

Role eozinofilů v patogenezi, diagnostice a léčbě bronchiálního astmatu

Jakub Novosad, Irena Krčmová

Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice, Hradec Králové

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Existence buněk odpovídajících eozinofilům byla histopatologicky doložena již v první polovině 19. století. Samotný termín „eozinofily“ byl však poprvé použit až Paulem Ehrlichem v roce 1878. Od jejich objevení byla jejich existence spojována s bronchiálním astmatem, patogenezí helmintóz a později alergiemi. Od počátku 21. století prošlo chápání podstaty této buněčné populace zásadním přehodnocením a v roce 2010 J. J. Lee navrhl koncept „LIAR“ (Local Immunity And/or Remodeling/Repair), podtrhující rozsáhlé imunoregulační funkce eozinofilů v kontextu zdraví a nemoci. Brzy se dále ukázalo, že zralé eozinofily nejsou strukturně, funkčně ani imunologicky homogenní buněčnou populací. Tvoří naopak podtypy charakterizované odlišným vývojem, imunofenotypem, citlivostí na růstové faktory, lokalizací, rolí a osudem ve tkáních a především podílem na patogenezi onemocnění včetně astmatu. Pro hlavní podskupiny eozinofilů byly nedávno navrženy termíny rezidentní (rEos) a zánětlivé (iEos) eozinofily. Ukazuje se, že pochopení funkcí eozinofilních subpopulací a jejich identifikace ve tkáních je základní podmínkou správné diagnostiky, klasifikace a léčby chorob s eozinofily asociovaných. Lze tudíž předpokládat, že nové biomarkery odhalující hlubší biologickou povahu těchto buněk mohou významně rozšířit stávající paletu validovaných parametrů sledovaných u bronchiálního astmatu.

Klíčová slova: biologická léčba, biomarkery, bronchiální astma, eozinofily, imunofenotyp.

The role of eosinophils in the pathogenesis, diagnosis and treatment of asthma

Cells corresponding to eosinophils were already histopathologically documented in the first half of the 19th century. However, the term „eosinophils“ was first used by Paul Ehrlich in 1878. Since the discovery of eosinophils, their existence has been associated with bronchial asthma, allergies and the pathogenesis of helminthic disorders. Since the beginning of the 21st century, understanding this cell population's nature has undergone a fundamental reassessment. In 2010, J. J. Lee proposed the concept of „LIAR“ (Local Immunity And/or Remodeling /Repair), underscoring the extensive immunoregulatory functions of eosinophils in the context of health and disease. It soon became apparent that mature eosinophils are not structurally, functionally, or immunologically homogeneous cell populations. On the contrary, they form subtypes characterized by distinct development, immunophenotype, sensitivity to growth factors, localization, role and fate in tissues and their contribution to the pathogenesis of various diseases, including asthma. Resident (rEos) and inflammatory (iEos) eosinophils have recently been proposed for the main eosinophil subsets. It turns out that understanding the functions of eosinophil subpopulations and their identification in tissues is an essential condition for the correct diagnosis, classification and treatment of diseases associated with eosinophils. It can therefore be assumed that new biomarkers revealing these cells' more profound biological nature can significantly expand the existing range of validated parameters monitored in bronchial asthma. Concurrently, they will contribute to more accurate diagnosis and more effective treatment of this disease.

Key words: biological treatment, biomarkers, bronchial asthma, eosinophils, immunophenotype.

Úvod

Existence buněk odpovídajících eozinofilům byla pravděpodobně poprvé histopatologicky doložena v učebnici patologie Gottlieba Glugeho z roku 1843. Termín „eozinofily“ byl však poprvé navržen až Paulem Ehrlichem v roce 1878. Již v té době byla jejich existence spojována s patogenezi bronchiálního astmatu. V průběhu 20. století prošly představy o úloze eozinofilů v lidském těle značnými turbulencemi. Zatímco v průběhu 70. a 80. let byly eozinofily vnímány jako regulační prvky tlumící prozánětlivou aktivitu mediátorů uvolňovaných žírnými buňkami, na konci 80. a 90. let 20. století začaly být vnímány jako terminální efektorové buňky imunopatologického zánětu způsobující tkáňové poškození. Tradičně byla jejich přítomnost ve tkáních spojována především s obranou proti helmintárním infekcím a s patogenezi alergií a vykazovala typicky vysokou míru závislosti zejména na aktivitě jejich hlavního růstového faktoru – interleukinu-5 (IL-5).

Od počátku 21. století byly teorie o jejich fyziologických rolích v lidském těle kompletně revidovány a v roce 2010 J. J. Lee, bývalý prezident Mezinárodní společnosti pro eozinofily, navrhl koncept „LIAR“ (Local Immunity And/or Remodeling/Repair) (1) model komplexní úlohy eozinofilů v remodelačních a reparačních procesech, a to jak ve zdraví, tak v nemoci. Působivá práce nicméně vyvolala nemalé kontroverze a vznesla několik evolučně biologických otázek týkajících se fundamentální role eozinofilů v průběhu fylogeneze: 1) Proč si některé organismy vyvinuly jedinečnou hematopoetickou linii jako obranný mechanismus proti vybraným patogenům (helmintům), které obecně nejsou považovány za život ohrožující? 2) Proč eozinofilní leukocyty chybí téměř u všech metazoi a jsou přítomny až u pěti tříd obratlovců kmene Chordata (fylogeneticky se vyvíjejí jen cca 600 milionů let)? A dále, 3) jestliže se vyvinuly eozinofily jako vrozená obrana hostitele proti helmintům, proč selektivní tlaky řízené patogeny nevedly ke vzniku alternativních hematopoetických signálních drah mimo interleukin-5 (IL-5)? (Vznik a vývoj eozinofilů je sice dále regulován prostřednictvím IL-3 a kolonie stimulující faktor pro granulocyty a makrofágy – GM-CSF, nicméně v daleko menší míře) (1).

Kromě předpokládaných antimikrobiálních funkcí začala být nově eozinofilům přisuzována rovněž úloha v morfogenezi tkání, slizniční homeostáze a metabolismu, ačkoli důkazy pocházely a pocházejí především ze zvířecích modelů (2). Jejich regulační a imunomodulační potenciál byl jednoznačně prokázán v gastrointestinálním traktu (tenké střevo navíc představuje fyziologický rezervoár eozinofilů v těle) (3), v tukové tkáni (4) či plicích (5). Společnou charakteristikou oblastí s vysokým počtem eozinofilů je vysoký buněčný obrát (1).

