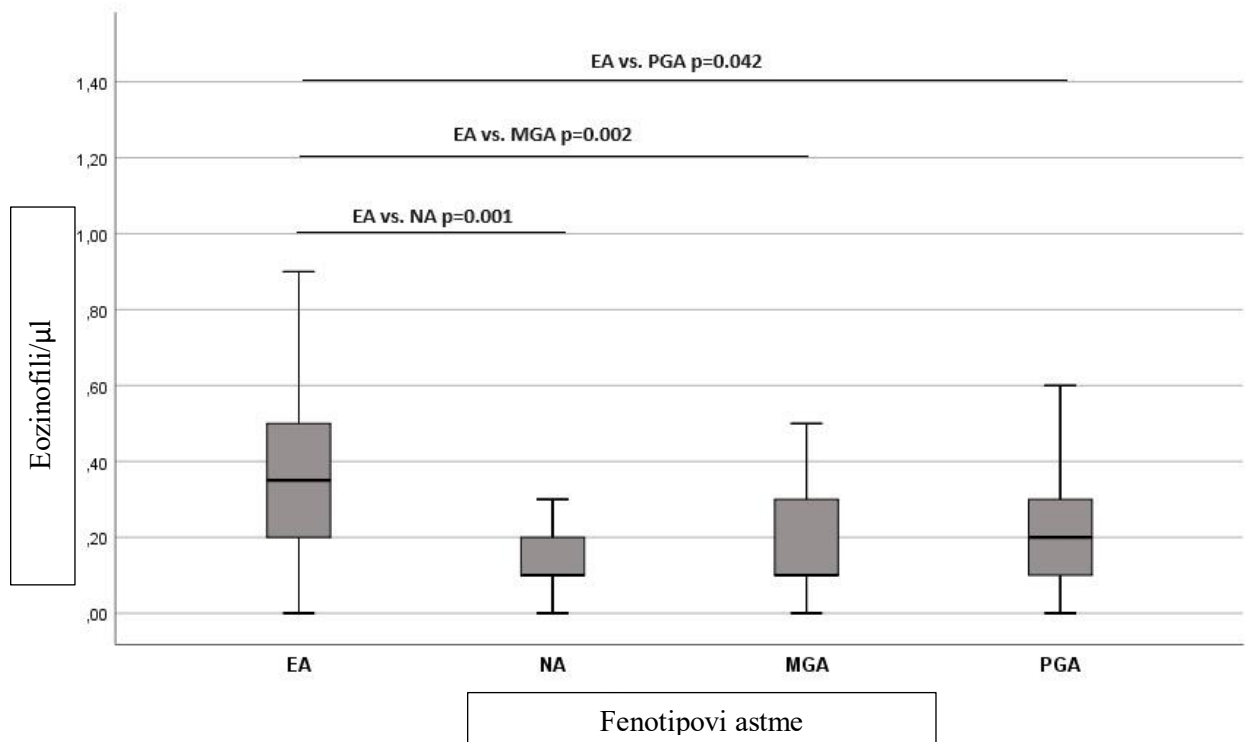


Figura 10. Broj eozinofila u inflamatornim fenotipovima

Skraćenice: EA- eozinofilna astma; NA- neutrofilna astma, MGA- mešovita granulocitna astma, PGA- paucigranulocitna astma

Imajući u vidu da je broj eozinofila bio najveći u EA, analizirali smo “cut off” vrednost eozinofila koja koreliše sa EA, preko ROC analize i utvrdili da vrednosti eozinofila u krvi od $\geq 240/\mu\text{L}$, sa 64% senzitivnosti i 72.7% specifičnosti (area under ROC curve=74.3, $p=0.001$) razlikuje pacijente sa EA (Figura 11).

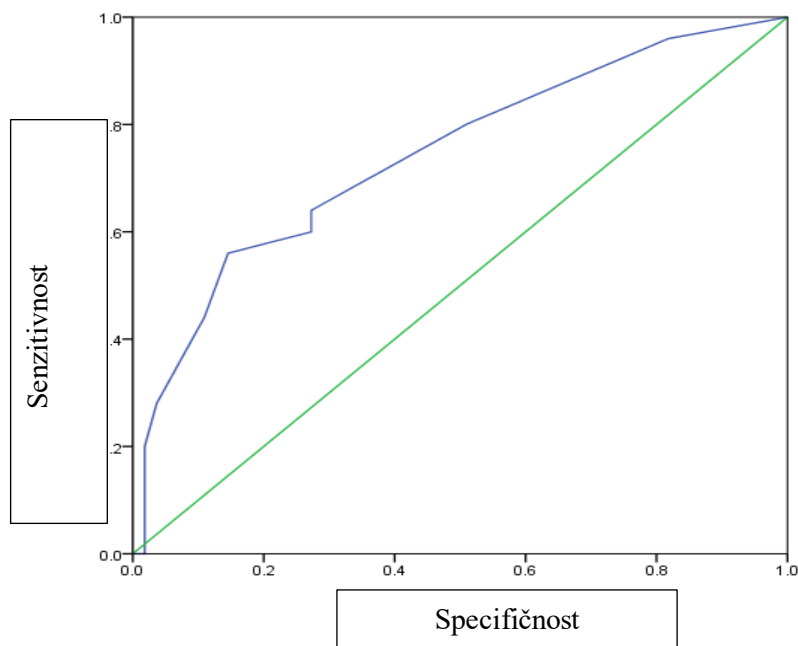


Figura 11: ROC kriva eozinofila kao dijagnostičkog markera za eozinofilni fenotip

FeNO, kao neinvazivni biomarker inflamacije disajnih puteva kod obolelih od bronhijalne astme prema četiri inflamatorna fenotipa je prikazan na Figuri 12. Utvrđeno je da se inflamatorni fenotipovi nisu značajno razlikovali prema vrednosti FeNO ($p=0.349$).

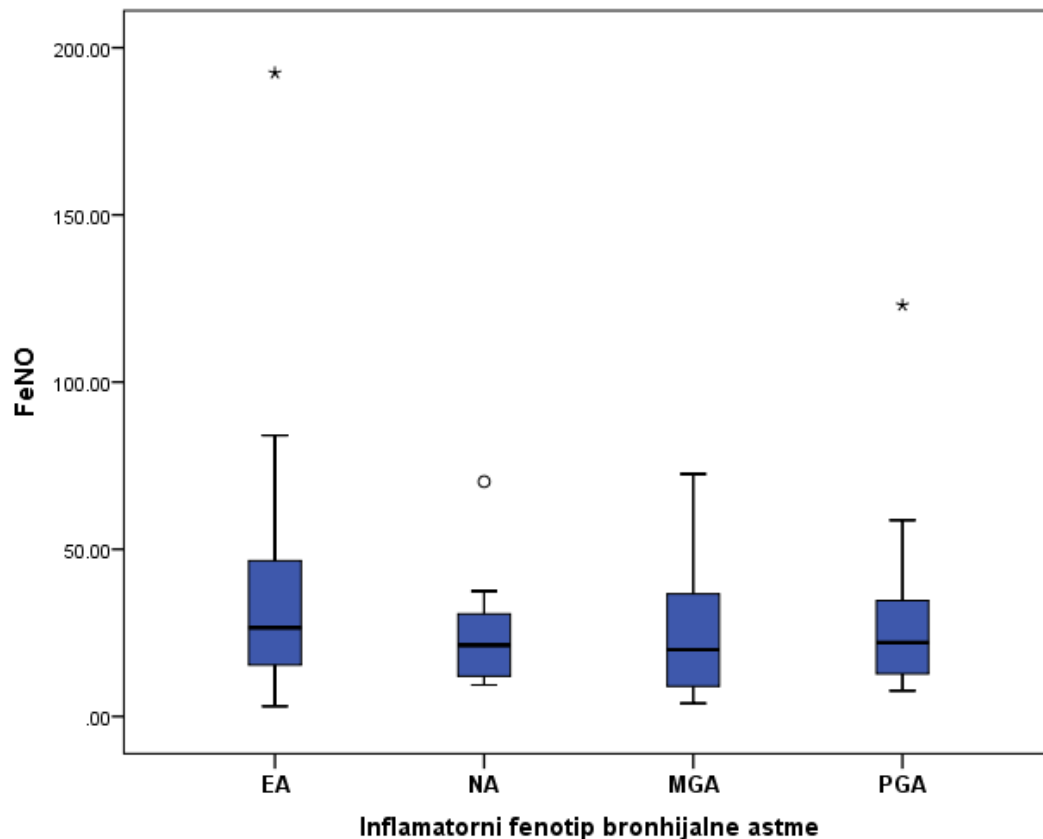


Figura 12. FeNO u inflamatornim fenotipovima bronhijalne astme

Skraćenica: FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida

Ispitivane su karakteristike koje bi mogle da razlikuju inflamatorne fenotipove jedan od drugog (EA, NA, MGA i PGA) univarijantnom, a zatim, tamo gde je bilo moguće i multivarijantnim logističkim regresionim modelovanjem.

Osobine koje su bile povezane sa eozinofilnim fenotipom bronhijalne astme su bile veći broj egzacerbacija u poslednjih godinu dana, dim kao okidač pogoršanja, primena nazalnih glikokortikoida, niže vrednosti MEF25 i MEF50, kao i više vrednosti CRP i periostina. Karakteristike koje su bile nezavisno povezane sa prisustvom eozinofilnog inflamatornog fenotipa bronhijalne astme su bili dim kao okidač pogoršanja (OR=5.966, 95%CI OR=1.53-23.30, $p=0.010$), niže vrednosti MEF25 (OR=0.964, 95%CI OR=0.94-0.99, $p=0.019$) i viši CRP (OR=1.246, 95%CI OR=1.01-1.54, $p=0.043$) (Tabela 17).

Tabela 17. Karakteristike koje izdvajaju eozinofilni inflamatorni fenotip astme od ostalih fenotipova

Karakteristika	Univarijantna logistička regresija			Multivarijantna logistička regresija		
	OR	95%CI OR	p*	OR	95%CI OR	p*
Broj egzacerbacija u poslednjih godinu dana	1.235	1.01-1.52	0.044			
Dim	3.857	1.24-12.04	0.020	5.966	1.53-23.30	0.010
Nazalni glikokortikoidi	3.054	1.06-8.81	0.039			
MEF25	0.970	0.94-0.99	0.033	0.964	0.94-0.99	0.019
MEF50	0.976	0.95-0.99	0.030			
CRP	1.198	1.01-1.43	0.049	1.246	1.01-1.54	0.043
Periostin	1.001	1.00-1.01	0.050	1.001	1.00-1.01	0.057

* za nivo značajnosti od 0.05, multivarijantni regresioni model po tipu Backward Wald (step 4)

Skraćenice: MEF25-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 25% VC; MEF50-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 50%VC; CRP- C reaktivni protein

Karakteristike koje bi mogle da izdvoje neutrofilni inflamatorni fenotip bronhijalne astme su bile niži broj eozinofila i viši nivo IL-8 u krvi, s tim što je samo viši IL-8 nezavisno povezana sa prisustvom ovog fenotipa bronhijalne astme (OR=1.009, 95%CI OR=1.01-1.02, p=0.025) (Tabela 18).

Tabela 18. Karakteristike koje izdvajaju neutrofilni inflamatorni fenotip astme od ostalih fenotipova

Karakteristika	Univarijantna logistička regresija			Multivarijantna logistička regresija		
	OR	95%CI OR	p*	OR	95%CI OR	p*
Eozinofili	0.006	0.00-0.77	0.039	0.008	0.00-1.30	0.063
IL-8	1.010	1.01-1.02	0.009	1.009	1.00-1.02	0.025
IgE	0.958	0.92-0.99	0.026			

* za nivo značajnosti od 0.05, multivarijantni regresioni model po tipu Backward Wald (step 2)

Karakteristike koje bi mogle da izdvoje MGA od ostalih fenotipova su prisustvo alergijskog rinitisa u porodici, fizički napor kao okidač pogoršanja, alergenska imunoterapija, viši FEV1/FVC, MEF50 i MEF75, dok je jedina karakteristika nezavisno povezana sa prisustvom mešovitog granulocitnog fenotipa bila viša vrednost MEF50 (OR=1.030, 95%CI OR=1.01-1.06, p=0.023) (Tabela 19).

Tabela 19. Karakteristike koje izdvajaju mešoviti granulocitni inflamatorni fenotip astme od ostalih fenotipova

Karakteristika	Univarijantna logistička regresija			Multivarijantna logistička regresija		
	OR	95%CI OR	p*	OR	95%CI OR	p*
Alergijski rinitis u porodici	2.870	1.05-7.8	0.039			
Fizički napor	7.105	1.27-39.72	0.026	5.011	0.80-31.38	0.085
Alergenska imunoterapija	4.200	1.18-15.00	0.027	3.812	0.96-15.13	0.057
FEV1/FVC	1.072	1.01-1.14	0.036			
MEF50	1.027	1.01-1.05	0.021	1.030	1.01-1.06	0.023
MEF75	1.032	1.01-1.06	0.023			

* za nivo značajnosti od 0.05, multivarijantni regresioni model po tipu Backward Wald (step 4)

Skraćenice: FEV1-forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi; FEV1/FVC-forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi/forsirani vitalni kapacitet MEF50-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 50% VC; MEF75-srednji ekspirijumski protok vazduha pri 75%VC

Jedina osobina koja je bila potencijalno povezana sa paugranulocitnim inflamatornim fenotipom bronhijalne astme je bilo prisustvo alergijskog rinitisa u porodici (Tabela 20).

Tabela 20. Karakteristike koje izdvajaju paucigranulocitni inflamatorni fenotip astme od ostalih fenotipova

Karakteristika	Univarijantna logistička regresija			Multivarijantna logistička regresija		
	OR	95%CI OR	p*	OR	95%CI OR	p*
Alergijski rinitis u porodici	2.870	1.05-7.8	0.039			

* za nivo značajnosti od 0.05

4.5. Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima i inflamatornim fenotipovima astme

Ispitivana je povezanost stepena kontrole bronhijalne astme prema ACT, ACQ i GINA upitniku o kontroli simptoma sa biomarkerima unutar četiri definisana inflamatorna fenotipa

4.5.1. Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima kod pacijenata sa eozinofilnim inflamatornim fenotipom

U Tabelama 21, 22 i 23 su prikazani rezultati poređenja biomarkera pacijenata sa eozinofilnim inflamatornim fenotipom bronhijalne astme prema stepenu kontrole bolesti na osnovu ACT, ACQ i GINA upitnika o kontroli simptoma. Utvrđeno je da se ovi pacijenti nisu razlikovali ni po jednom od evaluiranih biomarkera prema stepenu kontrole bolesti tj. bez obzira na stepen kontrole bolesti procenjenom ovim upitnicima, prosečne vrednosti svih ispitivanih biomarkera (broj eozinofila, IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL6, IL-8, IL-17A i IL-33) su bile jednake.

Tabela 21. Povezanost stepena kontrole astme prema ACT sa biomarkerima kod pacijenata sa eozinofilnim inflamatornim fenotipom

Biomarker med (min-max)	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACT			p*
	Loša kontrola n=11	Nije dobra kontrola n=6	Dobra kontrola n=8	
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.4 (0.1-0.7)	0.2 (0.1-0.6)	0.5 (0.0-1.1)	0.408
IgE (IU/ml)	166 (55-595)	185 (36-365)	322.5 (26-734)	0.865
FeNO (ppb)	28.8 (9.3-192.4)	16.0 (10-81)	35.8 (3.1-84.1)	0.590
Periostin (pmol/l)	1330.1 (505.5-2651.9)	720.3 (445.3-1216.3)	1061.1 (713.3-2445.4)	0.162
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-1.1)	0.0 (0.0-0.0)	0.2 (0.0-91.2)	0.151
IL-6 (pg/ml)	2.6 (1.5-6.3)	3.0 (1.6-3.2)	2.2 (1.5-4.1)	0.643
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-132.2)	5.0 (0.0-23.5)	0.0 (0.0-210.9)	0.233
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-3.3)	0.3 (0.0-1.8)	0.0 (0.0-0.3)	0.214
IL-33 (pg/ml)	51.7 (0.0-1006.1)	96.7 (17.9-906.7)	9.2 (1.8-838.6)	0.162

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice: ACT-test kontrola astme (engl. Asthma control test); FeNO- frakcija izdahnutog azot monoksida

Tabela 22. Povezanost stepena kontrole astme prema ACQ sa biomarkerima kod pacijenata sa eozinofilnim inflamatornim fenotipom

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACQ			p*
	Loše kontrolisana n=6	Siva zona n=5	Dobro kontrolisana n=14	
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.3 (0.1-0.7)	0.5 (0.2-0.9)	0.3 (0.0-1.1)	0.488
IgE (IU/ml)	178.5 (36-595)	186 (75-734)	260 (26-654)	0.717
FeNO (ppb)	27.7 (9.3-192.4)	25 (10-46.5)	36.7 (3.1-84.1)	0.931
Periostin (pmol/l)	840.2 (445.3-2314.4)	2001.6 (792.2-2651.89)	1061.1 (713.3-2424.4)	0.128
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-1.1)	0.0 (0.0-0.5)	0.2 (0.0-91.2)	0.459
IL-6 (pg/ml)	2.4 (1.5-6.3)	3.4 (1.5-5.0)	2.2 (1.5-3.5)	0.347
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-132.2)	0.0 (0.0-110.4)	0.0 (0.0-210.9)	0.886
IL-17A (pg/ml)	0.1 (0.0-3.3)	0.0 (0.0-0.3)	0.0 (0.0-0.3)	0.286
IL-33 (pg/ml)	79.0 (0.0-906.7)	28.6 (0.0-1006.1)	9.2 (1.8-838.6)	0.388

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice: ACQ-Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire); FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida

Tabela 23. Povezanost stepena kontrole astme prema GINA upitiku o kontroli simptoma sa biomarkerima kod pacijenata sa eozinofilnim inflamatornim fenotipom

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema GINA			p*
	Nekontrolisana n=4	Delimično kontrolisana n=10	Dobro kontrolisana n=11	
Broj eozinofila, (*10 ⁹ /L)	0.6 (0.1-0.9)	0.2 (0.0-1.1)	0.4 (0.1-0.7)	0.617
IgE (IU/ml)	491.5 (61-734)	169 (26-504)	198 (75-654)	0.137
FeNO (ppb)	52.3 (3.1-84.1)	20.4 (9.3-49.4)	35.4 (13.4-192.4)	0.131
Periostin (pmol/l)	1697.3 (713.3-2445.4)	900.2 (505.5-2001.6)	881.7 (445.3-2651.9)	0.465
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.3)	0.0 (0.0-91.2)	0.0 (0.0-1.1)	0.901
IL-6 (pg/ml)	3.0 (1.5-4.1)	3.2 (1.5-6.3)	2.0 (1.5-5.0)	0.512
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-23.5)	0.0 (0.0-210.9)	0.353
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-0.3)	0.0 (0.0-1.8)	0.0 (0.0-3.3)	0.644
IL-33 (pg/ml)	9.6 (3.1-838.6)	44.3 (1.8-1006.1)	18.4 (0.0-794.9)	0.411

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice: GINA-Globalna inicijativa za astmu (engl. Global Asthma Initiative); FeNO- frakcija izdahnutog azot monoksida

4.5.2. Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima kod pacijenata sa neutrofilnim inflamatornim fenotipom

U Tabelama 24, 25 i 26 su prikazani rezultati poređenja nivoa biomarkera pacijenata sa neutrofilnim inflamatornim fenotipom bronhijalne astme prema stepenu kontrole bolesti na osnovu ACT, ACQ i GINA upitnika o kontroli simptoma. Pacijenti se nisu razlikovali u ispitivanim biomarkerima (broj eozinofila, IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A i IL-33), prema kontroli bolesti procenjenoj navedenim upitnicima.

