

Eozinofilų β grandinės citokinų receptorių ir integrinų raiška bei bronchų epitelio pažeidimo žymenų reikšmė sergant 2-ojo tipo astma

EXPRESSION OF EOSINOPHIL β CHAIN-SIGNALING CYTOKINES RECEPTORS AND INTEGRINS, THE VALUE OF BRONCHIAL EPITHELIAL INJURY MARKERS IN TYPE 2 ASTHMA

VIRGINIJA KALINAUSKAITĖ-ŽUKAUSKĖ
LSMU MA Pulmonologijos klinika

2020 m. vasario 20 d. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos viešajame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje Virginija Kalinauskaitė-Žukauskė sėkmingai apgynė daktaro mokslo laipsnio disertaciją „Eozinofilų β grandinės citokinų receptorių ir integrinų raiška bei bronchų epitelio pažeidimo žymenų reikšmė sergant 2-ojo tipo astma“. Disertacija rengta 2014–2019 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Pulmonologijos klinikoje. Straipsnyje pateikiami esminiai disertacijos rezultatai.

Mokslinis vadovas: prof. dr. Kęstutis Malakauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas)

Disertacijos gynimo taryba: prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė, pirmininkė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas)

prof. dr. Vilmantė Borutė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas)

prof. dr. Rimantas Daugelavičius (Vytauto Didžiojo universitetas)

prof. dr. Laura Malinauskienė (Vilniaus universitetas)

prof. dr. Marc Humbert (Pietų Paryžiaus universitetas)

Virginija Kalinauskaitė-Žukauskė successfully defended her doctoral dissertation “Expression of eosinophil β chain-signaling cytokines, receptors and integrins, the value of bronchial epithelial injury markers in type 2 asthma” at the open session of the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on the 20th of February, 2020. The Dissertation has been prepared at the Department of Pulmonology of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2014–2019. The article presents the essential results of the dissertation.

Scientific Supervisor: Prof. Dr. Kęstutis Malakauskas (Lithuanian University of Health Sciences)

The Defense Council: Prof. Habil. Dr. Vaiva Lesauskaitė, Chairperson (Lithuanian University of Health Sciences)

Prof. Dr. Vilmantė Borutė (Lithuanian University of Health Sciences)

Prof. Dr. Rimantas Daugelavičius (Vytautas Magnus University)

Prof. Dr. Laura Malinauskienė (Vilnius University)

Prof. Dr. Marc Humbert (South Paris University)

IVADAS

Astma yra lėtinė uždegiminė, dažniausiai visą gyvenimą besitęsianti kvėpavimo takų liga, kuriai būdingi epizodiniai arba nuolatiniai kvėpavimo simptomai, kintama bronchų obstrukcija, klinikinių požymių ir patogenezės heterogeniškumas. Sergamumas nuolat didėja, kaip ir su tuo susijusi ekonominė našta [1–3]. Per pastaruosius 35 metus astma pasiekė epidemijos lygį [4]. Vyksta nuolatiniai astmos patogenezės tyrimai, siekiant geriau suprasti ir nustatyti būdus, kaip veiksmingiau ją valdyti.

Svarbiausia astmos patogenezės grandis – lėtinis kvėpavimo takų uždegimas [5]. Dažniausiai nustatomas 2-ojo tipo uždegimo atsakas [6], kuris tiksliau apibrė-

žiamas kaip 2-ojo tipo T limfocitų pagalbininkų (angl. *T helper cells type 2*, Th2) uždegimas, turintis ryškią eozinofiliją [7]. 2-ojo tipo uždegimas būdingas pacientams, sergantiems alergine ir eozinofiline astma, kurios sudaro iki šiol identifikuotų astmos fenotipų ir endotipų pagrindą [8] (1 pav.). Pagal vyraujančią uždegimo modelį vartojami tiek „2-ojo tipo“, tiek „eozinofilinės astmos“ terminai. Astma su vyraujančiu eozinofiliniu uždegimu turi intensyvesnius ligos simptomus, būna dažnesni ligos paūmėjimai, blogesnis atsakas į skiriamus įkvėpjamuosius gliukokortikoidus (IGK), o ligos eiga dažniausiai būna sunki [9–12]. Ligos sunkumas kinta netgi tarp tų patį fenotipą arba endotipą turinčių asmenų [9]. Nors eo-

Disertacijos

zinofilų reikšmė astmos patogenezei yra žinoma, vis dar neaišku, kas sąlygoja minėtus skirtumus, kokie mechanizmai, o gal pačių eozinofilų struktūros savitumai gali turėti įtakos kvėpavimo takų uždegimo intensyvumui.

Eozinofilų brendimas, aktyvinimas ir telkimasis plaučiuose lemiamas trijų pagrindinių citokinų, dar vadinamų eozinofilopoetiniais: interleukino (IL) 3, IL-5 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio (angl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) bei yra susijęs su integrinų (ypač pagrindinių – $\alpha 4\beta 1$, $\alpha M\beta 2$), esančių ant eozinofilų paviršiaus, aktyvinimu [13–19]. Šie reguluoja eozinofilų

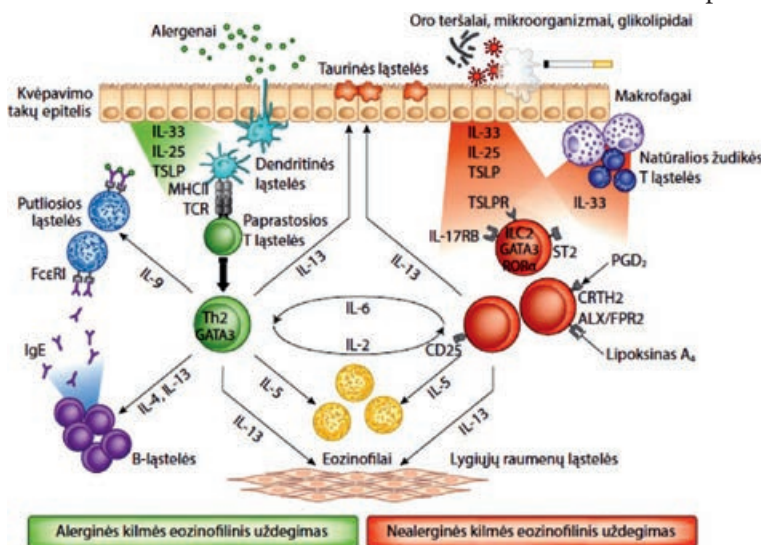
ekstravazaciją iš bronchų kraujotakos į bronchus ir jų spindį. Integrinų funkcija sudėtinga, nes kiekvienas jų gali būti keliose konformacijos būsenose, turėti skirtingą raiškos lygį. Nors tyrimai yra nuolat atliekami, vis dar stinga žinių apie, galbūt, skirtingą minėtų citokinų receptorių ir integrinų raišką eozinofiluose bei sąsają su eozinofilinio uždegimo intensyvumu.

Pastaraisiais metais didėja susidomėjimas bronchų epitelio svarba astmos patogenezei. Bronchai su aplinka tiesiogiai kontaktuoja per įkvepiamą orą, o jų epitelis yra pirmoji apsauga, veikianti kaip fizinis ir cheminis barjeras [20] (2 pav.). Daromos prielaidos, kad būtent dėl epitelio pažeidimo, kuri sąlygoja jo disfunkciją, kinta

epitelio citokinų, pvz., užkrūčio liaukos stromos limfopoetino (angl. *thymic stromal lymphopoietin*, TSLP), IL-25, IL-33 ir citovilino ezrino gamyba bei išsiskyrimas. Daugėja duomenų, kad tai gali būti vienas iš esminių kvėpavimo takų uždegimo atsiradimo, jo palaikymo ir sisteminio organizmo atsako etapų [7, 21, 22]. Norint išsiaiškinti, ar eozinofilinio uždegimo aktyvumas turi įtakos šių biologiškai aktyvių medžiagų gamybai, reikalingi išsamūs tyrimai, atliekami ir eozinofilinio uždegimo slopinimo metu.