Brzy se ukázalo, že zralé eozinofily nejsou imunologicky homogenní buněčnou populací, ale tvoří více či méně strukturně a funkčně odlišné podtypy, které mají rozdílný vývoj, lokalizaci, úlohu a osud ve tkáních, zejména během stavů aktivace zánětu (5–7). Proto bylo navrženo nové klasifikační schéma, které sestává z eozinofilních progenitorů, eozinofilů v ustáleném stavu a dále regulačních/rezidentních eozinofilů (rEos, někdy též označovaných jako eozinofily typu 1) a zánětlivých/inflamatorních eozinofilů (iEos, nebo eozinofily typu 2) (5, 8).

Je zřejmé, že pochopení vzniku a funkcí fenotypově odlišných skupin eozinofilů je nezbytnou podmínkou k objasnění patogeneze chorob

s těmito buňkami asociovaných a dále k jejich efektivní diagnostice a konečně i léčbě, zejména biologické.

Konvenční pohled na roli eozinofilů ve tkáních

Experimentální studie prováděné převážně na zvířecích modelech (zejména myších) opakovaně prokázaly, že tkáňové eozinofily kromě jistého antiinfekčního potenciálu přispívají např. k regeneraci svalové tkáně, normálnímu vývoji mléčných žláz a pohlavních orgánů, tvorbě IgA protilátek v trávicím traktu a ovlivňují citlivost na inzulin v tukové tkáni (3–5, 7). V kostní dřeni eozinofily produkují IL-4 např. podporují zrání B-lymfocytů a udržují po dlouhou dobu při životě plazmatické buňky. Eozinofily mají pravděpodobně také imunomodulační potenciál při vytváření repertoáru specifických receptorů T-lymfocytů v thymu jako součást centrální indukce tolerance (9). Evolučně biologicky lze předpokládat, že se eozinofily mediovaná imunitní reakce (později označovaná jako „T2- high“ reaktivita nebo reaktivita typu 2, viz dále) mohla vyvinout za účelem omezení poškozujícího zánětu. Existují dokonce důkazy, že některé parazitární infekce mohou regulační funkce eozinofilů zneužívat ve svůj prospěch a usnadnit si tak vlastní přežívání ve tkáních (10).

Konvenčně však byly eozinofily vnímány (zejména v průběhu 80. a 90. let 20. století) jako buňky schopné omezit růst parazitů ve tkáních. Podmínkou efektorových antiinfekčních i regulačních mechanismů eozinofilů je jejich schopnost uvolňovat do svého okolí biologicky vysoce aktivní látky vznikající v buněčných organelách či lipidových tělíscích (kationické proteiny a lipidové mediátory). Eozinofily dále vylučují Charcot-Leydenovy krystaly (Galektin 10) z primárních granulí a velké množství cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (11). Vlastní proces aktivace eozinofilů je iniciován vazbou příslušného aktivního ligandu na povrchový receptor.

K uvolnění všech produktů může dojít několika způsoby, 1) klasikou exocytózou (zejména v prostředí bakteriální infekce), 2) složenou exocytózou (vylučování několika různých produktů najednou přes nově vytvořený „fúzní“ buněčný kompartment, časté u helmintůz), 3) nejčastěji se vyskytující postupná degranulace, zprostředkovaná především tzv. „sombrovy granuly“ (unikátní vezikulotubulární struktury sloužící pravděpodobně především k transportu obsahu specifických granulí na povrch eozinofilu). Ke konečnému způsobu uvolnění aktivních mediátorů do okolí dochází při 4) cytolýze po nekrotické smrti eozinofilu (16, 18), která je spolu s postupnou degranulací pro úlohu eozinofilů ve tkáních nejdůležitější. Po cytolýze eozinofilů zůstávají izolovaná uzavřená granula ve tkáních exprimující na svém povrchu receptory pro cytokiny, chemokiny a cysteinylóvé leukotrieny. Interakce s příslušnými ligandy vede k následnému uvolnění obsahu granulí (9). Volná eozinofilní granula (FEG) pravděpodobně hrají významnou roli v patogenezi astmatu (14) a jejich výskyt může být spojen také s tvorbou autoproti látek proti proteinům produkovanými eozinofily, jako je eozinofilní peroxidáza (EPX) (15).

Některé proteiny produkované eozinofily mají vlastnosti, které mohou kromě eliminace helmintů bránit i infekcím virovým, bakteriálním a plísňovým. Eozinofily jsou schopny fagocytózy a intracelulárního zabíjení (produkují k tomuto účelu volné kyslíkové a dusíkové radikály,

exprimují indukovatelnou NO syntetázu (iNOS) a generují NO působící toxicky na intracelulární parazity včetně virů (16) a prezentace antigenu pomocným T-lymfocytům (17). Některé kationické proteiny mají RNAázovou aktivitu. V neposlední řadě mohou eozinofily vytvářet tzv. „extracelulární DNA pasti“ (Extracellular Eosinophil Traps – EET), jimiž mohou eliminovat gramnegativní bakterie např. ve sliznici gastrointestinálního traktu, některé parazity a viry. Tvorba EET je spojena se smrtí eozinofilů značovanou jako EETóza.

Tkáňová a imunopatologická aktivita eozinofilů může být následně spojena s 1) tvorbou trombů, 2) poškozením neuronů a konečně 3) fibrotizací (17). V dýchacích cestách je tak jejich komplexní působení spojováno s procesy remodelace (19).

