

**lek. Katarzyna Mycroft-Rzeszotarska**

**Ocena profilu molekularnego i fenotypu eozynofiliów we krwi i drogach oddechowych u chorych na POChP**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Katarzyna Górka

Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego  
Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024 r.

**Słowa kluczowe:** eozynofil, POChP, astma, zapalenie, chemokiny, transkryptom, cytometria przepływowa

**Keywords:** eosinophil, COPD, asthma, inflammation, chemokines, transcriptome, flow cytometry

## ***Podziękowania***

*Pragnę serdecznie podziękować mojej Promotorce  
dr hab. n. med. Katarzynie Górskiej  
za ogromne wsparcie merytoryczne i inspirację do pracy naukowej.*

*Serdeczne podziękowania dla dr hab. n. med. Magdaleny Paplińskiej-Gorycy  
za merytoryczne wsparcie i bezcenną pomoc.*

*Dziękuję Kierownikowi Kliniki  
Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii UCK WUM  
Panu Profesorowi Rafałowi Krenke  
za cenne merytoryczne wsparcie.*

*Serdecznie dziękuję Pracownikom  
Ośrodka Diagnostyki Laboratoryjnej Chorób Układu Oddechowego  
Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii UCK WUM  
za pomoc w realizacji pracy doktorskiej.*

*Dziękuję Zespołowi Pielęgniarskiemu  
Odcinka Diagnostycznego  
Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii UCK WUM  
za pomoc w realizacji pracy doktorskiej.*

*Serdecznie dziękuję mojemu Mężowi i Rodzicom  
za wsparcie i motywację do rozwoju naukowego.*



## Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską

1. **Mycroft K**, Krenke R, Górska K. Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(8):2565-2574.  
doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017.

Praca przeglądowa

Punktacja MEiN: 140

Impact Factor: 8,86

2. **Mycroft K**, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Nejman-Gryz P, Krenke R, Górska K. Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma. *Cells.* 2023;12(12):1631.  
doi: 10.3390/cells12121631.

Praca oryginalna

Punktacja MEiN: 140

Impact Factor: 5,1

3. **Mycroft K**, Proboszcz M, Paplińska-Goryca M, Krenke R, Górska K. Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study. *J Cell Mol Med.* 2024; 28:e70110.  
doi: 10.1111/jcmm.70110.

Praca oryginalna

Punktacja MEiN: 100

Impact Factor: 4,3

Łączna punktacja MEiN: 380 punktów

Łączny IF: 18,261

## Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów .....	7
2. Streszczenie w języku polskim .....	9
3. Streszczenie w języku angielskim .....	12
4. Wstęp.....	15
4.1. Przewlekła obturacyjna choroba płuc.....	15
4.2. Biologia eozynofilów .....	17
4.2.1. Funkcje eozynofilów.....	17
4.2.2. Heterogenność eozynofilów.....	19
4.3. Rola eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych w patogenezie chorób obturacyjnych układu oddechowego .....	20
4.3.1. Astma .....	20
4.3.2. POChP.....	21
4.3.3. Liczba eozynofilów we krwi obwodowej jako biomarker eozynofilii w drogach oddechowych w astmie i w POChP .....	23
4.3.4. Podłoże molekularne funkcji eozynofilów w chorobach obturacyjnych.....	24
4.4. Eozynofilia obwodowa jako cel terapeutyczny w POChP .....	24
4.4.1. Glikokortykosteroidy wziewne w leczeniu POChP .....	24
4.4.2. Leki biologiczne w leczeniu POChP .....	28
5. Założenia i cel pracy .....	30
6. Kopie opublikowanych prac.....	32
7. Podsumowanie .....	62
8. Wnioski .....	65
9. Opinia Komisji Bioetycznej .....	66
10. Oświadczenia współautorów publikacji.....	68
11. Piśmiennictwo do rozdziałów w języku polskim.....	74

## 1. Wykaz stosowanych skrótów

skrót	<i>pełna nazwa w języku angielskim</i> pełna nazwa w języku polskim
<b>BALF</b>	<i>Bronchoalveolar lavage fluid</i> Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i> antygen powierzchniowy wykrywany odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi
<b>CCL</b>	<i>CC chemokine</i> Chemokina CC
<b>CCR</b>	<i>Chemokine CC receptor</i> receptor dla chemokin CC
<b>CR3</b>	<i>Complement receptor 3</i> Receptor dopełniacza 3
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i> kwas deoksyrybonukleinowy
<b>DUSP</b>	<i>Dual specificity phosphatase</i>
<b>ECP</b>	<i>Eosinophil cationic protein</i> Eozynofilowe białko kationowe
<b>EDN</b>	<i>Eosinophil-derived neurotoxin</i> Neurotoksyna eozynofilowa
<b>EPO</b>	<i>Eosinophil peroxidase</i> Peroksydaza eozynofilowa
<b>EKR1/2</b>	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
<b>FEV<sub>1</sub></b>	<i>forced expiratory volume in one second</i> natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów
<b>GOLD</b>	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i> Międzynarodowa Inicjatywa na Rzecz Przewlekłej Obturacyjnej Choroby Płuc
<b>iEos</b>	<i>Inflammatory eosinophil</i> Eozynofil zapalny
<b>IgE</b>	<i>Immunoglobulin E</i> Immunoglobulina E
<b>IL</b>	<i>interleukin</i> interleukina
<b>ILC2</b>	<i>Type 2 innate lymphoid cells</i> nieswoiste komórki limfoidalne typu 2

<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>LABA</b>	<i>Long-acting Beta-agonist</i> Beta 2- mimetyk długo działający
<b>LAMA</b>	<i>Long-acting muscarinic antagonist</i> Lek przeciwcholinergiczny długodziałający
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinases</i> kinazy aktywowane mitogenami
<b>MBP</b>	<i>Major basic protein</i> Główne białko zasadowe
<b>MIP</b>	<i>Macrophage inflammatory protein</i> Białko zapalne makrofagów
<b>MMP</b>	<i>Matrix metalloproteinase</i> Metaloproteinaza macierzy
<b>mRNA</b>	<i>Messenger ribonucleic acid</i> Matrycowy kwas rybonukleinowy
<b>POChP</b>	Przewlekła obturacyjna choroba płuc
<b>RANTES</b>	<i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
<b>rEos</b>	<i>Residual eosinophil</i> Eozynofil rezydualny
<b>RR</b>	<i>Rate ratio</i> Współczynnik częstości
<b>SGRQ</b>	<i>Saint George's Respiratory Questionnaire</i> Kwestionariusz Szpitala Świętego Jerzego
<b>TGF</b>	<i>Tumor growth factor</i> transformujący czynnik wzrostu
<b>Th</b>	<i>T helper lymphocyte</i> limfocyty T pomocnicze
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i> Czynnik martwicy nowotworów
<b>TSLP</b>	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i> Limfopoetyna zrębowa grasicy
<b>wGKS</b>	Glikokortykosteroidy wziewne
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> Światowa Organizacja Zdrowia



## 2. Streszczenie w języku polskim

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) dotyczy około 10% światowej populacji w wieku 30-79 lat. W krajach rozwiniętych głównym czynnikiem uczestniczącym w patogenezie choroby jest palenie papierosów. Powtarzające się narażenie na czynniki toksyczne we wdychanym powietrzu przyczynia się do rozwoju przewlekłego zapalenia w drogach oddechowych, destrukcji mięszu płucnego i zmian strukturalnych w ścianie małych naczyń płucnych. POChP ma charakter postępujący i nieodwracalny, a zbyt późna rozpoznawalność i trudności w leczeniu powodują, że stanowi trzecią przyczynę zgonów na świecie według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcanej jest poszukiwaniom biomarkerów, które umożliwiłyby wytypowanie spośród chorych na POChP osób, które mogłyby odnieść korzyść ze spersonalizowanej formy leczenia. Jednym z badanych biomarkerów w POChP jest liczba eozynofiliów we krwi obwodowej. Jednak rola eozynofiliów w patogenezie i leczeniu POChP jest od wielu lat przedmiotem licznych dyskusji.