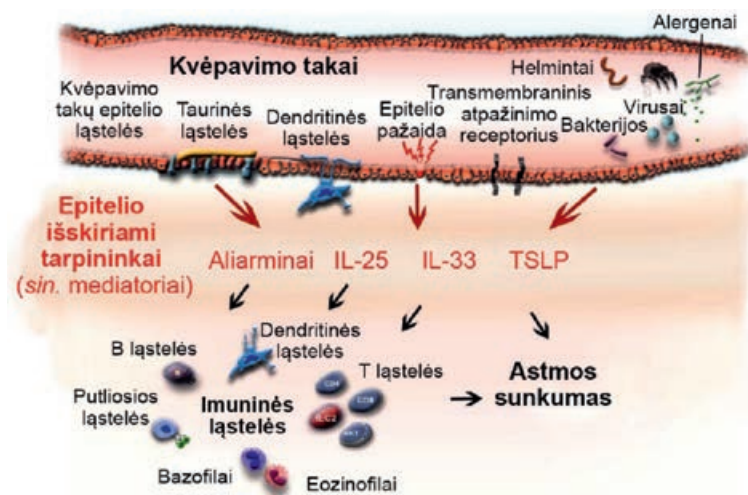
Ne mažiau svarbu ir 2-ojo tipo uždegimo biologiniai žymenys. Šiuo metu patvirtinti yra penki: periferinio kraujo ir skreplių eozinofilų kiekis, azoto monoksido frakcija iškvepiamajame ore (FeNO), imunoglobulino (Ig) E ir serumo periostino koncentracijos [23]. Daugelis jų nėra specifiški, todėl būtinos papildomos priemonės, galinčios padėti anksčiau identifikuoti 2-ojo tipo astmą, įvertinti uždegimo aktyvumą gydymo metu. Tokiomis priemonėmis galėtų būti eozinofilų brendimo, aktyvinimo ir telkimosi procesuose aktyviai dalyvaujantys citokinai, pvz., IL-3, IL-5, GM-CSF (alerginės astmos (AA) atveju) ir pagrindinio IL-4/IL-13 signalinio kelio citokinai, aktyvintų eozinofilų telkimąsi į audinius (chemotaksį) reguliuojantys chemokinai: chemokino C-C motyvo ligandas 11 (CCL11, eotaksinas), chemokino C-C motyvo ligandas 17 (CCL17); su bronchų epitelio pažeidimu susiję IL-25, IL-33, TSLP, ezrinas. Visos šios biologiškai aktyviosios medžiagos aktyviai dalyvauja formuojant kvėpavimo takų 2-ojo tipo uždegiminį atsaką.

Taigi, nors eozinofilų reikšmė astmos patogenezėje plačiai pripažįstama, paviršiniai eozinofilų komponentai, galbūt sąlygojantys eozinofilų telkimąsi kvėpavimo takuose, o su tuo ir susijusį 2-ojo tipo uždegimo intensyvumą, nėra pakankamai ištirti. Per mažai



1 pav. Skirtingi eozinofilinio uždegimo patogenetiniai keliai sergant astma [24]

Santrumpos: CRTH2 – chemoatraktanto receptoriaus homologinė molekulė ant Th2 ląstelių; ALX/FPR2 – lipoksino A4 receptoriaus; FcεRI – didelio afiniteto IgE receptoriaus; GATA3 – GATA surišantis baltymas 3; IgE – imunoglobulinas E; IL – interleukinas; PGD2 – prostaglandinas D2; RORα – su retino rūgštimi susiję receptoriai α; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas.



2 pav. Pagrindiniai bronchų epitelio citokinai [25]

Epitelio gaminami citokinai – IL-25, IL-33 ir TSLP – išsiskiria, reaguodami į įvairius bronchų epitelio dirgiklius, įskaitant infekcijos sukėlėjus, aplinkos alergenų ir atmosferos teršalus, aktyvina tam tikras imunines bei efektorines ląsteles ir astma sergančiam asmeniui sukeliama kvėpavimo takų uždegimas.

įvertinta ir bronchų epitelio citokinų įtaka sukeltant, skatinant ir palaikant 2-ojo tipo uždegimą. Taip pat stinga papildomų biologinių žymenų, galinčių prisidėti vertinant šių procesų intensyvumą diagnozuojant ir gydant 2-ojo tipo astmą bei prognozuojant jos eigą.

METODIKA

Tyrimo dalyviai

Lietuvos sveikatos mokslo universiteto Medicinos fakulteto Pulmonologijos klinikoje 2014–2019 m. vykdytas mokslinis tyrimas, kuriame siekta iširti eozinofilų β grandinės citokinų receptorių ir integrinų raišką bei bronchų epitelio pažeidimo žymenų reikšmę sergant 2-ojo tipo astma. Tyrimui vykdyti gautas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Regioninio biomedicininio tyrimų Etikos komiteto leidimas (Nr. BE-2-13, po papildymo – Nr. BE-2-13/2015) ir Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos leidimas (Nr. 2R-7192 (2.6-1.)).

Į tyrimą įtraukti nerūkantys 18–65 metų amžiaus vyrai ir moterys, sergantys nesunkia, IGK neįgydyta AA, taip pat sergantys sunkia nealergine eozinofiline astma (SNEA) ir sveiki asmenys, pasirašę informuoto asmens sutikimo formas.

Priklausomai nuo disertacinio darbo uždavinio, pagrindinė tiriamųjų grupė buvo pacientai, sergantys nesunkia AA arba SNEA. Kontrolinę grupę sudarė sveiki asmenys.

AA grupės pacientams liga nustatyta remiantis būdingais klinikiniais simptomais, trunkančiais ne trumpiau nei vienerius metus. Atopija patvirtinta atliekant odos dūrio mėginius (ODM) ir nustatytas įsijautrinimas namų dulkių erkų (*Dermatophagoides pteronyssinus*) alergenui, patvirtintas anamneze ir simptomų trukme ≥ 1 metai. Astma diagnozuota bronchų provokaciniu mėginiu su metacholinu arba bronchų dilataciniu mėginiu. Trumpo veikimo bronchus plečiančiųjų vaistų, pvz., salbutamolio, vartojimas leistas, tačiau prieš atliekamus tyrimus šių vaistų tiriamasis turėjo būti neįkvėpęs ne mažiau kaip 6 val. Asmenys, vartojantys kitus astmai gydyti skiriamus įkvėpiamuosius arba geriamuosius vaistus, turintys kliniškai išreikštus nuolatinės alergijos simptomus, 1 mėn. iki tyrimo pradžios persirgę kvėpavimo takų infekcija, į tyrimą nebuvo įtraukti.

SNEA grupės tiriamiesiems sunkios astmos diagnozė nustatyta ne trumpiau kaip metai iki įtraukimo į tyrimą (ir liga prasidėjo suaugusiojo amžiuje), nepavyko pasiekti astmos simptomų kontrolės skiriant dideles IGK dozes, liga paūmėja ne rečiau kaip du kartus per metus, nėra atopijos (pagal klinikinius simptomus ir ODM), eozinofilų kiekis periferiniame kraujyje įtraukimo į tyrimą metu $\geq 0,15 \times 10^9/l$ arba bent kartą per paskutinius metus nustatytas $\geq 0,30 \times 10^9/l$ kiekis, paneigus kitas galimas blogos astmos kontrolės ir eozinofilijos priežastis.