Tabela 24. Povezanost stepena kontrole astme prema ACT sa biomarkerima kod pacijenata sa neutrofilnim inflamatornim fenotipom

Biomarker med (min-max)	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACT			p*
	Loša kontrola n=6	Nije dobra kontrola n=1	Dobra kontrola n=5	
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.1 (0.0-0.3)	/	0.2 (0.0-0.2)	0.828
IgE (IU/ml)	156 (61-730)	/	96 (60-492)	0.266
FeNO (ppb)	18.0 (9.4-37.5)	/	19.0 (11.3-70.2)	0.741
Periostin (pmol/l)	587.8 (404.1-1458.2)	/	790.3 (515.3-1243.5)	0.565
IL-5 (pg/ml)	0.2 (0.0-2.3)	/	0.0 (0.0-7.8)	0.631
IL-6 (pg/ml)	2.5 (1.7-3.1)	/	2.8 (1.4- 5.1)	0.474
IL-8 (pg/ml)	8.3 (0.0-177.5)	/	0.0 (0.0-304.1)	0.122
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-2.0)	/	0.0 (0.0-2.9)	0.873
IL-33 (pg/ml)	66.0 (11.8-752.3)	/	5.0 (0.0-305.6)	0.113

*za nivo značajnosti od 0.05 prema Mann-Whitney testu za lošu i dobru kontrolu jer jedna od grupa ima n=1
Skracenicice: ACT-test kontrola astme (engl. Asthma control test); FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida

Tabela 25. Povezanost stepena kontrole astme prema ACQ sa biomarkerima kod pacijenata sa neutrofilnim inflamatornim fenotipom

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACQ			p*
	Loše kontrolisana n=4	Siva zona n=4	Dobro kontrolisana n=4	
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.1 (0.0-0.3)	0.1 (0.0-0.2)	0.1 (0.0-0.2)	0.798
IgE (IU/ml)	138 (61-730)	87 (53-221)	194 (69-492)	0.472
FeNO (ppb)	22.7 (11.7-37.5)	24.6 (9.4-28.3)	16.3 (11.3-70.2)	0.944
Periostin (pmol/l)	583.2 (404.1-1458.2)	630.9 (523.8-924.2)	933.7 (515.3-1243.5)	0.551
IL-5 (pg/ml)	0.2 (0.0-0.6)	0.0 (0.0-2.3)	1.1 (0.0-7.8)	0.708
IL-6 (pg/ml)	2.6 (2.4-3.1)	1.9 (1.7-2.5)	7.3 (1.6-14.2)	0.194
IL-8 (pg/ml)	8.3 (0.0-177.5)	81.6 (0.0-328.2)	0.0 (0.0-304.1)	0.560
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-2.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-2.9)	0.573
IL-33 (pg/ml)	45.2 (11.8-707.6)	49.0 (0.0-752.3)	11.9 (0.0-305.6)	0.585

*za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skracenicice: ACQ- Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire); FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida

Tabela 26. Povezanost stepena kontrole astme prema GINA upitniku o kontroli simptoma sa biomarkerima kod pacijenata sa neutrofilnim inflamatornim fenotipom

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema GINA upitniku o kontroli simptoma			p*
	Nekontrolisana n=2	Delimično kontrolisana n=4	Dobro kontrolisana n=6	
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.0-0.3)	0.1 (0.0-0.2)	0.702
IgE (IU/ml)	294 (96-492)	203 (60-730)	73.5 (53-221)	0.344
FeNO (ppb)	15.2 (11.3-19.0)	31.5 (23.6-70.2)	13.0 (9.4-33.0)	0.113
Periostin (pmol/l)	879.4 (515.3-1243.5)	661.4 (523.8-1077.0)	690.6 (404.1-1458.2)	0.947
IL-5 (pg/ml)	1.1 (0.0-2.2)	0.3 (0.0-7.8)	0.0 (0.0-2.3)	0.909
IL-6 (pg/ml)	13.0 (11.9-14.2)	2.3 (1.7-2.8)	2.4 (1.6-3.1)	0.097

IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)	81.7 (0.0-304.1)	8.2 (0.0-328.2)	0.289
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-2.9)	0.0 (0.0-2.0)	0.721
IL-33 (pg/ml)	155.3 (5.0-305.6)	32.2 (0.0-86.6)	28.4 (0.0-752.3)	0.964

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice: GINA-Globalna inicijativa za astmu (engl. Global Asthma Initiative); FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida

4.5.3. Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima kod pacijenata sa mešovitim granulocitnim inflamatornim fenotipom

U Tabelama 27, 28 i 29 su prikazani rezultati poređenja nivoa biomarkera kod pacijenata sa mešovitim granulocitnim inflamatornim fenotipom bronhijalne astme prema stepenu kontrole bolesti na osnovu ACT, ACQ i GINA upitnika o kontroli simptoma. Nije bilo razlike ni po jednom od evaluiranih biomarkera (broj eozinofila, IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17 i IL-33) prema stepenu kontrole bolesti procenjenim ovim upitnicima.

Tabela 27. Povezanost stepena kontrole astme prema ACT sa biomarkerima kod pacijenata sa mešovitim granulocitnim inflamatornim fenotipom

Biomarker med (min-max)	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACT			p*
	Loša kontrola n=9	Nije dobra kontrola n=4	Dobra kontrola n=11	
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.2 (0.0-0.5)	0.2 (0.0-0.5)	0.1 (0.0-0.5)	0.683
IgE (IU/ml)	149 (10-401)	420.5 (6-832)	87 (12-965)	0.993
FeNO (ppb)	18.7 (3.9-58.4)	12.7 (6.7-22.1)	32.8 (5-72.5)	0.475
Periostin (pmol/l)	1000 (692.3-2226.7)	584.0 (493.6-905.8)	909.7 (518.0-1848.6)	0.055
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-2.5)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-8.7)	0.617
IL-6 (pg/ml)	2.7 (1.5-4.3)	2.7 (2.1-3.6)	3.2 (1.5-10.0)	0.431
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-12.3)	0.0 (0.0-137.3)	0.0 (0.0-73.8)	0.813
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-2.7)	0.0 (0.0-0.9)	0.0 (0.0-1.2)	0.691
IL-33 (pg/ml)	14.4 (0.0-290.2)	51.4 (0.0-123.1)	4.4 (0.0-602.0)	0.669

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice: ACT-test kontrola astme (engl. Asthma control test); FeNO- frakcija izdahnutog azot monoksida

Tabela 28. Povezanost stepena kontrole astme prema ACQ sa biomarkerima kod pacijenata sa mešovitim granulocitnim inflamatornim fenotipom

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACQ			p*
	Loše kontrolisana n=9	Siva zona n=5	Dobro kontrolisana n=10	
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.2 (0.0-0.5)	0.1 (0.0-0.5)	0.1 (0.0-0.5)	0.402
IgE (IU/ml)	152.5 (6-831)	75 (10-832)	87 (12-965)	0.703
FeNO (ppb)	17.9 (3.9-58.4)	13.5 (6.7-72.5)	32.8 (5-68)	0.773
Periostin (pmol/l)	952.9 (534.2-2226.7)	642.6 (493.6-1848.6)	909.7 (518.0-1794.0)	0.574
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-2.5)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-8.7)	0.545
IL-6 (pg/ml)	2.4 (1.5-4.3)	3.2 (2.1-3.6)	2.9 (1.5-10.0)	0.484
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-137.3)	0.0 (0.0-12.1)	0.0 (0.0-73.8)	0.842
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-1.7)	0.0 (0.0-2.7)	0.0 (0.0-1.2)	0.587

IL-33(pg/ml)	10.3 (0.0-290.2)	24.2 (0.0-78.6)	4.4 (0.2-602.0)	0.570
--------------	------------------	-----------------	-----------------	-------

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice:ACQ- Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire); FeNO- frakcija izdahnutog azot monoksida

Tabela 29. Povezanost stepena kontrole astme prema GINA upitniku o kontroli simptoma sa biomarkerima kod pacijenata sa mešovitim inflamatornim fenotipom

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema GINA upitniku o kontroli simptoma			p*
	Nekontrolisana n=7	Delimično kontrolisana n=8	Dobro kontrolisana n=9	
Broj eozinofila, (*10 ⁹ /L)	0.1 (0.0-0.5)	0.2 (0.0-0.5)	0.1 (0.0-0.5)	0.571
IgE (IU/ml)	137 (53-965)	81.5 (10-832)	112 (6-401)	0.424
FeNO (ppb)	33.2 (5.0-72.5)	12.7 (6.3-35.0)	22.1 (3.9-58.4)	0.338
Periostin (mmol/l)	909.7 (518.0-1848.6)	828.8 (493.6-2226.7)	967.1 (534.2-1334.9)	0.954
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-8.7)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-2.5)	0.304
IL-6 (pg/ml)	3.2 (1.5-6.7)	2.6 (2.1-10.0)	2.7 (1.5-4.3)	0.424
IL-8 (pg/ml)	3.3 (0.0-73.8)	0.0 (0.0-137.3)	0.0 (0.0-12.3)	0.229
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-1.2)	0.0 (0.0-0.9)	0.0 (0.0-2.7)	0.572
IL-33 (pg/ml)	4.4 (0.0-602.0)	51.4 (0.0-284.3)	14.4 (0.0-290.2)	0.634

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice:GINA-Globalna inicijativa za astmu (engl. Global Asthma Initiative);FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida

4.5.4. Povezanost stepena kontrole astme sa biomarkerima kod pacijenata sa paugranulocitnim inflamatornim fenotipom

Ispitivana je povezanost stepena kontrola bolesti prema ACT, ACQ i GINA upitniku o kontroli simptoma sa biomarkerima (broj eozinofila, IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A i IL-33) kod pacijenata sa paucigranulocitnim fenotipom. Pacijenti se nisu razlikovali ni po jednom od ispitivanih biomarkera prema stepenu kontrole bolesti procenjenoj ovim upitnicima, što je prikazano u tabelama 30, 31 i 32.

Tabela 30. Povezanost stepena kontrole astme prema ACT sa biomarkerima kod pacijenata sa paugranulocitnim inflamatornim fenotipom

Biomarker med (min-max)	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACT			p*
	Loša kontrola n=9	Nije dobra kontrola n=5	Dobra kontrola n=5	
Broj eozinofila (*10 ⁹ /L)	0.3 (0.0-0.6)	0.1 (0.0-3.9)	0.2 (0.1-0.5)	0.752
IgE (IU/ml)	60 (13-681)	78 (8-850)	123 (4.7-505)	0.851
FeNO (ppb)	17.6 (8.2-34.4)	35 (7.7-123.0)	22.1 (11.2-37.8)	0.230
Periostin (pmol/l)	858.4 (241.8-1419.2)	1049.6 (995.5-2018.0)	1100.5 (912.8-1573.9)	0.381
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.5)	0.0 (0.0-13.9)	0.0 (0.0-0.0)	0.550
IL-6 (pg/ml)	3.1 (1.0-8.0)	2.8 (2.1-4.6)	2.4 (1.5-5.5)	0.952

IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-212.7)	0.0 (0.0-23.9)	0.0 (0.0-0.0)	0.183
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-8.7)	0.0 (0.0-0.0)	0.247
IL-33 (pg/ml)	22.9 (0.0-672.5)	16.4 (0.0-138.1)	251.7 (0.0-802.2)	0.677

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice: ACT-test kontrola astme (engl. Asthma control test); FeNO- frakcija izdahnutog azot monoksida

Tabela 31. Povezanost stepena kontrole astme prema ACQ sa biomarkerima kod pacijenata sa paugranulocitnim inflamatornim fenotipom

Karakteristika	Nivo kontrole bronhijalne astme prema ACQ			p*
	Loše kontrolisana n=4	Siva zona n=5	Dobro kontrolisana n=10	
Broj eozinofila, (*10 ⁹ /L)	0.2 (0.0-3.9)	0.2 (0.0-0.2)	0.3 (0.1-0.6)	0.263
IgE (IU/ml)	95.5 (13-850)	78 (8-505)	43.5 (4.7-123)	0.436
FeNO (ppb)	20.7 (7.7-123.0)	22.1 (11.2-58.7)	28.6 (15.3-37.8)	0.654
Periostin (pmol/l)	1020.2 (241.8-2018.0)	1149.3 (924.5-1573.9)	1006.7 (814.3-1515.3)	0.533
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-13.9)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.222
IL-6 (pg/ml)	2.9 (1.5-8.0)	2.4 (2.1-4.6)	2.3 (1.0-5.5)	0.787
IL-8 (pg/ml)	7.9 (0.0-212.7)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.060
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-8.7)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.638
IL-33 (pg/ml)	19.6 (0.0-672.5)	117.2 (0.0-251.7)	307.0 (0.0-802.2)	0.958

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice: ACQ-Upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire); FeNO- frakcija izdahnutog azot monoksida

Tabela 32. Povezanost stepena kontrole astme prema GINA upitniku o kontroli simptoma sa biomarkerima kod pacijenata sa paugranulocitnim inflamatornim fenotipom

Karakteristika	Nivo kontrole astme prema GINA upitniku o kontroli simptoma			p*
	Nekontrolisana n=4	Delimično kontrolisana n=8	Dobro kontrolisana n=7	
Broj eozinofila, (*10 ⁹ /L)	0.1 (0.1-0.2)	0.2 (0.0-3.9)	0.2 (0.0-0.4)	0.399
IgE (IU/ml)	54 (4.7-505)	101.5 (8-850)	60 (13-681)	0.666
FeNO (ppb)	29.2 (15.3- 125)	24.9 (7.7-58.7)	17.6 (8.2-34.4)	0.361
Periostin (pmol/l)	1337.2 (912.8-2018.0)	1020.2 (814.3-1515.3)	1177.4 (241.8-1419.2)	0.375
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-13.9)	0.0 (0.0-0.5)	0.0 (0.0-0.0)	0.296
IL-6 (pg/ml)	2.1 (1.5-5.5)	2.6 (1.0-4.6)	3.2 (1.6-8.0)	0.387
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-129.0)	0.0 (0.0-212.7)	0.0 (0.0-0.0)	0.328
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-8.7)	0.0 (0.0-0.0)	0.503
IL-33 (pg/ml)	44.7 (0.0-614.0)	19.6 (0.0-802.2)	31.5 (0.0-672.5)	0.969

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice:GINA- Globalna inicijativa za astmu (engl. Global Asthma Initiative); FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida

4.6. Biomarkeri inflamatornih fenotipova kod pacijenta sa i bez biološke terapije

U Tabeli 33 su prikazani biomarkeri (CRP, eozinofili, periostin, IgE, FeNO, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A i IL-33) ispitanika prema 4 inflamatorna fenotipa astme koji nisu bili na biološkoj terapiji. Utvrđena je značajna razlika u broju eozinofila i IL-17A u serumu između 4 inflamatorna fenotipa ($p=0.034$; $p=0.004$). Oba ova biomarkera su bila najveća u eozinofilnom inflamatornom fenotipu. Broj eozinofila je bio značajno veći u eozinofilnom inflamatornom fenotipu u odnosu na neutrofilni, mešoviti granulocitni i paucogranulocitni fenotip ($p=0.012$, $p=0.028$, $p=0.049$). Značajno veće vrednosti IL-17A su utvrđene u eozinofilnom fenotipu u odnosu na neutrofilni i paucigranulocitni ($p=0.016$; $p=0.002$), kao i u mešovitom granulocitnom u odnosu na paucigranulocitni inflamatorni fenotip ($p=0.042$).

Tabela 33. Biomarkeri prema inflamatornim fenotipovima kod pacijenta bez biološke terapije

Biomarker, med (IQR)	EA n=18	NA n=10	MGA n=18	PGA n=17	P*
SE (mm/h)	12 (8-22.5)	9 (7.5-18.5)	13 (9.5-18)	12 (8-17)	0.825
CRP (mg/L)	1.9 (1.5-4.2)	1.1 (1.0-2.3)	1.25 (1.0-3.4)	1.2 (1.0-3.0)	0.131
Leukociti ($10^9/L$)	6.6 (5.9-8.2)	6.4 (5.1-7.0)	6.1 (5.5-8.0)	6.0 (5.5-7.5)	0.729
Neutrofili ($10^9/L$)	3.6 (2.8-4.5)	3.3 (3.0-4.6)	3.2 (2.8-4.7)	3.3 (2.6-4.0)	0.790
Limfociti ($10^9/L$)	2.2 (1.9-2.6)	1.7 (1.2-2.6)	2.2 (1.8-2.8)	2.1 (1.7-2.2)	0.157
Eozinofili($10^9/L$)	0.3 (0.2-0.6)	0.1 (0.1-0.2)	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.3)	0.034
IgE (IU/ml)	182.5 (75.7-363.5)	87.0 (60.7-288.7)	81.5 (20.2-309.5)	78.0 (18.0-205.0)	0.212
FeNO (ppb)	24.2 (14.1-39.4)	16.3 (11.6-26.3)	16.2 (7.8-32.9)	20.9 (11.6-31.6)	0.420
IL-6 (pg/ml)	2.8 (1.9-3.2)	2.4 (1.7-5.3)	2.6 (2.1-3.4)	3.1 (1.8-3.3)	0.969
Periostin (pmol/l), med	865.7 (697.6-1851.8)	661.4 (521.7-1004.1)	925.3 (713.2-1125.8)	1049.6 (836.4-1355.4)	0.256
IL-5 (pg/ml)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-1.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.081
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0-2.8)	0.2 (0.0-166.5)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-7.9)	0.271
IL-33 (pg/ml)	41.6 (10.8-315.0)	42.2 (3.7-406.1)	9.4 (0.2-89.7)	22.9 (4.3-194.9)	0.346
IL-17A (pg/ml)	0 (0.0-0.6)	0 (0.0-0.0)	0 (0.0-0.1)	0 (0.0-0.0)	0.004

* za nivo značajnosti od 0.05 prema Kruskal-Wallis testu

Skraćenice: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA- mešovita granulocitna astma, PGA- paucigranulocitna astma; SE-sedimentacija; CRP- C reaktivni protein; FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida

Ispitali smo biomarkere kod pacijenta sa biološkom (n=17) i bez biološke terapije (n=63) kod 4 inflamatorna fenotipa (Tabela 34). Ustanovljena je značajna razlika u IL-5 kod pacijenata sa EA na biološkoj i EA bez biološke terapije (p=0.043). IL-5 je bio značajno veći kod pacijenta sa EA koji su bili na biološkoj terapiji. Ustanovljeno je da je broj leukocita, neutrofila, IL-5, IL-6 i IL-8 razlikuje kod pacijenta sa mešovitim granulocitnom astmom (p=0.049, p=0.019, p=0.012, p=0.032, p=0.03). Koncentracija IL-5, IL-6 i IL-8 su bile veće kod pacijenta sa MGA na biološkoj terapiji, a broj leukocita i neutrofila je bio veći u MGA bez biološke terapija (Figura 13).

