

# Astımda Klinik ve Laboratuvar Biyobelirteçler

## Clinical and Laboratory Biomarkers in Asthma

Dr. Füsün ŞAHİN

SBÜ, Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları, İstanbul

### ÖZET

Astım, farklı mekanizmalar tarafından oluşturulan çoklu fenotiplerle karakterize heterojen bir hastalıktır. Hastalığın altta yatan patofizyolojik mekanizmalarını belirlemek için altın standart bronkoskopi veya biyopsi ile akciğer dokusu elde etmektir, ancak bu tür girişimler önemli bir risk taşır. Biyobelirteçler, hastalık mekanizmalarını yansıtmak ve seyri tahmin etmek ve özellikle şiddetli hastalığı olan hastalarda belirli tedavilere yanıt verme durumunu değerlendirmek için gereklidir. Bir biyobelirteç kolayca ölçülmeli, tekrarlanabilir olmalı ve ölçümü diğer konakçı faktörler veya komorbiditelerin varlığı ile karıştırılmamalıdır. Ne yazık ki, ideal bir biyobelirteç mevcut değildir. T2-yüksek astımı yansıtan biyobelirteçler mevcuttur ve bazıları şiddetli hastalıktaki mevcut hedefe yönelik tedavilere yanıtı öngörür. T2-düşük astımı yansıtan biyobelirteçlere ise büyük bir ihtiyaç vardır. Astımın heterojenliğini inceleyerek terapötik yanıtı tahmin etmek için kan, idrar ve ekshale nefes dahil kompozit biyobelirteçlerin geliştirilmesi pratikte daha uygun bir çözüm gibi görünmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Astım, biyobelirteç, endotip, fenotip, inflamasyon.

### SUMMARY

Asthma is a heterogeneous disease characterized by multiple phenotypes created by different mechanisms. To determine the underlying pathophysiological mechanisms of the disease is to obtain lung tissue by gold standard bronchoscopy or biopsy, but such interventions pose a significant risk. Biomarkers are required to reflect disease mechanisms and predict the course and to evaluate the state of responding to certain treatments, especially in patients with severe disease. A biomarker should be easily measured, reproducible, and its measurement should not be confused with other host factors or the presence of comorbidities. Unfortunately, an ideal biomarker is not available. Biomarkers are available that reflect T2-high asthma, and some predict response to current targeted therapies in severe disease. There is a great need for biomarkers that reflect T2-low asthma. The development of composite biomarkers, including blood, urine, and exhaled breath, to predict the therapeutic response by studying the heterogeneity of asthma seems to be a more appropriate solution in practice.

**Keywords:** Asthma, biomarker, endotype, phenotype, inflammation.

### Yazışma Adresi / Address for Correspondence

Doç. Dr. Füsün ŞAHİN

SBÜ, Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları, İstanbul

e-posta: fusunsahin19700@hotmail.com

DOI: 10.5152/gghs.2020.014

## GİRİŞ

Biyobelirteçler ile hastanın kliniği birlikte fenotipler ve endotiplerin tanımlanmasında, klinik seyir ve prognozu öngörmede, uygun terapötik yaklaşımın belirlenmesinde önemli rol oynar. Uzun yıllar boyunca şiddetli astım tedavisi öncelikle “herkese uygun tek tedavi” yaklaşımına dayanıyordu. Son yıllarda astımın, hastalığın derecesi ve altta yatan hava yolu inflamasyonu tipi, klinik semptomlar ve tedaviye yanıt arasında farklardan yansıyan heterojen bir hastalık olduğu daha da netleşmiştir. Bu gerçekler, astım yönetiminde daha kişiselleştirilmiş bir yaklaşımı kolaylaştırmak için hastalığın fenotiplerini ve endotiplerini keşfetmenin önemini vurgulamıştır. Astımın değerlendirilmesinde başlangıç yaşı, atopi varlığı veya yokluğu, diğer maruziyetler ve spirometri gibi klinik değerlendirmeler önemli olmakla birlikte, ciddi hastalığı olan hastaların doğru fenotiplendirilmesinde ve tedaviye yanıtı öngörmede sıklıkla yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, hastalığın altta yatan spesifik patofizyolojik süreçlerini daha iyi yansıtmaya ve tedavideki yaklaşımı iyileştirmeye yardımcı olmak için biyobelirteçlerin kullanımı ortaya çıkmıştır.

## ASTIM FENOTİP VE ENDOTİPLERİ

Astımın pek çok fenotip ve endotipi, klinik ve patofizyolojik özellikleri temel alınarak tanımlanmıştır<sup>(1)</sup>. Astım fenotiplerinin T2 yüksek ve T2 düşük (T2 dışı) şeklinde iki ana sınıfa ayrılması, klinik tabloya ve altta yatan hava yolu inflamasyon göstergelerinin varlığına veya yokluğuna dayanır.

T2 yüksek astımı olan hastalar şiddetli astımı olan hastaların yaklaşık %60'ını oluşturur, genellikle inhale kortikosteroidlere yanıt verir ve interleükin (IL) -4, IL-5 ve IL-13 gibi T2 sitokinlerinin artan ekspresyonu ile ilişkilidir<sup>(2)</sup>. Erken başlangıçlı alerjik astım, geç başlangıçlı eozinofilik ve aspirinle indüklenen solunum hastalığı (AERD) dahil olmak üzere çeşitli T2 yüksek astım alt tipleri tanımlanmıştır.

T2 düşük (T2 olmayan) astım, aynı zamanda çok heterojen olmasına rağmen, genellikle nötrofilik veya minimal (pauci-granülositik) hava yolu enflamasyonu ile karakterizedir. Nötrofilik iltihaplanmaya yol açan iki mekanizma arasında;

1. Düzensiz doğuştan gelen bağışıklık yanıtı, olası nötrofilik içsel anormallikler,
2. TH17 inflamatuvar yolun aktivasyonu bulunur. T2 düşük veya T2 olmayan astımın alt tipleri duman maruziyeti, yaşlı astım ve geç başlangıçlı obez astım ile ilişkili nötrofilik astımı olanları içerir.

## BİYOBELİRTEÇLERİN ÖZELLİKLERİ

Biyobelirteç bazı biyolojik durumların ölçülebilir bir göstergesidir ve çoğunlukla kan, balgam, idrar gibi biyolojik sıvılarda veya ekshale nefeste ölçülür. ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) biyobelirteç çalışma grubu, bir biyobelirteci “normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik bir müdahaleye verilen farmakolojik yanıtların bir göstergesi olarak objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen karakteristik” olarak tanımladı<sup>(3)</sup>. Son yıllarda biyobelirteçler diyabet, kalp hastalığı ve kanser gibi çeşitli hastalıkların değerlendirilmesi, yönetimi ve tedavisinde önem kazanmıştır.

Astımdaki biyobelirteçler, altta yatan hava yolu inflamasyonunu ve kliniği yansıtmaya yardımcı olan tanı özelliklerine sahip olabilir. Ayrıca, spesifik tedavilere cevap verebilecek hastaları ve/veya astım alevlenmesi gibi risk altındaki hastaları tanımlayan prognostik özellikleri de belirleyici özelliklere sahip olabilirler. Ayrıca, az sayıda biyobelirteç, tedaviye verilen biyolojik yanıtı yansıtmaya yardımcı olacak farmakodinamik özelliklere sahiptir. Özetlenecek olursa astım için ideal bir biyobelirteç hastaya minimum rahatsızlık veya riskle kolayca elde edilebilir olmalı, kolayca ölçülmeli, altta yatan patofizyoloji veya tedavi hedefini yansıtmalı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmalı, tekrarlanabilir olmalı, ucuz olmalı, hastalığın izlenmesinde faydalı prognostik, öngörücü ve farmakodinamik özelliklere sahip olmalıdır<sup>(4)</sup>.

## I. T2 HAVA YOLU İNFLAMASYONUNU YANSITAN BİYOBELİRTEÇLER

### I. 1. Eozinofiller

Eozinofiller, astımlı birçok hastada kanda ve solunum yollarında artan inflamatuvar hücrelerdir<sup>(5)</sup>. Akciğerlerde eozinofiller, antijen sunumu, inflamatuvar mediatörlerin salınması (sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri) gibi bir dizi işlevi yerine getirir, inflamasyon ve hava yolu remodeling oluşumunda önemli bir rol oynar<sup>(6)</sup>. Eozinofillerin kemik iliğinden ve sistemik dolaşımdan alınması ve akciğere geçmesi, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinler tarafından kolaylaştırılır.

**I. 1a. Balgam eozinofilleri:** Balgam eozinofil sayısının değerlendirilmesinin eozinofilik hava yolu inflamasyonunu doğru bir şekilde değerlendirdiğine inanılmaktadır ve eozinofilik astım fenotipi, prognozu ve inhaler kortikosteroid (IKS) tedavisine potansiyel cevap hakkında önemli bilgiler sağlayabilir<sup>(7)</sup>. Balgam eozinofil sayısının  $\geq$  %2 olması, altta yatan eozinofilik hava yolu inflamasyonunu düşündürür.

Artan balgam eozinofil sayıları yüksek alevlenme riski ile ilişkilidir<sup>(8)</sup>. Astım semptomları,  $\beta$ -agonist kullanım sıklığı ve hava yolu fonksiyonu mutlaka hava yollarındaki eozinofilik inflamasyonun derecesini öngörmez ve astım için standart tedaviye rağmen yüksek balgam eozinofil sayıları zaman zaman devam edebilir<sup>(9)</sup>.