Į tyrimą nebuvo įtraukti SNEA sergantys asmenys, kurie 1 mėn. iki tyrimo pradžios patyrė ligos paūmėjimą arba vartojo sisteminio poveikio gliukokortikoi-

dus, taip pat tie, kuriems anamnezėje jau buvo skirta biologinė terapija astmai gydyti.

Sveiki asmenys (kontrolinė grupė) galėjo dalyvauti tyrime, jei neturėjo nusiskundimų, gretutinės patologijos ir alergijos požymių.

Bendrieji neįtraukimo kriterijai visiems tyrimo dalyviams: kitos lėtinės kvėpavimo sistemos ligos; kitos reikšmingos psichinės ir (arba) vidaus organų ligos bei būklės; rūkymas, alkoholio arba narkotikų priklausomybė; nėštumas; maitinimas krūtimi.

Iš viso iširti 59 asmenys: 21 AA sergantis asmuo, 17 SNEA sergančių pacientų ir 21 sveikas asmuo. Pirmam ir antram disertacijos uždaviniams įgyvendinti iširti 32 asmenys – 8 pacientai, sergantys SNEA, 12 AA ir 12 sveikų asmenų. Trečiam uždaviniui įgyvendinti iširti 9 pacientai, sergantys AA, ir 9 sveiki asmenys. Šiems pacientams buvo atlikti bronchų provokaciniai mėginiai alergenu. Ketvirtam uždaviniui įgyvendinti įtraukti 9 sergantys SNEA asmenys, kuriems naujai skirtas gydymas humanizuotu monokloniniu IL-5 antikūnu mepolizumabu.

Tiriamieji, vykdant skirtingus uždavinius, nesikartojo.

Pirmo vizito metu (kuris daliai tiriamųjų buvo momentinis) nustatyta FeNO, atlikta spiograma, punktuota periferinė vena ir paimti kraujo tyrimai, daliai AA sergančių tiriamųjų ir sveikų asmenų atlikta bronchų provokacija *D. pteronyssinus* alergenu. Šiems po 24 val. kartotas FeNO matavimas, atlikta spiograma, paimta kraujo tyrimams. Daliai sergančiųjų SNEA antras vizitas vykdytas praėjus 28 dienoms po pirmos monokloninio antikūno prieš IL-5 mepolizumabo dozės paskyrimo. Šio vizito metu kartotas FeNO matavimas, spiograma, paimta kraujo tyrimams.

Pagrindiniai tyrimo metodai

Iškvėpiamojo oro FeNO matuota visiems tiriamiesiems prieš atliekant spiogramas. Matavimai atlikti NIOX VERO® aparatu (Circassia, Jungtinė Karalystė), kurio veikimo pagrindas – elektrocheminė iškvėpiamojo oro analizė. Tyrimas atliekamas tiriamajam apžiojant kandiklį, giliai įkvėpiant oro, kuris per tą patį kandiklį išpučiamas 10 sek. laikotarpiu kiek įmanoma pastovesniu greičiu (~50 ml/sek.).

Plaučių funkcija vertinta atliekant **spiogramą** ir matuojant forsuito iškvėpimo tūrį per pirmąją sekundę (angl. *forced expiratory volume in 1 second*, FEV₁), forsuitą gyvybinę talpą (angl. *forced vital capacity*, FVC) ir FEV₁/FVC santykį spirometru (Ganshorn Medizin Electronic, Vokietija), gautos vertės atitinkamai palygintos su rodiklių būtinaisiais dydžiais. Plaučių funkcijos vertinimas paremtas Amerikos krūtinės draugijos (angl. *American Thoracic Society*, ATS) rekomendacijomis [26].

Bronchų provokacinis mėginys alergenu atliktas su *D. pteronyssinus* alergenu (laikomu svarbiausiu antigeniniu požūriu [27]) per slėginį dozimetą

Disertacijos

(ProvoX, Ganshorn Medizin Electronic, Vokietija), tiekiant *D. pteronyssinus* alergeną (DIATER, Ispanija). Pagal tyrimo protokolą pirmiausia įvertintas galimas 0,9 proc. fiziologinio natrio chlorido tirpalo poveikis spirometriniams rodikliams, kituose etapuose alergenas aerozolio pavidalu tiekias kas 10 min. pagal protokolą numatytomis dozėmis, iki kol buvo pasiekta 60,0 histamino ekvivalentinio stiprumo (angl. *histamine equivalent potency*, HEP) /ml dozė arba buvo pasiektas ≥ 20 proc. FEV₁ sumažėjimas.

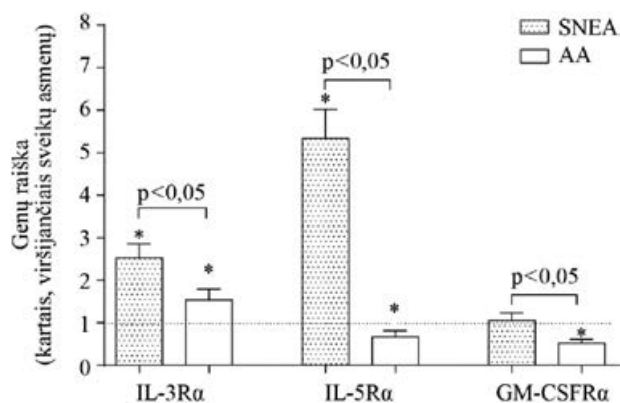
Periferinio kraujo eozinofilų išskyrimas atliktas centrifuguojant aukšto tankio gradientu (Ficoll, GE Healthcare, Suomija) bei naudojant magnetinės separacijos (Miltenyi Biotec, JAV) metodą.

Eozinofilų β grandinės citokinų receptorių ir išorinės membranos integrinų raiškos matuotos atliekant tikrojo laiko polimerazės grandininės reakcijos, naudojant „Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step“ rinkinius (Applied Biosystems, Foster Sitis, Kalifornija, JAV) aparatu „7500 Fast Real-Time PCR system“ (Applied Biosystems, Foster Sitis, Kalifornija, JAV).

Biologiškai aktyvių medžiagų (baltymų (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-33, eotaksino (CCL11), CCL17, GM-CSF, TSLP, periostino, ezrino) **koncentracijos kraujo serume** buvo išmatuotos imunisorbentinės analizės (angl. *the enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) būdu pagal gamintojo pateikiamas instrukcijas, eksperimentams naudojant kiekvienai medžiagai specializuotus ELISA rinkinius.