Eozinofily jako biomarker astmatu

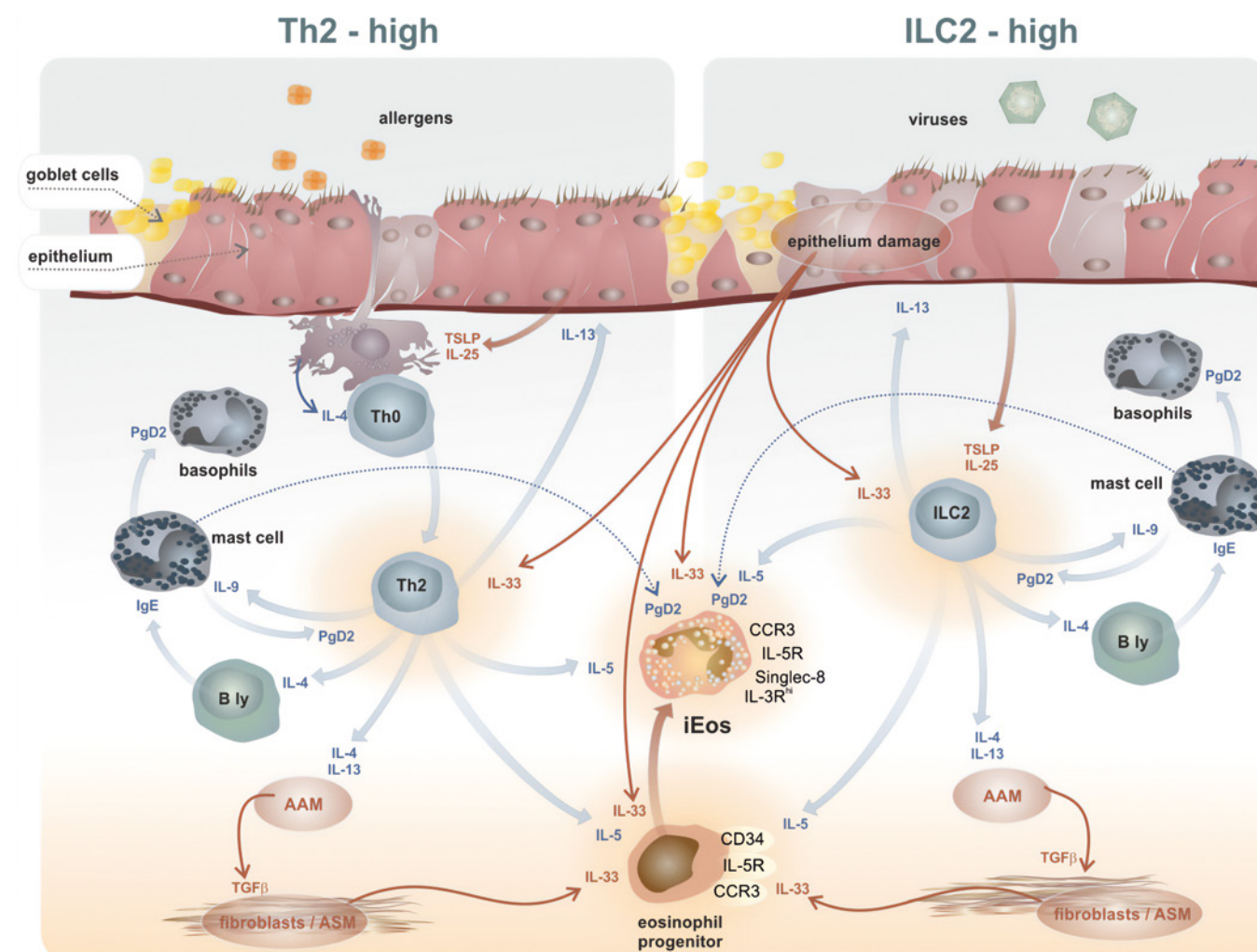
Vyšetření eozinofilů u pacientů s bronchiálním astmatem obecně má mezi ostatními biomarkery jedinečné postavení, vzhledem k přesvědčivým důkazům o jejich zásadní roli v samotné patogenezi onemocnění. Průkaz jejich přítomnosti ve sputu byl již v 50. letech 20. století spojován se zvýšenou vnímavostí astmatu ke kortikoidní léčbě. Jejich přítomnost v bioptických a cytologických vzorcích dýchacích cest dala vzniknout konceptu eozinofilního a neeozinofilního astmatu a ve své podstatě i pojmům fenotyp a endotyp. V současnosti jsou zánětlivé

endotypy astmatu označovány jako tzv. „T2- high“ (dříve eozinofilní) nebo „T2- low“ (dříve non-eozinofilní), kde primárním rozlišujícím faktorem je přítomnost eozinofilního zánětu (nověji obecně označeného tzv. jako zánět typu 2 pro vůdčí roli Th2 a ILC2 buněk). U nemocných trpících astmatem se známkami T2-high zánětu musíme následně rozlišit, zda k němu dochází primárně na základě specifické, alergické, atopické reaktivity (Th2- high, eozinofilní, alergické astma), nebo je-li zánětlivý proces řízen dominantně nespecifickými, nealergickými, neatopickými mechanismy prostřednictvím vrozené imunity (ILC2-high, eozinofilní, nealergické astma). Imunologické a do značné míry i klinické důsledky obou příslušných aktivizačních modelů jsou částečně podobné, přičemž se eozinofily vyskytují v samotném jádru zánětlivých procesů (20), viz obr. 1: T2-high zánětlivé endotypy astmatu.

Identifikace zánětlivého endotypu astmatu se ukázala být nezbytnou nejen pro diagnostiku onemocnění, ale také pro odhad jeho klinické závažnosti, rizika exacerbací, bronchiální hyperreakivity či remodelace dýchacích cest a je rovněž významným prediktorem odpovědi na konvenční protizánětlivou léčbu inhalačními nebo systémovými kortikoidy.

Zlatým standardem pro průkaz eozinofilního – T2-high zánětlivého endotypu je tradičně považován relativní počet eozinofilů v indukovaném sputu přesahující 2 nebo 3 %. V klinické praxi se však toto vyšetření pro svou náročnost jak při odběru, tak v preanalytické i analytické fázi

Obr. 1. T2-high zánětlivé endotypy astmatu (44), obrázek autora, komentář v textu



měření provádí jen výjimečně. V současné době proto za tímto účelem používáme trojici validovaných a standardizovaných biomarkerů – absolutní počet eozinofilů v periferní krvi (AEC), frakci oxidu dusnatého ve vydechaném dechu (FeNO) a produkci imunoglobulin E (IgE) spolu s alergologickým vyšetřením (21, 22). Vzájemný vztah mezi uvedenými biomarkery je však stále předmětem diskuzí, nicméně jistě není lineární, a to ani mezi krevními a tkáňovými eozinofily.

Patrně největší množství informací a dat o vyšetření krevních a tkáňových eozinofilů bylo získáno díky biomarkerovým studiím a studiím účinnosti biologické terapie zaměřené proti IL-5. První randomizovaná kontrolovaná studie (fáze IIa) hodnotila účinek monoklonální protilátky anti-IL-5 (SB-240563) na stav dýchacích cest po expozici inhalačním alergenem u neselektovaných pacientů s mírným astmatem v roce 2000. Výsledkem sice bylo významné snížení eozinofilů v periferní krvi po dobu 16 týdnů a v indukovaném sputu čtyři týdny po infuzi, nicméně bez vlivu na klinické výsledky – pozdní alergickou reakci nebo hyperreaktivitu vyvolanou histaminem (23). Zklamání z neúspěchu antieozinofilní terapie u astmatu vedlo dokonce k pochybnostem o kauzalitě vztahu mezi eozinofily a bronchiálním astmatem. Jak se však později ukázalo, zásadním důvodem selhání byla velká biologická variabilita onemocnění, která snížila statistickou sílu pro průkaz klinického efektu léčby. Bylo proto do budoucna nutné lépe specifikovat cílovou skupinu astmatiků, kteří by mohli mít z terapie prospěch. V té době (v roce 2008) přišel Haldar se svou první shlukovou analýzou, která do jisté míry prokázala možnou nezávislost klinických projevů na intenzitě zánětu, a tím i existenci diskordantních forem onemocnění (symptomy bez zánětu nebo naopak zánět bez příznaků) (24). Pokud studijní skupiny aplikovaly léčbu nově pouze u astmatiků s převažujícím eozinofilním zánětem definovaným eozinofilii sputa navzdory systémové léčbě kortikosteroidy, bylo dosaženo statisticky, ale zejména i klinicky významného účinku (25–27). Zpočátku byli tito pacienti charakterizováni zvýšenými eozinofily v indukovaném sputu ($\geq 3\%$). Později (pro umožnění rutinního hodnocení) byly definovány zvýšením počtu eozinofilů v periferní krvi (≥ 150 buněk/ μl v době screeningu nebo $\geq 300/\mu\text{l}$ alespoň jednou za poslední rok) (28). Hlavním přínosem uvedených studií byl tedy jednak definitivní důkaz účinnosti antieozinofilní anti-IL-5 léčby, ale stejně tak i logické zařazení identifikace imunologického fenotypu astmatu do rutinních diagnosticko-terapeutických algoritmů.