Niniejsza rozprawa doktorska jest oparta na cyklu 3 prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach: 1 pracy poglądowej oraz 2 pracach oryginalnych. Wstęp do rozprawy doktorskiej oparty jest na pracy poglądowej (*Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications*, doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017), która została opracowana na podstawie dostępnego na tamten czas piśmiennictwa. Przygotowanie pracy poglądowej pozwoliło zapoznać się z aktualną literaturą poświęconą tematyce eozynofiliów w POChP i wskazać luki w ówczesnym stanie wiedzy. W pracy przedstawiono mechanizmy związane z rozwojem eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych w POChP oraz omówiono możliwy wpływ tego typu zapalenia na przebieg choroby. Następnie, przeanalizowano dostępną literaturę na temat liczby eozynofiliów we krwi obwodowej jako biomarkera. Mimo, że istnienie zależności między liczbą eozynofiliów we krwi obwodowej a liczbą eozynofiliów w drogach oddechowych jest kwestią niejednoznaczną, a sama liczba eozynofiliów we krwi nie jest parametrem stabilnym, to została udowodniona zależność między odpowiedzią na wGKS a liczbą eozynofiliów we krwi u chorych z zaostrzeniami choroby.

Obie prace oryginalne poświęcone są analizie porównawczej eozynofiliów u chorych na POChP oraz na astmę. W pracy pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are*

*Differently Polarized than in Asthma* (doi: 10.3390/cells12121631) za pomocą cytometrii przepływowej scharakteryzowano eozynofile pod kątem występowania wybranych cząsteczek powierzchniowych, a następnie porównano je w dwóch kompartmentach: we krwi obwodowej oraz w drogach oddechowych (w płwocinie indukowanej). To pozwoliło zaobserwować, że eozynofile we krwi charakteryzowały się zwiększoną ekspresją CD125, CD193, CD62L i CD14 w porównaniu z eozynofilami w płwocinie indukowanej w grupie chorych na POChP, astmę oraz w grupie kontrolnej, co sugeruje zmianę fenotypu eozynofilów po rekrutacji do dróg oddechowych niezależnie od rozpoznania.

W grupie chorych na POChP zaobserwowano wyższy odsetek eozynofilów CD193+ i CD66b+ w płwocinie indukowanej w porównaniu z grupą kontrolną oraz wyższy odsetek eozynofilów CD11b+ w porównaniu z grupą chorych na astmę. Następnie subpopulacje eozynofilów scharakteryzowano poprzez ekspresję pary markerów: CD125 i CD193. We wszystkich trzech grupach eozynofile we krwi i płwocinie charakteryzowały się przewagą profilu CD193+CD125+. Stwierdzono obniżony poziom eozynofilów CD193-CD125+ w płwocinie u chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki naszego badania sugerują różną polaryzację eozynofilów tkankowych i ogólnoustrojowych oraz różnice w subpopulacjach eozynofilów u chorych na POChP w porównaniu z chorymi na astmę lub osobami zdrowymi.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją CD125 na eozynofilach w płwocinie lub krwi a stężeniem IL-5 w płwocinie oraz pomiędzy ekspresją CD193 na eozynofilach w płwocinie lub krwi, oraz pomiędzy stężeniem eotaksyny-3 w płwocinie. Co więcej, w żadnej z badanych grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy IL-5 lub eotaksyną-3 a odsetkiem subpopulacji eozynofilów CD125+CD193+.

W pracy pt. *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study* (doi: 10.1111/jcmm.70110) oceniono i porównano profile transkrypcyjne eozynofilów we krwi obwodowej u chorych na POChP i astmę, co umożliwiło identyfikację 26 genów ulegających różnicowej ekspresji. Geny, których ekspresja była najsilniej zwiększona w POChP - *CCL3L1* i *CCL4L2* kodowały chemokiny. Gen *CCL3L1* koduje białko zapalne makrofagów 1  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ). Wiązanie MIP-1 $\alpha$  – CCR5 bierze udział w procesach związanych z uszkodzeniem połączeń ścisłych w nabłonku dróg oddechowych w POChP. CCR5 jest także receptorem dla MIP-1 $\beta$  kodowanym

m.in. przez *CCL4L2*, którego ekspresja w naszym badaniu okazała się zwiększona u pacjentów z POChP. Zarówno MIP-1 $\alpha$ , jak i MIP-1 $\beta$  są chemoatraktantami monocytów i makrofagów. Stwierdzona w niniejszej pracy zwiększona ekspresja mRNA *CCL3L1* w eozynofilach u chorych na POChP może sugerować, że rolą eozynofilów w POChP jest przyciąganie makrofagów do płuc, a nie promowanie zapalenia eozynofilowego w drogach oddechowych. Może to wskazywać na odmienną funkcję eozynofilów w patobiologii astmy i POChP oraz może wyjaśniać różną wrażliwość na wGKS u pacjentów z POChP lub astmą.

### 3. Streszczenie w języku angielskim

The analysis of transcriptional profiles and phenotypes of eosinophils in the blood and in the airways in COPD patients

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) affects approximately 10% of the world's population aged 30-79. In developed countries, the main factor involved in the pathogenesis of the disease is cigarette smoking. Repeated exposure to toxic factors in inhaled air contributes to the development of chronic inflammation in the respiratory tract, destruction of the lung parenchyma and structural changes in the walls of small pulmonary vessels. COPD is progressive and irreversible, and late diagnosis and difficulties in treatment make it the third cause of death in the world according to the estimates by the World Health Organization.

Hence, in recent years, many efforts have been made in the search for biomarkers that would enable the selection of COPD patients who could benefit from a personalized form of treatment. One of the biomarkers extensively studied in COPD is the number of eosinophils in peripheral blood. Despite many efforts, the role of eosinophils in the pathogenesis and treatment of COPD remains ambiguous.

This doctoral dissertation consists of three research papers published in peer-reviewed journals: 1 review and 2 original papers. The introduction to the doctoral dissertation is based on the review of the world literature (*Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications*, doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017). The paper presents the mechanisms associated with the development of eosinophilic inflammation in the respiratory tract in COPD and discusses the possible impact of this type of inflammation on the course of the disease. Moreover, the available literature on the number of eosinophils in peripheral blood as a biomarker was analyzed. The association between the number of eosinophils in peripheral blood and the number of eosinophils in the respiratory tract is equivocal and the number of eosinophils in the blood itself was not found to be a stable parameter. However, a relationship between the response to corticosteroids and the number of eosinophils in the blood in patients with exacerbations has been found.