EOZINOFILŲ β GRANDINĖS CITOKINŲ RECEPTORIŲ IR INTEGRINŲ RAIŠKA

Ištirti 32 nerūkantys suaugusieji. SNEA grupės tiriamieji išsiskyrė ne tik didesniu kraujo eozinofilų kiekiu, bet ir vyresniu amžiumi, prastesne plaučių funkcija ir didesne FeNO. Atopijos komponentas buvo nustatytas tik AA grupės tiriamiesiems. IgE koncentracija buvo



3 pav. IL-3, IL-5 ir GM-CSF receptorių raiška eozinofiluose

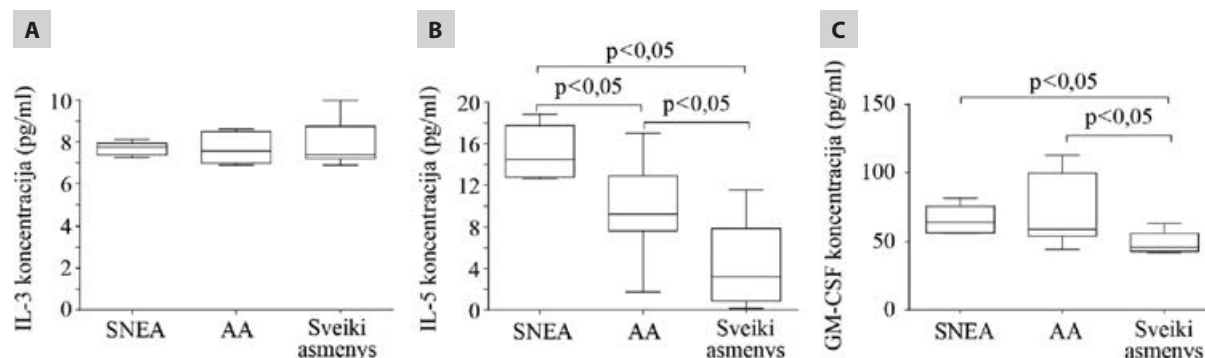
Rezultatai pateikiami kaip vidurkis \pm standartinė vidurkio paklaida. SNEA grupė n = 8, AA grupė n = 12, sveiki asmenys (kontrolinė grupė) n = 12. *p < 0,05, palyginus su sveikais asmenimis (kontrolinė grupė). Statistinei analizei, palyginti SNEA ir AA grupes, naudotas Mann-Whitney U-testas, palyginti su sveikais asmenimis – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

Santrumpos: AA – alerginė astma; GM-CSFRa – granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojamojo veiksnio receptoriaus α ; IL-3Ra – interleukino 3 receptoriaus α ; IL-5Ra – interleukino 5 receptoriaus α ; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma.

didžiausia AA grupėje ir reikšmingai skyrėsi nuo SNEA grupės (p < 0,05).

IL-3, IL-5, GM-CSF receptorių raiška eozinofiluose ir šių citokinų koncentracija serume

SNEA grupėje IL-3Ra ir IL-5Ra genų raiškos buvo žymiai didesnės, atitinkamai – $2,5 \pm 0,3$ ir $5,3 \pm 0,7$ karto (p < 0,05), palyginus su sveikais asmenimis, o GM-CSFRa raiška tarp tiriamųjų grupių nesiskyrė ($1,1 \pm 0,2$ karto, p = 0,56). Palyginus AA grupę su sveikais asmenimis, pastebėta, kad IL-3Ra geno raiška didesnė $1,5 \pm 0,2$ karto (p < 0,05), tačiau IL-5Ra ir GM-CSFRa reikšmingai mažesnės, atitinkamai – $3,1 \pm 1,2$ ir $2,4 \pm 0,4$ (p < 0,05; 3 pav.). Be to, nustatyti reikšmingi genų raiškos skirtumai tarp SNEA ir AA grupių. SNEA



4 pav. Eozinofilų brendimui ir aktyvinimui įtakos turinčių citokinų koncentracijos serume: (A) IL-3 koncentracija; (B) IL-5 koncentracija; (C) GM-CSF koncentracija.

Rezultatai pateikiami kaip mediana, nurodant mažiausią bei didžiausią vertes. SNEA grupė n = 5, AA grupė n = 11, sveiki asmenys (kontrolinė grupė) n = 10. Statistinė analizė – Mann-Whitney U testas.

Santrumpos: AA – alerginė astma; GM-CSF – granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantysis veiksnys; IL-3 – interleukinas 3; IL-5 – interleukinas 5; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma.

sergančiųjų eozinofilai turėjo reikšmingai didesnes IL-3R α , IL-5R α ir GM-CSFR α genų raiškas, atitinkamai – 1,7 \pm 0,2, 8,0 \pm 1,0 ir 2,1 \pm 0,3 karto ($p < 0,05$).

Lygiagrečiai įvertintos ir minėtų citokininų koncentracijos serume. IL-3 koncentracija tarp visų trijų grupių reikšmingai nesiskyrė: 7,8 [7,3–8,1] pg/ml SNEA grupėje, 7,7 [6,9–8,6] pg/ml, sergant AA, ir 7,9 [6,9–10,0] pg/ml sveikiems asmenims (4 pav., A). Nustatyta didesnė IL-5 koncentracija sergant SNEA (14,5 [12,6–18,8] pg/ml), palyginus su AA ir sveikų asmenų grupėmis (atitinkamai – 9,3 [1,7–17,03] pg/ml ir 3,2 [0,2–11,5] pg/ml, 4 pav., B). Nustatyta GM-CSF koncentracija buvo didesnė pacientams, sergantiems SNEA ir AA (atitinkamai – 64,2 [56,1–81,2] pg/ml ir 59,1 [44,2–112,8] pg/ml, $p > 0,05$, be reikšmingo skirtumo tarp grupių), palyginus su sveikais asmenimis – (45,91 [41,7–63,4] pg/ml; 4 pav., C).

Tyrimo metu nustatyta, kad SNEA sergantiems pacientams eozinofilų IL-3, IL-5, GM-CSF receptorių raiška yra žymiai didesnė, palyginus su sergančiaisiais nesunkia, IGK dar neįgydyta AA. Be to, pastebėta, kad IL-5R α receptoriaus raiška, sergant AA, yra nuslopinta, tačiau, sergant SNEA, stipriai aktyvinta, todėl galima manyti, jog su IL-5 susijęs signalinis kelias yra labai svarbus eozinofilų aktyvinimui sergant SNEA.

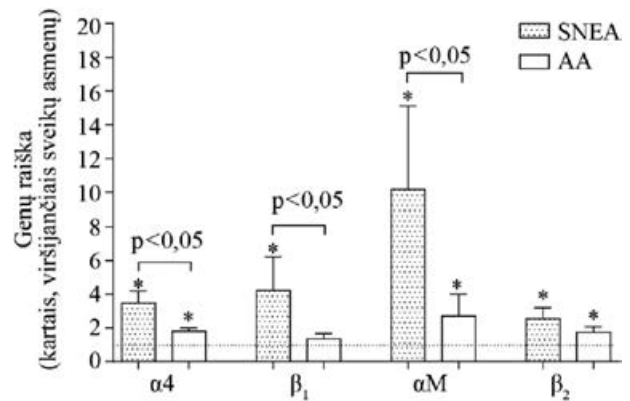
Eozinofilų integrinų raiška

Ištirta dviejų pagrindinių eozinofilų integrinų $\alpha 4\beta 1$ ir $\alpha M\beta 2$ genų raiška sergant SNEA ir AA, gauti duomenys palyginti su sveikų asmenų. Tiek SNEA, tiek AA grupėse pacientai turėjo daug daugiau integrinų subvieneto $\alpha 4$ mRNR (3,5 \pm 0,7 karto ir 1,8 \pm 0,2 karto, $p < 0,05$), αM mRNR (10,2 \pm 4,9 ir 2,7 \pm 1,3 karto, $p < 0,05$), $\beta 2$ mRNR (2,5 \pm 0,7 ir 1,8 \pm 0,3 karto, $p < 0,05$) bei $\beta 1$ mRNR tik SNEA grupėje (4,2 \pm 2,0), palyginus su sveikų asmenų eozinofiluose nustatomomis atitinkančiomis mRNR reikšmėmis ($p < 0,05$). Raiška tarp astma sergančiųjų taip pat nebuvo vienoda: sergant SNEA, eozinofilai turėjo didesnę integrinų subvienetų $\alpha 4$, $\beta 1$ ir αM raišką nei sergant AA (atitinkamai – 2,1 \pm 0,4 karto, 3,1 \pm 1,5 karto ir 3,8 \pm 1,8 karto, $p < 0,05$; 5 pav.).