1958'de Brown astımdaki hava yolu eozinofilisi ile kortikosteroid tedavisine yanıt arasında ilişki olduğunu bildiren ilk kişidir. Astımlı semptomatik bireylerde balgam eozinofil sayısı artar ve yüksek eozinofiller kortikosteroid ile tedavi edilen hastaların %50'sinde ve kortikosteroid almayan hastaların %70 ila %80'inde bulunabilir<sup>(10)</sup>. Balgam eozinofil sayısı alerjen maruziyeti ile artar ve kortikosteroidler tarafından azaltılır<sup>(11)</sup>. İnhalasyon kortikosteroid (İKS) azaltma çalışmaları astımlı hastalarda balgam eozinofil sayısındaki artışın astım alevlenmesini öngörebileceğini göstermektedir<sup>(12,13)</sup>. Green ve ark. tarafından yapılan randomize, çift kör çalışmada 74 orta ila şiddetli astım hastası, İngiliz Toraks Derneği (BTS) kılavuzuna uyan tedavi koluna veya balgam eozinofil sayısını %1-3 arasında tutmak amacıyla yönetilen bir tedavi koluna randomize edilmiştir<sup>(9)</sup>. Balgam eozinofil bazlı tedavi grubundaki hastalarda 12 aylık çalışma sırasında belirgin olarak daha az alevlenme ve daha az hastaneye yatış gözlenmiştir. Ortalama günlük  $\beta_2$ -agonisti, İKS veya oral kortikosteroid dozu gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Diğer çalışmalar balgam eozinofil bazlı astım tedavisini değerlendirmiş ve altı çalışmanın Cochrane sistematik incelemesi, astımı olan yetişkinlerin tedavisini değerlendirmek için balgam eozinofil sayısının kullanılmasının, astım alevlenmelerini azaltmada klinik değerlendirmeden daha faydalı olduğu sonucuna varmıştır<sup>(14)</sup>. Daha yakın zamanlarda, Lazarus ve arkadaşları hafif, inatçı astımı olan 295 hastayı randomize etmiş ve İKS (mometazon), LAMA (tiotropium) veya plasebo vermek için onların balgam eozinofillerini (sırasıyla < %2 veya  $\geq$  %2, düşük ve yüksek balgam eozinofil seviyesi) kategorize etmiştir<sup>(15)</sup>. Balgam eozinofil düzeyi düşük olan hastalarda, mometazon yanıtı plasebodan anlamlı olarak daha iyi değil, ancak tiotropiyuma yanıtı plasebo'ya kıyasla daha iyi olarak bulunmuştur. Yüksek balgam eozinofil grubunda ise, mometazon yanıtı plasebodan daha üstün, ancak tiotropium'a yanıtı ise plaseboya kıyasla iyi bulunmamıştır. Bununla birlikte, astım fenotipinin değerlendirilmesindeki potansiyel faydalarına rağmen, balgam eozinofil ölçümü uzman merkezlerle sınırlıdır ve klinik ortamların çoğunda rutin bakılan

bir test olarak düşünülmez. Ek olarak bazı hastalar, hipertonic salin kullanılarak balgam indüksiyonu yapıldığında bile balgam örneği veremez. Bu nedenle, şiddetli astımla ilgili ERS/ATS kılavuzları, bu teknikle deneyimli uzman merkezlerde şiddetli astımı olan yetişkin hastaların tedavisinde balgam eozinofil sayılarının kullanılmasını önermektedir<sup>(16)</sup>.

Hava yolu inflamasyonunun diğer biyobelirteçleri balgam eozinofil seviyesini yansıtabilir. Westerhof ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırma, balgam eozinofili tahmininde fraksiyonel ekshalasyon nitrik oksit (FeNO) ve kan eozinofil sayısını ölçmenin benzer bir doğruluğunu göstermiştir ( $\geq$  %3). Çalışmaya çeşitli fenotipte ve farklı şiddetlerde yetişkin başlangıçlı astımı olan 571 hasta dahil edilmiştir. Diğer taraftan, total IgE düzeyi, balgam eozinofil seviyesini tahmin etmek için daha az anlamlıdır. Sonuçlar, FeNO ve kan eozinofil sayısının kombinasyonunun fenotipten bağımsız olarak yetişkin astım hastalarının yarısında yüksek veya düşük balgam eozinofil sayısını tahmin etmek için kullanılabileceğini göstermektedir<sup>(7)</sup>.

**I. 1b. Kan eozinofilleri:** Kan eozinofilleri astımda hava yolu inflamasyonunun potansiyel biyobelirteçleri olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Yüksek kan eozinofil sayılarını tanımlamak için klinik çalışmalarda kullanılan değer 150 ila 300 hücre/mL arasında değişmektedir<sup>(17,18)</sup>. İngiltere'de yapılan bir çalışmadan elde edilen veriler, > 400 hücre/ $\mu$ L kan eozinofil sayısının astım alevlenmesini arttırdığını ve alevlenmelerin oranının artan eozinofil sayısı ile ilişkili olduğunu göstermiştir<sup>(19)</sup>. Başka bir başka çalışmada, hem orta (25-50 ppb) hem de yüksek FeNO seviyeleri ( $\geq$  50 ppb) ve kan eozinofil sayıları ( $\geq$  500 hücre/mm) astım atakları ile ilişkili bulunmuştur (20). Balgam eozinofilisini tahmin etmek için yüksek bir mutlak eozinofil sayısı bildirilmesine rağmen, bu tahmin şiddetli astımda daha zayıf hale gelmektedir. Ayrıca üst solunum yolu alerjileri, paraziter enfeksiyonlar ve bazı otoimmün hastalıklar da eozinofili ile ilişkili olabileceği için eozinofil sayısının tanısal faydası sınırlıdır<sup>(21)</sup>.

Kan eozinofil sayısı astım tanısı için yararlı değildir (GINA), ancak prognostik bir biyobelirteç görevi görebilir ve tip 2 inflamasyonu olan astımlı hastalarda terapötik yanıtı tahmin edebilir<sup>(22)</sup>. Mutlak kan eozinofil sayısının ölçülmesi, T2 yüksek eozinofilik astımı olan hastaları fenotipleme için, mepolizumab<sup>(23)</sup>, reslizumab<sup>(24)</sup> ve benralizumab<sup>(25)</sup> dahil anti-IL-5 tedavileri için olduğu kadar Dupilumab<sup>(26)</sup> gibi IL-4 ve

IL-13 yollarını ilgilendiren tedavi seçimleri açısından da yararlı bir biyobelirteçtir. Bu tür tedavilerle klinik olarak anlamlı astım alevlenmelerindeki azalma, başlangıçta kan eozinofil sayıları ile ilişkilidir, daha yüksek kan eozinofilleri olan hastalarda daha belirgin bir etki vardır<sup>(23)</sup>. Kan eozinofil sayıları IL-5 hedefli tedavi sırasında bir sonuç olarak değerlendirilmiş, eozinofil seviyeleri tedavi sırasında önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, anti-IL4 tedavisi ile, kan eozinofil seviyeleri tedavi ile geçici olarak artabilir<sup>(26)</sup>. Klinik çalışmalarda daha yüksek bazal eozinofilleri olan alerjik astımlı hastaların tedavisiyle daha belirgin bir azalma gösterdikleri ve anti-IgE tedavisine (omalizumab) daha iyi yanıt verecekleri öngörülmüştür. Bununla birlikte, kan eozinofillerinin omalizumab'a yanıtı öngörmedeki rolü, bazı çalışmalarla tutarlı olmamıştır<sup>(27)</sup>.

Klinik olarak anlamlı bir eozinofil cut-off'u ve eozinofilik astımı olan bir hastayı belirlemek için kaç ölçüm yapılması gerektiği konusunda tartışmalar devam etmektedir. Mepolizumab ile yapılan MENSA çalışması, dahil edilme kriteri olarak  $\geq 150$  hücre/ $\mu$ L kan eozinofil sayısı kullansa da, klinik deneyimler  $\geq 300$  hücre/ $\mu$ L temel eozinofil sayısının daha uygun bir cut-off olacağını düşündürmektedir. Dahası, GINA, mutlak kan eozinofil ölçümündeki geniş günlük değişkenlik nedeniyle eozinofilik astımı olan bir hastayı belirleyebilmek için en az üç tutarlı ölçümün gerekli olduğunu önermektedir<sup>(28)</sup>.

**I. 1c. Eozinofil katyonik protein:** Eozinofil katyonik protein (EKP), eozinofilik granüositlerin granüllerinde depolanan ve eozinofil degranülasyonu sırasında salınan sitotoksik bir proteindir. EKP'nin hava yollarındaki bakteriler, parazitler, virüsler ve epitel hücreleri üzerinde toksik etkisi vardır. Ayrıca, solunum yollarında mukus üretimini uyarmak gibi toksik olmayan etkiler de taşır. EKP seviyeleri farklı vücut sıvılarında ve dokularında (en yaygın olarak serum veya balgam) güvenilir bir şekilde ölçülebilir ve eozinofilik inflamasyon ve aktivitenin bir belirteci olarak kullanılabilir<sup>(29)</sup>. Astımlı hastalarda sigara içmeyen sağlıklı bireylere göre serum EKP düzeyleri yükselir; ancak KOAH, interstisyel akciğer hastalıkları, akut solunum yolu enfeksiyonları, polianjitis eozinofilik granümatöz (EGPA), kronik eozinofilik pnömoni ve alerjik rinit gibi diğer solunum hastalıklarında da yükselebilir<sup>(30)</sup>. Solunum yolu direnci ve bronkospazm ile ilişkili olarak yetişkinlerde ve atopik astımı olan çocuklarda serum EKP'nin arttığı bulunmuştur<sup>(31)</sup>. EKP değerlendirmesinin, diğer biyobelirteçlerin daha az uygulanabilir olabileceği küçük çocuk-

larda inhale kortikosteroidlerin başlatılması ve doz titrasyonu için yararlı olabileceği öne sürülmüştür<sup>(4)</sup>, ancak bu stratejiyi doğrulamak için diğer tamamlayıcı çalışmalara ihtiyaç vardır<sup>(32)</sup>.

EKP, astım şiddetinin değerlendirilmesinde de araştırılmıştır. Değişik şiddette astımı olan 185 hastada eozinofilik inflamatuvar belirteçlerin çalışılmış, balgam EKP düzeyleri şiddetli astım grubunda hafif veya orta derecede astımı olan hastalara göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Değişik şiddetteki astımlı hastalar, sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek balgam EKP düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur<sup>(33)</sup>. Başka bir çalışmada 36 astım hastası incelenmiş, daha şiddetli hastalarda hafif astımlı veya sağlıklı kontrollere kıyasla balgam EKP düzeyleri anlamlı düzeyde artmıştır. Kortikosteroid bağımlı astımı olan hastalar arasında son alevlenmeler, astım kontrolünün bir belirteci olarak EKP'nin rolünü düşündüren balgam EKP düzeylerinde anlamlı bir artış ile ilişkilendirilmiştir. Başka bir çalışmada, serum EKP'si yüksek olan hafif ila orta astımlı 21 çocukta serum EKP ölçümü, astım tedavisine karar verme kriteri olarak değerlendirilmiştir. Serum EKP düzeyine bağlı olarak, hastalar sodyum kromoglikat günde iki kez (S-EKP  $< 15$   $\mu$ g/L), budesonid 200  $\mu$ g (S-EKP 15-30  $\mu$ g/L) veya 400 mcg günde iki kez (S-EKP  $\geq 30$   $\mu$ g/L) ile tedavi edilerek aylık ziyaretlerde değerlendirilmiş. 12 aylık çalışma sırasında hiçbir hastada oral steroid veya acil başvurusu gerektiren astım alevlenmesi gelişmemiştir<sup>(34)</sup>. Bir başka altı aylık randomize çok merkezli çalışmada, serum EKP seviyesi veya pik akış ölçümlerine dayanarak inhale kortikosteroid dozu incelenmiş; inhale kortikosteroid dozu, sabah pik akımı veya serum EKP ölçümlerine göre dört haftada bir ayarlanmıştır. İki grup arasında semptomlar arasında anlamlı bir fark bulunmamış ve her iki grup da başlangıç düzeyine kıyasla İKS dozajının artmasına neden olan her iki algoritmaya rağmen semptomlarda iyileşme göstermemiştir<sup>(35)</sup>. Diğer bir çalışmada ise, serum EKP ve fraksiyonel ekshale nitrik oksit (FeNO) için kayıtlı değerleri olan 339 astımlı hasta incelenmiştir. Hem serum EKP düzeyleri hem de FeNO düzeyleri yüksek olan hastalarda, yakın zamanda alevlenme olasılığı daha yüksek bulunmuş, bu da hem EKP hem de FeNO'nun birlikte ölçümünün yüksek alevlenme riski olan hastaları tanımlamak için değerli olabileceğini düşündürmüştür<sup>(36)</sup>.