In both original papers a comparative analysis of eosinophils in patients with COPD and asthma was performed. In the study *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma* (doi: 10.3390/cells12121631), we evaluated the

expression of several surface molecules on eosinophils using flow cytometry, and then compared it to eosinophils in peripheral blood and in the respiratory tract (induced sputum). We observed that eosinophils in the blood exhibited increased expression of CD125, CD193, CD62L, and CD14 compared to eosinophils in induced sputum in the COPD, asthma, and control groups, which might suggest a change in eosinophil phenotype after recruitment to the respiratory tract regardless of diagnosis.

In the group of COPD patients, a higher percentage of CD193<sup>+</sup> and CD66b<sup>+</sup> eosinophils was observed in induced sputum compared to the control group, and a higher percentage of CD11b<sup>+</sup> eosinophils compared to the asthma group. Subsequently, eosinophil subpopulations were characterized by the expression of the pair of markers CD125 and CD193. In all three groups, eosinophils in blood and sputum were predominantly CD193<sup>+</sup>CD125<sup>+</sup>. A decreased level of CD193<sup>-</sup>CD125<sup>+</sup> eosinophils was found in sputum in COPD patients compared to the control group. Our study results suggest different polarization of tissue and systemic eosinophils and differences in eosinophil subpopulations in COPD patients compared to those with asthma or healthy individuals.

No correlation was found between the expression of CD125 on eosinophils in sputum or blood and the concentration of IL-5 in sputum, nor between the expression of CD193 on eosinophils in sputum or blood and the concentration of eotaxin-3 in sputum. Furthermore, in none of the studied groups was found a correlation between IL-5 or eotaxin-3 and the percentage of CD125<sup>+</sup>CD193<sup>+</sup> eosinophil subpopulations.

In the study *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study* (doi: 10.1111/jcmm.70110) we assessed and compared transcriptional profiles of eosinophils in peripheral blood in patients with COPD and asthma. The RNA-Seq data analysis identified 26 differentially expressed genes in COPD and asthma. The most strongly up-regulated genes in COPD were *CCL3L1* and *CCL4L2*, which encode chemokines. The *CCL3L1* gene encodes macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ). MIP-1 $\alpha$ -CCR5 binding is linked to the processes associated with tight junction injury in the airway epithelium in COPD. CCR5 also serves as a receptor for MIP-1 $\beta$  encoded by i.a. *CCL4L2* which in our study was found to be up-regulated in COPD patients. Both MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  are monocyte and macrophage chemoattractants. The upgraded mRNA expression of *CCL3L1* in COPD eosinophils

observed in our study may suggest that in COPD eosinophils attract macrophages into the lungs rather than drive local eosinophilic inflammation. This finding underscores the different function of eosinophils in asthma and COPD pathobiology and might explain different ICS-sensitivity of patients with COPD and asthma.

## 4. Wstęp

Niniejsza rozprawa doktorska opiera się na cyklu 3 prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach: 1 pracy pogładowej oraz 2 pracach oryginalnych. Wstęp do rozprawy doktorskiej oparty jest na pracy pogładowej (*Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications*, doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017), która została opracowana na podstawie dostępnego na tamten czas (rok 2020) piśmiennictwa. Przygotowanie pracy pogładowej pozwoliło zapoznać się z aktualną literaturą poświęconą tematyce eozynofiliów w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (POChP) i wskazać luki w ówczesnym stanie wiedzy. Dotychczasowe badania skupiały się na charakterystyce eozynofiliów u chorych na astmę, jednak brakowało badań, które oceniałyby eozynofile pod kątem jakościowym u chorych na POChP.

Obie prace oryginalne poświęcone są analizie porównawczej eozynofiliów u chorych na POChP oraz na astmę. W pracy pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma* (doi: 10.3390/cells12121631) za pomocą cytometrii przepływowej scharakteryzowano eozynofile pod kątem występowania wybranych cząsteczek powierzchniowych, a następnie porównano je w dwóch kompartmentach: we krwi obwodowej oraz w drogach oddechowych (w płwocinie indukowanej), co pozwoliło zaobserwować, jakie zmiany zachodzą w eozynofilach podczas migracji z krążenia do dolnych dróg oddechowych u chorych na POChP, astmę oraz w grupie kontrolnej bez chorób układu oddechowego. W pracy pt. *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study* (doi: 10.1111/jcmm.70110) oceniono i porównano profile transkrypcyjne eozynofiliów we krwi obwodowej u chorych na POChP i astmę, co umożliwiło identyfikację genów ulegających różnicowej ekspresji.

### 4.1. Przewlekła obturacyjna choroba płuc

POChP dotyczy około 10% światowej populacji w wieku 30-79 lat (1). Etiologia POChP jest złożona, spośród uznanych czynników ryzyka jest palenie papierosów, narażenie na dymy uwalniane podczas palenia biomasy, nieoptymalny rozwój płuc (np. niska masa urodzeniowa, wcześniactwo, częste infekcje w dzieciństwie, astma dziecięca) (2). W krajach

rozwinętych głównym czynnikiem uczestniczącym w patogenezie choroby jest palenie papierosów. Powtarzające się narażenie na czynniki toksyczne we wdychanym powietrzu przyczynia się do rozwoju przewlekłego zapalenia w drogach oddechowych, destrukcji miąższu płucnego i zmian strukturalnych w ścianie małych naczyń płucnych (2). POChP ma charakter postępujący i nieodwracalny (2), a zbyt późna rozpoznawalność i trudności w leczeniu powodują, że stanowi trzecią przyczynę zgonów na świecie według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) (3).

Podstawowym narzędziem służącym do rozpoznania POChP jest badanie spirometryczne. Warunkiem rozpoznania POChP u osób z objawami lub wywiadem narażenia na dym papierosowy lub pyły, jest stwierdzenie utrwalonej obturacji w spirometrii (2, 4). Najczęstszymi objawami choroby są kaszel, odkrztuszanie wydzieliny oraz duszność wysiłkowa (2).

Najistotniejszym elementem leczenia POChP jest zaprzestanie palenia papierosów (2, 5). Stosowane w farmakoterapii leki rozszerzające oskrzela (bronchodylatory) łagodzą objawy i mogą jedynie spowolnić postęp choroby (5). Istotnym problemem klinicznym w POChP są zaostrzenia, które wiążą się z pogorszeniem czynności płuc i jakości życia oraz zwiększoną śmiertelnością (6).

POChP może mieć różnorodny przebieg, co wynika z jej heterogennego charakteru (2, 7). Na podstawie obrazu klinicznego i wyników badań dodatkowych obecnie wyróżnia się kilka fenotypów choroby, które charakteryzuje odmienny obraz kliniczny, m.in. (8):

- przewlekłe zapalenie oskrzeli,
- rozedma,
- POChP przebiegająca z częstymi zaostrzeniami,
- POChP przebiegająca bez zaostrzeń,
- współistnienie astmy i POChP.

Ukierunkowanie terapii na dany fenotyp może poprawić skuteczność leczenia i przyczynić się do zmniejszenia śmiertelności.