V dalších fázích klinického testování léčby zaměřené proti IL-5 byly prahové hodnoty absolutního počtu periferních eozinofilů identifikující vhodné nemocné nejčastěji stanoveny v rozmezí 150–400 buněk/ μl . Obecně se však ukázalo, že čím vyšší je počet eozinofilů v periferní krvi, tím větší je pravděpodobnost jejich přítomnosti ve tkáních, včetně indukovaného sputa (pravděpodobně existuje určitá „spouštěcí hladina“ eozinofilů v periferní krvi, která umožní jejich vstup do tkání), a tím větší je i předpokládaný efekt antieozinofilní léčby (29).

Diskuze o vztahu vyšetření periferních eozinofilů k eozinofilii v dýchacích cestách a jeho přínosu k identifikaci zánětlivého endotypu, rizika zhoršení nebo exacerbace astmatu a hodnocení jeho odezvy na terapii (biologickou nebo konvenční protizánětlivou) nadále přetrvává. Manali Mukherjee a Parameswaran Nair zdůraznili mnoho problémů:

1. eozinofily v indukovaném sputu mohou předpovídat ztrátu kontroly astmatu s vyšší citlivostí ve srovnání s jejich počtem v periferní krvi,
2. korelace mezi eozinofily v periferní krvi a indukovaným sputem se s rostoucí tíží astmatu snižuje,
3. eozinofily v periferní krvi nemusí nutně odrážet fenomén lokální eozinofilopoézy v periferní tkáni,
4. zvýšení počtu eozinofilů v periferní krvi bylo prokázáno např. v souvislosti s terapií lebrikizumabem (anti-IL-13) nebo dupilumabem (anti-IL-4R α) bez vazby na ztrátu kontroly astmatu,
5. spíše než samotný jejich počet je třeba brát v úvahu funkční stav, aktivaci a degranulaci (30).

Pochybnosti ohledně spolehlivé implementace vyšetření eozinofilie periferní krve do běžné klinické praxe přizívají i další důležité otázky. Mezi ně patří mimo jiné:

6. nejistota týkající se asociace klinických výsledků léčby s hodnotami periferní eozinofilie,
7. jaká (pokud existuje) je skutečně spolehlivá prahová hodnota eozinofilie periferní krve pro predikci klinického průběhu onemocnění a jeho odpovědi na cílenou terapii zaměřenou proti IL-5(R),
8. kolikrát by vzhledem k jeho variabilitě měla být eozinofilie prokázána a nakonec,
9. lze sledováním počtu eozinofilů v periferní krvi sledovat účinnost léčby, zejména u pacientů s těžkou formou onemocnění, u kterých je nízký stupeň korelace s eozinofily v indukovaném sputu nejvíce patrný (29)?

Shrme, že vyšetření eozinofilů v periferní krvi je nezbytné (i když v některých ohledech stále diskutabilní a problematické) vyšetření při kontrolách pacientů s bronchiálním astmatem. Nepochybně poskytuje informace o zánětlivém endotypu nemoci, přispívá k lepšímu odhadu prognózy a pravděpodobnosti efektu protizánětlivé léčby (steroidy nebo biologiky především zaměřenými proti eozinofilům), nicméně musí být vždy interpretována opatrně a v širokém klinickém kontextu choroby a již probíhající terapie (31).

Tkáňové eozinofily a nové pohledy na jejich plasticitu a funkci

Eozinofily jsou mimořádně dynamickou a nehomogenní buněčnou populací, a to jak na úrovni progenitorů (především v kostní dřeni, ale i v periferních tkáních, včetně plic v průběhu tzv. eozinofilopoézy *in situ*), tak ve stadiu plně vyzrálých a imunokompetentních buněk. Historicky byly popisovány dva typy eozinofilů s odlišnou specifickou hmotností: jednak eozinofily s normální hustotou (normodenzní, specifická hmotnost $\geq 1,085$ g/l), a ty s nižší hustotou (hypodenzní, specifická hmotnost $< 1,085$ g/l), přičemž hypodenzní představují aktivovaný fenotyp (32). Autoři Prin a kol. byli první, kteří zaznamenali, že vyšší cytotoxické schopnosti eozinofilů byly pozorovány u hypodenzních eozinofilů a byly spojeny s vyšší úrovní vakuolizace (33). Další výzkum odhalil, že zvýšený počet hypodenzních eozinofilů v periferní krvi souvisí např. i s klinickou závažností astmatu a hyperreaktivitou dýchacích cest (34). Tyto buňky

byly rovněž pozorovány v tekutině z bronchoalveolární laváže (BALF) po expozici antigenu (32).

Později Abdala-Valenciová a spol. analyzovali plasticitu fenotypu myších eozinofilů v natrávené plicní tkáni a BALF pomocí průtokové cytometrie 6 hodin po stimulaci ovalbuminem. Postupný průnik eozinofilů z plicního intersticia do dýchacích cest byl spojen s transformací fenotypu Siglec-F^{med}CD11c na fenotyp Siglec-F^{high}CD11c^{low}. Navíc s konkrétními imunofenotypy souvisely i specifické morfologické rozdíly (Siglec-F^{med}CD11c- eozinofily měly jádro prstencového tvaru, a představovaly možný analog k normodenzním eozinofilům, zatímco Siglec-F^{high}CD11c^{low} buňky měly jádra segmentovaná, známky vyšší vakuolizace a nižší denzitu). Autoři pozorovali, že vznik fenotypu Siglec-F^{high}CD11c^{low} (hypodenzní eozinofily) je spojen s migrací do slizničního kompartmentu (35). Jiní popsali podobné subpopulace eozinofilů i v myších plicích stimulovaných alergenem. Tento koncept byl následně rozšířen na tkáňovou klasifikaci myších eozinofilů rozlišující mezi:

1. progenitory eozinofilů (nezralé eozinofily rekrutované jako prekurzory nebo procházející hematopoézou in situ),
2. eozinofily v ustáleném stavu (klidové eozinofily),
3. eozinofily typu 1 (obsahující kruhové jádro, mající normální denzitu a fenotyp Siglec-F^{med}CD11c) a,
4. eozinofily typu 2 (nesoucí imunofenotyp Siglec-F^{high}CD11c^{low} se segmentovaným jádrem, vakuolizací a nízkou denzitou).