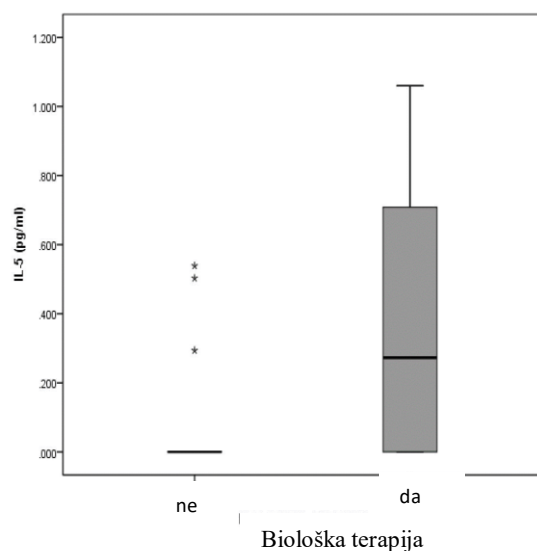
Tabela 34. Biomarkeri kod pacijenata sa i bez biološke terapije

Biomarker, med (IQR)	EA		p*	NA		p*	MGA		p*	PGA		p*
	Bio n=7	No bio n=18		Bio n=2	No bio n=10		Bio n=6	No bio n=18		Bio n=2	No bio n=17	
SE (mm/h)	12 (10-24.0)	12 (8-22.5)	0.879	Const.	9 (2-36)	NA	13.5 (8.0-24.0)	13.0 (9.5-18.0)	0.712	9.0 (6.0-9.0)	12.0 (8.0-17.0)	0.348
CRP (mg/L)	1.9 (1.0-2.5)	1.9 (1.5-4.2)	0.831	Const.	1.1 (1.0-7.1)	NA	4.6 (1.4-7.5)	1.2 (1.0-3.4)	0.062	1.1 (1.0-1.1)	1.2 (1.0-3.0)	0.584
Leukociti (10 ⁹ /L)	6.5 (6.3-7.7)	6.6 (5.9-8.2)	0.808	8.4 (5.1-8.4)	6.4 (5.1-7.0)	0.666	5.3 (4.6-5.8)	6.1 (5.5-8.0)	0.049	7.15 (7.1-7.15)	6.0 (5.5-7.5)	0.424
Neutrofilii (10 ⁹ /L)	3.1 (3.0-3.5)	3.6 (2.8-4.5)	0.524	5.6 (3.4-5.6)	3.3 (3.0-4.6)	0.194	2.6 (2.1-2.7)	3.2 (2.8-4.7)	0.019	3.5 (2.3-3.5)	3.3 (2.6-4.0)	0.894
Limfociti (10 ⁹ /L)	2.2 (1.1-2.7)	2.2 (1.9-2.6)	0.745	2.1 (1.2-2.1)	1.7 (1.2-2.6)	0.747	2.0 (1.6-2.3)	2.2 (1.8-2.8)	0.270	2.6 (1.4-2.6)	2.1 (1.7-2.2)	0.788
Eozinofili (10 ⁹ /L)	0.4 (0.2-0.9)	0.35 (0.2-0.6)	0.583	Const.	0.15 (0.0-0.3)	NA	0.05 (0.0-0.2)	0.2 (0.1-0.3)	0.068	2.0 (0.1-2.0)	0.2 (0.1-0.3)	0.543
IgE (IU/ml)	370 (38.0-654.0)	182.5 (75.7-363.5)	0.545	245 (198-292)	87 (53-730)	0.283	150.5 (108.7-524.7)	81.5 (20.2-309.5)	0.161	444.5 (39.0-444.5)	78.0 (18.0-205.0)	0.425
FeNO (ppb)	46.6 (24.1-84.1)	24.20 (14.1-39.4)	0.069	51.6 (33.0-51.6)	16.3 (11.6-26.3)	0.053	62.9 (8.7-62.9)	16.2 (7.8-16.2)	0.102	79.0 (35.0-79.0)	20.9 (11.6-31.6)	0.063
IL-6 (pg/ml)	1.7 (1.5-3.5)	2.8 (1.9-3.2)	0.190	Const.	2.45 (1.6-14.2)	NA	3.3 (3.1-4.9)	2.6 (2.1-3.4)	0.032	2.4 (2.1-2.4)	3.1 (1.8-3.3)	0.594
Periostin (pmol/l), med	1330.1 (783.1-1837.2)	865.7 (697.6-1851.8)	0.333	795.8 (514.7-795.8)	661.4 (521.7-661.4)	0.830	823.8 (611.5-1807.7)	925.3 (713.2-1125.8)	0.841	1506.8 (995.5-1506.8)	1049 (836.4-1355.4)	0.352
IL-5 (pg/ml)	0.3 (0.0-1.1)	0.0 (0.0-0.0)	0.043	4.1 (0.4-4.1)	0.0 (0.0-1.0)	0.108	0.04 (0.0-4.1)	0.0 (0.0-0.0)	0.012	6.9 (0.0-6.9)	0.0 (0.0-0.0)	0.117

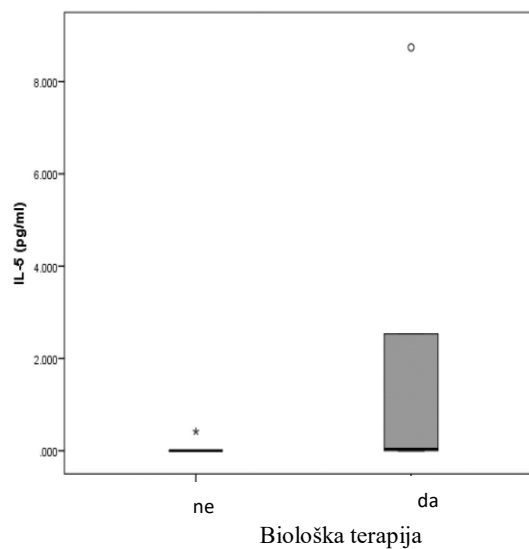
IL-8 (pg/ml)	0.0 (0.0- 13.6)	0.0 (0.0- 2.8)	0.42 2	160.1 (16.1- 160.1)	0.2 (0.0- 166.6)	0.18 1	6.1 (0.0- 33.0)	0.0 (0.0- 0.0)	0.038	11.9 (0.0- 11.9)	0.0 (0.0- 7.9)	0.54 9
IL-33 (pg/ml)	3.8 (1.8- 100.9)	41.6 (10.8- 315.0)	0.13 0	15.3 (11.8- 15.3)	45.2 (3.7- 406.1)	0.66 7	48.5 (3.0- 209.7)	9.4 (0.2- 89.7)	0.31 6	48.6 (16.4- 48.6)	22.9 (4.3- 194.9)	0.79 0
IL-17A (pg/ml)	0.0 (0.0- 0.5)	0.0 (0.0- 1.2)	0.33 9	2.45 (2- 2.9)	Const.	NA	0.0 (0.0- 1.2)	0.0 (0.0- 0.2)	0.66 1	4.3 (0.0- 8.7)	Const.	NA

*za nivo značajnosti od 0.05 prema Mann-Whitney test

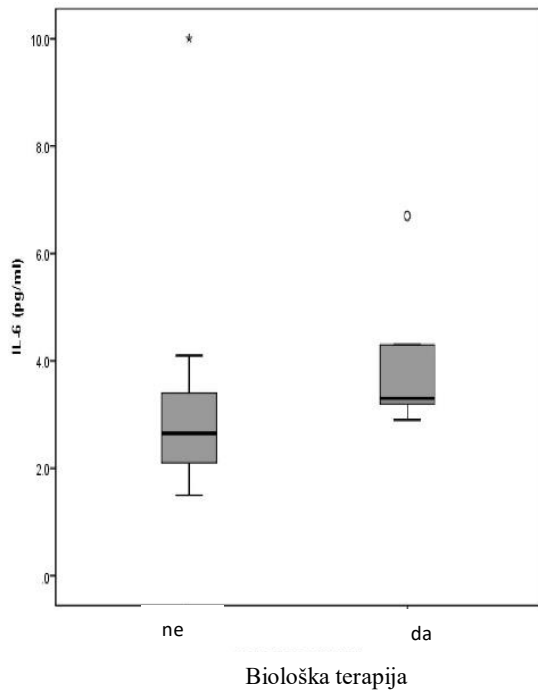
Skraćenice: EA-eozinofilna astma; NA-neutrofilna astma, MGA-mešovita granulocitna astma, PGA- paucigranulocitna astma; SE-sedimentacija; CRP- C reaktivni protein; FeNO-frakcija izdahnutog azot monoksida; Bio-biolška terapija; Const konstantna vrednost sa varijabilnost jednaka 0: NA-nije primenljivo (engl. not applicable)



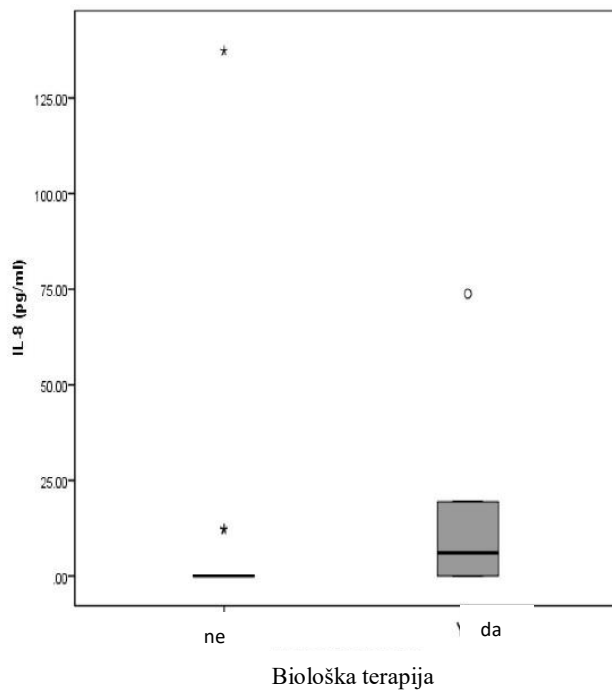
A.



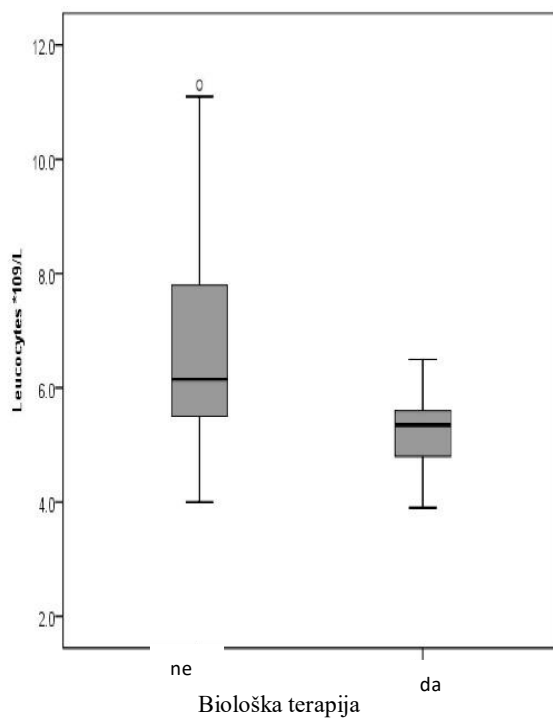
B.



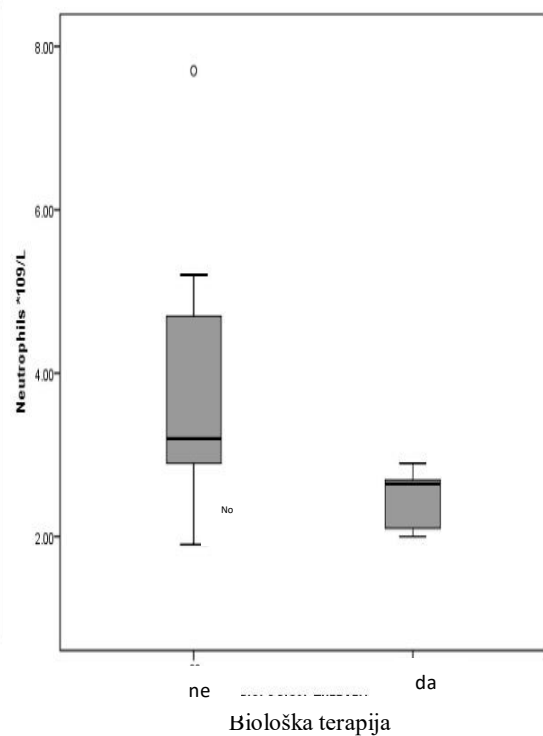
C.



D.



E.



F.

Figura 13. Biomarkeri kod pacijenata sa biološkom i bez biološke terapije prema inflamatornim fenotipovima astme (A): IL-5 u EA na biološkoj i EA bez biološke terapije; (B):IL-5 u MGA na biološkoj i MGA bez biološke terapije; (C): IL-6 u MGA na biološkoj i MGA bez biološke terapije (D): IL-8 u MGA na biološkoj i MGA bez biološke terapije (E): Leucociti u MGA na biološkoj i MGA bez biološke terapije (F): Neutrofili u MGA na biološkoj i MGA bez biološke terapije;Skraćenice: EA-eozinofilna astma; MGA- mešovita granulocitna astma

5. DISKUSIJA

Današnji koncept posmatranja astme je zasnovan na fenotipizaciji i endotipizaciji uz implementaciju principa precizne i personalizovane medicine, uz značajno mesto biomarkera kao važnog instrumenta za definisanje fenotipova i endotipova. Kompleksni i često preklapajući patofiziološki procesi koji dovode do inflamacije, glavne patološke odrednice astme, čine određivanje fenotipova zahtevnim, naročito u uslovima svakodnevnog rada. Takođe, povezanost biomarkera sa karakteristikama astme predstavlja pravi izazov, imajući u svu vidu složenost astme, ali i činjenicu koje sve kriterijume biomarkeri treba prema definiciji da ispune da bi bili validni.

Precizna identifikacija fenotipova je jedna od ključnih koraka u evaluaciji pacijenata, jer se na osnovu nje donose odluke koje se tiču odabira terapije, naročito kod pacijenata sa teškom astmom. Inflamatorni fenotipovi se mogu odrediti na različite načine, a indukovani sputum je zlatni standard. Ova metoda oslikava na adekvatan način inflamaciju u disajnim putevima i daje podatke o tipu inflamacije, ali se ne izvodi često u uslovima svakodnevne kliničke prakse. Zato su u poslednjih 10ak godina vrlo aktuelna istraživanja na polju biomarkera, koji na najbolji način oslikavaju inflamatorne fenotipove astme. Međutim, ne postoje opšte prihvaćeni i jasno definisani biomarkeri koji se dovode u vezu sa inflamatornim fenotipovima, niti saglasnost u vodičima o tačnim vrednostima biomarkera ili kombinaciji više njih u definisanju fenotipova.

U ovoj studiji preseka, analizom indukovanog sputuma je utvrđena učestalost inflamatornih fenotipova u kohorti od 80 pacijenata sa astmom. U cilju povezivanja patofizioloških procesa sa fenotipovima, analizirani su biomarkeri i njihov značaj u identifikaciji samih fenotipova. Nadalje smo evaluirali demografske, kliničke, funkcionalne karakteristike samih fenotipova, kao i njihovu povezanost sa biomarkerima i povezanost sa stepenom kontrole astme. Analizirani su diskriminatorski faktori između samih fenotipova, a zatim i razlike u biomarkerima različitih fenotipova kod pacijenta sa i bez biološke terapije.

S obzirom na širok spektar kliničkih manifestacija i značajne varijacije u kontroli pacijenata sa astmom, najpre je učinjena analiza osnovnih demografskih, kliničkih, funkcionalnih i laboratorijskih karakteristika ispitanika. Naši bolesnici su bili prosečne starosti 43.65 ± 12.72 godina, dominantno ženskog pola. Predominacija ženskog pola u astmi je u skladu sa podacima iz literature, prema kojima se dominacija ženskog pola javlja nakon 14. godine života, a definitivno u u grupi pacijenata od 23. do 64. godine života (156). Povećana prevalenca ženskog pola nad muškim počinje nakon puberteta i održava se kasnije tokom života, a može se dovesti u vezu sa promenama hormonskog statusa žena tokom puberteta, menstrualnog ciklusa, menopauze i hormonskim uticajem na patogenezu astme (157,158). Nešto više od polovine pacijenata (56.3%) su bili pušači sa srednjim trajanjem pušačkog statusa od 14 godina,

što je nešto više u odnosu na podatke iz literature, prema kojima se prevalenca pušača kreće od 10 do 40 % (59). Naši rezultati se mogu tumačiti većom prevalencom pušenja u našoj zemlji, ne tako striktnim zabranama pušenja, manjkom kampanje o štetnosti pušenja, nedovoljnog broja savetovališta koji ukazuju na loše efekte pušenja i koja pružaju pomoć u prekidanju pušenja. Pušenje ima niz negativnih uticaja u astmi, utiče na lošiju kontrolu bolesti i slabijem odgovoru na kortikosteroidnu terapiju (160, 161). Prevencija pušenja i upućivanje pacijenata u savetovališta za prekid pušenja predstavljaju bitan korak u holističkom pristupu u lečenju astme.

Više od polovine naših ispitanika je bilo prekomerno uhranjeno, što je značajno više u odnosu na literaturne podatke (162). Viši BMI je označen kao najznačajniji faktor rizika za mortalitet u velikom desetogodišnjem istraživanju sa ukupno 262 miliona asmaticara (163). Longitudinalne studije su pokazale da dobitak u telesnoj težini ima negativan efekat na smanjenje plućne funkcije, što se objašnjava samim mehaničkim efektom težine na smanjenje VC, kao i povećanim inflamatornim odgovorom adipoznog tkiva (164). Masno tkivo kod gojaznih pacijenata sa astmom sadrži više M1 makrofaga koji sekretuje proinflamatorne citokine i dovode do sistemske inflamacije (165). Ova dodatna inflamacija kod astme, na terenu već postojeće, može biti uzrok povećanih egzacerbacija. U različitim istraživanjima fenotipova astme, jasno su definisani fenotipovi astme gojaznih kao i astme sa prekomernom težinom (3, 48, 70,71,74).