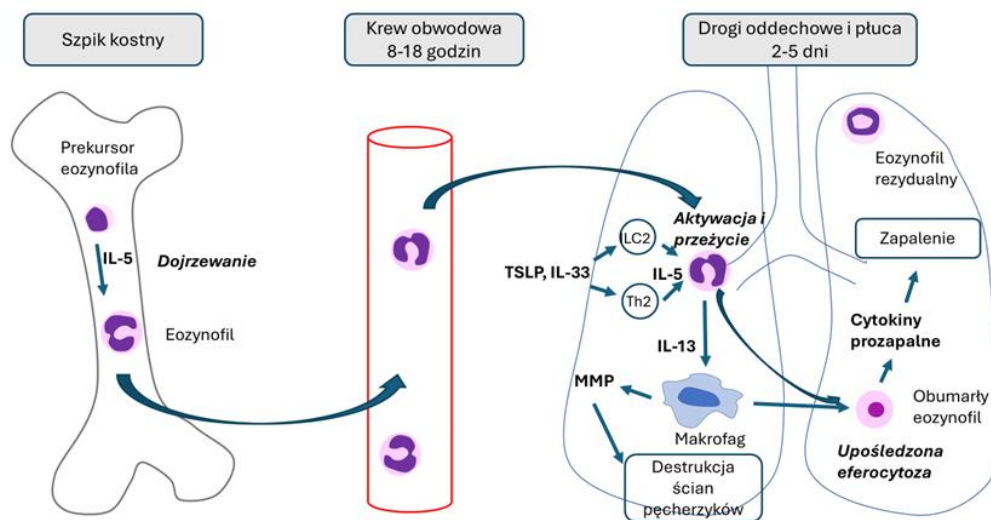


W ostatnich latach wiele uwagi poświęcanej jest poszukiwaniom biomarkerów, które umożliwiłyby wytypowanie spośród chorych na POChP osób, które mogłyby odnieść korzyść ze spersonalizowanej formy leczenia. Jednym z badanych biomarkerów w POChP jest liczba eozynofiliów we krwi obwodowej. Zwiększona liczba eozynofiliów we krwi obwodowej jest cechą charakterystyczną dla astmy (9). Wobec wielu podobieństw między astmą a POChP (m.in. obturacja oskrzeli, wspólne objawy kliniczne typu przewlekły kaszel, duszność) (10), podejmowane są próby zastosowania leków skutecznych w astmie, takich jak wziewne glikokortykosteroidy (wGKS) czy leki biologiczne, również w POChP. Jednak rola eozynofiliów, a co za tym idzie, również wGKS, które mają ugruntowane znaczenie w astmie, w patogenezie i leczeniu POChP jest od wielu lat przedmiotem licznych dyskusji.

## 4.2. Biologia eozynofiliów

### 4.2.1. Funkcje eozynofiliów

Eozynofile stanowią część populacji leukocytów o znaczeniu regulatorowym. Eozynofile wpływają na rekrutację, dojrzewanie limfocytów T w grasicy i uczestniczą w odpowiedzi przeciwko różnym patogenom poprzez tworzenie pozakomórkowych pułapek z mitochondrialnego DNA (11), czy uwalnianie białek cytotoksycznych z ziarnistości (12). Eozynofile dojrzewają w szpiku kostnym pod wpływem cytokin, takich jak interleukiny (IL)-3 i IL-5 i czynników transkrypcyjnych, np. czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), po czym przechodzą do krążenia, gdzie w warunkach fizjologicznych stanowią <5% leukocytów. Następnie są rekrutowane do innych tkanek: przewodu pokarmowego, tkanki tłuszczowej, grasicy, śledziony czy płuc (13, 14). Istnieje znacząca różnica pomiędzy czasem przebywania eozynofiliów w krążeniu, który trwa od 8 do 18 godzin, a czasem ich przeżycia w tkankach, który może sięgać nawet kilku dni (15). Warto przy tym zauważyć, że liczba eozynofiliów w tkankach jest około 100-krotnie większa niż we krwi, a układ krążenia służy jedynie jako droga transportu ze szpiku kostnego do tkanek (15). Na rycinie 1 przedstawiono cykl życiowy eozynofiliów.



Rycina 1. Schemat przedstawiający cykl życiowy eozynofili w POChP. Zaadaptowano z publikacji Mycroft i wsp. „*Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications*”

W tkankach, dojrzewanie, migracja i rekrutacja eozynofili, regulowane są przez cytokiny i chemokiny wytwarzane lokalnie w miejscu zapalenia: eotaksynę-1, -2, -3, IL-4, IL-5, IL-33, GM-CSF, chemokinę CCL5 (inaczej RANTES, ang. *Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) oraz białka adhezyjne (np. receptor dopełniacza CR3 – CD11b/CD18 lub L-selektyna – CD62L) obecne na eozynofiliach (16, 17). W pewnych warunkach, np. w odpowiedzi na alergeny lub pasożyty, wytwarzanie mediatorów przyciągających eozynofile jest nasilane przez limfocyty T pomocnicze typu 2 (komórki Th2), powodując nacieki eozynofilowe w tkankach (9, 16). Zapalenie eozynofilowe może ulec dalszemu nasileniu na skutek działania czynników sprzyjających przeżyciu lub hamujących apoptozę (IL-3, IL-5, GM-CSF, alarminy) (18-20) czy zwiększonej rekrutacji eozynofili prowadząc do rozwoju astmy, przewlekłego zapalenia zatok przynosowych lub eozynofilowego zapalenia przełyku (16). Długotrwała akumulacja eozynofili w drogach oddechowych przyczynia się do niekontrolowanej degranulacji eozynofili i uwolnienia z

ziarnistości białek cytotoksycznych: głównego białka zasadowego (MBP, ang. *major basic protein*), eozynofilowego białka kationowego (ECP, ang. *eosinophil cationic protein*), peroksydazy eozynofilowej (EPO, ang. *eosinophil peroxidase*), neurotoksyny eozynofilowej (EDN, ang. *eosinophil-derived neurotoxin*) i w konsekwencji uszkodzenia i upośledzenia funkcji nabłonka, m.in. dróg oddechowych.

#### 4.2.2. Heterogenność eozynofilów

Eozynofile w różnych tkankach i stanach chorobowych różnią się wyglądem struktur wewnątrzkomórkowych, ekspresją białek powierzchniowych oraz profilem transkrypcyjnym (21-23). Wyróżnia się dwie główne populacje eozynofilów: dziewicze (nieaktywowane) i aktywowane (22). Markerami aktywacji eozynofilów są m.in. białka adhezyjne, takie jak integryna Mac-1 (CD11b/CD18), L-selektyna (CD62L) oraz receptory dla cytokin, np. IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-3R $\alpha$  (CD123) czy IL-5R $\alpha$  (CD125) (22, 24).

Przed migracją do docelowych tkanek eozynofile dojrzewają i zmieniają ekspresję receptorów powierzchniowych (22). Ponadto na ekspresję receptorów może mieć wpływ środowisko lokalne, np. w drogach oddechowych. Zmiana ekspresji receptora może być związana z jego internalizacją, eksternalizacją lub oddzieleniem z powierzchni komórki, co powoduje, że dana komórka zmienia swoje właściwości i może pełnić inną funkcję niż dotychczas. Różnice w stanach aktywności między eozynofilami krążącymi we krwi a tymi w drogach oddechowych zostały wykazane zarówno u osób zdrowych (25), jak i u chorych na astmę (26). W jednym z badań prowadzonych na populacji chorych na astmę na powierzchni eozynofilów w drogach oddechowych obserwowano zwiększoną ekspresję CD11b, CD66b i obniżoną ekspresję CD62L w porównaniu do eozynofilów krwi obwodowej (26).