Eozinofily typu 1 jsou intersticiální / stromální eozinofily sehrávající pravděpodobně důležitou úlohu v průběhu imunitní aktivace typu 1 (T2- low) na rozdíl od eozinofilů typu 2 asociovaných dominantně s epitelem a imunitní reaktivitou typu 2 (8).

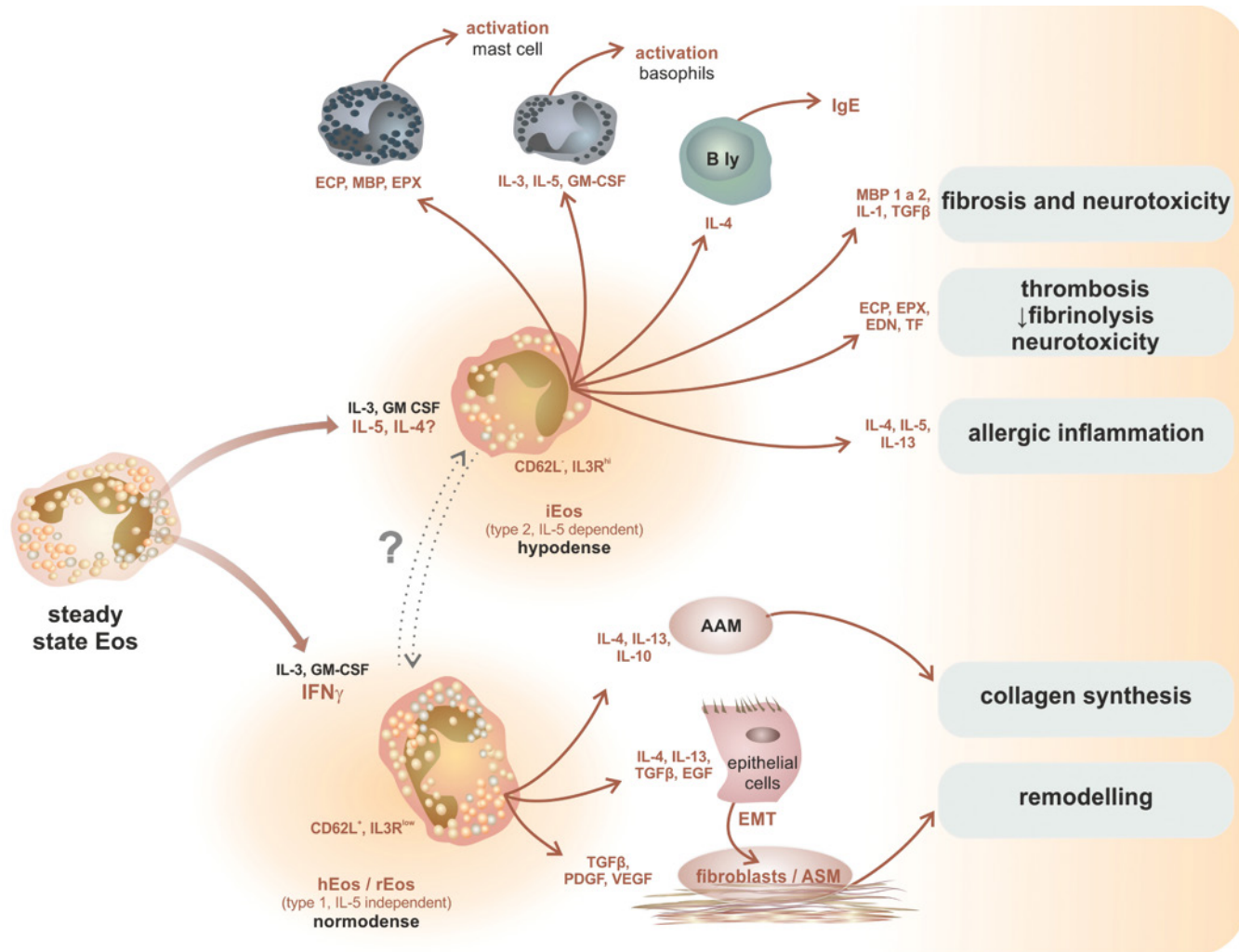
V souladu s dichotomickým modelem eozinofilů typu 1 a 2 Mesnilová a kol. v roce 2016 objevili fenotypově odlišné podtypy eozinofilů v myších plicích jak v klidovém stavu, tak po iniciaci alergického zánětu roztoči domácího prachu. Tyto buňky byly následně označeny jako rezidentní eozinofily – rEos (Siglec-F^{med}CD62L⁺CD101^{low}, na IL-5 nezávislé parenchymální buňky s kruhovitým jádrem) a zánětlivé eozinofily – iEos (Siglec-F^{high}CD62L⁺CD101^{high}, peribronchiální buňky závislé na IL-5 se segmentovaným jádrem). Studie dále prokázala, že rEos aktivují geny zapojené v negativní regulaci imunitní odpovědi a potlačují zánět typu 2. Autoři navíc popsali dvě analogické fenotypově odlišné skupiny eozinofilů i v lidských plicích zdravých dárců – CD62L⁺IL-3R^{low} a ve sputu pacientů s astmatem CD62L^{low}IL-3R^{high} (5). Replikace protokolu imunofenotypizace odhalila přítomnost těchto buněk i v nosních polypech pacientů trpících CRSwNP (36). Publikované nálezy tedy naznačují, že jsou klasifikace založené na morfologických změnách, denzitě nebo imunofenotypu téměř identické a extrapolovatelné z myších modelů i na lidské jedince (37).

Z předchozích nálezů dále vyplývá, že jak již samotný přestup eozinofilů z krevního řečiště do tkání, tak následná interakce s buňkami intersticia jsou neodmyslitelně spojeny s jejich významnou morfologickou a funkční transformací, která je příkladem intratkáňové buněčné diferenciace a mobility. Tyto imunofenotypové změny navíc korelují se závažností onemocnění (37) a odrážejí aktivaci tkáňových eozinofilů. Pro tento účel můžeme analyzovat i mnoho dalších povrchových mar-

kerů, s pozitivní (např. CD11b, CD11c, CD13, CD18, CD25, CD69, CD123 (IL-3Ra), HLA-DR nebo TSLPR) nebo negativní (např. CR3, IL-5Ra, a CD62L (L-selektin)) korelací se stavem aktivace (36, 37).