Najčešće udružene bolesti kod naših ispitanika su bile alergijski rinitis (79%), alergije na lekove (27%), nealergijski rinitis (19%), kardiovaskularna oboljenja (17.5%), što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja (166, 167). Velika učestalost alergijskog rinitisa se može dovesti u vezu sa profilom pacijenata koji se leče u našoj ustanovi, a u skladu je sa podacima o prevalenci alergijskog rinitisa u astmi (166). Takođe, veća učestalost alergija na lekove u našoj kohorti, u odnosu na druga istraživanja se može objasniti usko specijalizovanim opredeljenjem naše ustanove u koju se upućuju pacijenti koji u anamnezi imaju podatke o reakcijama na lekove. Kroz dobro poznat koncept jedinstvenog disajnog puta objašnjava se veza alergijskog rinitisa i bronhijalne astme sa epidemiološkim i patofiziološkim podacima koji podržavaju jedinstveni disajni put. Meta analiza je pokazala jaku povezanost alergijskog rinitisa sa bronhijalnom astmom (OR 4.24, 95% CI 3.82–4.71), a poznato je da je upravo alergijski rinitis glavni faktor rizika za nastanak bronhijalne astme i da nelečeni alergijski rinitis dovodi do pogoršanja astme (166,168). Učestalost primenjene terapije (antihistaminici 72.5%, nazalni kortikosteroidi, 58.8%, LTRA 57.5%), dominantni simptomi (zapušenost nosa, curenje nosa), povišen prosečan IgE (121 IU/ml), alergeni kao glavni okidači egzacerbacija (60%) ukazuju da je naša kohorta dominantno sastavljena od pacijenata sa bronhijalnom astmom i alergijskim rinitisom, odnosno udruženom bolesti disajnog puta. Međutim, neki autori dovode u pitanje koncept jedinstvenog disajnog puta smatrajući ga isuviše jednostavnim objašnjenjem složenih patofizioloških mehanizma obe bolesti (169). Ukazuje se na postojanje različitih fenotipova alergijskog rinitisa, kao što je ekstremni alergijski fenotip koga čine udruženi alergijski rinitis, alergijski konjuktivitis i astma (169). Predlaže se i korišćenje nove

nomenklature-multimorbiditet astme, u koje se ubrajaju pacijenti sa astmom i rinitisom i koji se razlikuju od pacijenata koji imaju samo rinitis. Te razlike su definisane prema patofiziološkim mehanizmima: TLR i IL-17 su ključni za alergijski rinitis kao samostalnu bolest; IL-33 i IL-5 za alergijski i nealergijski multimorbiditet kao sistemske bolesti. Takođe, razlike se odnose i na prisustvo senzibilizacija, težinu simptoma i odgovoru na terapiju. Ova promena u konceptu evaluacije alergijskog rinitisa kroz fenotipizaciju, ima utemeljenje i paralelu upravo u konceptu fenotipizacije astme. Nelečeni komorbiditeti mogu dovesti do egzacerbacija astme, a ponekad je teško u kliničkoj praksi razlikovati da li se radi o pogoršanju astme i/ili pridruženih bolesti, što ukazuje na potrebu za stalnom i detaljnom evaluacijom komorbiditeta i njihovim lečenjem.

Alergijski rinitis (48.8%), bronhijalna astma (38.8%) i alergija na lekove (27.5%) su bile najučestalije bolesti u porodičnoj anamnezi, što je u saglasnosti sa istraživanjima o značaju porodičnog opterećenja alergijske kijavice i bronhijalne astme (170, 171, 172). Kao najčešći okidač pogoršanja su bili alergeni, kod 60% pacijenata, što se uklapa u profil naše kohorte, ali i zagađenje kod 41%. Zagađenje utiče na pogoršanja astme i faktor je rizika sa nastanak astme, a takođe pacijenti sa astmom su više osetljiviji na zagađenje u odnosu na zdrave osobe (173, 174). Zagađenje dovodi do pogoršanja astme direktnim oštećenjem respiratorne sluznice, uticajem na inflamaciju, epigenetskim promenama (175). Studija koja je sprovedena u Zlatiborskom kraju je pokazala povezanost kratkotrajnoj izloženosti sumpor dioksidu i brojem poseta hitnoj službi, naročito kod osoba koje imaju alergijske bolesti, uključujući bronhijalnu astmu (176). Svedoci smo svakodnevnih informacija o štetnosti zagađenja kao i dnevnih podataka o povećanom stepenu zagađenja u gradovima naše zemlje putem medija, pa mere koje mogu dovesti do smanjenja zagađenja mogu imati značajne benefite kod obolelih od astme.

Uloga 25-hidroksivitamina (OH) vitamina D u astmi je jako aktuelna u poslednjih nekoliko godina, imajući u vidu njegova imunomodulatorna dejstva sa jedne strane, a sa druge strane relativno jednostavan način nadoknade ukoliko se utvrdi manjak. Opisane su mnogobrojne veze astme i 25(OH)vitamina D: povezanost sa pogoršanjima bolesti, imunoregulatorna dejstva na inflamatorne procese i na alarmine, dejstvo na pojačan odgovor na terapiju kortikosteroidima u teškoj astmi, nedostatak 25 (OH) vitamina D kao faktor rizika za nastanak astme (177). Deficijencija 25 (OH) vitamina D je definisana kao koncentracija ispod 50 nmol/L, a insuficijencija 50-70 nmol/L (178). Prosečne vrednosti 25 (OH) vitamina D kod naših ispitanika su iznosile 50.5 nmol/l, što je na granici deficijencije, a prema kriterijumima laboratorije gde je analiza urađena, vrednosti 25 do 50 nmol/L ukazuju na nedostatak. Suplementacija 25 (OH) vitaminom D se preporučuje kod pacijenata sa astmom koji imaju zabeležene niske vrednosti (177, 179). U našoj kohorti pacijenti su imali i druge komorbiditete u kojima se takođe mogao javiti nizak nivo vitamina D, tako da je teško procenti stepen povezanosti nedostatka vitaminom D isključivo sa astmom, ali suplementacija vitaminom D svakako može biti važan deo celokupnog pristupa u lečenju astme.

Kontrola astme predstavlja bitan aspekt u evaluaciji pacijenata, jer se na osnovu procene kontrole bolesti donese odluka o lečenju. Ne postoji opšte prihvaćena definicija kontrole astme. U proceni kontrole bolesti se uzimaju u obzir i aspekti lekara i aspekti pacijenta, a kontrola zavisi od velikog broja različitih faktora, kao što su genetika, aktuelne bolesti, trenutna terapija, faktori okoline i psihološki faktori (180). Prema ATS/ERS, kontrola astme se definiše kao stepen do koga se različite manifestacije astme mogu terapijski smanjiti ili potpuno ukloniti, a sastoji se od stepena kliničke kontrole astme i rizika od budućih pogoršanja (181). Kontrola astme jeste bitan aspekt prema GINA vodičima, a procenju se kroz dva domena: kontrola simptoma i kontrola rizika budućih pogoršanja (3). Procena kontrole simptoma se između ostalog može proceniti i preko upitnika, kao što su GINA upitnik o kontroli simptoma, ACQ, ACT. Ovi upitnici se vrlo često koriste u naučnim istraživanjima, jer se na numerički način mogu predstaviti podaci vezani za kontrolu bolesti, a zatim i porediti. Kontrola astme u našem istraživanju je procenjena GINA, ACT i ACQ upitnicima. Naši pacijenti se prema GINA upitniku o kontroli simptoma imali: 21% dobro kontrolisanu, a 41% loše kontrolisanu bolest; prema ACT: 44 % dobro kontrolisanu, a 36% loše kontrolisanu bolest, prema ACT 29% dobro, a 47% loše kontrolisanu. Prosečan FEV1 je iznosio 92.6%, a FEV1/FVC 71.36%, adherence je bila zadovoljavajuća, nije bilo u celoj kohorti teških egzacerbacija.

U cilju utvrđivanja razlika u vrednostima spirometrijskih parametara i biomarkera u zavisnosti od kontrole bronhijalne astme, ove karakteristike su upoređivane prema ACQ, ACT i GINA upitniku o kontroli simptoma. Shodno ACQ, utvrđeno je da su pacijenti u sivoj zoni kontrole bolesti imali najviše vrednosti FEV1 i VC u poređenju sa dobro i loše kontrolisanim pacijentima ($p=0.040$ i $p=0.045$), da su FEV1 i VC bili značajno viši kod obolelih od bronhijalne astme u sivoj zoni nego kod loše kontrolisanih ($p=0.037$ i $p=0.035$). Ovi rezultati da pacijenti u sivoj zoni kontrole bolesti imaju najvišu vrednost FEV1 i FVC može da ukaže na razliku u percepciji pacijenta o svojoj bolesti i procene kontrole spirometrijskim parametrima. Prema ACQ, broj leukocita i limfocita u krvi je bio značajno viši kod loše kontrolisanih pacijenata u poređenju sa dobro kontrolisanim ($p=0.009$ i $p=0.004$). Procenom kontrole bolesti prema ACT dobijeni su slični nalazi: pacijenti sa lošom kontrolom bolesti imali su najviši broj limfocita u krvi u poređenju sa pacijentima sa umerenom i dobrom kontrolom bronhijalne astme ($p=0.050$). I u drugim istraživanjima je uočeno da pacijenti sa lošom kontrolom bolesti imaju veći broj leukocita (182, 183). Ovi rezultati mogu ukazati na veći stepen inflamacije ili moguću infekciju kod loše kontrolisanih pacijenata. Nismo uočili razliku u spirometrijskim parametrima prema GINA upitniku o kontroli simptoma. Nepostojanje jedinstvene i usaglašene definicije kontrole bolesti, uz različite upitnike koji se koriste za procenu kontrole bolesti, je dovelo do razmatranja ovih problema na ekspertskom nivou i zaključeno je: postoji saglasnost da nema saglasnosti u definiciji kontrole astme; postoji pozitivna korelacija kontrole astme i ishoda lečenja; razlikuje se percepcija pacijenta i percepcija lekara o kontroli bolesti; pacijenti i lekari umanjuju kontrolu astme i da je bitno da buduće mere preko kojih će se analizirati kontrola astme obuhvate vizuru pacijenta, vizuru lekara i da se mogu koristiti i u istraživanjima (184).

Analiza indukovanog sputuma je pokazala skoro ujednačanu učestalost EA fenotipa (31%) i MGA (30%), a 19 pacijenata je imalo PGA (24%), dok je najmanje njih imalo NA (15%). Najveća učestalost EA je u skladu sa istraživanjima drugih autora, a distribucija ostalih fenotipova se razlikuje u istraživanjima (57,82,185,186). U nekim studijama je utvrđena dominacija PGA fenotipa, a sistematski pregled literature je pokazao da su EA i PGA dva najučestalija fenotipa (85,129,187). Različite učestalosti fenotipova se mogu objasniti različitim karakteristikama ispitanika koji su uključeni u istraživanja, različitim dizajnom istraživanja, ali i različitim "cut off" vrednostima koje su korišćene da se definišu fenotipovi prema indukovanom sputumu. Naše istraživanje je obuhvatilo pacijente koji su bili na različitim stepenima kontrole astme, kod kojih je pored inhalacione primenjena i biološka terapija, što je moglo uticati na aktuelni fenotip procenjen indukovanim sputumom, pošto inicijalni fenotip pri dijagnozi astme nije bio poznat. Visoka učestalost MGA fenotipa u našem istraživanju, koji zajedno sa EA pripada T2 astmi, može se dovesti u vezu sa visokom učestalošću alergijskog rinitisa u našoj kohorti. Kod drugih studija koji su bili istog dizajna kao i naša i sličnog broja ispitanika, dakle studija preseka, ispitivana populacija je bila populacija sa teškom astmom (82, 185). Takođe, etničke razlike kao i razlike u geografskoj distribuciji mogu biti faktori koji utiču na prevalencu fenotipova (187).

Nije utvrđena razlika između 4 inflamatorna fenotipova u osnovnim demografskim karakteristikama, laboratorijskim parametrima i primenjenoj terapiji: pacijenti su bili prosečno iste starosti, jednakog odnosa polova, iste zastupljenosti pušača i nepušača, iste dužine trajanja pušačkog statusa, kao i zastupljenosti komorbiditeta i oboljenja u porodičnoj anamnezi, bez razlike u BMI, istog prosečnog trajanja bolesti kao i simptoma pre postavljanja dijagnoze, podjednake zastupljenosti najčešćih simptoma i istih najčešćih okidača, sa istim brojem teških egzacerbacija u poslednjih godinu dana, bez razlike u senzibilizaciji na standardne inhalacione alergene i bez razlike u ispitivanim biohemijskim markerima i primenjenoj terapiji. I istraživanje kod 96 pacijenata sa astmom je pokazalo da nema razlike prema polu, BMI, stepenu težine bolesti, kontroli bolesti, posetama hitnim službama u poslednjih godinu dana, FEV1, prisutnosti alergijskog rinitisa ili nazalnom polipozom između 4 različita inflamatorna fenotipa (82). Nije utvrđena razlika između fenotipova i kod 176 pacijenta prema BMI, pušačkom statusu, početku i toku astme, kao i ACT (129). Slični rezultati o nepostojanju razlike u odnosu na godine, pol, atopijski i pušački status su uočene i kod drugih autora (185). Međutim, u studiji sa preko 500 pacijenta su utvrđene određene razlike među fenotipovima, pa se tako EA razlikovala po većoj učestalosti atopije, slabijoj kontroli bolesti i većim stepenom bronhijalne hiperreaktivnosti u odnosu na PGA (85).

Kontrola astme procenjena ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma nije pokazala ujednačenost u sve tri skale kada smo analizirali pojedinačne fenotipove, a ovakav nalaz ukazuje na potrebu za jasnim definisanjem definicije kontrole astme i upitnicima koje se koriste, ali i o doživljaju pacijenata o svojoj bolesti, kada odgovaraju na upitnike.

U odnosu na spirometrijske parametre, utvrdili smo da postoji značajna razlika MEF75 među fenotipovima, najveća vrednost MEF75 je uočena u MGA. Ovaj nalaz sugerira na značaj parametara koju ukazuju na disfunkciju malih disajnih puteva u evaluaciji inflamatornih fenotipova. Poznato je da je disfunkcija malih disajnih puteva bitna odlika astme i da je povezana sa lošijom kontrolom bolesti i čestim pogoršanjima i da je prisutna kod svih stepena težine astme (188, 189). Različiti instrumenti se koriste u kliničkoj praksi da se evaluiira disfunkcija malih disajnih puteva, između ostalih MEF25, MEF50, MEF75, MEF25-75, MMEF spirometrijski parametri i IOS, za koje je pokazano da su dobri markeri disfunkcije malih disajnih puteva (190-192). Iako se spirometrija i IOS često koriste, ne postoji zlatni dijagnostički standard kojima se procenjuje disfunkcija malih disajnih puteva (193). U našem istraživanju je pokazano da je više od polovine ispitanika (56%) imalo povišene otpore u malim disajnim putevima, kao marker disfunkciju malih disajnih puteva, i to najučestalije u EA (56%), zatim u MGA (45.8%), PGA (42.1%), NA (25%), ali bez razlike između fenotipova. Diskrepanca u našim rezultatima prema kojima se MGA karakterisala sa jedne strane najboljim MEF75, a prema IOS disfunkcija je bila prisutna kod 45.8% MGA pacijenta, ukazuju na potrebu pažljive interpretacije jednog spirometrijskog parametra u kontekstu karakterizacije fenotipova. Međutim, uloga disfunkcije malih disajnih puteva kao dodatnog markera u astmi nije dovoljno istraživana, iako predstavlja bitan deo mozaika evaluacije inflamatornih fenotipova. Studija Abda i saradnika je istraživala ovu temu i utvrdila da postoji povezanost disfunkcije malih disajnih puteva sa inflamatornim fenotipovima, da su pacijenti sa EA i MGA imali lošije parametre disfunkcije malih disajnih puteva u odnosu na ostala 2 fenotipa (65). To je slično i našim rezultatima: prema IOS, EA i MGA se odlikovala najučestalijom disfunkcijom malih disajnih puteva. Ova studija je pokazala da su kod pacijenata sa perzistentnom eozinofilijom i neutrofilijom u sputumu, prisutni pokazatelji disfunkcije malih disajnih puteva tokom praćenja. Međutim, postoje značajne razlike između našeg istraživanja i napred pomenutog i odnose se na: broj ispitanika (80 u našem, prema 197), dizajn studije (studija preseka prema longitudinalnoj); "cut off" vrednostima za definisanje fenotipova (eozinofili $\geq 3\%$ i neutrofiliji 61% u našoj studiji, prema ≥ 2 eozinofila (EA) % i $\geq 50\%$ neutrofila (NA)); i instrumentima za određivanje disfunkcije malih disajnih puteva (spirometrija i IOS u našem istraživanju, a spirometrija, IOS, pletizmografija, ispiranje inertnim gasom u studiji Abdo i saradnika).

Analiza biomarkera je pokazala da postoji značajna razlika u broju eozinofila među između različitih inflamatornih fenotipova. Broj eozinofila je bio značajno veći u EA u odnosu na NA ($p=0.001$), MGA ($p=0.002$) i PGA ($p=0.042$). Nismo utvrdili korelaciju između broja eozinofila u serumu i procenta eozinofila u sputumu u EA ($\rho=-0.03$, $p=0.863$). U drugim istraživanjima je pokazano da eozinofilija u serumu koreliše sa eozinofilima u sputumu (82-86). Međutim, ne postoje jedinstveni stavovi o tome koja vrednost eozinofila u krvi je povezana sa eozinofilima u sputumu, kao što ne postoje ni jedinstveni stavovi i vodiči o tome koji procenat eozinofila u sputumu tačno definiše eozinofilni fenotip. Pokazano je da se vrednosti od eozinofila u serumu od 150 do preko $400/\mu\text{L}$ korelišu sa različitim "cut off" vrednostima eozinofila u sputumu $> 2\%$, $\geq 2\%$, $\geq 2.5\%$, $> 3\%$, $\geq 3\%$ (92). U našem istraživanju smo pokazali da vrednosti eozinofila $\geq 240/\mu\text{l}$ identifikuju pacijente sa EA, sa 64% senzitivnosti i 72.7% specifičnosti (AUC= 0.74,

p=0.001). Velika studija sa 508 pacijenata sa astmom je pokazala slične rezultate našima, gde je vrednost od 220/ μ l eozinofila u serumu korelisala sa EA, koja je takođe bila definisana kao i u našem istraživanju, odnosno sa $\geq 3\%$ eozinofila u sputumu (AUC= 0.79, p=0.0001) (85). Međutim, istraživanja ukazuju da ne postoji uvek dobra povezanost serumskih eozinofila sa sputumom i da je indukovani sputum senzitivnija metoda u određivanju inflamatornih fenotipova u odnosu na eozinofile u serumu (194, 195).