Wyniki badań przeprowadzonych z użyciem modelu mysiego scharakteryzowały dwa odmienne podtypy eozynofilów: eozynofile zapalne pełniące rolę komórek efektorowych (iEos) i eozynofile rezydualne utrzymujące homeostazę (rEos) (21). Obie populacje różniły się wyglądem jądra komórkowego i ekspresją białek powierzchniowych: L-selektyny (CD62L) i CD101. Zarówno rEos jak i iEos były obecne w płucach i we krwi, co sugeruje, że różnicowanie eozynofilów na oba podtypy rozpoczyna się jeszcze przed rekrutacją eozynofilów do tkanek docelowych.

### 4.3. Rola eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych w patogenezie chorób obturacyjnych układu oddechowego

#### 4.3.1. Astma

Astma charakteryzuje się przewlekłym zapaleniem w drogach oddechowych prowadzącym do nadreaktywności oskrzeli i nadmiernej produkcji śluzu. Patogeneza astmy może mieć różne podłoże immunologiczne: z dominacją odpowiedzi immunologicznej typu Th2 związaną z limfocytami Th2 lub rzadziej, z ograniczoną odpowiedzią Th2-zależną, gdzie większą rolę odgrywają limfocyty Th1 i Th17.

W szlaku Th2-zależnym uczestniczą eozynofile, limfocyty Th2 oraz wrodzone komórki limfoidalne typu 2 (ILC2, ang. *type 2 innate lymphoid cells*) (27). Limfopoetyna zrębowa grasicy (TSLP, ang. *thymic stromal lymphopoietin*), IL-25 i IL-33, nazywane również alarminami, wydzielane są przez komórki nabłonkowe w odpowiedzi na stresory i biorą udział w rekrutacji i aktywacji komórek Th2 i ILC2. Cytokiny produkowane przez komórki ILC2 i Th2 (IL-4, IL-5 oraz IL-13) wpływają na rekrutację, różnicowanie i aktywację eozynofilów. IL-5 oraz eotaksyny są silnymi chemoatraktantami dla eozynofilów i powodują ich napływ z krwi obwodowej i akumulację w oskrzelach. Pod wpływem cytokin produkowanych przez komórki Th2 ulegają aktywacji. Aktywowane eozynofile uczestniczą w mechanizmach prowadzących do uszkodzenia nabłonka oskrzeli, remodelingu dróg oddechowych, nadreaktywności oskrzeli oraz zwiększonej produkcji śluzu (28). Po rekrutacji do dróg oddechowych eozynofile ulegają degranulacji pod wpływem IL-5 i uwalniają ziarnistości o właściwościach cytotoksycznych, co prowadzi do miejscowego uszkodzenia nabłonka. MBP i EPO zawarte w ziarnistościach eozynofilów dodatkowo stymulują mastocyty i bazofile do uwolnienia histaminy. Histamina w połączeniu z IL-13 i leukotrienami prowadzi do nadreaktywności oskrzeli. IL-13 dodatkowo wpływa na produkcję śluzu przez promowanie różnicowania komórek kubkowych. Remodeling oskrzeli spowodowany jest przerostem mięśni gładkich, proliferacją fibroblastów, nadmierną produkcją kolagenu pod wpływem transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ , ang. *tumor growth factor  $\beta$* ). TGF- $\beta$  może być uwalniany bezpośrednio z eozynofilów lub pod wpływem uszkodzenia nabłonka.

Astma z dominującą odpowiedzią Th2-zależną może mieć podłoże alergiczne, gdzie w patogenezie dodatkowo uczestniczą mechanizmy nadwrażliwości typu 1. W reakcji

nadwrażliwości typu 1 dochodzi do zależnej od immunoglobuliny E (IgE) degranulacji mastocytów i bazofilów po kontakcie z zewnątrzpochodnymi antygenami. IgE mają bezpośredni wpływ na eozynofile poprzez receptory FcεRI i FcεRII znajdujące się na powierzchni eozynofilów (29). Aktywacja receptora FcεRI prowadzi do aktywacji i degranulacji eozynofilów oraz uwolnienia EPO z ziarnistości, podczas gdy aktywacja receptora FcεRII skutkuje uwolnieniem czynnika martwicy nowotworów alfa (TNFα, ang. *tumor necrosis factor alpha*) oraz zwiększoną ekspresją integryn i wydłużonym przeżyciem eozynofilów (29).

Powyższe mechanizmy mają istotne znaczenie dla przebiegu i leczenia astmy. Podstawowymi lekami kontrolującymi przebieg astmy są glikokortykosteroidy wziewne, które rekomendowane są na każdym stopniu leczenia astmy (30). U wybranych chorych z astmą ciężką zalecane są leki biologiczne o różnych punktach uchwytu, które mają za zadanie przerwanie kluczowych szlaków patofizjologicznych astmy.

#### 4.3.2. POChP

Eozynofilowe zapalenie dróg oddechowych występuje rzadziej i jest mniej nasilone u chorych na POChP niż u chorych na astmę (31-33), a jego mechanizm nadal nie jest dobrze poznany. Sugeruje się, że upośledzona funkcja makrofagów w usuwaniu apoptotycznych eozynofilów u chorych na POChP prowadzi do uwolnienia wewnątrzkomórkowych cytokin prozapalnych i wiąże się ze zwiększoną ciężkością i częstotliwością zaostrzeń (34). W patogenezie eozynofilowego zapalenia dróg oddechowych mogą też uczestniczyć szlaki Th2-zależne (ryc. 1) (35). Wykazano, że zarówno u chorych na POChP, jak i u chorych na astmę, występuje zwiększona ekspresja IL-33 w błonie śluzowej oskrzeli w porównaniu z grupą kontrolną bez chorób układu oddechowego (33), a u pacjentów z POChP i eozynofilią dróg oddechowych stwierdzono podwyższony poziom IL-33 w płwocinie indukowanej oraz krwi obwodowej (36). Indukowany przez IL-33 oraz inne alarminy rozwój zapalenia Th2-zależnego prowadzi poprzez cytokiny IL-4, IL-5 czy IL-13 do aktywacji eozynofilów. Podwyższony poziom zarówno IL-4, jak i IL-13 jest związany z rozwojem zaostrzeń u chorych na POChP (37, 38). Natomiast wyniki badań z użyciem modelu mysiego wykazały indukcję ekspresji IL-13 w eozynofilach dróg oddechowych przez IL-33 (39). Co więcej, IL-13 produkowana przez eozynofile stymuluje ekspresję metaloproteinazy macierzy-12 (MMP-

12, ang. *matrix metalloproteinase*) w makrofagach pęcherzykowych (40, 41). Metaloproteinazy macierzy są proteazami, które powodują niszczenie przegród pęcherzykowych, co w konsekwencji prowadzi do rozedmy płuc (40). U chorych na POChP z zapaleniem eozynofilowym i współistniejącą rozedmą stwierdzono wyższy poziom MMP-12 w płwocinie w porównaniu z chorymi na POChP bez zapalenia eozynofilowego i bez rozedmy (40), co sugeruje, że IL-13 poprzez MMP-12 wpływa na rozwój rozedmy płuc u chorych na POChP. Biorąc pod uwagę fakt, że zarówno u chorych na POChP, jak i u chorych na astmę występuje zwiększone stężenie MMP-12 w płwocinie oraz, że związek pomiędzy poziomem MMP-12 w płwocinie a stopniem rozedmy stwierdzono jedynie u chorych na POChP (42), można przypuszczać, że MMP-12 może odgrywać odmienną rolę w obu chorobach obturacyjnych.