Özetle, artmış EKP düzeyleri, alevlenme riski ve kontrolsüz astım riski ile ilişkili prognostik özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, öngörücü özellikleri için çok fazla veri yoktur ve diğer birçok hava yolu bo-

zukluğu birlikteliği olabilmesi nedeniyle tanı değeri sınırlıdır. Son olarak, bir IL-5 reseptör anatagonisti olan benralizumab tedavisine yanıt olarak EKP seviyelerinin azaldığı bildirilmesine rağmen, farmakodinamik özellikleri kapsamlı olarak incelenmemiştir<sup>(37)</sup>.

**I.1.d. Eozinofil kaynaklı nörotoksin:** Eozinofil kaynaklı nörotoksin (EKN), astım biyobelirteci olarak incelenmekte olan, serum ve idrar gibi farklı vücut sıvılarından örneklenebilen, aktif eozinofiller tarafından salınan bir başka granül proteindir. Astımlı 151 çocukta yapılan bir çalışmada serum EKN, EKP ve kan eozinofil düzeyleri astım şiddeti, atopik ve atopik olmayan astım ile korelasyon göstermiştir.

Atopik astımı olanlarda hem serum EKN hem de EKP, atopik olmayan astım veya sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hem serum EKN, hem de EKP birbirleri, kan eozinofil seviyeleri ve hava yolu aşırı duyarlılık derecesi ile korelasyon göstermiştir. Ayrıca EKN ve EKP düzeyleri ile astım şiddeti arasında bir korelasyon gözlenmiştir. Çalışmada olgular hafif, orta ve şiddetli astıma ayrılmış ve şiddetli astımı olan hastalarda serum EKP seviyesi, hafif astımı olanlara göre anlamlı olarak daha yüksek iken, orta ve şiddetli astım arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Şiddetli astımı olan hastalarda EKN düzeyleri, orta veya hafif astımı olanlara kıyasla anlamlı derecede yüksek olarak saptanmış olup, bu da EKN'nin astım şiddetinin belirlenmesinde EKP'den muhtemelen daha duyarlı bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir<sup>(38)</sup>. Bir başka çalışmada astım alevlenmesi ile başvuran 43 çocukta EKN, EKP ve total eozinofil düzeyleri araştırılmış, elektif cerrahi için başvuran 19 astımlı olmayan çocuk kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ölçümler, başvuru sırasında ve sekiz hafta içinde tekrarlanmıştır. Astımlı hastalarda hem EKN, hem de EKP düzeyleri kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek, ancak akut alevlenme sırasında takip eden stabil faz seviyesine kıyasla sadece EKN seviyeleri anlamlı olarak daha yüksek ölçülmüştür<sup>(39)</sup>.

Aspirinle indüklenen solunum hastalığı (AERD) için bir biyobelirteç bulmayı amaçlayan çalışmada, atopik astımı olan 40 hastada ve AERD'li 40 hastada serum EKN düzeyleri ölçülmüş, EKN düzeylerinin AERD grubunda atopik astım grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, AERD için %90 sensitif ve %60 spesifik olduğu bildirilmiştir<sup>(40)</sup>.

**I.1.e. Eozinofil peroksit (EPX):** EPX, aktive olan eozinofil tarafından salınan büyük bir granüldür. Nazal ve faringeal örneklerde tespit edilebilir. Seviyesi

kötü kontrol edilen eozinofilik astımı, alerjik hastalığı ve eozinofilik hastalıkları olan hastalarda balgam eozinofilleri ile korelasyon göstermiştir<sup>(41)</sup>. Anti-eozinofilik biyolojik ajanlarla tedavi edilen hastalarda EPX seviyeleri azalmıştır.

## I. 2. Ekshale Edilen Nitrik Oksit Fraksiyonu (FeNO)

Hava yolu hücrelerinde nitrik oksit sentetaz (NOS) ile üretilen gazlı bir mediatör olan nitrik oksidin kantitatif ölçümü, hava yolu inflamasyonunun ve T2 inflamasyonunun indirekt bir belirteci olarak kabul edilir<sup>(42)</sup>.

Ekshale edilen nefesteki fraksiyonel nitrik oksit (FeNO), hava yollarının inflamatuvar durumu hakkında bilgi sağlar<sup>(43)</sup>. Nitrik oksit, bronkodilatör ve inflamatuvar mediatör olarak akciğer biyolojisinde önemli rol oynar ve amino asit L-argininin L-sitrüline dönüştürülmesi sırasında akciğerde nitrik oksit sentetazlardan üretilir. Biyobelirteç olarak FeNO, alerjik inflamasyon sürecinde indüklenebilir NOS aktivasyonunun bir sonucu olarak hava yolu epitelyumu tarafından nitrik oksit üretiminden kaynaklanır<sup>(4,44)</sup>. Astımı olan hastalar nefeslerinde, hava yolu inflamasyonuna sekonder hava yolu epitel hücrelerinde indüklenebilir NOS aktivasyonuna bağlı olduğu düşünülen yüksek NO düzeylerine sahiptir<sup>(43)</sup>. Kemilüminesans analizörleri gaz fazında NO konsantrasyonunu ölçer<sup>(45)</sup>. Amerikan Toraks Derneği (ATS) ve Avrupa Solunum Derneği (ERS) kılavuzu ekshalasyon nefesindeki fraksiyonel ekshalasyon NO konsantrasyonunun (FeNO) milyar başına parça olarak (ppb) ifade edilmesini önerir.

Tek, bağımsız bir biyobelirteç olarak FeNO özellikle yararlı olmayabilir ve belki de daha kapsamlı bir panelin parçası olarak kullanılmalıdır<sup>(4)</sup>. Şiddetli astımın tedavisi için mevcut kılavuzlar, yetişkinlerin ve astımı olan çocukların yönetimi için rutinde FeNO kullanımını önermemektedir<sup>(16)</sup>. Ekshale edilen uçucu organik bileşiklerin kütle spektrometresi ile birleştirilmiş gaz kromatografisi ile ölçümü astımlı çocuklarda alevlenme riskini tahmin edebilir<sup>(46)</sup>. FeNO seviyeleri inflamasyon ve akciğer eozinofilisi ile ilişkilidir, ancak IL-5'ten bağımsızdır<sup>(47)</sup>. Astımın klinik çalışmalarında kullanılmak üzere FeNO ek bir biyobelirteç olarak önerilmiştir<sup>(3)</sup>. FeNO astımda yükselir ve inhale steroidlerle azalır<sup>(48)</sup>. Sigara içme, atopi ve yaş FeNO değerlerinin dağılımını etkilemektedir<sup>(49,50,51)</sup>. FeNO'nun kullanımı ve yorumlanması ile ilgili ATS kılavuzu, düşük bir FeNO'yu yetişkinlerde < 25 ppb (çocuklarda < 20 ppb) olarak tanımlamaktadır<sup>(43)</sup>. Düşük FeNO'lu (erişkinlerde < 25 ppb

ve çocuklarda < 20 ppb) semptomatik hastalarda eozinofilik inflamasyonun olası olmadığını gösterirken, yüksek FeNO (yetişkinlerde > 50 ppb ve çocuklarda > 35 ppb) hava yolu eozinofilisi ve steroid duyarlı inflamasyon olduğunu düşündürmektedir<sup>(43)</sup>. FeNO'da belirgin bir artış veya azalma > %20 (bazal değeri > 50 ppb ise) veya > 10 ppb (bazal değeri < 50 ppb ise) olarak tanımlanır.

Kronik persistan stabil astımı olan 94 hastayı içeren randomize bir çalışmada, inhale kortikosteroid (İKS) dozunu titre etmek için FeNO ölçümleri ve GINA kılavuzlarına dayanan geleneksel tedavi alan bir kontrol grubu kullanılmıştır<sup>(52)</sup>. FeNO seviyelerini takip ederek yönetilen grup anlamlı olarak daha az İKS gerektirmiş ve alevlenmelerin sayısı azalmıştır<sup>(53)</sup>. FeNO ölçülürken kullanılan analizör, yaş (FeNO çocuklarda yaşla birlikte artar), boy, atopik semptomlar, sigara, anti-inflamatuvar ilaç kullanımı, ölçüm tekniği, ekshalasyon akış hızı ve burun NO kontaminasyonu dahil olmak üzere dikkat edilmesi gereken birçok durum vardır<sup>(54)</sup>. Bir çalışmada, dupilumabın alevlenmeyi azaltmadaki etkinliği, daha yüksek FENO seviyesine ( $\geq 25$  ila <50 ppb veya  $\geq 50$  ppb) sahip hastalarda daha düşük FENO (< 25 ppb) olanlara göre anlamlı derecede daha belirgin bulunmuştur<sup>(26)</sup>. Ayrıca, dupilumab tedavisinin, lebrikizumab gibi IL-13 yolunu hedefleyen diğer ilaçlarla gösterilen bir etki olan FeNO düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir<sup>(55)</sup>. FeNO seviyeleri mepolizumab tedavisinden etkilenmez<sup>(23)</sup>. Başlangıçtaki FeNO düzeyleri de kontrolsüz ciddi persistan alerjik astımı olan hastalarda astım alevlenmelerinin omalizumab ile daha belirgin bir azalabileceğini öngörmüştür<sup>(27)</sup>. FeNO'nun klinik faydası, FeNO bazlı bir yönetim stratejisi ile tedavi edilen astım hastalarında astım alevlenmelerinin daha düşük olması ve İKS dozajını belirleme potansiyelini içermesidir<sup>(56)</sup>. Ek olarak, steroid-bağımlı astım hastalarında FeNO sıklıkla artar.

İKS tedavisine uyumlu olan şiddetli astımı olan bazı hastalarda yüksek FeNO seviyeleri görülebilse de, İKS tedavisine zayıf uyumun bir göstergesi olarak kullanılabilir<sup>(57)</sup>. Hanania ve ark., 7901 yetişkin astımlı hastayı (> 12 yaş) tedavi eden, FeNO ölçümünü hava yolu inflamasyonunun bir belirtisi olarak kullanan, düşük veya yüksek inflamasyonlu olarak kategorize eden 337 ABD'li klinisyenin çalışmalarını içeren bir araştırmanın sonuçlarını yayınlamışlardır<sup>(58)</sup>. Klinisyenler FeNO ölçümünü kullanarak, tedavi planını %31 oranında değiştirmiş, esas olarak %90 olguda

İKS'yi değiştirmiştir. Yüksek inflamasyonlu hastaların %66'sında İKS başlanmış veya arttırılmıştır. Düşük inflamasyonlu hastaların %9'unda İKS dozu azaltılmış veya kesilmiştir. Şiddetli astımın yönetimi hakkındaki 2014 ATS/ERS kılavuzları yetişkinlerde ve şiddetli astımı olan çocuklarda tedaviye rehberlik etmek için FeNO'nun kullanılmasını önermekle birlikte, hedefe yönelik tedavilerin ortaya çıkması bu biyobelirtecin kullanımının artmasına neden olmuştur<sup>(59)</sup>.