U ostalim analiziranim biomarkerima (IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33) nije utvrđena razlika između inflamatornih fenotipova. Ovi rezultati mogu govoriti u prilog kompleksnosti raznovrsnih i složenih imunoloških interakcija T2 i non T2 fenotipova, odnosno ključnih citokina: periostina, IgE, IL-5 i IL-33 za T2 fenotip, a IL-6, IL-8, IL-17A za non T2 fenotip. Iako se lokalna inflamacija bolje procenjuje analizom citokina iz sputuma, BAL ili bioptata, serumski citokini daju više podataka o sistemske inflamaciji (196). Kompleksnost i preklapanje Th1, Th2, Th17, i ILC-2 imunološkog odgovora, kao i promena dominacije između različitih imunoloških profila tokom vremena, koji zavise od različitih lokalnih i sistemskih činilaca, ukazuju na plastičnost i heterogenost T2 i non T2 mehanizama (11,47). U tom smislu možemo da sagledamo i naše rezultate, a takođe treba imati u vidu da je 17 naših pacijenata bilo na biološkoj terapiji koja je mogla uticati na vrednosti citokina u serumu. Što se tiče FeNO, kao često ispitivanog biomarkera, nismo utvrdili da se 4 fenotipa razlikuju prema vrednostima FeNO, što je pokazano i kod drugih autora (97, 138, 194). Imajući u vidu da je FeNO indirektan marker IL-13 puta T2 inflamacije, povezanost FeNO sa eozinofilnim fenotipom je naročito proučavana, pa je uočena pozitivna korelacija FeNO sa EA (83,85 86,139). Naše istraživanje nije utvrdilo povezanost FeNO sa eozinofilnim fenotipom, što može ukazati da unutar EA kao tipičnog predstavnika T2 inflamacije, mogu postojati različiti dominantni imunološki putevi inflamacije, IL-13 i/ili IL-5 i da FeNO ne mora uvek da odražava eozinofilnu inflamaciju (197). Prosečna vrednost FeNO u našem istraživanju je iznosila 23.5ppb (12.1-37.7ppb), što bi shodno ATS/ERS kriterijumima spadalo u neozinofilnu astmu (94). Na vrednost FeNO utiču mnogobrojni faktori, a na rezultat FeNO naših ispitanika su mogli uticati sledeći: više od polovine ispitanika su bili pušači, većina je imala udruženost sa alergijskim rinitisom, više od polovine je bilo prekomerno uhranjeno, a većina je bila na srednjim dnevnim dozama IKS. Iako je FeNO lako dostupan biomarker, on ne predstavlja surogat za eozinofilnu inflamaciju disajnih puteva, a njegov značaj se može sagledati u tome da predstavlja dodatni, a ne pojedinačni biomarker eozinofilne inflamacije (101,139).

Ispitivali smo i karakteristike na osnovu kojih se mogu razlikovati 4 inflamatorna fenotipova. Naše istraživanje je pokazalo da se EA odlikuje većim brojem egzacerbacija u poslednjih godinu dana, dimom kao okidačem pogoršanja, primenom nazalnih glikokortikoida, nižim vrednostima MEF25 i MEF50, višim vrednostima CRP i periostina, a da su nezavisni prediktori EA dim kao okidač pogoršanja (OR=5.966, 95%CI OR=1.53-23.30, p=0,010), niže vrednosti MEF25 (OR=0.964, 95%CI OR=0.94-0.99, p=0,019) i viši CRP (OR=1.246, 95%CI OR=1.01-1.54, p=0.043). Naši rezultati su u saglasnosti sa drugim istraživanjima u kojima je takođe

utvrđeno da se eozinofilni fenotip odlikuje lošijom kontrolom bolesti i većim vrednostima periostina (85,198,199). Studija Wagenera i saradnika, međutim, nije potvrdila povezanost periostina sa eozinofilnim fenotipom (26). Primena nazalnih kortikosteroida kao odlike EA se može tumačiti profilom naše kohorte koju su činili pacijenti sa alergijskim rinitisom, a uloga duvanskog dima kao nezavisnog faktora pogoršanja EA se može tumačiti u kontekstu velike izloženosti duvanskog dima u našoj zemlji i EA kao najučestalijeg fenotipa. Viši CRP je i kod drugih autora bio povezan sa EA (200-201). Niži MEF25 kao marker disfunkcije malih disajnih puteva u našem ispitivanju je u saglasnosti sa drugim istraživanjima (65). Celukupna analiza eozinofilnog fenotipa u našem ispitivanju ukazuje da je to fenotip koji se odlikuje lošijom kontrolom bolesti (više ezgarcebacija), mogućom disfunkcijom malih disajnih puteva (niži MEF25 i MEF50), perzistentnom inflamacijom (povišen CRP i periostin) i duvanskim dimom kao okidačem pogoršanja.

Neutrofilni inflamatorni fenotip je jako složen, sa nedovoljno poznatim patofiziološkim mehanizmima. Predpostavlja se da se nakon aktivacije epitelnih ćelija i alveolarnih makrogaafa sekretuju proinflamatorni citokini (IL-6, IL-1b, IL-8) koji dovode do aktivacije neutrofila (11). Takođe, IL-17A ima ulogu u patogenezi NA (202). Istraživanje kineskih autora je pokazalo da se neutrofilni fenotip karakteriše povišenim nivoom IL-8 u serumu i u sputumu, a da je IL-17A biomarker NA (129). I drugi autori su ukazali na značaj IL-17 u definisanju NA, što nije pokazano u našim rezultatima (128,129,202). Pacijenti sa NA u našem istraživanju su se karakterisali sa nižim brojem eozinofila, što je očekivano, i sa većim nivoom IL-8, koji je takođe bio nezavistan faktor povezan za NA. Povećana ekspresija IL-8RA i IL-8RB gena, kao i IL-8 je pokazana u neutrofilnom fenotipu i u drugim istraživanjima, ali je pokazano da se NA karakteriše i povišenim vrednostima CRP i IL-6 (135). Naši rezultati ukazuju da je IL-8 bitan biomarker u NA, a poznato je da je IL-8 najprevalentniji hemotaktički neutrofilni faktor. Kliničke odlike NA u drugim istraživanjima su starije životno doba, povećana prevalenca fiksne opstrukcije, manja prevalenca atopije i veća prvelenca prestanka pušenja (59).

Prema našim rezultatima MGA se od ostalih fenotipova razlikovao prema prisustvu alergijskog rinitisa u porodici, fizičkim naporom kao okidačem pogoršanja, primenom alergenske imunoterapije, višim FEV1/FVC, MEF50 i MEF75, dok je jedina karakteristika nezavisno povezana sa MGA bila viša vrednost MEF50 (OR=1.030, 95%CI OR=1.01-1.06, p=0,023). Ovi rezultati sugerišu na T2 inflamaciju (alergijski rinitis u porodici, primena alergenske imunoterapije) kao obeležje MGA, ali i na dobru spirometrijsku kontrolu ovog fenotipa (viši FEV1/FVC, MEF50 i MEF75). Naši rezultati su u suprotnosti sa drugim istraživanjima, u kojima se MGA odlikovao lošijom plućnom funkcijom (65, 85, 203). Razlog za ovakav nalaz možda se može sagledati u primeni biološke terapije kod 6 od 24 pacijenata sa MGA, koja je mogla uticati na dobru plućnu funkciju.

Paucigranulocitni inflamatorni fenotip u našem istraživanju se karakterisao samo sa jednom osobinom: pozitivnom porodičnom anamnezom alergijskog rinitisa. Naši rezultati se mogu

uklopiti u klaster 2 istraživanja 145 pacijenta sa PGA, a koji se odlikovao psihološkim disfunkcijama, alergijskim rinokonjuktivitisom i drugim alergijskim bolestima, dok se klaster 1 u ovom istraživanju odlikovao dobrom plućnom funkcijom i najvećom učestalošću, a klaster 3 je bio povezan za pušenjem (204). Ispitujući PGA fenotip, grčki autori su zaključili da je to najučestaliji fenotip, da je “benigni”, sa dobrim odgovorom na terapiju i nižim stepenom inflamacije (185). I u našem istraživanju, 2 od 19 pacijenata je bilo na biološkoj terapiji, što bi ukazalo da se radi o fenotipu bez pacijenta sa teškom astmom. Manji stepen inflamacije u PGA je zaključak i kod drugih autora (96). Neki autori dovode u pitanje postojanje PGA kao nezavisnog inflamatornog fenotipa, smatrajući ga fenotipom koji je u suštini eozinofilni fenotip adekvatno i dobro lečen IKS (96,185). Može se reći da je upravo glavna odlika ovog inflamatornog fenotipa heterogenost (187, 204).

Analiza povezanosti biomarkera pojedinačnih fenotipova sa kontrolom bolesti procenjenom ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma je pokazala da ne postoji korelacija biomarkera ni sa jednim upitnikom o kontroli bolesti, bez obzira na inflamatorni fenotip. Studija kinskih autora je pokazala da se EA karakteriše nižim ACT, ali da nema razlike između 4 fenotipa u ACT i ACQ6 upitnicima (205). Studija kod 86 pacijenata sa teškom astmom nije utvrdila da postoji povezanost između biomarkera (eozinofila u sputumu i serumu) različitih inflamatornih fenotipova sa ACT (206). Kontrola astme se procenjuje ACT, ACQ i GINA upitnicima, što je najčešći slučaj u studijama. ACT skala se koristi često u svakodnevnom radu i predstavlja samo jedan deo kompleksne priče o kontroli astme. Nepostojanje povezanosti kontrole astme procenjene ovim upitnicima sa biomarkerima različitih fenotipova, može ukazati da kontrola bolesti definisana upitnicima ne govori uvek o aktuelnoj inflamaciji. Paradigma da se optimalna terapija astme postiže kontrolom simptoma i smanjenjem rizika od budućih pogoršanja, u kliničkoj praksi se najčešće svodi na korekciju terapije prema parametrima spirometrije i procene simptoma, što kod većine pacijenta sa blagom i umerenom astmom može da bude adekvatno, ali može da postoji neslaganje sa simptomima procenjenim upitnicima i postojećom inflamacijom (205). Kod pacijenata sa teškom astmom, može da postoji diskordinacija između simptoma i inflamacije. Studija Haldara i saradnika je pokazala da u klasteru teške astme postoji diskrepanca između onih pacijenta koji imaju izražene simptome, a imaju minimalnu inflamaciju i obrnuto, da postoji manje simptoma, a izražena inflamacija (71). Pokazana su značajno manja pogoršanja astme kada se odluke o lečenju donose na osnovu praćenja analize indukovano sputuma u odnosu na vodiče, ali je u kliničkoj praksi to teško izvodljivo i zahtevno (63).

Biološka terapija u astmi se korsi na koraku 5 prema GINA vodičima, a usmerena je na ključne patofiziološke odlike: anti IgE, anti IL-5, anti IL-5R, anti IL-4, anti TSLP. U kliničkim istraživanjima je pokazana efektivnost i efikasnost biološke terapije, smanjenje egzacerbacija, poboljšanje plućne funkcije i smanjenje primene per os kortikosteroidne terapije (207). U studiji italijanskih autora, koji su retrospektivno analizirali 90 pacijenata sa teškom astmom, nakon 36 meseci je pokazano da je biološka terapija efikasna, da poboljšava ACT i FeNO i da smanjuje egzacerbacije (208). U našem istraživanju 63 ispitanika je bilo bez biološke terapije, pa smo prvo analizirali fenotipsku distribuciju kod ove grupe, a zatim analizirali biomarkere.

Rezultati pacijenata bez biološke terapije su pokazali sličnu zastupljenost fenotipova kao u celoj kohorti: 18 je imalo EA (29%), 10 NA (16%), 18 MGA (29%) i 17 PGA (27%). Rezultati potvrđuju da su EA i MGA i kod pacijenta bez biološke terapije 2 najučestalija fenotipa. Utvrđena je značajna razlika u broju eozinofila i IL-17A u serumu između 4 inflamatorna fenotipa ($p=0.034$; $p=0.004$). Oba ova biomarkera su bila najveća u eozinofilnom inflamatornom fenotipu. Broj eozinofila je bio značajno veći u EA u odnosu na NA, MGA i PGA ($p=0.012$, $p=0.028$, $p=0.049$). Značajno veće vrednosti IL-17A su bile prisutne u eozinofilnom fenotipu u odnosu na neutrofilni i paucigranulocitni ($p=0.016$; $p=0.002$), kao i u mešovitom granulocitnom u odnosu na paucigranulocitni inflamatorni fenotip ($p=0.042$). Naši rezultati da se EA kod pacijenta bez biološke terapije odlikuje najvećim brojem eozinofila u serumu je u skladu sa celom kohortom. Međutim, nalaz da se EA bez biološke terapije odlikuje povišenim nivom IL-17A je interesantan. IL-17A se dovodi u vezu sa NA (128, 129, 202). Naši rezultati mogu sugerisati da su naši pacijenti sa EA bez biološke terapije imali mešoviti Th2/Th17 fenotip, čije postojanje je pokazano u istraživanjima (209, 210). Značaj IL-17A na Th2 eozinofilnu inflamaciju je pokazan i na animalnim modelima (211). Takođe, Th2/Th17 subset može da dovede do pojačane inflamacije, pogoršanja astme i može biti povezan za pacijentima koji imaju lošiju kontrolu bolesti (212, 213).

Imajući u vidu da biološka terapija može da utiče na astmu, odlučili smo da da poredimo biomarkere kod 63 ispitanika bez biološke terapije sa 17 ispitanika na biološkoj terapiji. Uočena je značajna razlika u IL-5 kod pacijenata sa EA na biološkoj i EA bez biološke terapije ($p=0.043$). IL-5 je bio značajno veći kod pacijenta sa EA koji su bili na biološkoj terapiji. Istraživanja su pokazala da primena benralizuma i mepolizumaba dovodi do povećanja serumskog IL-5 (214-216). Kod naših pacijenata sa EA na biološkoj terapiji, 6 od 7 je primalo omalizumab, a samo jedan benralizumab. Naši rezultati ukazuju da pacijenti koji su primali omalizumab mogu imati i IL-5 endotip, pa povišeni nivo IL-5 u ovoj grupi ukazuje na perzistentnu eozinofilnu inflamaciju na koju nije delovala primenjena biološka terapija omalizumabom. Ovakvi rezultati mogu govoriti da kod ovih pacijenata treba razmotriti prelazak na drugu biološku terapiju, kao i na kompleksnost patofizioloških mehanizama unutar fenotipa EA. Analiza 68 pacijenata sa teškom EA je pokazala da je njih 30 prešlo na drugu biološku terapiju nakon 21 meseca, ukazujući da postoje pacijenti koji ne odgovaraju na inicijalnu biološku terapiju i kod kojih postoji mogućnosti promene imunološkog odgovora unutar samog fenotipa (217). Naši rezultati su pokazali da se broj leukocita, neutrofila, IL-5, IL-6 i IL-8 razlikuje kod pacijenta sa MGA sa i bez biološke terapije ($p=0.049$, $p=0.019$, $p=0.012$, $p=0.032$, $p=0.03$). Koncentracija IL-5, IL-6 i IL-8 su bile veće kod pacijenta sa MGA na biološkoj terapiji, a broj leukocita i neutrofila je bio veći kod MGA bez biološke terapije. Veći nivo IL-5 se može dovesti u vezu sa primenom benralizumaba kod 4 od 6 pacijenata kod MGA, što je moglo dovesti do porasta IL-5. Veći IL-8 sugerise na izraženiji neutrofilnu inflamaciju u mešovitom MGA, ali i to, da biološka terapija ne targetuje neutrofilni deo inflamacije u ovom fenotipu. Visok IL-6 u MGA sa biološkom terapijom može da ukaže na perizistentnu sistemsku inflamaciju u MGA fenotipu, gde biološka terapija nema efekta. Veći broj leukocita i neutrofila kod MGA bez biološke terapije se može objasniti mogućom prisutnom neutrofilnom inflamacijom koje je prominentnija u odnosu na eozinofilnu, pa i kod ovih pacijenata treba razmotriti reviziju terapije.

6. ZAKLJUČCI

1. Ispitanici su prosečne starosti 46 godina, dominantno ženskog pola, polovina pušači i prokomereno uhranjeni, sa alergijskim rinitisom kao najčešćim komorbiditetom i alergenima kao najčešćim okidačima pogoršanja astme, koji su imali nedostatak 25 (OH) vitamina D, različitog stepena kontrole bolesti, sa povećanim brojem leukocita i limfocita kao markerima loše kontrole bolesti.
2. Dominantni fenotipovi dobijeni analizom indukovanog sputuma su EA i MGA.
3. MEF75 treba pažljivo intepretirati kao diskriminatorni marker fenotipova, a u skladu sa ostalim instrumentima procene disfunkcije malih disajnih puteva, kao što je impulsna oscilometrija. Disfunkciju malih disajnih puteva treba razmotriti u evaluaciji fenotipova.
4. Inflamatorni fenotipovi se ne razlikuju prema biomarkerima: IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33), a ispitivani biomarkeri (eozinofili, IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33) različitih inflamatornih fenotipova nisu povezani sa kontrolom bolesti. Stepem kontrole astme procenjen ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma ne odražava uvek aktuelnu inflamaciju.
5. Eozinofili u serumu su biomarker EA. Vrednosti eozinofila preko 240/ml identifikuju EA sa sa 64% senzitivnosti i 72.7% specifičnosti.
6. Eozinofilni inflamatorni fenotip se odlikuje lošijom kontrolom bolesti (više ezgarcebacija), mogućom disfunkcijom malih disajnih puteva (niži MEF25 i MEF50), perzistentom inflamacijom (povišen CRP i periostin), duvanskim dimom kao okidačem pogoršanja i primenom nazalnih glikokortikoida. Nezavnsni prediktori EA su dim kao okidač pogoršanja, niži MEF i povišen CRP.
7. Neutrofilni inflamatorni fenotip se karakteriše nižim brojem eozinofila u serumu i višim IL-8, koji je nezavisno povezan sa ovim fenotipom.
8. Mešoviti granulocitni fenotip se odlikuje alergijskim manifestacijama (alergijski rinitis u porodici, primena alergenske imunoterapije), boljom kontrolom bolesti (višim FEV1/FVC, MEF50 i MEF75) i fizičkim naporom kao okidačem pogoršanja. Veća vrednost MEF50 je jedina karakteristika nezavisno povezana sa MGA.
9. Kod pacijenta bez biološke terapije najučestaliji fenotip je EA i MGA. Eozinofili u serumu i IL-17A su biomarkeri EA bez biološke terapije, IL-5 može biti biomarker EA na biološkoj terapiji.

10. Pacijenti sa MGA fenotipom na biološkoj terapiji imaju veći nivo IL-5, IL-6, IL-8. Pacijenti sa MGA fenotipom bez biološke terapije imaju veći broj leukocita i neutrofila, što ukazuje na dominantnu neutrofilnu inflamaciju i sugeriše razmatranje terapijskog pristupa.