Značné úsilí bylo věnováno odhalení hlavních rolí různých eozinofilních subpopulací (zejména rEos a iEos) ve zdraví i nemoci (9). Za fyziologických okolností rEos pravděpodobně významně přispívají k regeneraci tkání (38) a mají potenciál inhibovat zánět typu 2 v plicích (5). Naopak iEos buňky vládnou potenciálně významně destruktivní silou iniciující možnou tkáňovou patologii (1, 7, 9). Navíc v souladu s tkáňovou kinetikou naivních a aktivovaných eozinofilů jsou rEos lokalizovány hlavně v plicním parenchymu, na rozdíl od iEos, které sídlí primárně ve sliznici dýchacích cest a unikají do sputa (2, 5). Rozsáhlá analýza eozinofilů v dýchacích cestách tento názor podpořila a zároveň prokázala, že intraepiteliální eozinofily jsou spojeny s endogenní hyperreaktivitou dýchacích cest (AHR) a zánětem typu 2 a mohou interagovat s intraepiteliálními mastocyty prostřednictvím cysteinylových leukotrienů (CysLT) k regulaci zánětu dýchacích cest (39). Funkční subtypy eozinofilů jsou schematicky znázorněny na obr. 2.

Je stále předmětem diskuze, zda je tato fundamentální funkční diferenciace eozinofilů iniciována již v kostní dřeni, v periferní krvi, nebo až po vstupu do tkání. Jinými slovy, zda jsou tyto procesy odrazem „endotypizace“ eozinofilů již během jejich vývoje v kostní dřeni, nebo následkem tkáňově indukované „plasticity“, čili lokální transformace eozinofilů prostřednictvím interakce s tkáňovým mikroprostředím (2). První studie z 80. let minulého století prokázaly přítomnost hypodenzních eozinofilů u astmatických pacientů v oběhu (40), a tyto buňky byly od počátku interpretovány jako aktivované eozinofily. Vykazují zvýšené přežívání, adhezi, metabolismus kyslíku, produkci superoxidu a cytotoxicitu závislou na protilátkách ve srovnání s eozinofily normodenzními (41). Pozdější imunofenotypizační studie potvrdily přítomnost různých podskupin eozinofilů (rEos a iEos) v periferní krvi i tkáních (5, 42). Stále však není jasné, zda hlavní zdroj signálů ovlivňujících funkční transformaci pochází dominantně z kostní dřeně nebo z periferních tkání, či zda je pod vlivem léčby (2). Van Hulst a kol. porovnávali profily genové exprese eozinofilů v krevním oběhu u zdravých kontrol a pacientů s alergickým nebo těžkým eozinofilním astmatem (T2-high zánětlivý endotyp) léčených buď mepolizumabem (anti-IL-5), nebo omalizumabem (anti-IgE). Zjistili, že prakticky žádný rozdíl v programu genové aktivity rezidentních eozinofilů u pacientů léčených mepolizumabem ve srovnání s eozinofily zdravých kontrol a pacientů léčených omalizumabem není patrný. Tyto výsledky podporují myšlenku, že biologika namířená proti IL-5 do tohoto procesu pravděpodobně významněji nezasahují (43). Nadcházející studie by proto měly porovnat heterogenitu krevních (a dřeňových) eozinofilů pacientů s astmatem (nebo jinými eozinofilními poruchami) s různými zánětlivými fenotypy (2) a dále, zda identifikace jejich fenotypu dokáže přispět ke zpřesnění indikace cílené biologické léčby namířené buď proti cirkulujícímu IL-5 (mepolizumab, reslizumab), nebo proti receptoru (IL-5Ra – benralizumab) (44–46). Konečně, vzájemný vztah mezi zrajícími tkáňovými eozinofily a specifickým tkáňovým mikroprostředím může být bilaterální. Nejen eozinofily, ale i plně diferencované epiteliální buňky mohou podléhat určité reverzibilní fenotypové transformaci za

Obr. 2. Funkční subtypy eozinofilů (44), obrázek autora, komentář v textu

řízení cytokiny indukovanými mj. i eozinofily (IL-4 a IL-13 nebo růstové faktory, např. TGFβ či fibroblastový růstový faktor FGF) – epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT) (47).

Jaké otázky stále čekají na odpovědi?

Již více než sto let vnímáme spojení mezi eozinofily a eozinofilním (T2- high) astmatem jako klinicky relevantní, což vedlo k rozvoji nových diagnostických a terapeutických možností a zejména pak k zavedení cílené biologické léčby. Navzdory obrovskému pokroku v této oblasti se však stále potýkáme s elementárními problémy spojenými s fenotypizací onemocnění, výběrem, načasováním, monitorováním, změnou nebo indikací k ukončení specifické antieozinofilní léčby. Některé iritující otázky mohou znít:

1. Jak můžeme zjednodušit a zpřesnit diagnostiku astmatu, zejména ve smyslu identifikace zánětlivého endotypu? (Reálná role biomarkerů je stále předmětem diskuze)
2. Jaká biologická léčba bude pro konkrétního pacienta nejlepší? (Imunologické charakteristiky potenciálních respondérů na příslušné léčebné modality se v současné době významně překrývají)
3. Jak monitorovat účinek léčby? (Je vhodnější řídit se klinickým nebo laboratorním nálezem? Jaká je hierarchie jednotlivých vyšetření a jejich spolehlivá interpretace?)

4. Pokud registrujeme klinický efekt léčby, můžeme si být jisti, že dosažená účinnost je nejlepší možná? Jak rychlá a stabilní může klinická odpověď být?

5. Je pozorovaná klinická odpověď dostatečná pro pokračování v léčbě, nebo bychom měli zvážit její změnu, ukončení, nebo úpravu dávkování?

Jak již bylo zmíněno dříve, identifikace zánětlivého fenotypu či endotypu astmatu je nezbytným krokem k nastavení efektivní terapie, zejména biologické. V každodenní klinické praxi se za tímto účelem musíme řídit krom klinického stavu a anamnézy pouze vyšetřeními validovaných a standardizovaných biomarkerů s dobře definovanými hraničními hodnotami (AEC v periferní krvi nebo ve sputu, FeNO a alergologické vyšetření a stanovení celkového a specifického IgE). Všechny tyto výstupy mají za cíl detekovat T2-high zánětlivý endotyp, nicméně jejich klinická interpretace je odlišná, vzhledem k tomu, že jde o odlišně regulované parametry. Izolovaná nebo kombinovaná pozitivita tudíž informuje o odlišné dominující cytokinové signalizaci v patogenezi onemocnění a podporuje tak odlišnou léčebnou strategii. Je častým problémem, že jeden pacient může být potenciálně vhodný pro více terapeutických přístupů. Například 88 % všech pacientů s těžkým astmatem v International Severe Asthma Registry (ISAR) mělo alespoň

jeden pozitivní biomarker, 59 % mělo dvojnásobnou pozitivitu a 27 % bylo trojnásobně pozitivní (hranice byly: $AEC \geq 300/\mu l$, $FeNO \geq 25$ ppb a $IgE \geq 75$ kU/l) (48). V jiné průřezové analýze výchozích dat celkové populace nemocných s astmatem splňovalo 78 % charakteristiky alergického astmatu (potenciálně způsobilých pro anti-IgE terapii), 39,5 % z nich by však mělo reagovat i na antieozinofilní léčbu (anti-IL-5(R)). A ze 40,6 % pacientů s eozinofilním astmatem (pravděpodobní respondéři na anti-IL-5(R) terapii) by 75,8 % z nich mohlo potenciálně reagovat na léčbu anti-IgE díky přítomné alergické reaktivitě (49). Všechna biomarkerová vyšetření jsou navíc v čase nestabilní, a je tudíž obtížné stanovit jednoduchou a všeobíhající interpretaci příslušných nálezů (50).