İngiltere rehberlerindeki (AHRQ ve NICE) FeNO ölçümlerini içeren algoritmaları tanıya, tedavi yanıtına, doz titrasyonuna ve tedaviye uyuma yardımcı olabilecekleri için önermektedir<sup>(60)</sup>. Benzer şekilde GINA, FeNO  $\geq 25$  ppb olan hastalarda anti-IgE tedavisi ve anti-IL-4R tedavisine iyi yanıtın olduğu, olağan tedavilere cevap vermeyen hastalar için FeNO kullanımını önermektedir<sup>(28)</sup>.

Özetle, FeNO'nun şiddetli astımda tanısal, prognostik ve prediktif (öngörücü) özellikleri vardır. Ek olarak, farmakodinamik özelliklere sahiptir ve seviyeleri, İKS veya IL4/IL-13 yolunu hedefleyen ilaçların kullanımıyla azaltılabilir.

### I. 3. Serum IgE

IgE, tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonlarına aracılık eden ve alerjik astım patogeneğinde anahtar rol oynayan bir immünoglobulindir. Serum IgE, astım riski ile yakından ilişkilidir. Alerjenlere maruz kalındığında IgE mast hücreleri ve bazofiller üzerindeki IgE reseptörlerine bağlanır ve T2 cevabına aracılık eden sitokinler üretir<sup>(61)</sup>. Ayrıca, artan IgE düzeyleri wheezing insidansı, yetişkinlerde ve çocuklarda astımın şiddeti ile koreledir ve balgam eozinofilik inflamasyon varlığı ile ilişkili bağımsız bir faktördür<sup>(62)</sup>.

Total serum IgE düzeyleri alerjik astımı olan bireyleri tanımlamaya yardımcı olsa da, ölçümü klinik prezentasyon ve fizik muayene bulguları ile birleştirilmelidir. Alerjene özgü IgE seviyesi ölçümü, spesifik alerjene duyarlı olan bireylerin tanımlanmasında daha yararlıdır ve hastanın alerjik profilinin tam olarak değerlendirilmesi için özellikle cilt prick testleri mevcut değilse veya yapılamazsa önerilir. Klinikte total IgE seviyeleri, serbest IgE ve yüksek afiniteli reseptör Fc $\epsilon$ RI arasındaki etkileşimi bloke eden rekombinant bir insan monoklonal anti-IgE antikoru olan omalizumab için aday olabilecek hastaları tanımlamak için kullanılır.

Mevcut kılavuzlar, pereniyal alerjisi ve yüksek IgE seviyeleri olan kontrolsüz astım hastalarında ek tedavi

olarak omalizumab önermektedir. Bununla birlikte, total IgE seviyesi klinik yanıtı öngöremez ve tedavinin başlanmasından sonra IgE düzeylerinin ölçümü, omalizumab'a yanıtı belirlemek için kullanılamaz. Bu nedenle total IgE'nin herhangi bir öngörücü veya farmakodinamik özelliği yoktur. Astımda anti-IgE'ye iyi cevabın olacağını öngören faktörler kan eozinofilleri  $\geq 260/\mu\text{l}$ , FeNO  $\geq 20$  ppb, alerjene bağlı semptomlar ve çocukluk çağı astımıdır<sup>(63)</sup>.

#### I. 4. Serum Periostin

Periostin IL-13 ve IL-4'e yanıt olarak bronşiyal epitel hücreleri ve akciğer fibroblastları tarafından salgılanan hücre dışı bir matriks proteindir ve T2 yüksek eozinofilik astım ile ilişkilendirilmiştir<sup>(64,65)</sup>. Serum periostininin astımlı yetişkinlerde hastalık ilerlemesi üzerindeki etkisi, tip 2-yüksek astım için bir biyobelirteç olarak kullanımını desteklemektedir<sup>(66)</sup>. Periostin, fibroblastların aktivasyonu ve epitelyal hücreler üzerindeki otokrin etkileri yoluyla astımda subepitelyal fibrozis ve hava yolunun remodeling (yeniden şekillenmesi)'ine katkıda bulunabilir<sup>(67)</sup>. Şiddetli astımı olan hastalarda balgam ve kan eozinofilleri, periostin, FeNO ve immünoglobulin E (IgE) üzerine yapılan bir araştırma, periostinin balgam ve doku eozinofilisi için en güçlü biyobelirteç olduğunu bulmuştur<sup>(68,69)</sup>.

Yüksek doz İKS tedavisi alan şiddetli kontrolsüz astımı olan 59 hastanın dahil edildiği bir çalışmada, artmış serum periostin seviyeleri serum balgam ve bronş biyopsilerinde rezidüel hava yolu eozinofilisini öngörmüştür. Periostin bu konuda FeNO, kan eozinofil sayıları ve serum IgE'den daha iyi bir performans göstermiştir<sup>(68)</sup>. İyi kontrol edilen astımı olan hastalarda serum periostin düzeyleri zaman içinde stabil görünmektedir. Kontrol altındaki astımlıları içeren bir çalışmada, ortalama serum periostin seviyesi 52.2 ng/mL olarak ölçülmüştür<sup>(66)</sup>.

Serum periostininin prediktif bir biyobelirteç olarak kullanımı astımda çeşitli biyolojik ajan tedavilerine cevabın değerlendirilmesi için araştırılmıştır. Anti-IL-13 monoklonal antikoru olan lebrikizumab'ın randomize kontrollü bir çalışmasında, zayıf kontrollü astımı olan 107 hasta tedavi grubuna alınmış; yüksek periostin düzeyleri olan hastalar, tedavi ile düşük periostin seviyesi olanlara göre FEV<sub>1</sub>'de daha büyük iyileşme göstermiştir<sup>(69)</sup>. Bu sonuç, yüksek periostin grubunu tanımlayan  $\geq 50$  ng/mL periostin düzeylerine sahip lebrikizumab ile tedavi edilen 347 hastanın dahil olduğu, iki randomize kontrollü

çalışmadan elde edilen hasta verilerinin toplandığı bir çalışmada da gösterilmiştir<sup>(56)</sup>. Çalışma periostin-yüksek gruptaki astım alevlenmelerinde %60 azalma, periostin-düşük gruptaki hastalar arasında ise sadece %5 azalma olduğunu göstermiştir. Serum periostini, daha yüksek alevlenme oranları yaşayan yüksek bazal periostini olan hastalarda prognostik özelliklere sahip olabilir.

Sonuç olarak, serum periostini, İKS ve IL-13/IL-4 yolunu hedefleyen ilaçlar gibi tedavilerin başlanmasından sonra seviyeleri azaldığı için farmakodinamik özelliklere de sahiptir. Bununla birlikte, periostin seviyeleri özellikle büyüyen çocuklarda yaşla dalgalanabilir ve astımda bağımsız bir biyobelirteç olarak kullanılacak güvenilirliğini sınırlayabilen bir özellik olarak atopik dermatit, eozinofilik otitis media, eozinofilik özofajit, idiyopatik pulmoner fibrozis, skleroderma, diyabetik nefropati, kanser, kardiyovasküler hastalık, pre-eklampsi ve lupus nefriti gibi diğer hastalıklarda da yüksek bulunabilir<sup>(64)</sup>.

Özetle, periostinin prognostik, prediktif ve farmakodinamik özellikleri olabilirken, bazı kısıtlamalar bağımsız bir biyobelirteç olarak faydasını etkileyebilmiş ve bu nedenle kullanımı bu noktada araştırma amaçlı bir biyobelirteç olarak sınırlı kalmıştır.

#### I. 5. Serum Dipeptidil Peptidaz (DDP-4)

Dipeptidil peptidaz-4 (DPP4), akciğer epitel hücrelerinde, endotelial hücrelerde ve submukozal bezlerde yüksek oranda salınır. Bronşiyal düz kasların ve insan fetal akciğer fibroblastının proliferasyonunu uyarır ve fibronektin üretimini teşvik eder. Sıçan modellerinde, alerjen maruziyetinden sonra bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısında ve parankimal dokuda enzimatik aktivitesinin arttığı gösterilmiştir<sup>(70)</sup>.

Periostin gibi, astımda DPP4'ün rolü belirsizdir. DPP4 inhibisyonunun, uygulama yoluna (oral, aerosolize, topikal) bağlı hayvan modellerinde hava yolu inflamasyonu üzerinde etkileri vardır<sup>(71)</sup>. İnsan hava yolu inflamasyonunda DPP4 çalışmaları sınırlıdır. İnsanlarda IL-13, DPP-4'ün bir indükleyicisidir ve ciddi kontrolsüz astımı olan hastalarda faz 2b klinik çalışmasında IL-13 yolu aktivasyonunun biyobelirteçleri olarak DDP-4 ve periostin'in kullanımı kaydedilmiştir<sup>(72)</sup>. Ayrıca, DDP-10, aspirinle oluşan solunum hastalığı ile anlamlı derecede ilişkilidir<sup>(73)</sup>.

Özet olarak, DPP-4 ve DPP-10'un astımda bir biyobelirteç olarak kullanılması, daha fazla araştırma gerektirmektedir.

## I. 6. Liposinler

Antiinflamatuvar etkiye sahiptir ve kemotaksis ve ilgili sinyal transdüksiyonunda önemli bir rol oynar<sup>(4)</sup>.

## I. 7. Diğerleri

Tip 2 inflamasyonun diğer potansiyel biyobelirteçleri arasında, monosit kemotaktik protein-4 (MCP4), eotaksin-2 ve üriner bromotirozin bulunur<sup>(74-76)</sup>.

## I. 8. Üriner Metabolitler ve Biyobelirteçler

**I.8a. Lökotrien E4 (LT-E4):** Lökotrien E4, idrar örneklerinde invazif olmayan bir şekilde ölçülebilen sisteinil lökotrien metabolizmasının bir ürünüdür. Alerjik astımı olan çocuklarda ve aspirinle şiddetlenen solunum hastalığı olan yetişkinlerde idrar lökotrien E4 (uLTE4) konsantrasyonları artar<sup>(4)</sup>. Birçok çalışma, uLTE4'ün astım tedavisi seçiminde önemli bir biyobelirteç olabileceğinden düşündürmektedir<sup>(32)</sup>. Astım alevlenmeleri sırasında seviyeleri artar ve ayrıca lökotrien reseptör antagonistleri ile tedaviye cevabın bir göstergesi olabilir<sup>(77)</sup>. Hafif ila orta şiddette astımı olan 48 hastayı içeren dört haftalık bir çalışmada,  $\geq 200$  pg/mg düzeyindeki bir üriner lökotrien E4 seviyesi, montelukast tedavisine 3.5 kat daha fazla klinik yanıt olasılığı ile ilişkilendirilmiştir<sup>(78)</sup>. Bir meta-analize göre, idrarda lökotrien E4 seviyeleri potansiyel olarak aspirinle indüklenen solunum hastalığı riski olan hastaları tanımlamak için de kullanılabilir<sup>(79)</sup>.