Taigi, tyrimo metu nustatyta, kad, sergant SNEA, eozinofilų $\alpha 4$, $\beta 1$ ir αM integrinų subvienetų raiška yra didesnė, palyginus su nesunkia, IGK dar neįgydyta AA. Todėl manoma, kad, sergant SNEA, eozinofilų adhezinių savybių pokyčiai yra dėl pakitusios $\alpha 4\beta 1$ integrino raiškos.

Periostino, eotaksino ir CCL17 koncentracijos serume

Periostino koncentracija astma sergantiems pacientams buvo reikšmingai didesnė (atitinkamai – 66,5 [54,2–131,5] ng/ml SNEA grupėje ir 86,3 [63,3–161,7] ng/ml AA grupėje, be reikšmingo skirtumo tarp grupių, $p > 0,05$), palyginus su sveikais asmenimis



5 pav. Eozinofilų integrinų raiška

Rezultatai pateikiami kaip vidurkis \pm standartinė vidurkio paklaida. SNEA grupė n = 8, AA grupė n = 12, sveiki asmenys n = 12.

* $p < 0,05$, palyginus su sveikais asmenimis.

Analizuojant skirtumus tarp SNEA ir AA, naudotas Mann-Whitney U testas; analizuojant skirtumus su sveikais asmenimis – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

Santrumpos: AA – alerginė astma; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma.

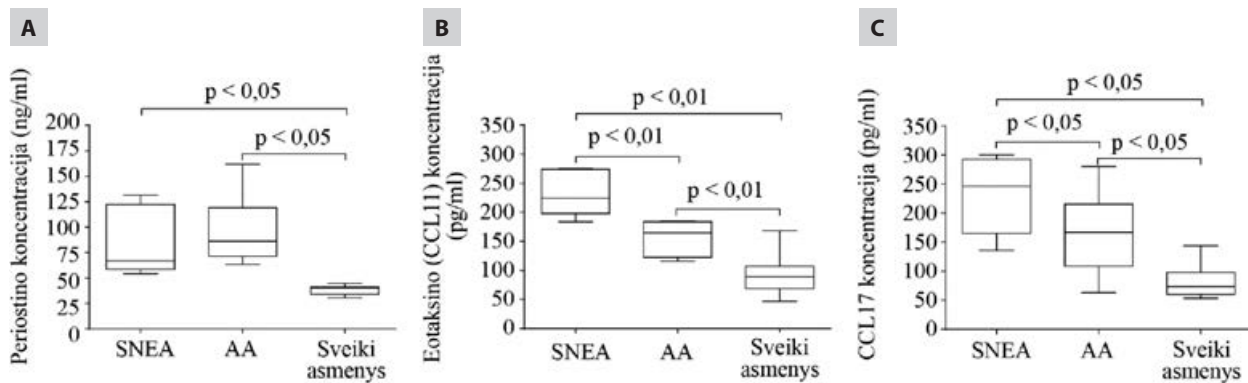
(40,0 [30,3–45,0] ng/ml, $p < 0,05$; 6 pav., A). Vertinant eotaksino koncentraciją, ši buvo daug didesnė sergant SNEA, palyginus su sergančiaisiais AA ir sveikais asmenimis (atitinkamai – 224,2 [183,7–275,1] pg/ml, 164,7 [116,1–184,7] pg/ml ir 89,2 [47,1–168,5] pg/ml, atitinkamai; 6 pav., B). CCL17 koncentracijos skirtumai buvo panašūs į eotaksino – didžiausia CCL17 koncentracija nustatyta SNEA grupėje (246,1 [135,6–300,4] pg/ml), mažiausia – sveikiems asmenims (73,7 [53,7–144,2] pg/ml), o sergant AA, užėmė tarpinę poziciją (167,0 [63,2–279,9] pg/ml; 6 pav., C).

Apibendrinus gautus duomenis, nustatyta padidėjusi eotaksino bei CCL17 koncentracija kraujo serume. Juos derinant su jau patvirtintais eozinofilinio kvėpavimo takų uždegimo biologiniais žymenimis, galima lengviau atskirti sunkią eozinofilinę astmą bei numatyti ligos eigą, gydymo veiksmingumą ir baigtis.

BRONCHŲ EPITELIO PAŽAIDOS ŽYMENYS IR JŲ REIKŠMĖ

Tyrimo metu analizuota, kaip poveikis *D. pteronyssinus* alergenu (praėjus 24 val.) keičia epitelio citokininų IL-25, IL-33, TSLP ir citovilino ezrino bei pagrindinių IL-4/IL-13 signalinio kelio citokininų koncentracijas, imituojuant bronchų pažeidimą sergant AA. Taip pat vertinta, kaip kinta epitelio citokininų koncentracija gydant antikūnu prieš IL-5 mepolizumabu (po vienkartinės vaisto dozės) eozinofilinio uždegimo slopinimo metu.

Ištirta 18 suaugusių nerūkančių asmenų. AA sergantiems asmenims nustatytas padidėjęs periferinio kraujo eozinofilų kiekis ir bendrojo IgE koncentracija, taip pat nustatyta aukštesnė FeNO. Atopijos komponentą turėjo tik AA grupės pacientai. Po bronchų provokacinio mėginio alergenu AA grupėje pastebėtas reikšmingas kraujo eozinofilų skaičiaus ir FeNO padidėjimas.



6 pav. Perioestino, eotaksino ir CCL17 koncentracijos serume: (A) perioestino koncentracija; (B) eotaksino koncentracija; (C) CCL17 koncentracija.

Rezultatai pateikiami kaip mediana, nurodant mažiausią bei didžiausią vertes. SNEA grupė n = 5, AA grupė n = 11, sveiki asmenys n = 10. Statistinei analizei naudotas Mann-Whitney U testas.

Santrumpos: AA – alerginė astma; CCL11 – chemokino C-C motyvo ligandas 11; CCL17 – chemokino C-C motyvo ligandas 17; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma.

Siekiant įvertinti, kaip kinta epitelio citokinų koncentracijos, gydant antikūnu prieš IL-5 mepolizumabu (po vienkartinės vaisto dozės) eozinofilinio uždegimo slopinimo metu, ištirti 9 SNEA pacientai dviejuose atskaitos taškuose: prieš skiriant humanizuotą monokloninį antikūną prieš IL-5 mepolizumabą ir praėjus keturioms savaitėms po pirmos 100 mg mepolizumabo dozės suleidimo po oda. Tiriamieji, sergantys SNEA, buvo vyresnio amžiaus, turintys polinkį į atsvarį, gydomi didelėmis IGK dozėmis. Visiems nustatyta sutrikusi plaučių funkcija ir padidėjęs eozinofilų kiekis kraujyje ($>0,15 \times 10^9/l$) bei padidėjęs FeNO. Per stebėsenos laikotarpį (nuo pirmos vaisto dozės suleidimo iki praėjo keturios savaitės) astmos paūmėjimų nefiksuota. Praėjus keturioms savaitėms po mepolizumabo skyrimo (prieš sekančią vaisto dozę), pastebėta reikšmingai sumažėjusi kraujo eozinofilija, pagerėjusi plaučių funkcija, nors FeNO lygis išliko žymiau nepakitęs.