Klinická povaha onemocnění (fenotyp) je vždy směs odlišných patogenetických procesů (endotypy), které se mohou různě kombinovat (51). Tato redundance může rezultovat v nedostatečnou účinnost léčby, která cílí na jeden konkrétní imunologický proces. Není proto překvapivé, že i správně indikovaná biologická léčba dokáže redukovat těžké exacerbace astmatu pouze o 30–50 % (52). Antieozinofilní léčba namířená proti IL-5(R) u pacientů s těžkým eozinofilním astmatem je účinná jen u cca 83 % nemocných (69 % respondérů a pouze asi 14 % superrespondérů definovaných klinickým, laboratorním a spirometrickým zlepšením) (53). Ačkoli jsou klinické a laboratorní charakteristiky pacientů potenciálně vhodných pro anticytokinovou (anti-IL-5) nebo antireceptorovou (anti-IL-5R) léčbu prakticky stejné, důsledky použití jednotlivých biologik se výrazně liší. Stejně tak je i nestejná povaha tzv. průlomových exacerbací v případech selhání léčby (54, 55) vyžadující rozdílné terapeutické řešení (56). Kromě toho pouze u 30,12 % pacientů s astmatem léčených mepolizumabem a u 40 % pacientů léčených benralizumabem je onemocnění po 12 měsících léčby uvedeno do kompletní remise (57–59).

Řešení všech výše uvedených limitací úspěšné biologické léčby těžkého astmatu vyžaduje podrobnější pochopení imunopatogeneze choroby. Současné používané biomarkery zjevně nejsou dostatečné k identifikaci superrespondérů mezi všemi pacienty

s těžkým astmatem, a poskytují pouze rozmazaný obraz endo/fenotypu onemocnění. Na druhou stranu máme k dispozici důkazy, že např. zvýšený počet hypodenzních/aktivovaných eozinofilů v periferní krvi je patognomickým rysem eozinofilního bronchiálního astmatu (40), vykazujícího jistou míru korelace s antigenní expozicí dýchacích cest (32) a se závažností onemocnění (34). Fenotypové změny eozinofilů (60) jsou pravděpodobně v souladu s možnou dysregulací rezidentních a zánětlivých eozinofilů (rEos/iEos) v průběhu vzniku a rozvoje astmatu (5).

Příslušné buněčné populace mohou být navíc relativně snadno detekovatelné v periferní krvi a deregulace jejich poměrů např. může odrážet alergickou stimulaci u pacientů s alergickým astmatem (42) nebo přítomnost komorbidit, jako je CRSwNP (36). Tato vyšetření mohou tedy pravděpodobně mít potenciál zpřesnit naše rozhodovací algoritmy pro volbu biologické léčby (6), a proto jsou další klinická data podporující tuto hypotézu očekávána s velkými nadějemi.

Závěr

Eozinofily představují fascinující buněčnou populaci s rozsáhlým polem působení v lidském těle. Naše chápání jejich role ve specifických patologiích se za posledních 20 let exponenciálně rozšířilo a vedlo k vývoji cílené antieozinofilní biologické terapie založené na interakci buď s hlavním růstovým faktorem eozinofilů (IL-5), nebo s povrchovými molekulami eozinofilů (IL-5R α). Obě léčebné modalities se nicméně liší jak v klinických, tak biologických a laboratorních dopadech. Přestože se vyšetření eozinofilů v periferní krvi stalo nezbytnou podmínkou diagnostiky a fenotypizace astmatu, izolované stanovení jejich počtu vykresluje složité biologické procesy jen v hrubých rysech a je nedostatečné pro rozhodnutí, který léčebný postup má větší šanci na úspěšnou kontrolu astmatu nebo dokonce na navození klinické či kompletní remise. Věříme, že funkční a fenotypová charakteristika cirkulujících či tkáňových eozinofilů může přispět k řešení alespoň některých klinických otázek.

LITERATURA

- Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, et al. Eosinophils in health and disease: The LIAR hypothesis. *Clinical and Experimental Allergy*. 2010;40:563-575.
- Van Hulst G, Bureau F, Desmet CJ. Eosinophils as drivers of severe eosinophilic asthma: Endotypes or plasticity? *Int J Mol Sci*. 2021;22:10150.
- Loktionov A. Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders. *World J Gastroenterol*. 2019; 25:3503-3526.
- Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*. 2014;157:1292-1308.
- Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *Journal of Clinical Investigation* 2016;126:3279-3295.
- Rothenberg ME. A hidden residential cell in the lung. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126:3185-3187.
- Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:1-6.
- Abdala-Valencia H, Coden ME, Chiarella SE, et al. Shaping eosinophil identity in the tissue contexts of development, homeostasis, and disease. *J Leukoc Biol*. 2018;104:95-108.
- Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:746-760.
- Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, et al. Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J Immunol*. 2009;182:1577-83.
- McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front Med (Lausanne)* 2017;4:1-14.
- Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: Form and function. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:17406-17415.
- Melo RCN, Weller PF. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J Leukoc Biol*. 2018;104:85-93.
- Persson C, Uller L. Theirs but to die and do: primary lysis of eosinophils and free eosinophil granules in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:628-633.
- Mukherjee M, Bulir DC, Radford K, et al. Sputum autoantibodies in patients with severe eosinophilic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018;141:1269-1279.
- Drake MG, Bivins-Smith ER, Proskocil BJ, et al. Human and mouse eosinophils have antiviral activity against parainfluenza virus. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55:387-394.
- Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int*. 2018;2018:28.
- Mukherjee M, Lacy P, Ueki S. Eosinophil extracellular traps and inflammatory pathologies-untangling the web! *Front Immunol*. 2018;9:2763.
- Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, et al. A Critical Role for Eosinophils in Allergic Airways Remodeling. *Science* (1979). 2004;305:1776-1779.
- Brusselle GG, Koppelman GH. Biologic Therapies for Severe Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2022;386:157-171.
- Global Initiative For Asthma (GINA). DIFFICULT-TO-TREAT SEVERE ASTHMA in adolescent and adult patients GINA Pocket Guide For Health Professionals Diagnosis and Management. 2019.
- Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2022 update). Global Initiative for Asthma. 2022;1-186.

23. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 2000;356:2144-8.
24. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:218-224.
25. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med*. 2009;360:973-984.
26. Nair P, Pizzichini MMM, Kjarsgaard M, et al. Mepolizumab for Prednisone-Dependent Asthma with Sputum Eosinophilia. *New England Journal of Medicine*. 2009;360:985-993.
27. Pavord ID, Haldar P, Bradding P, et al. Mepolizumab in refractory eosinophilic asthma. *Thorax*. 2010;65:370.
28. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2014; 71:1198-1207.
29. Nair P, O'Byrne PM. Measuring Eosinophils to Make Treatment Decisions in Asthma. *Chest*. 2016;150:485-7.
30. Mukherjee M, Nair P. Blood or sputum eosinophils to guide asthma therapy? *Lancet Respir Med*. 2015;3:824-825.
31. Kostikas K, Brindicci C, Patalano F. Blood Eosinophils as Biomarkers to Drive Treatment Choices in Asthma and COPD. *Curr Drug Targets*. 2018;19:1882-1896.
32. Kroegel C, Liu MC, Hubbard WC, et al. Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subjects after segmental antigen challenge: Surface phenotype, density heterogeneity, and prostanoid production. *J Allergy Clin Immunol*. 1994; 93:725-734.
33. Prin L, Capron M, Tonnel AB, et al. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int Arch Allergy Immunol*. 1983; 72:336-346.
34. Kuo HP, Yu TR, Yu CT. Hypodense eosinophil number relates to clinical severity, airway hyperresponsiveness and response to inhaled corticosteroids in asthmatic subjects. *European Respiratory Journal*. 1994;7:1452-1459.
35. Abdala Valencia H, Loffredo LF, Misharin A V, et al. Phenotypic plasticity and targeting of Siglec-FhighCD11c low eosinophils to the airway in a murine model of asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;71:267-271.
36. Matucci A, Nencini F, Maggiore G, et al. High proportion of inflammatory CD62L low eosinophils in blood and nasal polyps of severe asthma patients. *Clinical & Experimental Allergy*. 2023;53:78-87.
37. Kanda A, Yun Y, Bui D Van, et al. The multiple functions and subpopulations of eosinophils in tissues under steady-state and pathological conditions. *Allergology International*. 2021;70:9-18.
38. Shah K, Ignacio A, McCoy KD, et al. The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2020;13:574-583.
39. Al-Shaikhly T, Murphy RC, Parker A, et al. Location of eosinophils in the airway wall is critical for specific features of airway hyperresponsiveness and T2 inflammation in asthma. *European Respiratory Journal*. 2022;60:2101865.
40. Fukuda T, Dunnette SL, Reed CE, et al. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *American Review of Respiratory Disease*. 1985;132:981-985.
41. Peters MS, Gleich GJ, Dunnette SL, et al. Ultrastructural study of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome: A morphological basis of hypodense eosinophils. *Blood*. 1988;71:780-785.
42. Januskevicius A, Jurkeviciute E, Janulaityte I, et al. Blood Eosinophils Subtypes and Their Survivability in Asthma Patients. *Cells*. 2020;9:1248.
43. Van Hulst G, Jorssen J, Jacobs N, et al. Anti-IL5 mepolizumab minimally influences residual blood eosinophils in severe asthma. *European Respiratory Journal*. 2022;59:2100935.
44. Novosad J, Krčmová I, Souček O, et al. Subsets of Eosinophils in Asthma, a Challenge for Precise Treatment. *Int J Mol Sci*. 2023; 24: 5716.
45. Freeman CM, Curtis JL, Hastie AT. Finding the Right Biological: Eosinophil Subset Differences in Asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. Epub ahead of print 13 June 2023. DOI: 10.1164/RCCM.202305-0811ED.
46. Cabrera López C, Sánchez Santos A, Lemes Castellano A, et al. Eosinophils Subtypes in Asthmatic and COPD Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. Epub ahead of print 18 April 2023. DOI: 10.1164/rccm.202301-0149OC.
47. Ijaz T, Pazdrak K, Kalita M, et al. Systems biology approaches to understanding Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in mucosal remodeling and signaling in asthma. *World Allergy Organ J*. 2014;7:13.
48. Denton E, Price DB, Tran TN, et al. Cluster Analysis of Inflammatory Biomarker Expression in the International Severe Asthma Registry. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 2021;9:2680-2688.e7.
49. Chen M, Shepard K, Yang M, et al. Overlap of allergic, eosinophilic and type 2 inflammatory subtypes in moderate-to-severe asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. 2021;51:546-555.
50. Corren J, Du E, Gubbi A, et al. Variability in Blood Eosinophil Counts in Patients with Eosinophilic Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 2021; 9: 1224-1231.e9.
51. Kroes JA, Zielhuis SW, van Roon EN, et al. Prediction of response to biological treatment with monoclonal antibodies in severe asthma. *Biochem Pharmacol*. 2020;179:113978.
52. Rogliani P, Calzetta L, Matera MG, et al. Severe Asthma and Biological Therapy: When, Which, and for Whom. *Pulm Ther*. 2020;6:47-66.
53. Eger K, Kroes JA, ten Brinke A, et al. Long-Term Therapy Response to Anti-IL-5 Biologics in Severe Asthma-A Real-Life Evaluation. *J Allergy Clin Immunol. Pract* 2021;9:1194-1200.
54. McDowell PJ, Diver S, Yang F, et al. The inflammatory profile of exacerbations in patients with severe refractory eosinophilic asthma receiving mepolizumab (the MEX study): a prospective observational study. *Lancet Respir Med*. 2021;9:1174-1184.
55. Poznanski SM, Mukherjee M, Zhao N, et al. Asthma exacerbations on benralizumab are largely non-eosinophilic. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021;76:375-379.
56. Nair P, O'Byrne PM. Medical algorithms: Approach to adult asthma exacerbations. *Allergy*. 2021;76:3556-3559.
57. Menzies-Gow A, Bafadhel M, Busse WW, et al. An expert consensus framework for asthma remission as a treatment goal. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;145:75-65.
58. Menzies-Gow A, Szeffler SJ, Busse WW. The Relationship of Asthma Biologics to Remission for Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2021;9:1090-1098.
59. Maglio A, Vitale C, Pelaia C, et al. Severe Asthma Remissions Induced by Biologics Targeting IL5/IL5r: Results from a Multicenter Real-Life Study. *Int J Mol Sci*. 2023;24:2455.
60. Mengelers HJJ, Maikoe T, Hooibrink B, et al. Down modulation of L-Selection expression on eosinophils recovered from bronchoalveolar lavage fluid after allergen provocation. *Clinical and Experimental Allergy*. 1993;23:196-204.