**I.8b. Prostaglandin D2:** Prostaglandinler D2 (PGD2) ve metabolitleri (11  $\beta$  prostaglandin F2a) akciğer mast hücreleri tarafından salgınır ve hava yollarında bronkokonstriksiyon ve vazodilatasyona neden olan siklooksijenaz yolunun ana ürünüdür. Alerjen veya aspirin intoleransı olan astımlı hastalarda üriner PGD2 ve 11 $\beta$ PGF2 arttığı bildirilmiştir<sup>(80)</sup>. Bu üriner biyobelirteçlerle ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Özellikle PGD2 reseptörlerini hedefleyen yeni terapilerin (DP2 antagonistleri) geliştirilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Yakın zamanda astım KOAH birlikteliği (ACO) olan hastaları tanımlamak için üriner PGD2'nin faydası incelenmiş, ancak gelecekte yapılacak çalışmalarla kullanımının daha fazla değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır<sup>(81)</sup>.

**I.8c. Bromotirozin:** Bromotirozin, bir solunum patlaması sırasında eozinofiller aktive edildiği zaman hipobromik asitten üretilir. İdrarda stabilitesi ve invaziv olmayan ölçümü nedeniyle potansiyel bir biyobelirteç olarak birçok avantaja sahiptir. Bromotirozinin klinik ortamda kullanımı, daha büyük bir inflamatuvar biyobelirteç panelinin bir parçası olarak değerlendirildiğinde muhtemelen daha iyi olacaktır<sup>(4)</sup>.

Alerjik astımı olan hastalarda idrar bromotirozin konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu tanımlanmıştır. Hava akımı sınırlaması, yetersiz kontrol edilen astım ile ilişkilidir ve kortikosteroidlere yanıtı ve gelecekteki alevlenmeleri öngörmektedir<sup>(76)</sup>. Bununla birlikte, bromotirozinin diğer biyobelirteçlerle uyumluluğu ve bir biyobelirteç olarak kullanımı için hala sınırlı sayıda araştırmalar mevcuttur ve daha fazla değerlendirme yapılması gerekmektedir.

**I.8d. Metabolomikler:** Metabolomik, hücresel metabolik yollardan üretilen küçük moleküllerin incelenmesidir<sup>(82)</sup>. H-nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, bir vücut sıvısı içindeki spesifik kimyasal bileşenlerin miktarını belirlemek için kullanılır. Saude ve arkadaşları astım ve sağlıklı kontrolleri dahil ettiği 135 çocuğu incelediği çalışmada, 70 idrar metabolomiği ölçmüştür<sup>(83)</sup>. Sağlıklı kontrollerden astımı belirleme doğruluğu %94 bulunmuştur. Bu, astımın tanımlanmasında potansiyel bir klinik araç olarak insan idrar örneklerinin NMR analizinin olduğunu bildiren ilk çalışmadır. İdrar metabolomikleri çocuklarda kortikosteroid dirençli astımı belirleme ve astım ile KOAH'ı ayırma potansiyeline sahiptir<sup>(84)</sup>.

## I. 9. Kompozit (Birleşik) Biyobelirteçler

Tek bir biyobelirteç, astım gibi heterojen hastalıklarda görülen farklı patofizyolojiyi yansıtmaz. Bu nedenle, biyobelirteçleri birleştirmek astımdaki tahmin yeteneklerini artırabilir. Bir araştırmada kontrolsüz 75 astımlı hastada balgam eozinofil, FeNO ve kan eozinofil arasındaki korelasyonu araştırılmış ve kan eozinofil ile FeNO'nun eozinofilik hava yolu inflamasyonunu doğru olarak tahmin edebileceği bulunmuştur<sup>(85)</sup>. Şiddetli eozinofilik astımı olan hastalarda mepolizumabın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, başlangıç periferik kan eozinofil (PKE) ve FeNO ölçümleri olan 606 olgu analiz edilmiştir<sup>(86)</sup>. Temel demografik özellikler, klinik özellikler ve yıllık alevlenme oranları 4 biyobelirteç alt grubu, PKE yüksek FENO yüksek, PKE yüksek FENO düşük, PKE düşük FENO yüksek ve PKE düşük FENO düşük temel alınarak hesaplanmıştır. PKE yüksek FENO yüksek grubu, mepolizumab ile tedavi edildiğinde %33 alevlenme oranı azalması olan plasebo grubuna kıyasla %61 alevlenmeyi azaltma oranına sahip bulunmuştur. Mepolizumabın, FeNO'ya bakılmaksızın PKE düşük alt grupları üzerinde aynı etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir. Yakın zamanda, yüksek FENO ve kan eozinofil sayısının kombinasyonunun referans grubuna (normal FENO ve kan eozinofil sayısı) kıyasla daha yüksek alevlenme

oranları ile ilişkili olduğu ve birinci basamakta alevlenme riski olan astım hastalarını tanımlayabildiği gözlemsel bir çalışma yayınlanmıştır<sup>(87)</sup>.

Birleşik biyobelirteç yaklaşımının faydası İngiltere'de FeNO, kan eozinofil ve serum periostin seviyelerinin birleştirildiği ve Kompozit Biyobelirteç Puanı adı verilen RASP-UK programında değerlendirilmiştir<sup>(88)</sup>. RASP-UK programı, bu biyobelirteçlerin kortikosteroid tedavisine rehberlik edip edemeyeceğini ele alacak randomize, pragmatik, çok merkezli, paralel bir grup çalışmasıdır. ARIETTA çalışması, henüz tamamlanmış başka bir çalışmadır. Şiddetli astım hastalarında biyobelirteçler hakkındaki bilgimizi geliştirmeyi amaçlayan prospektif bir gözlemsel çalışmadır. Ayrıca, biyobelirteçler arasındaki korelasyonu incelemeyi, biyobelirteçler ve astım alevlenme oranı arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamıştır<sup>(89)</sup>. Bu çalışmanın nihai sonuçları henüz yayınlanmamıştır.

## II. T2 OLMAYAN BİYOBELİRTEÇLER

T2 düşük (T2 olmayan) astımın patofizyolojisi ve kesin mekanizmaları tam olarak anlaşılmış veya araştırılmamıştır. Genel olarak, bu tip astım, eozinofilik inflamasyon/T2 belirteçlerinin eksikliği ile karakterizedir ve bazen nötrofilik veya pauci-granülositik inflamasyon ile ilişkilidir. T2 düşük astım yaygındır, ciddi hastalığı olan hastaların üçte biri ile %45'ini oluşturur ve kortikosteroid tedavisine zayıf yanıt ile ilişkilidir<sup>(90)</sup>. Henüz klinik uygulamada doğrulanmış T2 düşük astım biyobelirteçleri yoktur. Astımdaki inflamatuvar paternlerle ilgili önemli bir çalışmada, şiddetli astımı olan 34 hastanın 14'ünün bronkoskopik BAL ve biyopsiye göre eozinofilik olmadığı görülmüştür<sup>(1)</sup>. Başka bir çalışmada, hastaların %55'i eozinofilik, %22'si nötrofilik ve %17'si pauci-granülositik bulunmuştur. Astımlı 833 hastanın balgam hücre sayıları ile yapılan farklı bir çalışmada ise olguların %58'inin eozinofilik olmadığı saptanmıştır<sup>(91,92)</sup>.

### II. 1. Balgam Nötrofilleri

Yüksek balgam nötrofil sayısı, daha çok şiddetli fenotip ile ilişkilidir<sup>(93)</sup>. Bununla birlikte, artmış nötrofilik balgam hücre sayımı için cut-off değeri literatürde değişiklik gösterir, ancak çoğu kaynak %61-76 arasında bir eşik olduğunu ileri sürmektedir<sup>(62)</sup>. Eozinofilik olmayan astımın kortikosteroidlere zayıf yanıt verdiği göz önüne alındığında, bu tip astım için başka tedaviler araştırılmıştır. Makrolidler kistik fibroz (KF), KF olmayan bronşektazi, alevlenmeye yatkın KOAH gibi nötrofilik enflamasyonu olan birçok kronik akciğer hastalığında faydalı etkilere sahiptir ve nötrofilik astımın makrolidlere özellikle duyarlı

olabileceği düşünülmektedir<sup>(94)</sup>. Randomize kontrollü AZISAST çalışmasında 55 hasta azitromisin ile altı aylık tedavi görmüş ve tedavinin genel bir yararı olmamasına rağmen, eozinofilik olmayan şiddetli astımı olan alt grupta şiddetli alevlenmelerde ve alt solunum yolu enfeksiyonlarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir<sup>(95)</sup>. Bununla birlikte, daha yakın tarihli bir Avustralya çalışması (AMAZES), şiddetli astımdaki azitromisine yanıtın, altta yatan hava yolu inflamasyonunun tipinden etkilenmediğini düşündürmektedir<sup>(96)</sup>.

Birkaç balgam mediatörü potansiyel biyobelirteç olabilir. İnflamatuvar paternin tanısı için balgam eozinofil peroksidaz, balgam eozinofilisi ile ilişkilidir<sup>(97)</sup>. Spesifik mikroRNA'lar nötrofilik astımı eozinofilik astımdan ayırt edebilir<sup>(98)</sup> ve nötrofil miyeloperoksidaz astım KOAH örtüşme sendromunu astımdan ayırma potansiyeline sahiptir<sup>(99)</sup>.

### II. 2. Serum Biyobelirteçleri

Günümüzde, kan nötrofil sayısı astım tanısı için bir biyobelirteç değildir<sup>(28)</sup>. Astımlı bazı hastalarda hava yolu ve kandaki IL-17 seviyeleri artar ve hastalık şiddeti ile ilişkilidir. Balgamdaki IL-17 ile nötrofilik inflamasyon ve IL-17 mRNA düzeyleri arasındaki ilişkinin, nötrofil sayılarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>(104)</sup>. IL-17 mRNA astımı olan hastaların balgam örneklerinde artar ve balgamdaki nötrofil sayıları ile korelasyon gösterir<sup>(100)</sup>. IL-17'nin steroid direncinde rol oynadığı varsayılmaktadır. Bununla birlikte, bir anti-IL-17 reseptör monoklonal antikoru olan brodalumab, kötü kontrollü astımlı hastalarla yapılan büyük çok merkezli bir çalışmada etkinlik gösterememiştir<sup>(101)</sup>.