IL-25, IL-33, TSLP ir ezrino koncentracijų pokyčiai serume po bronchų provokacinio mėginio *D. pteronyssinus* alergenu

Disertacinio darbo metu vertinta, kaip kinta IL-25, IL-33 ir TSLP koncentracijos serume sveikiems bei sergantiems AA asmenims, praėjus 24 val. po bronchų provokacinio mėginio *D. pteronyssinus* alergenu. Nustatyta, kad prieš provokaciją alergenu IL-25 koncentracija abiejose tiriamosiose grupėse buvo panaši: $37,4 \pm 2,2$ pg/ml AA grupėje ir $37,4 \pm 6,5$ pg/ml sveikiems asmenims. Po bronchų provokacinio mėginio *D. pteronyssinus* alergenu IL-25 koncentracija AA grupėje reikšmingai padidėjo iki $63,5 \pm 13,1$ pg/ml ($p < 0,05$), kai sveikiems asmenims žymiau nekito – $44,6 \pm 9,1$ pg/ml ($p > 0,05$) (7 pav., A).

IL-33 koncentracija serume dar prieš atliekant provokaciją *D. pteronyssinus* alergenu AA grupėje buvo beveik dukart didesnė – $65,7 \pm 10,9$ pg/ml, palygi-

nus su sveikų asmenų – $37,8 \pm 12,2$ pg/ml ($p < 0,05$). Bronchų provokacija alergenu neturėjo reikšmingos įtakos IL-33 koncentracijos padidėjimui abiejose tiriamosiose grupėse ir buvo atitinkamai – $63,4 \pm 6,8$ pg/ml bei $38,0 \pm 9,3$ pg/ml (7 pav., B). Vertinant TSLP koncentraciją serume, nustatyta, kad, prieš atliekant bronchų provokaciją alergenu, tiek sergantiems AA, tiek sveikiems asmenims šio citokino kiekis reikšmingai nesiskyrė ir buvo $311,7 \pm 39,9$ pg/ml AA grupėje bei $319,1 \pm 43,8$ pg/ml sveikų asmenų grupėje. Po bronchų provokacinio mėginio *D. pteronyssinus* alergenu reikšmingi pokyčiai pastebėti tik AA grupėje – TSLP koncentracija pakilo iki $383,5 \pm 65,4$ pg/ml ($p < 0,05$), o sveikiems asmenims reikšmingai nepakito ($304,2 \pm 39,2$ pg/ml) (7 pav., C). Pradinio vizito metu ezrino koncentracija tarp sergančiųjų AA ir sveikų asmenų reikšmingai nesiskyrė, atitinkamai – $112,1 \pm 10,3$ pg/ml bei $82,7 \pm 9,1$ pg/ml, tačiau po bronchų provokacinio mėginio *D. pteronyssinus* alergenu reikšmingai padidėjo iki $131,3 \pm 12,7$ pg/ml tik AA sergančiųjų grupėje ($p < 0,05$), o sveikiems asmenims reikšmingai nekito ($86,2 \pm 9,4$ pg/ml, 7 pav., D).

Taigi, nustatytas reikšmingas IL-25, TSLP ir ezrino koncentracijų serume padidėjimas praėjus 24 val. po bronchų provokacinio mėginio *D. pteronyssinus* alergenu, o tai siejama su ankstyvuoju bronchų epitelio pažeidimu. IL-33 reikšmingai nekito, tačiau jo serumo koncentracija pradinio vizito metu buvo beveik du kartus didesnė už sveikų asmenų.

IL-4/IL-13 signalinio kelio aktyvumas po bronchų provokacinio mėginio alergenu

Nustatyta, kad iki bronchų provokacinio mėginio metacholinu IL-4 koncentracija buvo ženkliai didesnė sergant AA ($46,7 \pm 7,3$ pg/ml), palyginus su sveikais asmenimis ($11,3 \pm 2,3$ pg/ml). Po alergeno poveikio AA grupėje reikšmingai padidėjo iki $62,8 \pm 7,2$ pg/ml

($p < 0,05$), be reikšmingų pokyčių sveikiems asmenims ($10,2 \pm 3,3$ pg/ml) (8 pav., A). IL-13 išsiskyrė didžiausiai nustatyta koncentracija: prieš bronchų provokacinį mėginį su alergenu siekė $889,1 \pm 177,5$ pg/ml, po alergeno poveikio dar labiau padidėjo – $1121,0 \pm 218,4$ pg/ml ($p < 0,05$) be reikšmingų pokyčių sveikiems asmenims (atitinkamai – $218,5 \pm 67,8$ pg/ml ir $230,6 \pm 91,6$ pg/ml (8 pav., B).

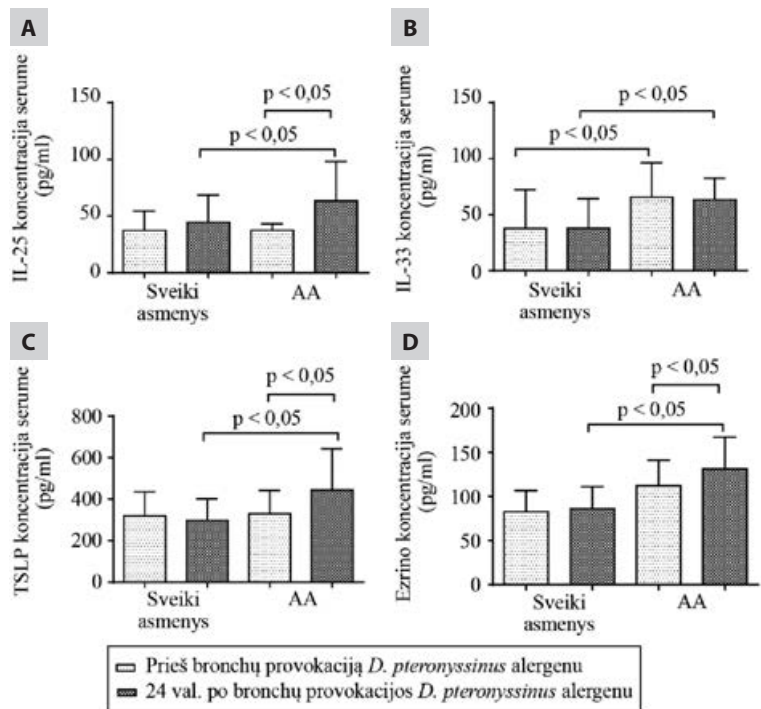
Taigi, nustatytas reikšmingas IL-4 ir IL-13 koncentracijų skirtumas tarp sergančiųjų AA ir sveikų asmenų, o bronchų provokacija alergenu dar labiau padidino jų koncentracijas. Tai rodo IL-4/IL-13 signalinio kelio svarbą vystantis 2-ojo tipo kvėpavimo takų uždegimui sergant AA.

IL-25 ir TSLP koncentracijų pokyčiai serume slopinant eozinofilinį uždegimą

Praėjus keturioms savaitėms po vienkartinės mepolizumabo dozės, eozinofilų kiekis kraujyje reikšmingai sumažėjo nuo $0,55 \pm 0,20 \times 10^9/l$ iki $0,14 \pm 0,04 \times 10^9/l$ ($p = 0,01$, 9 pav., A). Tyrimo metu nustatyta, kad jau po vienos mepolizumabo dozės IL-25 koncentracija serume žymiai sumažėjo nuo $48,0 \pm 17,2$ pg/ml iki $34,8 \pm 17,1$ pg/ml ($p = 0,02$, 9 pav., B). Serumo TSLP koncentracijos pokytis buvo panašus: $359,8 \pm 71,3$ pg/ml prieš paskiriant 100 mg mepolizumabo ir $275,6 \pm 47,8$ pg/ml, praėjus keturioms savaitėms po vienkartinės mepolizumabo dozės ($p = 0,02$, 9 pav., C).