Eozynofilia w drogach oddechowych, definiowana jako min. 3% odsetek eozynofilów w składzie komórkowym w płwociny indukowanej (43), występuje u około 30% chorych na POChP (32, 44). Wpływ eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych na przebieg POChP pozostaje przedmiotem badań. Sugeruje się, że poziom eozynofilów w płwocinie  $\geq 2\%$  zwiększa ryzyko zaostrzeń POChP (45). Co więcej, liczne badania kliniczne wykazały skuteczność wGKS u chorych z eozynofilią w płwocinie w zmniejszeniu duszności (32) czy zapobieganiu zaostrzeniom (46).

Oceniano również związek między liczbą eozynofilów w drogach oddechowych a wynikami badań czynnościowych płuc. Dane dotyczące zależności między eozynofilią a wartością natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej ( $FEV_1$ , ang. *forced expiratory volume in one second*) są sprzeczne. Wyniki niektórych badań wykazały wyższą wartość  $FEV_1$  po podaniu leku rozszerzającego oskrzela u pacjentów z niższymi wartościami odsetka eozynofilów w porównaniu do pacjentów z wyższymi odsetkami eozynofilów w płwocinie (32, 45), natomiast w innych badaniach nie zaobserwowano takiej zależności (44, 47).

Pomimo, że nie stwierdzono związku między dodatnią próbą rozkurczową (definiowaną jako wzrost  $FEV_1$  o  $>12\%$  i  $>200$  ml po leku rozszerzającym oskrzela) u chorych na POChP a eozynofilią w płwocinie (47, 48), to u pacjentów z wybitnie dodatnią próbą rozkurczową (definiowaną jako wzrost  $FEV_1$  o  $>15\%$  i  $>400$  ml) stwierdzono znacznie wyższy odsetek eozynofilów w płwocinie (mediana 6,11%) niż u pacjentów bez

dotatniej próby rozkurczowej (mediana 1,02%) (47). W przeciwieństwie do astmy (49), związek między nadreaktywnością oskrzeli a liczbą eozynofiliów w drogach oddechowych w POChP jest nadal niejednoznaczny (50, 51).

#### 4.3.3. Liczba eozynofiliów we krwi obwodowej jako biomarker eozynofilii w drogach oddechowych w astmie i w POChP

Ocena typu zapalenia dolnych dróg oddechowych może być dokonana na podstawie analizy różnych materiałów (52, 53). Zgodnie z hipotezą zjednoczonych dróg oddechowych (*the unified airways hypothesis*) przyjmuje się, że zapalenie w układzie oddechowym jest podobne na wszystkich jego poziomach (54). Najczęściej stosowaną metodą służącą ocenie zapalenia w drogach oddechowych jest badanie składu komórkowego indukowanej płwociny. Przyjmuje się, że to badanie odzwierciedla typ zapalenia toczącego się w oskrzelach większego kalibru. Zdecydowanie rzadziej, ze względu na inwazyjny charakter badania, wykonuje się bronchoskopię z biopsją oskrzeli i/lub płukaniem oskrzelowo-pęcherzykowym. Ocena składu komórkowego z płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF, ang. *bronchoalveolar lavage fluid*) umożliwia wgląd w zapalenie w końcowych odcinkach drzewa oskrzelowego. Ponieważ analiza indukowanej płwociny i materiału z bronchoskopii jest trudno dostępna w rutynowej praktyce klinicznej, często w ocenie zapalenia dróg oddechowych bierze się pod uwagę liczbę eozynofiliów we krwi obwodowej.

Liczba eozynofiliów we krwi obwodowej była szeroko badana jako marker eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych. Dodatnia korelacja między odsetkiem eozynofiliów w płwocinie indukowanej a liczbą lub odsetkiem eozynofiliów we krwi u chorych na astmę została stwierdzona w kilku badaniach (55-57). W przypadku POChP korelacja ta jest niejednoznaczna. Dodatnią korelację wykazano w kilku badaniach (45, 58). Analizując cytowane wcześniej badania, należy podkreślić fakt, że obejmowały one pacjentów ze współistniejącą astmą (45, 58) lub pacjentów sklasyfikowanych jako GOLD 0, czyli osoby z objawami ze strony układu oddechowego, ale prawidłową spirometrią (45). W badaniach, w których włączono wyłącznie chorych na POChP, obecność i siła korelacji wydają się dodatkowo zależne od ciężkości choroby. W łagodnej do umiarkowanej postaci POChP w okresie stabilnym choroby nie stwierdzono takiej zależności (44, 55). W stopniu umiarkowanym do ciężkiego zaawansowania choroby, stwierdzono jedynie słabą (59, 60), zaś u chorych w trakcie zaostrzenia obserwowano silniejszą korelację (59, 61).

Pomimo słabej zależności między liczbą eozynofiliów we krwi obwodowej a odsetkiem eozynofiliów w drogach oddechowych, liczba eozynofiliów we krwi obwodowej  $\geq 300/\mu\text{l}$ , podobnie jak eozynofilia w drogach oddechowych (45), wiąże się z podwyższonym ryzykiem zaostrzeń (62-64). Jednak liczba eozynofiliów we krwi obwodowej nie wpływa na ciężkość zaostrzenia u chorych hospitalizowanych (65), a chorzy z utrzymującą się wyższą liczbą eozynofiliów we krwi obwodowej mają lepsze rokowanie niż ci bez (66, 67). Jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska jest dobra odpowiedź na wGKS u tych chorych, co pokazały wyniki kilku badań klinicznych (68-71).

#### 4.3.4. Podłoże molekularne funkcji eozynofiliów w chorobach obturacyjnych

Wykazano, że eozynofile we krwi obwodowej u chorych na astmę w porównaniu do osób zdrowych mają odmienny profil ekspresji genów, podczas gdy u chorych na astmę i inne choroby przebiegające z eozynofilią obwodową profil ekspresji genów był podobny (72). Jednak nie wszystkie badania potwierdziły tę obserwację. W ocenie profilu transkrypcyjnego leukocytów krwi obwodowej u chorych z eozynofilową POChP i eozynofilową astmą, przeprowadzonej przez Yun i wsp. nie stwierdzono różnic w profilu ekspresyjnym leukocytów, zaś ekspresja genów specyficznych dla eozynofiliów była na podobnym poziomie (73). Z kolei u chorych na eozynofilową POChP stwierdzono podwyższoną ekspresję genów białek związanych z odpowiedzią Th2-zależną: CLCA1, CCL26, IL-13 oraz CST1 w materiale z biopsji szczoteczkowej oskrzeli i próbkach płwociny (74). W innym badaniu wykazano wyraźne różnice w ekspresji genów w materiale z biopsji szczoteczkowej pomiędzy chorymi na astmę eozynofilową i eozynofilową POChP (75). Co ciekawe, niektóre geny, których zwiększona ekspresja została wykazana w astmie, nie były związane z eozynofilowym zapaleniem w POChP, tj. periostina i SERPINB2 (74).