7. LITERATURA

1. Croisant S. Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease. *Adv Exp Med Biol.* 2014;795:17–29.
2. Rackemann F. A working classification of asthma. *Am J Med.*1947;3:601-606.
3. 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.
4. Canonica GW, Fernando I, Biardini F, Puggioni F, Racca F, Passalacqua G, Heffler E. Asthma: personalized and precision medicine. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2018;18:51-58.
5. Rice JP, Saccone NL, Rasmussen E. Definition of phenotype. *Adv Genet.*2001;42:69-76.
6. Ozdemir C, Kucukser CU, Akdis M, Akdis CA. The concept of asthma endotypes and phenotypes to guide current and novel treatment strategies. *Expert Rev Respir Med.* 2018;12:733-743.
7. Ray A, Oriss TB, Wenzel SE. Emerging molecular phenotypes of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(2):L130-40.
8. Ciprandi G, Tosca MA, Silvestri M, Ricciardolo FLM. Inflammatory biomarkers in asthma endotypes and consequent personalized therapy. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13:715-721.
9. Agache I, Akdis CA. Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *J Clin Invest.*2019;129:1493-1503.
10. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol.*2015;16(1):45-56.
11. Lambrecht BN, Hammad H. The basic immunology of asthma *Cell.*2021;184(6):1469-1485.
12. Godar M, Deswarte K, Vergote K, Saunders M, de Haard H, Hammad H, Blanchetot C, Lambrecht BN. A bispecific antibody strategy to target multiple type 2 cytokines in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*2018;142:1185- 1193.
13. Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol Rev.*2017;278:162-72.
14. Ohtomo T, Kaminuma O, Yamada J, Kitamura N, Abe A, Kobayashi N, Suko M, Mori A. Eosinophils are required for the induction of bronchial hyperresponsiveness in a Th transfer model of BALB/c background. *Int. Arch Allergy Immunol.*2010;152; 79–82.
15. Canas JA, Sastre B, Rodrigo-Munoz J, Fernandez-Nieto M, Barranco P, Quirce S, Sastre J, Del Pozo V. Eosinophil-derived exosomes contribute to asthma remodelling by activating structural lung cells. *Clin Exp. Allergy.*2018;48,1173–1185.
16. Wong TD, Elovic A, Matossian K, Nagura N, McBride J, Chou MY, et al. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor beta 1. *Blood.* 1991;78(10): 2702–2707.
17. Ueki S, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Hirokawa M, Matsuwaki Y, Honda K, Ohta N, Yamamoto S, Takagi Y. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps:

- Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:258–267.
18. Persson EK, Verstraete K, Heyndrickx I, Gevaert E, Aegerter H, Percier JM, Deswarte K, Verschueren KHG, Dansercoer A, Gras D, et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. 2019; *Science* 364, eaaw4295.
 19. Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate lymphoid cells. *Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology.* 2015; *Science* 348, aaa65661.
 20. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, Powrie F, Spits H. Innate lymphoid cells: 10 years on. *Cell.* 2018;174(5):1054-1066.
 21. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature.* 2010;463, 540–544.
 22. Furusawa J, Moro K, Motomura Y, Okamoto K, Zhu J, Takayanagi H, Kubo M, Koyasu S. Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. *J Immunol.* 2013;191, 1818–1826.
 23. Huang Y, Guo L, Qiu J, Chen X, Hu-Li J, Siebenlist U, Williamson PR, Urban JF Jr, Paul WE. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential ‘inflammatory’ type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2015;16:161–169.
 24. Guo L, Huang Y, Chen X, Hu-Li J, Urban JF Jr, Paul WE. Innate immunological function of TH2 cells in vivo. *Nat Immunol.* 2015;16:1051–1059.
 25. Roan F, Obata-Ninomiya K, Ziegler SF. Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1441-1451.
 26. Pinto SM, et al. A network map of IL-33 signaling pathway. *J Cell Commun Signal.* 2018;12(3):615–624.
 27. Rickel EA, Siegel LA, Yoon BR, Rottman JB, Kugler DG, Swart DA, Anders PM, Tocker JE, Comeau MR, Budelsky AL. Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities. *J Immunol.* 2008;181(6):4299–4310.
 28. Yao X, Wang W, Li Y, Huang P, Zhang Q, Wang J, Wang W, Lv Z, An Y, Qin J, Corrigan CJ, Hang K, Sun Y, Ying S. IL-25 induces airways angiogenesis and expression of multiple angiogenic factors in a murine asthma model. *Respir Res.* 2015;16(2015):28.
 29. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Körner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F is crucial for murine asthma. *J Immunol.* 2012;189:3641–3652.
 30. Khalaf K, Paoletti G, Puggioni F, Racca F, De Luca F, Giorgis V, Canonica GW, Heffler E. Asthma from immune pathogenesis to precision medicine. *Semin Immunol.* 2019;46:101294.
 31. Rochman Y, Dienger-Stambaugh K, Richgels PK, Lewkowich IP, Kartashov AV, Barski A, Khurana Hershey GK, Leonard WJ, Singh H. TSLP signaling in CD4+ T cells programs a pathogenic T helper 2 cell state. *Sci Signal.* 2018;11(521):eaam8858.
 32. Rochman I, Watanabe N, Arima K, Liu YJ, Leonard WJ. Cutting edge: Direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2007;178(11):6720–6724.

33. Kitajima M, Lee HC, Nakayama T, Ziegler SF. TSLP enhances the function of helper type 2 cells. *Eur J Immunol.*2011;41(7):1862–1871.
34. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA.*2007;104:15858-63.
35. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:388-95.
36. Fitzpatrick AM, Chipps BE, Holguin F, Woodruff PG. T2-"Low" Asthma: Overview and Management Strategies. *J Allergy Clin Immunol Pract.*2020;8(2):452-463.
37. McKinley L, Alcorn JR, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, et al. Th 17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol.*2008;181-4089-97.
38. Willis CR, Siegel L, Leith A. IL-17RA signaling in airway inflammation and bronchial hyperreactivity in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53(6):810-21.
39. He R, Oyoshi MK, Jin H, Geha RS. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(40):15817-22.
40. Busse WW, Holgate S, Kerwin E, Chon Y, Feng J, Lin J, Lin SL. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188:1294–1302.
41. Simpson JL, Phipps S, Baines KJ, Oreo KM, Gunawardhana L, Gibson PG. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. *Eur Respir J* 2014;43:1067–1076.
42. Radermecker C, Sabatel C, Vanwinge C, Ruscitti C, Marechal P, Perin F, Schyns J, Rocks N, Toussaint M, Cataldo D, et al. Locally instructed CXCR4hi neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps. *Nat Immunol.* 2019;20(11).444–1455.
43. Raundhal M, Morse C, Khare A, Oriss TB, Milosevic J, Trudeau J, et al. High IFN- γ and low SLP mark severe asthma in mice and humans. *J Clin Invest.*2015;125(8):3037–50.
44. Barrios VE, Jarosinski MA, Wright CD. Proteinase-activated receptor-2 mediates hyperresponsiveness in isolated Guinea pig bronchi. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(3):519–25.
45. Gauthier M, Chakraborty K, Oriss TB, Raundhal M, Das S, Chen J, et al. Severe asthma in humans and mouse model suggests a CXCL10 signature underlies corticosteroid-resistant Th1 bias. *JCI Insight.*2017;2(13):e94580.
46. Samitas K, Zervas E, Gaga M. T2- low asthma: current approach to diagnosis and therapy. *Curr Opin Pulm Med.*2017;23(1):48-5.
47. Luo W, Hu J, Xu W, Dong J. Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma. *Front Immunol.*2022;13:974066.
48. Ray A, Camiolo M, Fitzpatrick A, Gauthier M, Wenzel SE. Are We Meeting the Promise of Endotypes and Precision Medicine in Asthma? *Physiol Rev.*2020;100(3):983-1017.
49. Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Robinson DS, Kay AB, Corrigan CJ. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial

- biopsies from- patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(5):1497-504.
50. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(3):1001-8.
 51. Maestrelli P, Sietta M, Di Stefano A, et al. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1926-3.
 52. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax.* 1992;47:25-9.
 53. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(2 Pt 1):308-17.
 54. Bakakos P, Schleich F, Alchanatis M, Louis R. Induced sputum in asthma: from bench to bedside. *Curr Med Chem.* 2011;18(10):1415-22.
 55. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanović R, Maestrelli P, Sterk PJ. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl.* 2002;37:3s-8s.
 56. Djukanović R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl.* 2002;37:1s-2s.
 57. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. *Respirology.* 2006;11(1):54–61.
 58. Simpson JL, McElduff P, Gibson PG. Assessment and reproducibility of non-eosinophilic asthma using induced sputum *Respiration.* 2010;79(2):147-51.
 59. Gibson PG. Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. *Clin Respir J.* 2009;3(4):198-206.
 60. van Veen IH, Ten Brinke A, Gauw SA, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Consistency of sputum eosinophilia in difficult-to-treat asthma: a 5-year follow-up study *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(3):615-7.
 61. Hancox RJ, Cowan DC, Aldridge RE, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, Town GI, Taylor DR. Asthma phenotypes: consistency of classification using induced sputum. *Respirology.* 2012;17(3):461-6.
 62. Hargreave FE. Induced sputum for the investigation of airway inflammation: evidence for its clinical application. *Can Respir J.* 1999;6(2):169-74.
 63. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360(9347):1715-21.
 64. Petsky HL, Kynaston JA, Turner C, Li AM, Cates CJ, Lasserson TJ, Chang AB. Tailored interventions based on sputum eosinophils versus clinical symptoms for asthma in children and adults *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 A18;(2):CD005603.
 65. Abdo M, Pedersen F, Kirsten AM, Veith V, Biller H, Trinkmann F, von Mutius E, Kopp M, Hansen G, Rabe KF, Bahmer T, Watz H; ALLIANCE study group. Longitudinal

- Impact of Sputum Inflammatory Phenotypes on Small Airway Dysfunction and Disease Outcomes in Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.*2022;10(6):1545-1553.
66. Little SA, Chalmers GW, MacLeod KJ, McSharry C, Thomson NC. Non-invasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma. *Thorax.*2000;55(3):232-242.
 67. Wang W, Huang KW, Wu BM, Wang YJ, Wang C. Correlation of eosinophil counts in induced sputum and fractional concentration of exhaled nitric oxide and lung functions in patients with mild to moderate asthma. *Chin Med J.*2012;125(17):3157-60.
 68. Rosi E, Scano. Association of sputum parameters with clinical and functional measurements in asthma. *Thorax.*2000;55(3):235-8.
 69. Samter R, Beers RF. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy.* 1967;40:281-283.
 70. Wenzel S. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med.*2012;18(5):716-25.
 71. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, Wardlaw AJ, Green RH. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.*2008;178(3):218-224.
 72. Moore WC, Meyers RJ, Wenzel SE, Teague WG, Li H, D'Agostino R Jr, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.*2010;181(4):315-2.
 73. Wu W, Bleecker E, Moore W, Busse WW, Castro M, Chung KF, Calhoun WJ, Erzurum S, Gaston B, Israel E, Curran-Everett D, Wenzel SE. Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. *J Allergy Clin Immunol.*2014;133(5):1280-8.
 74. Lefaudeux D, De Meulder B, Loza MJ, Peffer N, Rowe A, Baribaud F, et al. U-BIOPRED clinical adult asthma clusters linked to a subset of sputum omics. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:1797-807.
 75. Yan X, Chu JH, Gomez J, Koenigs M, Holm C, He X, et al. Non invasive analysis of the sputum transcriptome discriminates clinical phenotypes of asthma. *Ann Am Thorac Soc.*2016;13:S104.
 76. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes in adult asthma: moving toward precision medicine. *J Allergy Clin Immunol.*2019;144:1-12.
 77. Salter B, Lacy P, Mukherjee M. Biologics in asthma: a molecular perspective to precision medicine. *Front Pharmacol.*2022;12:793409.
 78. Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharm Ther.*2001;69:89.
 79. Vijverberg SJ, Hilvering B, Raaijmakers JA, Lammers JW, Maitland-van der Zee AH, Koenderman L. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. *Biologics.* 2013;7:199-210.
 80. Fathy JV. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol.*2015;15:57-65.
 81. Fattouh R, Al-Garawi A, Fattouh M, Arias K, Walker TD, Goncharova S, et al. Eosinophils are dispensable for allergic remodeling and immunity in a model of house dust mite-induced airway disease. *Am J Resp Crit Care Med.*2011;183:179-88.
 82. Crespo-Lessmann A, Curto E, Mateus Medina EF, Palones E, Belda Soler A, Sánchez Maza S, Soto-Retes L, Plaza V. Characteristics of Induced-Sputum Inflammatory

- Phenotypes in Adults with Asthma: Predictors of Bronchial Eosinophilia. *J Asthma Allergy*.2023.19;16:95-10.
83. Westerhof GA, Korevaar DA, Amelink M, de Nijs SB, de Groot JC, Wang J, Weersink EJ, ten Brinke A, Bossuyt PM, Bel EH. Biomarkers to identify sputum eosinophilia in different adult asthma phenotypes. *Eur Respir J*.2015;46(3):688-96.
 84. Wagener AH, De Nijs SB, Lutter R, Sousa AR, Weersink EJ, Bel EH, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax*.2015;70:115–20.
 85. Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: Predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med*.2013;13:11.
 86. Yap E, Chua WM, Layaram L, Zeng I, Vandal AC et Garrett J. Can we predict sputum eosinophila from clinical assessment in patients referred to an adult asthma clinic? *Intern Med J*.2013;43(1):46-52.
 87. Berry M, Morgan A, Shaw DE. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non eosinophilic asthma *Thorax*.2007;62(12):1043-9.
 88. Price DB, Rigazio A, Campbell JD, Bleecker ER, Corrigan CJ, Thomas M, et al. Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: a UK cohort study. *Lancet Respir Med*.2015;3:849-58.
 89. Peters MC, Mauger D, Ross KR, Phillips B, Gaston B, Cardet JC, et al. Evidence for Exacerbation-Prone Asthma and Predictive Biomarkers of Exacerbation Frequency. *Am J Respir Crit Care Med*.2020;202(7):973-982.
 90. Holguin F, Cardet JC, Chung KF, Diver S, Ferreira DS, Fitzpatrick A, Gaga M, Kellermeyer L, Khurana S, Knight S, McDonald VM, Morgan RL, Ortega VE, Rigau D, Subbarao P, Tonia T, Adcock IM, Bleecker ER, Brightling C, Boulet LP, Cabana M, Castro M, Chanez P, Custovic A, Djukanovic R, Frey U, Frankemölle B, Gibson P, Hamerlijnck D, Jarjour N, Konno S, Shen H, Vitary C, Bush A. Management of severe asthma: a European Respiratory Society/American Thoracic Society guideline *Eur Respir J*.2020;55(1):1900588.
 91. Li H, Zhang Q, Wang J, Gao S, Li C, Wang J, Zhang S, Lin J. Variability of Type 2 inflammatory markers guiding biologic therapy of severe asthma: A 5-year retrospective study from a single tertiary hospital. *World Allergy Organ J*. 2021;14(9):100547.
 92. Guida G, Bagnasco D, Carriero V, Bertolini F, Ricciardolo FLM, Nicola S, et al. Critical evolution of asthma biomarkers in clinical practice. *Front Med (Lausanne)*. 2022;10:9:969243.
 93. Guo FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, Calhoun W, Erzurum SC. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol*. 2000;164:5970–5980.
 94. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med*.2011;184:602–15.
 95. Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy*.2005;35:1175–9.

96. Demarche S, Schleich F, Henket M, Paulus V, Van Hees T, Louis R. Detailed analysis of sputum and systemic inflammation in asthma phenotypes: are paucigranulocytic asthmatics really non-inflammatory? *BMC Pulm Med.*2016;5;16:46.
97. Petsky HL, Cates CJ, Kew KM, Chang AB. Tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils): a systematic review and meta-analysis. *Thorax.*2018;73(12):1110-1119.
98. Fitzpatrick AM. Biomarkers of asthma and allergic airway diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol.*2015;115:335–340.
99. Karrasch S, Linde K, Rücker G, Sommer H, Karsch-Völk M, Kleijnen J, Jörres RA, Schneider A. Accuracy of FeNO for diagnosing asthma: a systematic review. *Thorax.* 2017;72(2):109-11.
100. Matsunaga K, Hirano T, Oka A, Ito K, Edakuni N. Persistently high exhaled nitric oxide and loss of lung function in controlled asthma. *Allergol Int.*2016;65(3):266-71.
101. Loewenthal L, Menzies-Gow A. FeNo in asthma. *Semin Respir Crit Care Med.* 2022;43(5):635-645.
102. Rabe KF, Nair P, Brusselle G, Maspero JF, Castro M, Sher L, Zhu H, Hamilton JD, Swanson BN, Khan A, Chao J, Staudinger H, Pirozzi G, Antoni C, Amin N, Ruddy M, Akinlade B, Graham NMH, Stahl N, Yancopoulos GD, Teper A. Efficacy and Safety of Dupilumab in Glucocorticoid-Dependent Severe Asthma. *N Engl J Med.* 2018 J28;378(26):2475-248.
103. Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fathy JV, Hamilton RG, Hunt JF, Kita H, Liu AH, Panettieri RA Jr, Schleimer RP, Minnicozzi M. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.*2012;129:S9-23.
104. Demarche SF, Schleich FN, Paulus VA, Henket MA, Van Hees TJ, Louis RE. Is it possible to claim or refute sputum eosinophils $\geq 3\%$ in asthmatics with sufficient accuracy using biomarkers? *Respir Res.*2017;18(1):133.
105. Gibson PG, Reddel H, McDonald VM, Marks G, Jenkins C, Gillman A, Upham J, Sutherland M, Rimmer J, Thien F, Katsoulotos GP, Cook M, Yang I, Katelaris C, Bowler S, Langton D, Robinson P, Wright C, Yozghatlian V, Burgess S, Sivakumaran P, Jaffe A, Bowden J, Wark PA, Yan KY, Kritikos V, Peters M, Hew M, Aminazad A, Bint M, Guo M. Effectiveness and response predictors of omalizumab in a severe allergic asthma population with a high prevalence of comorbidities: the Australian Xolair Registry. *Intern Med J.*2016.46:1054–62.
106. Li B, Huang M, Huang S, Zeng X, Yuan Y, Peng X, Zhao W, Ye Y, Yu C, Liu L, Ou C, Cai S, Zhao H. Prediction of clinical response to omalizumab in moderate-to-severe asthma patients using the change in total serum IgE level. *J Thorac Dis.* 2020;12(12):7097-7105.
107. Li Y, Li X, Zhang B, Yu Q, Lu Y. Predictive biomarkers for response to omalizumab in patients with severe allergic asthma: a meta-analysis. *Expert Rev Respir Med.* 2022;16(9):1023-1033.
108. Peters MC, Mekonnen ZK, Yuan S, Bhakta NR, Woodruff PG, Fahy JV. Measures of gene expression in sputum cells can identify T2-high and T2-low subtypes of asthma. *J Allergy Clin Immunol.*2014;133:388–394.
109. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, Kerr S, Woodruff PG, Hou L, Muller SJ, Fahy JV. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2010;107:14170–14175.