Nustatytos šios reikšmingos koreliacijos: tarp eozinofilų skaičiaus kraujyje pokyčių ir IL-25 koncentracijos serume pokyčių po vienos mepolizumabo dozės ($r = 0,81$, $p = 0,008$; 10 pav.); taip pat tarp IL-25 koncentracijos serume ir TSLP koncentracijos serume pokyčių ($r = 0,93$, $p = 0,004$; 11 pav.). Tačiau koreliacija tarp eozinofilų kiekio kraujyje ir TSLP koncentracijos serume pokyčių nebuvo reikšminga ($r = 0,49$, $p > 0,05$).

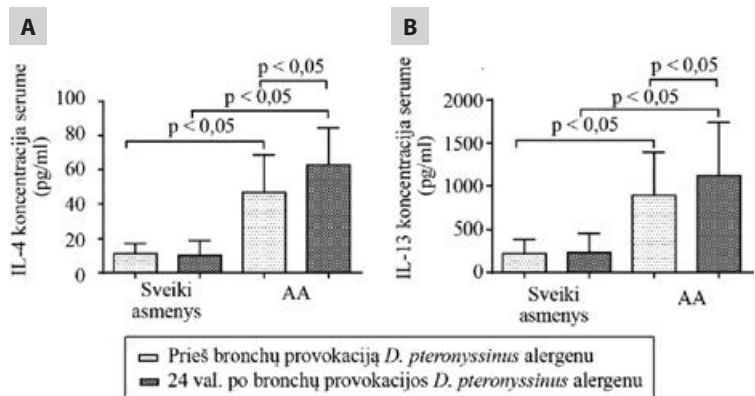
Taigi, atlikto tyrimo metu nustatyta, kad SNEA sergantiems asmenims, papildžius skiriamą gydymą humanizuotu monokloniniu antikūnu prieš IL-5 mepolizumabu, jau po vienkartinės vaisto dozės žymiai sumažėjo IL-25, TSLP koncentracija serume, o IL-25 pokytis dar ir koreliavo su kraujo eozinofilų bei TSLP pokyčiais.



7 pav. Bronchų epitelio citokinų koncentracijų pokytis praėjus 24 val. po bronchų provokacinio mėginio *Dermatophagoides pteronyssinus* alergenu: (A) IL-25 koncentracija; (B) IL-33 koncentracija; (C) TSLP koncentracija; (D) ezrino koncentracija.

Rezultatai pateikiami kaip vidurkis ir standartinė vidurkio paklaida. Alerginės astmos (AA) grupė $n = 9$, sveikų asmenų grupė – $n = 9$. Statistinė analizė – Mann-Whitney U testas.

Santrumpos: AA – alerginė astma; *D. pteronyssinus* – *Dermatophagoides pteronyssinus*; IL-25 – interleukinas 25; IL-33 – interleukinas 33; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas.



8 pav. IL-4 ir IL-13 koncentracija serume prieš ir praėjus 24 val. po bronchų provokacinio mėginio *Dermatophagoides pteronyssinus* alergenu: (A) IL-4 koncentracija; (B) IL-13 koncentracija.

Rezultatai pateikiami kaip vidurkis ir standartinė vidurkio paklaida.

Statistinė analizė – Mann-Whitney U testas.

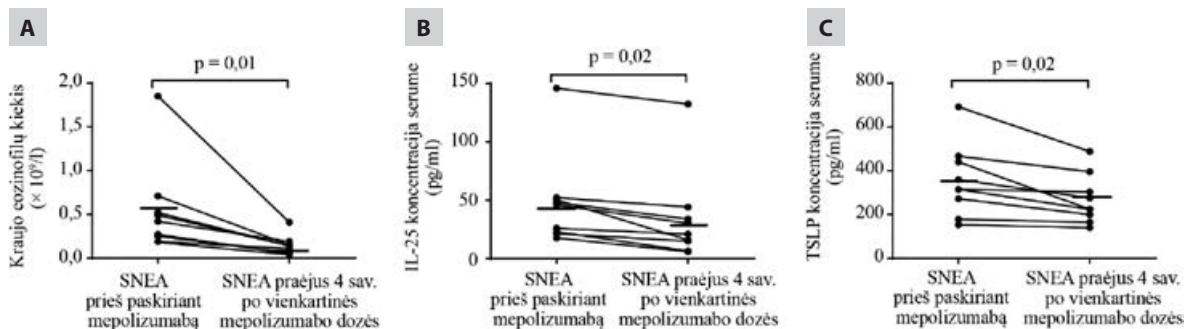
AA grupė $n = 9$, sveikų asmenų grupė $n = 9$.

Santrumpos: AA – alerginė astma; *D. pteronyssinus* – *Dermatophagoides pteronyssinus*; IL-4 – interleukinas 4; IL-13 – interleukinas 13.

APIBENDRINIMAS

Atlikto tyrimo metu nustatyta, kad eozinofilų β grandinės citokinų IL-3, IL-5, GM-CSF receptorių raiška buvo reikšmingai didesnė SNEA sergančiųjų asmenų, palyginus su nesunkia AA sergančiais pacientais. Verti-

Disertacijos

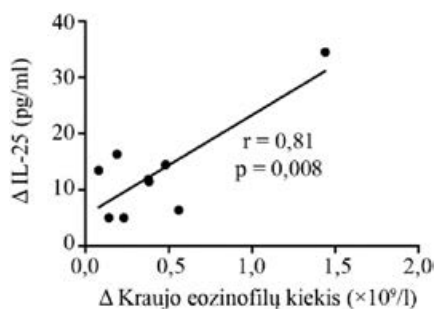


9 pav. Kraujo eozinofilų kiekio ir bronchų epitelio citokinų – IL-25 ir TSLP – pokytis, sergant SNEA po vienkartinės mepolizumabo dozės: (A) kraujo eozinofilų pokytis; (B) IL-25 pokytis; (C) TSLP pokytis.

Statistinė analizė – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

Pateikiami kiekvieno tiriamojo duomenys (n=9) konkrečiomis vertėmis, pažymint bendrą vidurkį.

Santrumpos: IL-25 – interleukinas 25; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas.

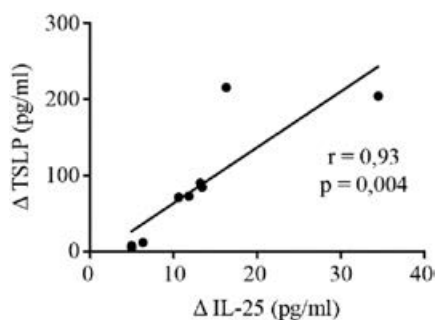


10 pav. Koreliacija tarp eozinofilų skaičiaus kraujyje pokyčių ir IL-25 koncentracijos serume pokyčių, sergant SNEA ir praėjus keturioms savaitėms po vienos mepolizumabo dozės

Pateikiami 9 SNEA sergančių pacientų duomenys.

Santrumpos: Δ – pokytis; IL-25 – interleukinas 25; r – Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma.

nant šių citokinų koncentracijas serume, nustatytas tik IL-5 reikšmingas kiekio padidėjimas SNEA tiriamiesiems, palyginus su nesunkia AA sergančiais pacientais. Ir SNEA, ir AA grupių tiriamiesiems nustatytos



11 pav. Koreliacija tarp IL-25 koncentracijos serume ir TSLP koncentracijos serume pokyčių, sergant SNEA ir praėjus keturioms savaitėms po vienos mepolizumabo dozės

Pateikiami 9 SNEA sergančių pacientų duomenys.