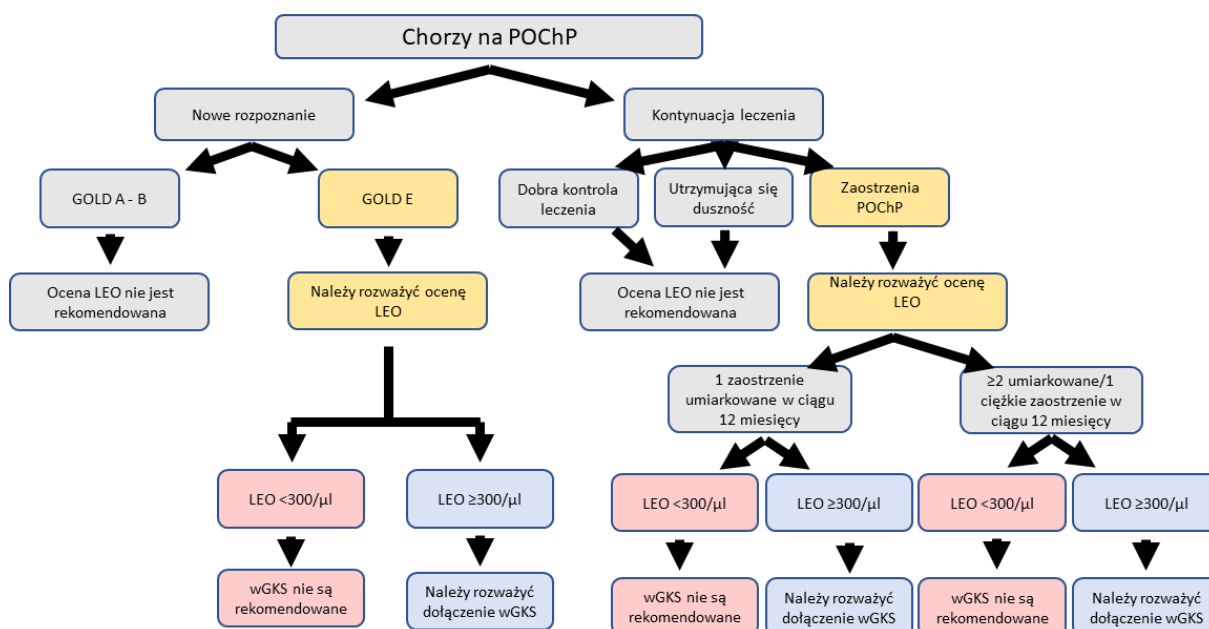
### 4.4. Eozynofilia obwodowa jako cel terapeutyczny w POChP

#### 4.4.1. Glikokortykosteroidy wziewne w leczeniu POChP

Podstawą leczenia POChP są leki rozszerzające oskrzela z grupy  $\beta$ -mimetyków i cholinolityków. Wskazaniem do zastosowania wGKS jako elementu terapii trójskładnikowej na początku leczenia jest liczba eozynofiliów we krwi obwodowej  $\geq 300/\mu\text{l}$  u chorych z wywiadami co najmniej 2 umiarkowanych lub 1 ciężkiego zaostrzenia w ciągu 12 miesięcy (kategoria E POChP) (76). Natomiast u chorych leczonych dotychczas jedynie lekami



bronchodylatacyjnymi, a u których występują zaostrzenia należy uwzględnić liczbę eozynofiliów w morfologii krwi obwodowej. Chorzy z 1 zaostrzeniem i liczbą eozynofiliów we krwi obwodowej  $\geq 300/\mu\text{l}$  oraz chorzy z co najmniej 2 zaostrzeniami i liczbą eozynofiliów we krwi obwodowej  $\geq 100/\mu\text{l}$  powinni być rozważeni pod kątem dołączenia wGKS do terapii. Należy podkreślić, że obecnie zastosowanie wGKS w monoterapii lub jedynie w połączeniu z długodziałającym beta-mimetykiem (LABA, ang. *long-acting beta-agonist*) nie jest rekomendowane w POChP. Na rycinie 2 przedstawiono schemat podsumowujący zastosowanie liczby eozynofiliów we krwi obwodowej w podejmowaniu decyzji terapeutycznych u chorych na POChP.



Rycina 2. Schemat przedstawia zastosowanie informacji na temat liczby eozynofiliów we krwi obwodowej w podejmowaniu decyzji terapeutycznych u chorych na POChP. Zaadaptowano z publikacji Mycroft i wsp. „*Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications*”. LEO – liczba eozynofiliów we krwi obwodowej.

Podstawą wydania takich rekomendacji były wyniki kilku badań klinicznych, w których oceniano wpływ wGKS na redukcję liczby zaostrzeń w zależności od liczby eozynofiliów we krwi obwodowej (69, 70, 77, 78). Dostrzeżenie roli eozynofiliów w patofizjologii POChP doprowadziło do postawienia hipotezy, że wGKS mogą być skuteczne

w hamowaniu zapalenia dróg oddechowych u chorych na POChP. W związku z tym przeprowadzono kilka analiz post hoc wcześniejszych badań dotyczących skuteczności wGKS u chorych na POChP (70, 71, 79, 80). W badaniach tych oceniano skuteczność terapii wGKS w skojarzeniu z LABA w porównaniu z wGKS w monoterapii, LABA, długodziałającym cholinolitykiem (LAMA, ang. *long-acting muscarinic antagonist*) lub placebo. Punktami końcowymi były częstość zaostrzeń oraz poprawa FEV<sub>1</sub> i jakości życia mierzonej za pomocą kwestionariusza Szpitala św. Jerzego (SGRQ, ang. *Saint George's Respiratory Questionnaire*) lub kwestionariusza klinicznego POChP (ang. *Clinical COPD Questionnaire*).

W badaniu Pascoe i wsp. wykazano, że tylko u pacjentów z wyjściową liczbą eozynofilów większą lub równą 2% leczenie wGKS/LABA prowadziło do istotnego zmniejszenia rocznej częstości zaostrzeń w porównaniu do stosowania LABA w monoterapii (70). Ten efekt był jeszcze bardziej widoczny w grupach z liczbą eozynofilów we krwi większą lub równą 4% i większą lub równą 6% (70). W analizie post hoc badania FORWARD stwierdzono redukcję częstości zaostrzeń u pacjentów z liczbą eozynofilów we krwi  $\geq 181,6/\mu\text{l}$  (71). Inne analizy potwierdziły, że korzystny wpływ terapii łączonej wGKS/LABA w porównaniu z LABA zwiększa się wraz ze wzrostem liczby eozynofilów we krwi obwodowej (69, 81).

W kolejnych latach oceniano skuteczność tzw. terapii potrójnej (połączenie wGKS/LABA/LAMA) jako potencjalnej metody leczenia pacjentów z ciężką objawową POChP z wysokim ryzykiem zaostrzeń pomimo terapii LAMA/LABA lub wGKS/LABA (68, 77, 78, 82). Spośród badań IMPACT, TRIBUTE i KRONOS jedynie dwa ostatnie wykluczały pacjentów ze współistnieniem astmy. W badaniu IMPACT zaobserwowano zmniejszenie częstości zaostrzeń w grupie otrzymującej terapię potrójną w porównaniu do grupy leczonej LAMA/LABA, niezależnie od poziomu eozynofilów we krwi obwodowej (77). Z kolei w badaniu TRIBUTE wykazano zmniejszenie częstości zaostrzeń w grupie leczonej terapią potrójną tylko u pacjentów z odsetkiem eozynofilów  $\geq 2\%$ , podczas gdy u chorych z liczbą eozynofilów  $\geq 200/\mu\text{l}$  różnica była nieistotna (78). Częstość zaostrzeń była drugorzędowym punktem końcowym badania KRONOS, do którego włączano objawowych chorych na POChP (68). W badaniu tym wykazano, że pacjenci z liczbą eozynofilów we krwi

obwodowej  $\geq 75/\mu\text{l}$  leczenia terapią potrójną mieli mniej zaostrzeń niż pacjenci leczenia LAMA/LABA.