110. James A, Janson C, Malinovschi A, Holweg C, Alving K, Ono J, Ohta S, Ek A, Middelveld R, Dahlén B, Forsberg B, Izuhara K, Dahlén SE. Serum periostin relates to type-2 inflammation and lung function in asthma: Data from the large population-based cohort Swedish GA(2)LEN. *Allergy*.2017;72(11):1753-1760.
111. Matsumoto H. Roles of Periostin in Asthma. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1132:145-159.
112. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, Shikotra A, Carter R, Audusseau S, Hamid Q, Bradding P, Fahy JV, Woodruff PG, Harris JM, Arron JR. Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma (BOBCAT) Study Group. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(3):647-65.
113. Takahashi K, Meguro K, Kawashima H, Kashiwakuma D, Kagami SI, Ohta S, Ono J, Izuhara K, Iwamoto I. J Asthma. Serum periostin levels serve as a biomarker for both eosinophilic airway inflammation and fixed airflow limitation in well-controlled asthmatics.2019;56(3):236-243.
114. Nagasaki T, Matsumoto H, Kanemitsu Y, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Integrating longitudinal information on pulmonary function and inflammation using asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*.2014;133(5):1474-7.
115. Bobolea I, Guillén-Vera D, De Las Cuevas-Moreno N, García-Granero DB, Loli-Ausejo D, Melero-Moreno C. Molecular T2 asthma phenotypes are stable but heterogeneous: the usefulness of periostin for endotyping. *Front Allergy*. 2023;4:1205115.
116. Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Volkmann B, Hagenberg A, Geldmacher H, Braun A, Krug N. Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(6):1319-27.
117. Jia L, Wang Y, Li J, Li S, Zhang Y, Shen J, Tan W, Wu C. Detection of IL-9 producing T cells in the PBMCs of allergic asthmatic patients. *BMC Immunol*. 2017;18(1):38.
118. Wang W, Cheng ZS, Chen YF, Lin YH. Increased circulating IL-9-producing CD8⁺ T cells are associated with eosinophilia and high FeNO in allergic asthmatics. *Exp Ther Med*.2016;12(6):4055-4060.
119. Parker JM, Oh CK, LaForce C, Miller SD, Pearlman DS, Le C, Robbie GJ, White WI, White B, Molfino NA; MEDI-528 Clinical Trials Group. Safety profile and clinical activity of multiple subcutaneous doses of MEDI-528, a humanized anti-interleukin-9 monoclonal antibody, in two randomized phase 2a studies in subjects with asthma. *BMC Pulm Med*.2011;11:14.
120. Oh CK, Leigh R, McLaurin KK, Kim K, Hultquist M, Molfino NA. A randomized, controlled trial to evaluate the effect of an anti-interleukin-9 monoclonal antibody in adults with uncontrolled asthma. *Respir Res*.2013;14:93.
121. Doherty TA, Broide DH. Insights into the biology of IL-9 in asthma. *J Allergy Clin Immunol*.2022;150(3):585-586.

122. Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, Johnston SL. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*2005;171(3):224-3.
123. Seys SF, Grabowski M, Adriaensen W, Decraene A, Dilissen E, Vanoirbeek JA, Dupont LJ, Ceuppens JL, Bullens DM. Sputum cytokine mapping reveals an “IL-5, IL-17A, IL-25-high” pattern associated with poorly controlled asthma. *Clin Exp Allergy* 2013;43:1009–1017.
124. Tsiologianni Z, Hillas G, Bakakos P, Aggelakis L, Konstantellou E, Papaioannou AI, Papaporfyriou A, Papiris S, Koulouris N, Loukides S, Kostikas K. Sputum interleukin-13 as a biomarker for the evaluation of asthma control. *Clin Exp Allergy.* 2016;46(7):923-31.
125. Rabea R, El-Gamal R, Fahmy EM, Taha HK, Bakr AO, Zaki ME, Elabbasy LM. Serum interleukin 33 levels and single nucleotide polymorphism rs1929992 in Egyptian patients with chronic asthma. *Egyptian J Immunol.*2021;28(4):264-271.
126. Zhao R, Shi Y, Liu N, Li B. Elevated levels of interleukin-33 are associated with asthma: A meta-analysis. *Immun Inflamm Dis.*2023;11(4):e842.
127. Tiotiu A. Biomarkers in asthma: state of the art. *Asthma Res Pract.*2018;4:10.
128. Bullone M, Carriero V, Bertolini F, Folino A, Mannelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Torchio R, Ricciardolo FLM. Elevated serum IgE, oral corticosteroid dependence and IL-17/22 expression in highly neutrophilic asthma. *Eur Respir J* 2019;54:1900068.
129. Gao W, Han GJ, Zhu YJ, Mao D, Hu H. Clinical characteristics and biomarkers analysis of asthma inflammatory phenotypes. *Biomark Med.*2020;14(3):211-222.
130. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Pagé N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *Clin Exp Allergy.*2013;43:1018-26.
131. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, Ceuppens JL. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res.*2006;7:135.
132. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemiere C, Hamid Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.*2009;123:1185-7.
133. Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respir Med.*2010;104:1131-7.
134. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, Ryan PH, Budelsky AL, Khurana Hershey GK. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.*2013;132:1194-1204.e2.
135. Wood LG, Baines KJ, Fu J, Scott HA, Gibson PG. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma. *Chest.*2012;142(1):86-9.
136. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest.*2001;119(5):1329-36.
137. Seys SF, Long MB The quest for biomarkers in asthma: challenging the T2 versus non-T2 paradigm. *Eur Respir J.*2022;59(2):210266.
138. Korevaar DA, Westerhof GA, Wang J, Cohen JF, Spijker R, Sterk PJ, Bel EH, Bossuyt PM. Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway

- eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med.*2015;3:290–300.
139. Comou H, Bel EH. Improving the diagnosis of eosinophilic asthma. *Expert Rev Respir Med.*2016;10(10):1093-1103.
 140. Larose MC, Chakir J, Archambault AS, Joubert P, Provost V, Laviolette M, Flamand N. Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: involvement in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol.*2015;136:904-13.
 141. Silkoff PE, Laviolette M, Singh D, FitzGerald JM, Kelsen S, Backer V, Porsbjerg CM, Girodet PO, Berger P, Kline JN, Chupp G, Susulic VS, Barnathan ES, Baribaud F, Loza MJ; Airways Disease Endotyping for Personalized Therapeutics (ADEPT) study investigators. Identification of airway mucosal type 2 inflammation by using clinical biomarkers in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.*2017;140:710–9.
 142. Han YY, Zhang X, Wang J, Wang G, Oliver BG, Zhang HP, Kang Y, Wang L, Qiu ZX, Li WM, Wang G. Multidimensional Assessment of Asthma Identifies Clinically Relevant Phenotype Overlap: A Cross-Sectional Study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(1):349-362.e1143.
 143. Pritchard DE, Moeckel F, Villa MS, Housman LT, McCarty CA, McLeod HL. Strategies for integrating personalized medicine into healthcare practice. *Per Med.* 2017;14:141–152.
 144. Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF Jr, Wardlaw AJ, Wenzel SE, Greenberger PA. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:355–360.
 145. Ferrando M, Bagnasco D, Varricchi G, Bernardi S, Bragantini A, Passalacqua G, Canonica GW. Personalized medicine in allergy. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017;9:15–24.
 146. Auffray C, Charron D, Hood L. Predictive, preventive, personalized and participatory medicine: back to the future. *Genome Med.*2010;2:57.
 147. Agusti A, Bel E, Thomas M, Vogelmeier C, Brusselle G, Holgate S, Humbert M, Jones P, Gibson PG, Vestbo J, Beasley R, Pavord ID. Treatable traits: toward precision medicine of chronic airway diseases. *Eur Respir J.*2016;47(2):410–419.
 148. Agusti A, Gibson PG, McDonald VM. Treatable Traits in Airway Disease: From Theory to Practice. *J Allergy Clin Immunol Pract.*2023;11(3):713-723.
 149. Melhorn J, Howell I, Pavord ID. Should we apply a treatable traits approach to asthma care? *Ann Allergy Asthma Immunol.*2022;128(4):390-397.
 150. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, Murray JJ, Pendergraft TB. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol.*2004;113:59–65.
 151. Juniper EF, Guyatt GH, Cox FM, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of the Mini Asthma Quality of Life Questionnaire. *Eur Respir J.*1999;14:32–38.
 152. Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, Sicherer S, Golden DB, Khan DA, Nicklas RA, Portnoy JM, Blessing-Moore J, Cox L, Lang DM, Oppenheimer J, Randolph CC, Schuller DE, Tilles SA, Wallace DV, Levetin E, Weber R; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of

- Allergy, Asthma and Immunology. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008;100(3 Suppl 3):S1-148.
153. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005;26(2):319-38.
 154. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(8):912-30.
 155. King GG, Bates J, Berger KI, Calverley P, de Melo PL, Dellaca RL, Farre R, Hall GL, Ioan I, Irvin CG, Kaczka DW, Kaminsky DA, Kurosawa H, Lombardi E, Maksym GN, Marchal F, Oppenheimer BW, Simpson SJ, Thamrin C, van den Berge M, Oostveen E. Technical standards for respiratory oscillometry. *Eur Respir J.* 2020;55:1900753.
 156. Schatz M, Camargo CA Jr. The relationship of sex to asthma prevalence, health care utilization, and medications in a large managed care organization. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;91(6):553-8.
 157. Shah R, Newcomb DC. Sex Bias in Asthma Prevalence and Pathogenesis. *Front Immunol.* 2018;18;9:2997.
 158. Chowdhury NU, Guntur VP, Newcomb DC, Wechsler ME. Sex and gender in asthma. *Eur Respir Rev.* 2021;30(162):210067.
 159. Thomson NC, Polosa R, Sin DD. Cigarette Smoking and Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022;10(11):2783-2.
 160. Stapleton M, Howard-Thompson A, George C, Hoover RM, Self TH. Smoking and asthma. *J Am Board Fam Med.* 2011;24(3):313-2.
 161. Balan I, Mahmood SN, Jaiswal R, Pleshkova Y, Manivannan D, Negit S, Shah V, Desai P, Akula NV, Nawaz MU, Gurram N, Tirupathi R, Patel U, Venkata VS. Prevalence of active and passive smoking among asthma and asthma-associated emergency admissions: a nationwide prevalence survey study. *J Investig Med.* 2023;71(7):730-741.
 162. Akinbami LJ, Fryar CD. Current Asthma Prevalence by Weight Status Among Adults: United States, 2001-2014. *NCHS Data Brief.* 2016;239:1-8.
 163. Shin YH, Hwang J, Kwon R, Lee SW, Kim MS. GBD 2019 Allergic Disorders Collaborators; Global, regional, and national burden of allergic disorders and their risk factors in 204 countries and territories, from 1990 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Allergy.* 2023;78(8):2232-2254.
 164. Peralta GP, Marcon A, Carsin AE, Abramson MJ, Accordini S, Amaral AF, Antó JM, Bowatte G, Burney P, Corsico A, Demoly P, Dharmage S, Forsberg B, Fuertes E, Garcia-Larsen V, Gíslason T, Gullón JA, Heinrich J, Holm M, Jarvis DL, Janson C, Jogi R, Johannessen A, Leynaert B, Rovira JM, Nowak D, Probst-Hensch N, Raheison C, Sánchez-Ramos JL, Sigsgaard T, Siroux V, Squillacioti G, Urrutia I, Weyler J, Zock JP, Garcia-Aymerich J. Body mass index and weight change are associated with adult lung function trajectories: the prospective ECRHS study. *Thorax.* 2020;75(4):313-320.
 165. Periyalil HA, Wood LG, Wright TA, Karihaloo C, Starkey MR, Miu AS, Baines KJ, Hansbro PM, Gibson PG. Obese asthmatics are characterized by altered adipose tissue macrophage activation. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(6):641-649.
 166. Rogliani P, Laitano R, Ora J, Beasley R, Calzetta L. Strength of association between comorbidities and asthma: a meta-analysis. *Eur Respir Rev.* 2023;32(167):22020.

167. Massoth L, Anderson C, McKinney KA. Asthma and chronic rhinosinusitis: diagnosis and medical management. *Med Sci (Basel)*.2019;7:53.
168. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Baena-Cagnani CE, Canonica GW, van Weel C, Agache I, Ait-Khaled N, Bachert C, Blaiss MS, Bonini S, Boulet LP, Bousquet PJ, Camargos P, Carlsen KH, Chen Y, Custovic A, Dahl R, Demoly P, Douagui H, Durham SR, van Wijk RG, Kalayci O, Kaliner MA, Kim YY, Kowalski ML, Kuna P, Le LT, Lemiere C, Li J, Lockey RF, Mavale-Manuel S, Meltzer EO, Mohammad Y, Mullol J, Naclerio R, O'Hehir RE, Ohta K, Ouedraogo S, Palkonen S, Papadopoulos N, Passalacqua G, Pawankar R, Popov TA, Rabe KF, Rosado-Pinto J, Scadding GK, Simons FE, Toskala E, Valovirta E, van Cauwenberge P, Wang DY, Wickman M, Yawn BP, Yorgancioglu A, Yusuf OM, Zar H, Annesi-Maesano I, Bateman ED, Ben Kheder A, Boakye DA, Bouchard J, Burney P, Busse WW, Chan-Yeung M, Chavannes NH, Chuchalin A, Dolen WK, Emuzyte R, Grouse L, Humbert M, Jackson C, Johnston SL, Keith PK, Kemp JP, Klossek JM, Larenas-Linnemann D, Lipworth B, Malo JL, Marshall GD, Naspitz C, Nekam K, Niggemann B, Nizankowska-Mogilnicka E, Okamoto Y, Orru MP, Potter P, Price D, Stoloff SW, Vandenplas O, Viegi G, Williams D; World Health Organization; GA(2)LEN; AllerGen. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA²LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63(Suppl86):8–16.
169. Bousquet J, Melén E, Haahtela T, Koppelman GH, Togias A, Valenta R, Akdis CA. Rhinitis associated with asthma is distinct from rhinitis alone: The ARIA-MeDALL hypothesis. *Allergy*.2023;78(5):1169-1203.
170. Ly NP, Celedón JC. Family history, environmental exposures in early life, and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*.2007;120(2):271-2.
171. Sheikh SI, Pitts J, Ryan-Wenger NA, McCoy KS, Hayes DJr. Environmental exposures and family history of asthma. *J Asthma*.2016;53(5):465-70.
172. Toppila-Salmi S, Chanoin S, Karjalainen J, Pekkanen J, Bousquet J, Siroux V. Risk of adult-onset asthma increases with the number of allergic multimorbidities and decreases with age. *Allergy*.2019;74(12):2406-2416.
173. Peden DB. Respiratory Health Effects of Air Pollutants. *Immunol Allergy Clin North Am*.2024;44(1):15-3.
174. Holtjer JCS, Bloemsma LD, Beijers RJHCG, Cornelissen MEB, Hilvering B, Houweling L, Vermeulen RCH, Downward GS, Maitland-Van der Zee AH. P4O2 consortium. Identifying risk factors for COPD and adult-onset asthma: an umbrella review. *Eur Respir Rev*.2023;32(168):230009.
175. Bronte-Moreno O, González-Barcala FJ, Muñoz-Gall X, Pueyo-Bastida A, Ramos-González J, Urrutia-Landa I. Impact of Air Pollution on Asthma: A Scoping Review. *Open Respir Arch*. 2023;5(2):100229.
176. Tomić-Spirić V, Kovačević G, Marinković J, Janković J, Ćirković A, Đerić AM, Relić N, Janković S. Sulfur dioxide and exacerbation of allergic respiratory diseases: A time-stratified case-crossover study. *J Res Med Sci*. 2021;29;26:109.
177. Pfeffer PE, Hawrylowicz CM. Vitamin D in Asthma: Mechanisms of Action and Considerations for Clinical Trials. *Chest*.2018;153(5):1229-1239.
178. Szymczak I, Pawliczak. Can vitamin D help in achieving asthma control? Vitamin D "revisited": An updated insight. *Adv Respir Med*.2018;86:103–109.

179. Tibrewal C, Modi NS, Bajoria PS, Dave PA, Rohit RK, Patel P, Gandhi SK, Gutlapalli SD, Gottlieb P, Nfonoyim J. Therapeutic Potential of Vitamin D in Management of Asthma: A Literature Review. *Cureus*.2023;15(7):e41956.
180. Blakey JD, Wardlaw AJ. What is severe asthma? *Clin Exp Allergy*. 2012; 42:617-624.
181. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, Chanez P, Enright PL, Gibson PG, de Jongste JC, Kerstjens HA, Lazarus SC, Levy ML, O'Byrne PM, Partridge MR, Pavord ID, Sears MR, Sterk PJ, Stoloff SW, Sullivan SD, Szefler SJ, Thomas MD, Wenzel SE; American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med*.2009;180(1):59-9.
182. Coşkun O, Ercan N, Bostanci I. The peripheral blood inflammatory patterns in the control levels of asthma in children. *J Asthma*. 2021;58(3):299-306.
183. Zhang XY, Simpson JL, Powell H, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, Jenkins C, Peters MJ, Lin JT, Gibson PG. Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clin Exp Allergy*.2014;44(9):1137-4.
184. Canonica GW, Spanevello A, de Llano LP, Domingo Ribas C, Blakey JD, Garcia G, Inoue H, Dalcolmo M, Yang D, Mokashi S, Kurne A, Butta AK. Is asthma control more than just an absence of symptoms? An expert consensus statement. *Respir Med*. 2022 ;202:106942.
185. Ntontsi P, Loukides S, Bakakos P, Kostikas K, Papatheodorou G, Papathanassiou E, Hillas G, Koulouris N, Papiris S, Papaioannou AI. Clinical, functional and inflammatory characteristics in patients with paucigranulocytic stable asthma: Comparison with different sputum phenotypes. *Allergy*.2017;72(11):1761-1767.
186. Suárez-Cuartín G, Crespo A, Mateus E, Torrejón M, Giner J, Belda A, Ramos-Barbón D, Torrego A, Plaza V. Variability in Asthma Inflammatory Phenotype in Induced Sputum. Frequency and Causes. *Arch Bronconeumol*.2016;52(2):76-8.
187. Feng Y, Liu X, Wang Y, Du R, Mao H. Delineating asthma according to inflammation phenotypes with a focus on paucigranulocytic asthma. *Chin Med J (Engl)*. 2023 5;136(13):1513-1522.
188. Cottini M, Lombardi C, Passalacqua G, Bagnasco D, Berti A, Comberiati P, Imeri G, Landi M, Heffler E. Small Airways: The "Silent Zone" of 2021 GINA Report? *Front Med (Lausanne)*.2022; 23;9:884679.
189. Postma DS, Brightling C, Baldi S, Van den Berge M, Fabbri LM, Gagnatelli A, Papi A, Van der Molen T, Rabe KF, Siddiqui S, Singh D, Nicolini G, Kraft M; ATLANTIS study group Exploring the relevance and extent of small airways dysfunction in asthma (ATLANTIS): baseline data from a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*.2019;7(5):402-416.
190. Cottini M, Bondi B, Bagnasco D, Braidò F, Passalacqua G, Licini A, Lombardi C, Berti A, Comberiati P, Landi M, Heffler E, Paoletti G. Impulse oscillometry defined small airway dysfunction in asthmatic patients with normal spirometry: Prevalence, clinical associations, and impact on asthma control. *Respir Med*.2023;218:107391.
191. Marseglia GL, Cirillo I, Vizzaccaro A, Klersy C, Tosca MA, La Rosa M, Marseglia A, Licari A, Leone M, Ciprandi G. Role of forced expiratory flow at 25–75% as an early