IL-8'in bir nötrofil kemoatraktanı olup, eozinofilik olmayan astımlıların balgam örneklerinde arttığı bulunmuştur ve nötrofil sayıları ile korelasyon gösterir<sup>(102)</sup>. BAL ve serumdaki 244 biyomolekülün seviyelerini araştıran bir çalışmada, nötrofilik astımda birçok belirtecin seviyeleri önemli ölçüde artmıştır. Bunlar arasında IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CXCL1, CCL3, CRP, GDF-15 ve solubl ST2 yer almaktadır<sup>(103)</sup>. Nötrofilik astımda sistemik inflamasyonu değerlendiren başka bir çalışmada IL-6, CXCR1 ve CXCR2 düzeyleri nötrofilik olmayan ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır<sup>(104)</sup>. Nötrofilik astımda incelenen diğer biyobelirteçler arasında serum ve balgam miyeloperoksidaz, nötrofil elastaz ve tümör nekroz faktör (TNF)- $\alpha$  yer alır<sup>(105)</sup>.

İnflamatuvar olmayan veya düşük dereceli bir inflamatuvar fenotip olarak kabul edilen pauci-granü-

lositik astım için biyobelirteçler hakkında daha az şey bilinmektedir<sup>(92-96)</sup>. Radyolojik biyobelirteçler ve remodelingi yansıtan biyobelirteçler bu tip astımı tanımlamak için faydalı olabilir. Bronşiyal termoplasti, pauci-granülositik şiddetli astımı olan hastalarda alternatif bir tedavi stratejisi olabilir<sup>(106)</sup>.

### III. YENİ BİYOBELİRTEÇLER

#### III. 1. Ekshale Nefes Kondensatındaki (ENK) Biyobelirteçler

Ekshale nefes kondensatı (ENK), hava yolu ortamını örneklemek için invazif olmayan bir yöntemdir. Solunan nefesi su buharı ile doyurarak ve yoğunlaşmış materyali toplayarak hem uçucu hem de uçucu olmayan bileşikler analiz eder. ENK'da toplanan bileşiklerin örnekleri arasında nitrik oksit ürünleri, hidrojen peroksit, lökotrienler ve sitokinler bulunur. Bazı bileşenler astım tanısı ile, diğerleri astım şiddeti ile ilişkilidir<sup>(61)</sup>. Ekshale nefes, hava yollarını kaplayan uçucu olmayan sıvı parçacıklarından oluşur. ENK analizi, çoklu biyobelirteçlerin ölçülmesini sağlayan ve alt fenotiplemeyi kolaylaştıran invazif olmayan yöntemlerden biridir. Proteom analizinin kullanılması hastalığa özgü proteolitik peptit veya protein paternlerini ortaya çıkarabilir ve astımın saptanması için yeni proteinlerin bulunmasına yardımcı olabilir. Sıvı kromatografi ve kütle spektrometrisi ENK numunelerinde bulunan proteinleri ayırabilir ve tespit edebilir.

Çalışma sonuçları çelişkili olmasına rağmen, solunan nefesin pH'sı hava yolu inflamasyonu ile ilişkilidir<sup>(107)</sup>.

ENK'nın şiddetli astım incelemesinde lökotrien B4, lipoksinler, araşidonik asit metabolitleri, nitrojen oksitler, amonyak, sitokinler, hidrojen peroksit, adenosin, 8 izoprostan ve TNF- $\alpha$  gibi birçok biyobelirteç artar<sup>(108)</sup>. Bununla birlikte, tükürük kontaminasyonu ve toplama teknikleri numunedeki proteinleri etkileyebilir ve biyobelirteçlerin zayıf tekrarlanabilirliği olabilir ve geçerli referans normal değerlerin olmaması astımda güvenilir biyobelirteçleri toplamak için ENK kullanımını sınırlayabilir.

#### III. 2. Uçucu Organik Bileşikler (UOB)

Nefeste UOB'ler endojen metabolizma ürünlerinden veya hava, gıda ve su gibi eksojen kaynaklardan türetilir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada UOB'lerin eozinofilik ve nötrofilik astımı doğru bir şekilde ayırt edebildikleri gösterilmiştir<sup>(109)</sup>. Heksan ve 2-heksanon gibi UOB'ler eozinofilik astımda yükselmiştir, kan eozinofilleri ve FENO ile karşılaştırılabilir

niteliktedir. FENO, kan eozinofilleri ve UOB'lerin kombinasyonu, eozinofilik astım için iyi bir tahmin yapmaya olanak vermiştir. Nötrofilik astımda nonanal, 1-propanol ve heksan ölçülmüştür. Özet olarak UOB'lerin astımda biyobelirteç olarak kullanımları mümkündür, ölçümleri non-invazivdir ve balgam eozinofilleri ile daha doğru bir şekilde ilişkilendirilebilir.

#### III. 3. Elektronik Burun (eBurun) Biyobelirteçleri

eBurun, UOB'lerin saptanması için bir kimyasal sensör dizisinden ve patern tanıma (nefes baskısı/biyopsi) için bir algoritmadan oluşur. Astım tanısı ve anti-inflamatuvar tedavinin izlenmesi için potansiyel bir yardımcı araçtır. Astım tanısı için eBurun ve FeNO birleştirildiğinde tanı hassasiyeti %95.8'e yükselmiştir<sup>(110)</sup>. Non-invaziv, taşınabilir, sensör teknolojisini içerir ve hem klinik hem de araştırma uygulamaları için umut verici bir teknik olabilir. eBurun'un klinik uygulamadaki faydası henüz tam olarak değerlendirilmemiştir.

#### III. 4. Hava Yolu Remodeling'inin Biyobelirteçleri

Şiddetli astımda hava yolu remodelingi (yeniden modellenmesi), hava yolu düz kas ve mukoz bezlerin hipertrofisi ve fiks hava yolu tıkanıklığı ile ilişkili olabilir. Bronşiyal duvar ve hava yolu düz kas hipertrofinde fibroblast, miyofibroblast, kollajen-3 birikimi artmıştır<sup>(62)</sup>. Remodeling'i belirlemek için bronş biyopsisi gereklidir<sup>(111)</sup>, bununla birlikte, riskli invaziv bir prosedürdür. Matriks metaloproteinaz (MMP)-1, fibroblast büyüme faktörü (FGF)-2 ve Galectin-3 gibi biyobelirteçlerin non-invazif balgam analizi remodeling'i tahmin edebilir, ancak bunların kullanımı sınırlıdır<sup>(112,113)</sup>.

#### III. 5. Genomikler

Yapılan bir çalışmada 6-gen ekspresyonu biyobelirtecin oluşmasına yol açan farklı astım fenotiplerinin uyarılmış balgam örneklerinden üretilen tüm genom gen ekspresyon profilleri araştırılmıştır<sup>(114)</sup>. Bunlar, astım endotiplerini ayırt edebilen ve kortikosteroidlere tedavi yanıtını tahmin edebilen charcot-leyden kristal proteini, karboksipeptidaz A3, deoksiribonükleaz 1 like 3, IL-1 $\beta$ , alkalin fosfataz ve kemokin reseptör 2'den oluşmaktadır. Bu 6 biyobelirteç tekrarlanabilir, astımdaki inflamatuvar fenotipleri önemli ölçüde ayırt eder ve IKS tedavisine yanıtı öngörür. Klinik ortama adapte edilebilmesi için bunların daha fazla değerlendirilmesi gerekir.

### III. 6. Ezrin

Ezrin, selüler morfolojiyi, hücreler arası yapışmayı ve epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonunu koruyan bir zar-hücre iskelet proteinidir. Laoukili ve arkadaşlarının çalışması, IL-13'ün ezrin ekspresyonunu düzenlediğini, epitelyal hücre polarizasyonunu ve silikatlı hücre farklılaşmasını değiştirerek astımda hava yolu hasarına ve tıkanmasına neden olduğunu ilk tarif eden çalışma olmuştur<sup>(115)</sup>. Jia ve arkadaşları, astmatik ENK'da ve serumda normal deneklerle karşılaştırıldığında ezrin düzeylerinin azaldığını göstermiştir<sup>(116)</sup>. Ayrıca, kontrolsüz ve kötü kontrol edilen astımlı hastalarda ezrin düzeyleri iyi kontrol edilenlere göre daha düşük bulunmuştur. Serum ezrin seviyeleri serum periostin ve IL-13 seviyeleri ile negatif korelasyon göstermiştir. Bu nedenle ezrin, IL-13 kaynaklı epitel hücre hasarı için potansiyel bir biyobelirteç olabilir, ancak astım kontrolü ve gelecekteki alevlenmeleri tahmin etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

### III. 7. Kitinazlar

Kitinazlar, hücre dışı matriksin düzenlenmesinde ve hava yolunun yeniden şekillenmesinde rol oynadığı düşünülen, kitinleri parçalama yeteneğine sahip hidrolazlardır<sup>(4)</sup>. Kitinaz benzeri protein YKL-40 kitinaz 3 like 1 (CHI3L1) inflamasyonlu bölgelerde üretilir, makrofajlardan ve düz kas hücrelerinden salgılanır. Astımı kronik obstrüktif akciğer hastalığından (KOAH) ve sağlıklı kontrollerden ayırmak için ilginç bir biyobelirteçtir. Tang ve arkadaşları, astımı olan hastaların serum YKL-40 düzeylerinin daha yüksek olduğunu, bunun total IgE, kan eozinofilleri ile korele ve akciğer fonksiyonu ile de ters orantılı olduğunu göstermiştir<sup>(117)</sup>. İki farklı astım fenotipi yüksek YKL-40 düzeyleri ile tanımlanmış olup, bunlar tip 2 olmayan inflamatuvar yollarla ilişkili olan biri irreversible hava yolu obstrüksiyonu ve diğeri şiddetli alevlenmelerle ilişkili olan fenotiptir<sup>(118)</sup>. Bu nedenle, YKL-40 tip 2 olmayan hastalarda şiddetli ve alevlenmeye yatkın astımı belirleme potansiyeline sahiptir ve daha büyük astım popülasyonunda değerlendirilmesi gerekir<sup>(32)</sup>.

### III. 8. Diğerleri

Son veriler, CCL26 (Eotaxin-3)'nin hava yolu mukozal ekspresyonunun tip 2 inflamasyon için en iyi ayırıcı belirteç olduğunu göstermiştir<sup>(119)</sup>.

Şiddetli atopik olmayan astımı olan yetişkin hastalarda serum ürokinaz plazminojen aktif reseptörü yükselmiştir<sup>(120)</sup>. Yine seçilmiş 10 mikroRNA'nın

(HS\_108.1, 112, 182.1, 240, 261.1, 3, 55.1, 91.1, has-miR-604 ve has-miR-638) seviyesi şiddetli astımlı çocuklarda daha yüksek bulunmuştur<sup>(121)</sup>.

Serum yüksek duyarlı C-reaktif protein (hs-CRP) astımlı hastalarda kötü kontrol edilenlerde sağlıklı kontrolden ve iyi kontrol edilenlere karşı daha fazla artar ve kalp hastalığı, hipertansiyon, hiperlipidemi, KOAH veya enfeksiyon gibi komplikasyonların olmadığı sigara içmeyen astımlı hastalarda hava yolu inflamasyonunun faydalı bir biyobelirteçini temsil edebilir<sup>(122)</sup>.