Santrumpos: Δ – pokytis; IL-25 – interleukinas 25; r – Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientas; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma; TSLP – užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas.

reikšmingai didesnės eotaksino, CCL17 ir periostino koncentracijos serume, palyginus su sveikais asmenimis, o eotaksino bei CCL17 koncentracijos reikšmingai skyrėsi ir tarp tirtų astmos grupių – didžiausi jų kiekiai

nustatyti sergant SNEA. Taip pat SNEA sergantiems asmenims nustatyta didesnė eozinofilų integrinų subvienetų $\alpha 4$, αM ir $\beta 1$ raiška, palyginus su pacientais, sergančiais nesunkia AA.

Vertinant bronchų epitelio pažeidimą, AA sergantiems pacientams po bronchų provokacinio mėginio alergenu *D. pteronyssinus* IL-25, TSLP, ezrino, taip pat IL-4 ir IL-13, koncentracijos serume reikšmingai padidėjo, o IL-33 – nepakito. SNEA sergantiems pacientams, skyrus humanizuotą monokloninį antikūną prieš IL-5 mepolizumabą, bronchų epitelio IL-25 ir TSLP koncentracijos serume reikšmingai sumažėjo. Taip pat nustatytos reikšmingos sąsajos tarp IL-25 ir TSLP koncentracijų serume pokyčių bei IL-25 koncentracijos serume ir kraujo eozinofilų skaičiaus pokyčių.



Dokt. V. Kalinauskaitės-Žukauskės (kairėje) disertacijos gynimas. Disertacijos gynimo taryba: iš kairės prof. M. Humbert (profesorius dešinėje vertėjavo LSMU MA Pulmonologijos klinikos gyd. dr. D. Hoppenot), prof. L. Malinauskienė, prof. habil. dr. V. Lesauskaitė (pirmininkė), prof. V. Borutaitė, prof. R. Daugelavičius.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Didesnė eozinofilų β grandinės citokinų IL-3, IL-5, GM-CSF receptorių ir integrinų subvienetų $\alpha 4$, $\beta 1$, αM raiška yra susijusi su sunkesne 2-ojo tipo astmos eiga. IL-25, TSLP ir ezrinas gali būti bronchų epitelio pažaidos, o eotaksinas ir CCL17 – 2-ojo tipo kvėpavimo takų uždegimo biologiniai žymenys sergant astma. Bronchų epitelio pažaidos žymenų IL-25, TSLP, ezrino kiekio serume, IL-5 ir IL-4/IL-13 signalinių kelių aktyvumo įvertinimas gali būti svarbūs parenkant individualizuotą 2-ojo tipo astmos gydymą.

STRAIPSNIAI, KURIUOSE PASKELBTI DISERTACIJOS REZULTATAI

Kalinauskaite-Zukauske V, Januskevicius A, Janulaityte I, Miliauskas S, Malakauskas K. Serum levels of epithelial-derived cytokines as interleukin 25 and thymic stromal lymphopoietin after a single dose of mepolizumab in patients with severe non-allergic eosinophilic asthma: a short report. *Can Respir J.* 2019;2019:8607657.

Kalinauskaite-Zukauske V, Janulaityte I, Januskevicius A, Malakauskas K. Serum levels of epithelial-derived mediators and interleukin-4/interleukin-13 signaling after bronchial challenge with Dermatophagoides pteronyssinus in patients with allergic asthma. *Scand J Immunol.* 2019; 90(5):e12820.

Kalinauskaite-Zukauske V, Januskevicius A, Janulaityte I, Miliauskas S, Malakauskas K. Expression of eosinophil β chain-signaling cytokines receptors, outer-membrane integrins, and type 2 inflammation biomarkers in severe non-allergic eosinophilic asthma. *BMC Pulm Med.* 2019,19(1): 158.

LITERATŪRA

1. Calhoun WJ, Haselkorn T, Mink DR, Miller DP, Dorenbau A, Zeiger RS. Clinical burden and predictors of asthma exacerbations in patients on guideline-based steps 4–6 asthma therapy in the TENOR cohort. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014; 2(2):193–200.
2. Chastek B, Korner S, Nagar SP, Albers F, Yancey S, Ortega H, et al. Economic burden of illness among patients with severe asthma in a managed care setting. *J Manag Care Spec Pharm.* 2016; 22(7):848–61.
3. Jiang WQ, Mei XD, Feng D. Air pollution and chronic airway diseases: what should people know and do? *J Thorac Dis.* 2016; 8(1):E31–40.
4. Cockcroft DW. Epidemic thunderstorm asthma. *Lancet Planet Health.* 2018; 2(6):e236–7
5. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2019. Available from: www.ginasthma.org
6. Robinson D, Humbert M, Buhl R, Cruz AA, Inoue H, Korom S, et al. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clin Exp Allergy.* 2017; 47(2):161–75.
7. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma – present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(1):57–65.
8. Jain N, Hanania N, Chippes B, Long A. Type 2 inflammation in asthma. In: MD Peer Exchange. Available at: <https://www.mdmag.com/peerexchange/biomarkers-severe-asthma/type-2-inflammation-in-asthma>
9. Carr TE, Zeki AA, Kraft M. Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018; 197(1):22–37.
10. Bjerregaard A, Laing IA, Backer V, Fally M, Khoo SK, Chidlow G, et al. Clinical characteristics of eosinophilic asthma exacerbations. *Respirology.* 2017; 22(2):295–300.
11. de Groot JC, Ten Brinke A, Bel EH. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins [published correction appears in *ERJ Open Res.* 2016; 2(3):]. *ERJ Open Res.* 2015; 1(1):00024–2015.
12. Price D, Wilson AM, Chisholm A, Rigazio A, Burden A, Thomas M, et al. Predicting frequent asthma exacerbations using blood eosinophil count and other patient data routinely available in clinical practice. *J Asthma Allergy.* 2016; 9:1–12.
13. Park YM, Bochner BS. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2010; 2(2):87–101.
14. Koenderman L. Priming: a critical step in the control of eosinophil activation. In: Lee JJ, Rosenberg HF, editors. *Eosinophils in health and disease.* Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 170–9.
15. Johansson MW, Mosher DF. Integrin activation states and eosinophil recruitment in asthma. *Front Pharmacol.* 2013; 4:33.
16. Chung KF. Asthma phenotyping: a necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies. *J Intern Med.* 2016; 279(2):192–204.
17. Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM, Mosher DF. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(1):1–12.
18. Calderwood D. Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32(Pt3):434–7.
19. Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimbaldston MA, Bonder CS, et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol Rev.* 2012; 250(1):277–302.
20. Deslee G, Dury S, Perotin JM, et al. Bronchial epithelial spheroids: an alternative culture model to investigate epithelium inflammation-mediated COPD. *Respir Res.* 2007; 8(1):86.
21. Wu Q, Eickelberg O. Ezrin in Asthma – A First Step to Early Biomarkers of Airway Epithelial Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019; 199(4):408–10.
22. Roan F, Obata-Ninomiya K, Ziegler SF. Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. *J Clin Invest.* 2019; 129(4): 1441–51.
23. Pavord ID, Beasley R, Agusti A, Anderson GP, Bel E, Brusselle G, et al. After asthma: redefining airways diseases. *Lancet.* 2018; 391(10118):350–400.
24. Caminati M, Le Pham D, Bagnasco D, Canonica GW. Type 2 immunity in asthma. *World Allergy Organ J.* 2018; 11(1):13.
25. West EE, Kashyap M, Leonard WJ. TSLP: A key regulator of asthma pathogenesis. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2012; 9(3–4):10.
26. 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. American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184(5):602–15.
27. Hamilton RG. Laboratory diagnosis of human allergic disease. In: Leung YM, Szefer SJ, Bonilla FA, Akdis CA, Sampson HA, editors. *Pediatric allergy: principles and practice.* 3rd ed. New York: Elsevier; 2016. p. 167-76.e1.