- marker of small airway impairment in subjects with allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.*2007;28:74–78.
192. Cirillo I, Klersy C, Marseglia GL, Vizzaccaro A, Pallestrini E, Tosca M, Ciprandi G. Role of FEF 25%–75% as a predictor of bronchial hyperreactivity in allergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.*2006;96:692–700.
 193. Calzetta L, Aiello M, Frizzelli A, Bertorelli G, Chetta A. Small airways in asthma: from bench-to bedside. *Minerva Med.*2022;113(1):79-93.
 194. Hastie AT, Moore WC, Li H, Rector BM, Ortega VE, Pascual RM, Peters SP, Meyers DA, Bleecker ER; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Biomarker surrogates do not accurately predict sputum eosinophil and neutrophil percentages in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(1):72-80.
 195. Caballero ML, Dominguez-Ortega J, Nin-Valencia AR, Sánchez-Ocando H, Barranco P. Eosinophil count could be more sensitive in induced sputum than in peripheral blood for phenotyping of patients with severe eosinophilic asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.*2021;31:360–36.
 196. Dimitrova D, Youroukova V, Ivanova-Todorova E, Tumangelova-Yuzeir K, Velikova. Serum levels of IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 and IL-17A in pre-defined groups of adult patients with moderate and severe bronchial asthma. *Respir Med.*2019;154:144-154.
 197. Couillard S, Shrimanker R, Chaudhuri R, Mansur AH, McGarvey LP, Heaney LG, Fowler SJ, Bradding P, Pavord ID, Hinks TSC. Fractional exhaled nitric oxide non suppression identifies corticosteroid-resistant type 2 signaling in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021;204(06):731–734.
 198. Ciólkowski J, Emeryk A, Hydzik P, Emeryk-Maksymiuk J, Kosmala E, Stasiowska B. Eosinophilic airway inflammation is a main feature of unstable asthma in adolescents. *Respir Med.*2019;147:7-12.
 199. Shimoda T, Obase Y, Kishikawa R, Iwanaga T. Serum high-sensitivity C-reactive protein can be an airway inflammation predictor in bronchial asthma. *Allergy Asthma Proc.*2015;36(2):e23-8.
 200. Ali H, Douwes J, Burmanje J, Gokhale P, Crane J, Pattemore P, Stanley T, Keenan J, Brooks C. Sputum inflammatory, neural, and remodeling mediators in eosinophilic and noneosinophilic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.*2023;130(6):776-783.
 201. Gibson PG, Foster PS. Neutrophilic asthma: welcome back! *Eur Respir J.* 2019;54(5):1901846.
 202. Hastie AT, Moore WC, Meyers DA, Vestal PL, Li H, Peters SP, Bleecker ER; National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J Allergy Clin Immunol.*2010;125(5):1028-1036.
 203. Deng K, Zhang X, Liu Y, Zhang L, Wang G, Feng M, Oliver BG, Wang L, Hansbro PM, Qin L, Xie M, Chen ZH, Simpson J, Zhang J, Li WM, Wang G, Gibson PG. Heterogeneity of Paucigranulocytic Asthma: A Prospective Cohort Study with Hierarchical Cluster Analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract.*2021;9(6):2344-2355.
 204. Shi B, Li W, Dong H, Xu M, Hao Y, Gao P. Distribution of inflammatory phenotypes among patients with asthma in Jilin Province, China: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med.*2021;21(1):364.

205. Schleich F, Brusselle G, Louis R, Vandenplas O, Michils A, Pilette C, Peche R, Manise M, Joos G. Heterogeneity of phenotypes in severe asthmatics. The Belgian Severe Asthma Registry (BSAR). *Respir Med.*2014;108(12):1723-32.
206. Brisk R, Heaney LG. Asthma control and exacerbations: two different sides of the same coin. *Curr OpinPulm Med.*2016;22(1):32-7.
207. Pitre T, Jassal T, Angjeli A, Jarabana V, Nannapaneni S, Umair A, Hussain M, Leung G, Kirsh S, Su J, Desai K, Coyne J, Mohan S, Zeraatkar D. A comparison of the effectiveness of biologic therapies for asthma: A systemic review and network meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol.*2023;130(5):595-606.
208. Solidoro P, Nicola S, Ridolfi I, Canonica GW, Blasi F, Paggiaro P, Heffler E, Bagnasco D, Patrucco F, Ribolla F, Bucca C, Rolla G, Albera C, Brussino L. Biologics in Severe Eosinophilic Asthma: Three-Year Follow-Up in a SANI Single Center. *Biomedicines.* 2022;10(2):200.
209. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M, Liotta F, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol.*2010;125(1):222-30.
210. Ervin C, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska MM, Martin RJ, Alam R. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.*2014;134: 1175-86.
211. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1023-3.
212. Hasegawa T, Uga H, Mori A, Kurata H. Increased serum IL-17A and Th2 cytokine levels in patients with severe uncontrolled asthma. *Eur Cytokine Netw.* 2017;28:8–18.
213. Wang YH, Voo KS, Liu B, Chen CY, Uygungil B, Spoede W, Bernstein JA, Huston DP, Liu YJ. A novel subset of CD4(+) T(H)2memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med.*2010;207:2479-91.
214. Pouliquen IJ, Kornmann O, Barton SV, Price JA, Ortega HG. Characterization of the relationship between dose and blood eosinophil response following subcutaneous administration of mepolizumab. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2015;53(12):1015–27.
215. Tsukamoto N, Takahashi N, Itoh H, Pouliquen I. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mepolizumab, an anti-interleukin 5 monoclonal antibody, in healthy Japanese male subjects. *Clin Pharmacol Drug Dev.*2016;5(2):102–8.
216. Pham TH, Damera G, Newbold P, Ranade K. Reductions in eosinophil biomarkers by benralizumab in patients with asthma. *Respir Med.*2016;111:21–9.
217. Caminati M, Marcon A, Guarnieri G, Miotti J, Bagnasco D, Carpagnano GE, Pelaia G, Vaia R, Maule M, Vianello A, Senna G. Benralizumab Efficacy in Late Non-Responders to Mepolizumab and Variables Associated with Occurrence of Switching: A Real-World Perspective *J Clin Med.*2023;12(5):1836.

Lista skraćenica korišćenih u tekstu:

GINA-globalna inicijative za astmu (engl. Global Initiative for Asthma)

APC-antigen prezentujuće ćelije (engl. antigen presenting cells-APC)

DC- dendritske ćelije

FcεRI -visokoafinitetni receptor za IgE

ICAM-1-intraćelijski adenzivni molekul 1 (engl. intercellular adhesion molecule)

VCAM- vaskularni ćelijski adhezivni molekul (engl. vascular cell adhesion molecule)

MBP- glavni bazni protein (engl. major binding protein)

EPO- eozinofilna peroksidaza

ECP- eozinofilni katjonski protein

EDN- neurotoksin poreklom iz eozinofila (engl. eosinophil-derived neurotoxin)

TNFα -tumor nekroze alpha

TGF-β -transformišući faktor rasta beta (engl.transforming growth factor beta)

CLC – Šarko- Lajden kristali (engl.Charcot-Leyden crystals)

ILC2-limfoidne ćelije tipa 2 (engl. innate lymphoid cell)

TSLP- timusni stromalni limfopoetin (engl. thymic stromal lymphopoetin)

ST2-supresor tumorogeneze (engl. suppression of tumorigenicity)

IL-1RAcP-pomoćni receptorski protein za IL-1 (engl. IL-1 receptor accessory protein)

IRAK -IL-1 receptor asocirane kinase (engl. IL-1R-associated kinase)

TLR-receptori sličnih Toll-u (engl. toll-like receptors)

PAR-proteaza aktivirani receptori (engl. protease activated receptors)

CFGM -faktor stimulacije granulocita- makrofaga (engl. colony-stimulating factor granulocyte- macrophage)

CLCA1-regulator hloridnih kanala 1 (engl.chloride channel regulator 1)

PRR-receptori prepoznavanja obrazaca (engl. pattern recognition receptors)

DAMP-molekulski obrasci oštećenja (engl. danger associated molecular patterns)

PAMS-molekulski obrasci patogena (engl. pathogen associated molecular patterns)

NLRP-receptori slični NODu (engl. NOD -like receptors)

IFN-γ interferon gama

SLPI- sekretorni inhibitor leukocitarne proteaze (engl. secretory leukocyte protease inhibitor)

mRNA-messenger RNA

BAL-bronhoalveolarni lavat

ERS-Evropsko respiratorno udruženje (engl. European Respiratory Society)

IKS- inhalacioni kortikosteroidi

BTS- Britansko torakalno udruženje (engl. British Thoracic Society -BTS)

IKS/LABA- inhalacioni kortikosteroidi /dugodelujući beta 2 agonisti

FeNO- frakcija izdahnutog azot oksida (engl. fractional exhaled nitric oxide)

BMI- indeks telesne mase (engl. body mass index)

PEF- vršni ekspiratorni protok

FEV1-forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi

FEV1/FVC- forsirani ekspirijumski volumen u 1. sekundi/forsirani vitalni kapacitet

ACQ- upitnika za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire)

ATS- Američko respiratorno društvo (engl. American Respiratory Society)

ppb- delovi na milijardu (engl. parts per billion)

AQLQ- astma upitnik o kvalitetu života (engl. Asthma quality of life Questionnaire)

NSAIL- nesteroidni antiinflamatorni lekovi

LABA- dugo delujući beta 2 agonisti (engl. long-acting beta 2 agonist)

LAMA- dugo delujući muskarinski antagonisti (engl. long-acting muscarinic antagonists)

LTRA- antagonisti receptora leukotrijena (engl. leukotriene receptor antagonist)

SABA- krakodelujući beta 2 agonisti (engl. short acting beta 2 agonist)

ACT- test o kontroli astme (engl. Asthma control test- ACT)

IOS- impulsna oscilometrija

CRP- C reaktivni protein

IgE- Imunoglobulin E

IL-5- Interleukin-5

IL-6- Intreleukin- 6

IL-8- Interleukin-8

IL-17A- Interleukin-17A

IL-33- Interleukin-33

FVC- forsirani vitalni kapacitet

VC- vitalni kapacitet

MEF25- srednji ekspiratorni protok vazduha pri 25% VC

MEF50- srednji ekspiratorni protok vazduha pri 50%VC

MEF75- srednji ekspiratorni protok vazduha pri 75% VC

MMEF- srednji-maksimalni ekspiratorni protok vazduha

EA- eozinofilna astma

NA- neutrofilna astma

MGA- mešovita granulocitna astma

PGA- paucigranulocitna astma

ELISA- test enzimskog imunoeeseja (engl. enzyme linked immunoabsorbent test)

Spisak publikovanih radova proisteklih iz rada na doktorskoj disertaciji:

1. Plavsic A, Nikolic BB, Milenkovic B, Miskovic R, Kusic N, Dimitrijevic M, Arandjelovic S, Milosevic K, Buha I, Spiric VT. **Asthma inflammatory Phenotypes: How Can We Distingiush Them?** J Clin Med. 2024 ;13(2):526. doi: 10.3390/jcm13020526. M22, IF 3.9

2. Plavšić A, Tomić Spirić V. **Biomarkeri u inflamatornim fenotipovima astme.** Medicinski podmladak.2024, 75(4)./doi.org/10.5937/mp75-47473 ; M52

Biografija

Dr Aleksandra Plavšić rođena je 14.05.1976.godine, u Novom Pazaru. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1995. godine, a završila 2002. godine sa prosečnom ocenom 8.66.

Od maja 2007. godine zaposlena je u Klinici za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Jula 2011. godine odbranila je završni rad specijalističkih akademskih studija iz oblasti imunologije pod nazivom "Antifosfolipidni sindrom u sistemskom eritemskom lupusu: patofiziološki mehanizmi, kliničke manifestacije i terapijski pristup" (mentor Prof. dr Sanvila Rašković). Januara 2014. godine položila specijalistički ispit iz interne medicine, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu (ocena odličan). U zvanje kliničkog asistenta za užu naučnu oblast interna medicina-alergologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu izabrana je aprila 2016. godine. Doktorske studije iz oblasti Zapaljenje i autoimunost je upisala školske 2016/2017. godine. Rad uže specijalizacije iz alergologije i kliničke imunologije pod naslovom " Klinički značaj biomarkera koagulacije u hroničnoj urtikariji " je odbranila 2018. godine (mentor Prof.dr Aleksandra Perić Popadić).

Kao predavač je učestvovala na više domaćih simpozijuma i domaćih kongresa sa međunarodnim učešćem, kao i na inostranim kongresima. Kao istraživač i koordinator učestvuje u izvođenju kliničkih studija.

Autor je 20 stručno-naučnih radova publikovanih in extenso i preko 40 izvoda u zbornicima sa međunarodnih i domaći sastanaka.

Član je Srpskog lekarskog društva, sekcije za alergologiju i kliničku imunologiju, Udruženja alergologa i kliničkih imunologa, Društva imunologa Srbije, kao i većeg broja međunarodnih udruženja – EAACI, SLEuro.

Aktivno se koristi engleskim i grčkim jezikom.

Prilog 1.

Test o kontroli astme (ACT), preuzeto i adaptirano prema referenci 150

Zaokružite broj pored odgovora za svako pitanje. Molimo Vas da odgovarate što iskrenije možete.

1. U protekle 4 nedelje koliko često Vas je astma ometala u obavljanju uobičajenih aktivnosti u poslu, školi ili u kući?

Uvek	1
Vrlo često	2
Povremeno	3
Retko	4
Nikada	5

2. U protekle 4 nedelje koliko često Vam je nedostajao dah?

Češće od jednom	1
Jednom dnevno	2
3 do 6 puta nedeljno	3
Jednom ili 2puta nedeljno	4
Nikada	5

3. U protekle 4 nedelje, koliko često su Vaši simptomi astme (šištanje u grudima, kašalj, nedostatak vazduha, stezanje u grudima ili bol u grudima), budili noću ili ujutru, ranije nego obično?

Četiri ili više noći nedeljno	1
Dve to tri noći nedeljno	2
Jednom nedeljno	3
Jednom ili 2 puta nedeljno	4
Nikada	5

4. U protekle 4 nedelje, koliko često Vam je bila potrebna pumpica za otklanajnje simptoma (kao na primer Ventolin) ili aparat za inhalaciju?

Tri ili više puta dnevno	1
Jednom ili dva puta dnevno	2
2 ili 3 puta nedeljno	3
Jednom nedeljno ili ređe	4
Nikada	5

5. Kako biste ocenili kontrolu Vaše astme u poslednje 4 nedelje?

Uopšte nije kontrolisana	1
Slabo kontrolisna	2
Donekle kontrolisna	3
Dobro kontrolisna	4
Kontrolisna u potpunosti	5

Prilog 2.

Upitnik o kontroli astme (ACQ), preuzeto i adaptirano prema referenci 151

<i>Molimo Vas da odgovorite na pitanja od 1 do 6</i>		
<i>Zaokružite broj odgovora koji najbolje opisuje kako ste se osećali tokom prošlih 7 dana</i>		
1.	U proseku, tokom prošlih 7 dana, koliko često se se budili tokom noći zbog Vaše astme?	0-nikada 1-skoro nikada 2-retko 3-nekoliko puta 4-prilično često 5-vrlo često 6-nisam mogao/la da spavam zbog astme
2.	U proseku, tokom prošlih 7 dana, koliko su jaki bili simptomi Vaše astme kada ste se budili ujutru?	0-bez simptoma 1-vrlo blagi simptomi 2- blagi simptomi 3-umereni simptomi 4-prilično jaki simptomi 5-jaki simptomi 6-vrlo jaki simptomi
3.	U proseku, tokom prošlih 7 dana, koliko je Vaša astma ograničavala Vaše aktivnosti?	0-nimalo ograničen 1-vrlo malo ograničen 2-malo ograničen 3-umereno ograničen 4-vrlo ograničen 5-izrazito ograničen 6-potpuno ograničen
4.	U proseku, tokom prošlih 7 dana, koliko jako ste, zbog Vaše astme, osećali nedostatak daha?	0-nimalo 1-vrlo malo 2-malo 3-umereno 4-prilično 5-mnogo 6-veoma mnogo
5.	U proseku, tokom prošlih 7 dana, koliko vremena ste šišтали?	0-nikada 1-vrlo retko 2-malo vremena 3-poneki deo vremena 4-dobar deo vremena 5-najveći deo vremena 6-sve vreme
6.	U proseku, tokom prošlih 7 dana, koliko udaha/inhalacija inhalacionog bronhodilatatora sa	0 -nijedan 1 - 1do 2 udaha/inhalacija svakog dana

	kratkim delovanjem (Ventolin,Berodual) ste koristili svakoga dana?	2 -3 do 4 udaha/inhalacija svakog dana 3 -5 do 8 udaha/inhalacija svakog dana 4 -9 do12 udaha/inhalacija svakog dana 5 -13 do16 udaha/inhalacija svakog dana 6 – više od 16 udaha/inhalacija svakog dana
--	---	--

Prilog 3.

GINA upitnik o kontroli simptoma, preuzeto i adaptirano prema referenci 3

U poslednje 4 nedelje da li je pacijent imao

- | | |
|---|-------|
| 1. dnevne simptome više od 2 puta nedeljno | da ne |
| 2. noćna budjenja zbog astme | da ne |
| 3. upotrebu rilivera više od 2 puta nedeljeno | da ne |
| 4. limitiranu aktivnost zbog astme | da ne |

* 0-dobro kontrolisana 1-2 da: delimično 3-4: nekontrolisana

Prilog 4.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра Плавшић

Број индекса 5085/2016

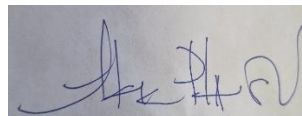
Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“ Значај интерлеукина-5, интерлеукина -17, интерлеукина-33, периостина и фракције издахнутог азот монооксида као биомаркера у процени фенотипова у бронхијалној астми“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора



У Београду, 22.01.2024.

Prilog 5.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Александра Плавшић
Број индекса 5085 /2016
Студијски програм Запаљење и аутоимуност

Наслов рада “ **Значај интерлеукина-5, интерлеукина -17, интерлеукина-33, периостина и фракције издахнутог азот монооксида као биомаркера у процени фенотипова у бронхијалној астми**“

Ментори: Проф. др Весна Томић Спирић

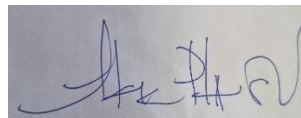
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 22.01.2024.



Prilog 6

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: “ “ **Значај интерлеукина-5, интерлеукина -17, интерлеукина-33, периостина и фракције издахнутог азот монооксида као биомаркера у процени фенотипова у бронхијалној астми**“ ”

која је моје ауторско дело.

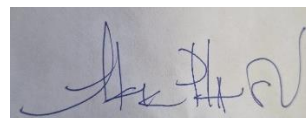
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора



У Београду, 22.01.2024.