Serumda inflamatuvar belirteçler interlökin-6 (IL-6) ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), astımlı hastalarda kontrollere göre daha yüksek seviyeler göstermiş ve daha şiddetli astım ile ilişkili bulunmuştur<sup>(123)</sup>. Yüksek serum IL-8 seviyesi KOAH'ı astım hastalarından ayırt edebilir<sup>(124)</sup>.

Serum biyobelirteçlerinin tüm avantajlarına rağmen, periferik kan çalışmalarının sıklıkla hava yolu biyolojisini yansıtmadığını ve bu nedenle periferik kan biyobelirteçlerinin solunum yollarındaki fizyolojik mekanizmaları temsil etmeyebileceğini hatırlamak önemlidir<sup>(65)</sup>.

## SONUÇ

Astımın moleküler fenotipini tanımlamak için ortaya çıkan biyobelirteçlerin daha fazla araştırılması ve validasyonu gerekmektedir. Astımın heterojenliğine bakıldığında, kandan, idrardan ve ekshale edilen nefesten kompozit biyobelirteçlerin geliştirilmesi, terapötik yanıtı tahmin etmek için pratikte daha uygun bir çözüm gibi görünmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Wenzel S.E., Schwartz L.B., Langmack E.L. et al., 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; 60 (3): 1001-1008.
2. Fahy J.V. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many, *Nat. Rev. Immunol.* 2015; 15 (1): 57-65.
3. Szeftel S.J., Wenzel S., Brown R. et al., Asthma outcomes: biomarkers, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;129 (3): S9-23.
4. Fitzpatrick AM. Biomarkers of asthma and allergic airway diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015;115: 335-340.
5. Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity, *Front. Immunol.* 2014; 5: 570.
6. Bochner B.S., Gleich G.J. What targeting eosinophils has taught us about their role in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126 (1): 16-25.

7. Westerhof G.A., Korevaar D.A., Amelink M. et al. Biomarkers to identify sputum eosinophilia in different adult asthma phenotypes, *Eur. Respir. J.* 2015; 46 (3):688–696.
8. Walsh C.J., Zaihra T., Benedetti A., et al. Exacerbation risk in severe asthma is stratified by inflammatory phenotype using longitudinal measures of sputum eosinophils, *Clin. Exp. Allergy* 2016; 46 (10): 1291–1302.
9. Green R.H., Brightling C.E., McKenna S., et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial, *Lancet* 2002; 360 (9347): 1715–1721.
10. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al. 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):308–17.
11. Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(5):1501–8.
12. Leuppi JD, Salome CM, Jenkins CR, et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(2):406–12.
13. Deykin A, Lazarus SC, Fahy JV, et al. Sputum eosinophil counts predict asthma control after discontinuation of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(4):720–7.
14. Petsky A., Li A., B. Chang. Tailored interventions based on sputum eosinophils versus clinical symptoms for asthma in children and adults, *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 8: Cd005603.
15. Lazarus SC., Krishnan JA., King TS, et al. Mometasone or tiotropium in mild asthma with a low sputum eosinophil level, *N. Engl. J. Med.* 2019; 380 (21): 2009–2019.
16. Chung K.F., Wenzel S.E, Brozek J.L., et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma, *Eur. Respir. J.* 2014; 43 (2): 343–373.
17. Wagener AH, de Nijs SB, Lutter R, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax* 2015;70(2):115–20.
18. Katz LE, Gleich GJ, Hartley BF, et al. Blood eosinophil count is a useful biomarker to identify patients with severe eosinophilic asthma. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11(4):531–6.
19. Price D.B., Rigazio A., Campbell J.D., et al. Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: a UK cohort study, *Lancet Respir. Med.* 2015; 3 (11): 849–858.
20. Malinovschi A., Fonseca J.A., Jacinto T, et al. Exhaled nitric oxide levels and blood eosinophil counts independently associate with wheeze and asthma events in National Health and Nutrition Examination Survey subjects, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132 (4): 821–827.
21. Vijverberg S.J., Hilvering B., Raaijmakers J.A., et al. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside, *Biologics* 2013; 7: 199–210.
22. Eguiluz-Gracia I, Tay TR, Hew M. et al. Recent Developments And Highlights In Biomarkers In Allergic Diseases And Asthma. *Allergy* 2018; 73: 2290-2305.
23. Ortega HG., Liu MC, Pavord ID., et al., Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma, *N. Engl. J. Med.* 2014; 371 (13): 1198–1207.
24. Castro M., Mathur S., Hargreave F., et al. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 184 (10): 1125–1132.
25. FitzGerald J.M., Bleecker E.R., Nair P., et al. Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor alpha monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial, *Lancet.* 2016; 388 (10056): 2128–2141.
26. Castro M, Corren J, Pavord I.D, et al. Dupilumab efficacy and safety in moderate- to Severe uncontrolled asthma, *N. Engl. J. Med.* 2018; 378 (26): 2486–2496.
27. Humbert M., Taille C., Mala L., et al. Omalizumab effectiveness in patients with severe allergic asthma according to blood eosinophil count: the STELLAIR study, *Eur. Respir. J.* 2018; 51 (5): 1702523.
28. Global Initiative for Asthma, Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Available from: (2019) [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).
29. Venge P, Bystrom J, Carlson M., et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease, *Clin. Exp. Allergy* 1999; 29 (9): 1172–1186.
30. Peona V, De Amici M, Quaglini S., et al., Serum eosinophilic cationic protein: is there a role in respiratory disorders? *J. Asthma* 2010; 47 (2): 131–134.
31. Koh GC, Shek LP, Goh DY, et al. Eosinophil Cationic Protein: Is It Useful In Asthma? A Systematic Review. *Respir Med* 2007;101:696-705.
32. Tiotiu A. Biomarkers in Asthma: State Of The Art. *Asthma Res Pract* 2018; 4: 10.
33. Bartoli M.L., Bacci E., Carnevali S., et al., Quality evaluation of samples obtained by spontaneous or induced sputum: comparison between two methods of processing and relationship with clinical and functional findings, *J. Asthma* 2002; 39 (6): 479–486.
34. Prehn A, Seger, R.A., Torresani T., et al. Evaluation of a clinical algorithm involving serum eosinophil cationic protein for guiding the antiinflammatory treatment of bronchial asthma in childhood, *Pediatr. Allergy Immunol.* 2000; 11 (2): 87–94.
35. Lowhagen O., Wever A.M., Lusuuardi M., et al. The inflammatory marker serum eosinophil cationic protein (ECP) compared with PEF as a tool to decide inhaled corticosteroid dose in asthmatic patients, *Respir. Med.* 2002; 96 (2): 95–101.
36. Mogensen I., Alving K., Bjerg A., et al. Simultaneously elevated exhaled nitric oxide and serum-eosinophil cationic protein relate to recent asthma events in asthmatics in a cross-sectional population-based study, *Clin. Exp. Allergy* 2016; 46 (12): 1540–1548.
37. Pham T.H., Damera G., Newbold P., K. Ranade. Reductions in eosinophil biomarkers by benralizumab in patients with asthma, *Respir. Med.* 2016; 111: 21–29.

38. Kim K.W., Lee K.E., Kim E.S., et al. Serum eosinophil derived neurotoxin (EDN) in diagnosis and evaluation of severity and bronchial hyperresponsiveness in childhood asthma, *Lung* 2007; 185 (2): 97–103.
39. Kim C.K., Callaway Z., Fletcher R., Koh Y.Y. Eosinophil-derived neurotoxin in childhood asthma: correlation with disease severity, *J. Asthma* 2010; 47 (5): 568–573.
40. Shin S.W., Park J.S., Park C.S. Elevation of eosinophil-derived neurotoxin in plasma of the subjects with aspirin-exacerbated respiratory disease: a possible peripheral blood protein biomarker, *PLoS One* 2013; 8 (6): e66644.
41. Rank M.A., Ochkur S.I., Lewis J.C., et al. Nasal and pharyngeal eosinophil peroxidase levels in adults with poorly controlled asthma correlate with sputum eosinophilia, *Allergy* 2016; 71 (4): 567–570.
42. Chiappori A., De Ferrari L., Folli C., et al. Biomarkers and severe asthma: a critical appraisal, *Clin. Mol. Allergy CMA* 2015; 13: 20.
43. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(5):602-615.
44. Topercerova J, Kolomaznik M, Kopincova J, et al. The effect of pulmonary surfactant on the airway smooth muscle after lipopolysaccharide exposure and its mechanisms. *Physiol Res* 2019; 68 (3): S275-S285.
45. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, et al. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181(2):852-7.
46. Robroeks CM, Van Berkel JJ, Jöbsis Q, et al. Exhaled volatile organic compounds predict exacerbations of childhood asthma in a 1-year prospective study. *Eur Respir J* 2013; 42: 98-106.
47. Fajt M.L., Wenzel S.E. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015; 135 (2): 299–310.
48. Silkoff PE, McClean P, Spino M, et al. Dose-response relationship and reproducibility of the fall in exhaled nitric oxide after inhaled beclomethasone dipropionate therapy in asthma patients. *Chest* 2001;119 (5):1322-8.
49. Jackson DJ, Virnig CM, Gangnon RE, et al. Fractional exhaled nitric oxide measurements are most closely associated with allergic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(5):949-53.
50. Kovesi T, Kulka R, Dales R. Exhaled nitric oxide concentration is affected by age, height, and race in healthy 9- to 12-year-old children. *Chest* 2008;133(1):169-75.
51. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, et al. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(2):609-12.
52. Smith A.D, Cowan. J.O., Brassett K.P., et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma, *N. Engl. J. Med.* 2005; 352 (21): 2163–2173.
53. McCormack M.C., Aloe C., Curtin-Brosnan J., et al. Guideline-recommended fractional exhaled nitric oxide is a poor predictor of health-care use among inner-city children and adolescents receiving usual asthma care, *Chest* 2013; 144 (3): 923–929.
54. Borrill Z., Clough D., Truman N., et al. A comparison of exhaled nitric oxide measurements performed using three different analysers, *Respir. Med.* 2006; 100 (8): 1392–1396.
55. Hanania N.A., Noonan M., Corren J., et al. Lebrikizumab in moderate-to-severe asthma: pooled data from two randomised placebo-controlled studies, *Thorax* 2015; 70 (8): 748–756.
56. Price D., Ryan D., Burden A., et al. Using fractional exhaled nitric oxide (FeNO) to diagnose steroid-responsive disease and guide asthma management in routine care, *Clin. Transl. Allergy* 2013; 3 (1): 37.
57. McNicholl D.M., Stevenson M., McGarvey L.P., Heaney L.G. The utility of fractional exhaled nitric oxide suppression in the identification of nonadherence in difficult asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186 (11): 1102–1108.
58. Hanania N.A., Massanari M., Jain N. Measurement of fractional exhaled nitric oxide in real-world clinical practice alters asthma treatment decisions, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2018; 120 (4): 414–418.
59. Chung K.F. Managing severe asthma in adults: lessons from the ERS/ATS guidelines, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2015; 21 (1): 8–15.
60. National Institute for Health and Care Excellence (NICE), Guideline [NG80], (2017).
61. Medrek SK, Parulekar AD, Hanama NA: Predictive biomarkers for asthma therapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017; 17: 69.
62. Schleich F., Demarche S., Louis R. Biomarkers in the management of difficult asthma, *Curr. Top. Med. Chem.* 2016; 16 (14): 1561–1573.
63. GINA difficult to treat and severe asthma in adolescent and adult patients, *Diagnosis and Management*, (2019) [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).
64. Izuhara K., Conway S.J., Moore B.B., et al. Roles of periostin in respiratory disorders. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2016; 193 (9): 949–956.
65. Grayson MH, Feldman S, Prince BT, et al. Advances in asthma in 2017: Mechanisms, biologics, and genetics. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142: 1423-1436.
66. Semprini R, Caswell-Smith R, Fingleton J, et al. Periostin Study Team. Longitudinal variation periostin levels in adults with stable asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139: 1687-1688.
67. Sidhu S.S., Yuan S., Innes A.L., et al. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010; 107 (32): 14170–14175.
68. Jia G, Erickson RW, Choy DF, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130(3):647-54.
69. Corren J., Weinstein S., Janka L., et al. Phase 3 study of reslizumab in patients with poorly controlled asthma: effects across a broad range of eosinophil counts, *Chest* 2016; 150 (4): 799–810.

70. Schade J, Stephan M, Schmiedl A, et al. Regulation of expression and function of dipeptidyl peptidase 4 (DP4), DP8/9, and DP10 in allergic responses of the lung in rats. *J Histochem Cytochem* 2008;56(2):147–55.
71. Stephan M, Suhling H, Schade J, et al. Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition in an animal model of experimental asthma: a matter of dose, route, and time. *Physiol Rep* 2013;1 (5):e00095.
72. Brightling C.E., Chanez P., Leigh R., et al. Efficacy and safety of tralokinumab in patients with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebocontrolled, phase 2b trial, *Lancet Respir. Med.* 2015; 3 (9): 692–701.
73. Kim S.H., Choi H., Yoon M.G., et al. Dipeptidyl-peptidase 10 as a genetic biomarker for the aspirin-exacerbated respiratory disease phenotype, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2015; 114 (3): 208–213.
74. Lamkhioed B, Garcia-Zepeda EA, Abi-Younes S, et al. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(2):723–32.
75. Provost V, Larose M-C, Langlois A, et al. CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. *J Leukoc Biol* 2013;94 (2):213–22.
76. Wedes SH, Wu W, Comhair SAA, et al. Urinary bromotyrosine measures asthma control and predicts asthma exacerbations in children. *J Pediatr* 2011;159 (2): 248–55.
77. Rabinovitch N. Urinary leukotriene E4, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2007; 27 (4): 651–664.
78. Cai C., Yang J., Hu S., et al. Relationship between urinary cysteinyl leukotriene E4 levels and clinical response to anti-leukotriene treatment in patients with asthma, *Lung* 2007; 185 (2): 105–112.
79. Hagan J.B., Laidlaw T.M., Divekar R., et al. Urinary leukotriene E4 to determine aspirin intolerance in asthma: a systematic review and meta-analysis, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2017; 5 (4): 990–997.
80. O'Sullivan S., Dahlen B., Dahlen S.E., Kumlin M. Increased urinary excretion of the prostaglandin D2 metabolite 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F2 after aspirin challenge supports mast cell activation in aspirin-induced airway obstruction, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98 (2): 421–432.
81. Uzan GC, Borekci S, Doventas YE, et al. The relationship between inflammatory markers and spirometric parameters in ACOS, Asthma, and COPD [published online ahead of print, 2019 Aug 12]. *J Asthma.* 2019; 1-7. doi:10.1080/02770903.2019.1652644.
82. Sadatsafavi M., Lynd L., Marra C., et al. Direct health care costs associated with asthma in British Columbia, *Can. Respir. J.* 2010; 17 (2): 74–80.
83. Saude E.J., Skappak C.D., Regush S., et al. Metabolomic profiling of asthma: diagnostic utility of urine nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127 (3): 757–764.
84. Park Y.H., Fitzpatrick A.M., Medriano C.A., Jones D.P. High-resolution metabolomics to identify urine biomarkers in corticosteroid-resistant asthmatic children, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 139 (5): 1518–1524.
85. Gao J, Wu F. Association between fractional exhaled nitric oxide, sputum induction and peripheral blood eosinophil in uncontrolled asthma, *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2018; 14: 21.
86. Shrimanker R., Keene O., Hynes G., et al. Prognostic and predictive value of blood eosinophil count, fractional exhaled nitric oxide and their combination in severe asthma: a post-hoc analysis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019; 200 (10):1308-1312.
87. Price D.B., Bosnic-Anticevich S., Pavord I.D. et al. Association of elevated fractional exhaled nitric oxide concentration and blood eosinophil count with severe asthma exacerbations, *Clin. Transl. Allergy* 2019; 9: 41.
88. Heaney L.G., Djukanovic R, Woodcock A., et al. Research in progress: medical research council united kingdom refractory asthma stratification programme (RASP-UK), *Thorax* 2016; 71 (2): 187–189.
89. Buhl R., Korn S., Menzies-Gow A., et al. Assessing biomarkers in a real-world severe asthma study (ARIETTA), *Respir. Med.* 2016; 115: 7–12.
90. Peters S.P., Busse W.W. New and Anticipated Therapies for Severe Asthma. *The journal of allergy and clinical immunology, J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2017; 5 (5): S15–S24.
91. Schleich F., Brusselle G., Louis R., et al. Heterogeneity of phenotypes in severe asthmatics. The belgian severe asthma registry (BSAR), *Respir. Med.* 2014; 108 (12): 1723–1732.
92. Demarche S., Schleich F., Henket M., et al. Detailed analysis of sputum and systemic inflammation in asthma phenotypes: are paucigranulocytic asthmatics really non-inflammatory? *BMC Pulm. Med.* 2016; 16: 46.
93. Moore W.C., Hastie A.T., Li X., et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; 133 (6): 1557–1563.
94. Wong E.H., Porter J.D., Edwards M.R., Johnston S.L. The role of macrolides in asthma: current evidence and future directions, *Lancet Respir. Med.* 2014; 2 (8): 657–670.
95. Brusselle G.G., Vanderstichele C., Jordens P., et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial, *Thorax* 2013; 68 (4): 322–329.
96. Gibson P.G., Yang I.A., Upham J.W., et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet.* 2017; 390 (10095): 659–668.
97. Nair P, Ochkur SI, Protheroe C, et al. Eosinophil peroxidase in sputum represents a unique biomarker of airway eosinophilia. *Allergy.* 2013; 68: 1177 1184.
98. Maes T, Cobos FA, Schleich F, et al. Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137: 1433-1446.
99. Iwamoto H, Gao J, Koskela J, et al. Differences in plasma and sputum biomarkers between COPD and COPD-asthma overlap. *Eur Respir J* 2014; 43: 421-429.
100. Bullens D.M., Truyen E., Coteur L., et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* 2006; 7: 135.

101. Busse W.W., Holgate S., Kerwin E., et al. Randomized, double-blind, placebocontrolled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 188 (11): 1294–1302.
102. Gibson P.G., Simpson J.L., Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8, *Chest* 2001; 119 (5): 1329–1336.
103. Alam R., Good J., Rollins D., et al. Airway and serum biochemical correlates of refractory neutrophilic asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 140 (4): 1004–1014.
104. Wood L.G., Baines K.J., Fu J., et al. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma, *Chest* 2012; 142 (1): 86–93.
105. Samitas K., Zervas E., Gaga M. T2-low asthma: current approach to diagnosis and therapy, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2017; 23 (1): 48–55.
106. Wilhelm C.P., Chipps B.E. Bronchial thermoplasty: a review of the evidence, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2016; 116 (2): 92–98.
107. Hunt J. Exhaled breath condensate pH assays, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2007; 27 (4): 597–606.
108. Bloemen K., Van Den Heuvel R., Govarts E., et al. A new approach to study exhaled proteins as potential biomarkers for asthma, *Clin. Exp. Allergy* 2011; 41 (3): 346–356.
109. Schleich F.N., Zanella DStefanuto., P.H., et al. Exhaled volatile organic compounds are able to discriminate between neutrophilic and eosinophilic asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019; 200 (4): 444–453.
110. Montuschi P., Santonico M., Mondino C., et al. Diagnostic performance of an electronic nose, fractional exhaled nitric oxide, and lung function testing in asthma, *Chest* 2010; 137 (4): 790–796.
111. Benayoun L., Druilhe A., Dombret M.C., et al. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167 (10): 1360–1368.
112. Bissonnette E.Y., Madore A.M., Chakir J., et al. Fibroblast growth factor-2 is a sputum remodeling biomarker of severe asthma, *J. Asthma* 2014; 51 (2): 119–126.
113. Mauri P., Riccio A.M., Rossi R., et al. Proteomics of bronchial biopsies: galectin-3 as a predictive biomarker of airway remodelling modulation in omalizumab 116treated severe asthma patients, *Immunol. Lett.* 2014; 162 (1): 2–10.
114. Baines K.J., Simpson J.L., Wood L.G., et al. Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; 133 (4): 997–1007.
115. Laoukili J., Perret E., Willems T., et al. IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells, *J. Clin. Invest.* 2001; 108 (12): 1817–1824.
116. Jia M., Yan X., Jiang X., et al. Ezrin, a membrane cytoskeleton cross-linker protein, as a marker of epithelial damage in asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019; 199 (4): 496–507.
117. Tang H., Fang Z., Sun Y., et al. YKL-40 in asthmatic patients, and its correlations with exacerbation, eosinophils and immunoglobulin E, *Eur. Respir. J.* 2010; 35 (4): 757–760.
118. Gomez JL, Yan X, Holm CT, et al. Characterisation of asthma subgroups associated with circulating YKL-40 levels. *Eur Respir J.* 2017;50(4):1700800.
119. Silkoff PE, Laviolette M, Singh D, et al. 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: 710-719.
120. Portelli MA, Moseley C, Stewart CE, et al. Airway and peripheral urokinase plasminogen activator receptor is elevated in asthma, and identifies a severe, nonatopic subset of patients. *Allergy* 2017; 72: 473-482.
121. Midyat L, Gulen F, Karaca E, et al. MicroRNA expression profiling in children with different asthma phenotypes. *Pediatr Pulmonol* 2016; 51: 582-587.
122. 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: e23-8.
123. Naik SP, Pam BSJ, Madhunapantula SV, et al. Evaluation of inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in asthma. *J Asthma* 2017; 54: 584-593.
124. Liu HC, Lu MC, Lin YC, et al. Differences in IL-8 in serum and exhaled breath condensate from patients with exacerbated COPD or asthma attacks. *J Formos Med Assoc* 2014; 113: 908-914.