Wziewne GKS jako leki przeciwzapalne mogą hamować eozynofilowe zapalenie dróg oddechowych u chorych na POChP (32). Mechanizmy odpowiedzialne za wrażliwość na wGKS w POChP badano w kilku badaniach *ex vivo* na komórkach, głównie makrofagach (83-86). W zbiorczej analizie tych badań wykazano wybiórczą wrażliwość wybranych mediatorów prozapalnych na glikokortykosteroidy (87). TNF- $\alpha$  i IL-6 były silniej hamowane niż IL-8 zarówno u chorych na POChP, osób palących bez POChP, jak i osób zdrowych. Natomiast nie wykazano różnic w hamowaniu powyższych mediatorów między grupami. Co ciekawe, stwierdzono dużą rozbieżność w odpowiedzi makrofagów na GKS wśród chorych na POChP, co może odzwierciedlać kliniczne różnice w odpowiedzi na leczenie wGKS. Ustalenie, które ze szlaków ulegają zahamowaniu pod wpływem leczenia wGKS u chorych na POChP, może być kluczowe w wyborze kolejnych celów terapeutycznych. Niestety powyższe badania nie koncentrowały się na roli eozynofiliów, a jedynie makrofagów w odpowiedzi na steroidy wziewne u chorych na POChP. Brak jest również badań porównujących odpowiedź makrofagów u chorych na POChP z uwzględnieniem poziomu eozynofiliów we krwi obwodowej.

Glikokortykosteroidy wykazują działanie przeciwzapalne, poprzez hamowanie kaskad związanych z kinazami aktywowanymi mitogenami (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinases*) (88). MAPK uczestniczą w wielu procesach w komórkach, m.in. proliferacji, różnicowaniu czy apoptozie. Do kinaz grupy MAPK należą EKR1/2 (ang. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*), c-Jun N-terminal kinase (JNK) czy p38 MAPK. Glikokortykosteroidy indukują zwiększenie ekspresji DUSP1, co z kolei hamuje aktywację p38 MAPK i JNK (88). Z drugiej strony, zmniejszenie ekspresji DUSP1 prowadzi do nadmiernego uwolnienia cytokin prozapalnych, np. TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL3 i CCL4 (88). Zaburzenia w obrębie kaskad związanych z MAPK mogą wiązać się z upośledzeniem odpowiedzi na glikokortykosteroidy. W badaniach dotyczących patomechanizmów astmy ciężkiej wykazano, że kaskady sygnalizacyjne MAPK uczestniczą w rozwoju oporności na glikokortykosteroidy poprzez zwiększenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego c-Jun (89). Niewykluczone, że dysregulacja MAPK może występować również u chorych na POChP, co by tłumaczyło gorszą odpowiedź na wGKS niż u chorych na astmę.

#### 4.4.2. Leki biologiczne w leczeniu POChP

Pomimo stosowania terapii trójskładnikowej, u części chorych na POChP utrzymują się zaostrzenia (77, 78, 90), co może wynikać z niedostatecznego hamowania szlaków immunologicznych biorących udział w patogenezie POChP (91). W badaniach klinicznych u chorych na POChP oceniano leki wpływające na IL-5 (mepolizumab) lub receptor dla IL-5 (IL-5R, benralizumab), szlak związany z IL-4 i IL-13 (dupilumab), czy na alarminy: IL-33 (itepekimab, tozorakimab, astegolimab) oraz TSLP (tezepelumab).

Badania oceniające wpływ leków anti-IL-5 i anti-IL-5R przyniosły niejednoznaczne rezultaty (92, 93). W jednej z analiz oceniających wyniki dwóch badań, METREX i METREO celem była ocena skuteczności mepolizumabu jako leczenia uzupełniającego do terapii potrójnej u pacjentów z eozynofilową POChP z zaostrzeniami w wywiadzie (92). Eozynofilię obwodową definiowano jako  $\geq 150$  eozynofilów/ $\mu\text{l}$  przy włączeniu do badania lub  $\geq 300$  komórek/ $\mu\text{l}$  w roku poprzedzającym włączenie do badania. Uczestnicy badania zostali losowo przydzieleni do grupy otrzymującej 100 mg mepolizumabu albo placebo w badaniu METREX, a w badaniu METREO 100 mg lub 300 mg mepolizumabu albo placebo. Pierwszorzędowy punkt końcowy, czyli zmniejszenie częstości zaostrzeń, osiągnięto jedynie w badaniu METREX (roczny współczynnik zaostrzeń wyniósł 1,40 w grupie otrzymującej mepolizumab i 1,71 w grupie placebo; współczynnik częstości (RR, ang. *rate ratio*) 0,82; 95% przedział ufności 0,68 do 0,98; skorygowane  $p = 0,04$ ). W badaniu METREO nie stwierdzono istotnego zmniejszenia częstości zaostrzeń (roczna częstość zaostrzeń wyniosła 1,19 w grupie mepolizumabu w dawce 100 mg, 1,27 w grupie otrzymującej mepolizumab w dawce 300 mg i w grupie placebo – 1,49 rocznie).

W badaniach GALATHEA i TERRANOVA benralizumab lub placebo podawano chorym na POChP z wartością  $\text{FEV}_1$  po leku rozszerzającym oskrzela między 20 a 65% wartości należnej i co najmniej 2 umiarkowanymi lub 1 ciężkim zaostrzeniem w wywiadzie, którzy otrzymywali wziewną terapię podwójną lub potrójną wziewną (93). W zbiorczej analizie post-hoc dla dawek 30 mg i 100 mg nie wykazano skuteczności benralizumabu w zmniejszaniu rocznej częstości zaostrzeń u pacjentów z podwyższoną liczbą eozynofilów ( $\geq 220/\mu\text{l}$ ). Jednakże dalsza analiza pozwoliła zidentyfikować podgrupy, które mogłyby odnieść korzyść z leczenia benralizumabem. Zaobserwowano, że u pacjentów z podwyższoną liczbą eozynofilów  $\geq 220/\mu\text{l}$ , którzy spełniali co najmniej jeden z warunków: 1. co najmniej 3 zaostrzenia w poprzednim roku, 2.  $\text{FEV}_1$  po leku rozszerzającym oskrzela  $< 40\%$  wartości

należnych lub 3. poprawa w zakresie FEV<sub>1</sub> po leku rozszerzającym oskrzela o  $\geq 15\%$ , benralizumab w dawce 100 mg znacząco zmniejszył częstość zaostrzeń w porównaniu z placebo. Natomiast niższa dawka benralizumabu (30 mg) nie wykazała takiego efektu leczenia.

Bardziej optymistyczne dane dotyczą zastosowania dupilumabu u chorych na POChP, które zaobserwowano w badaniach BOREAS i NOTUS (94, 95). Dupilumab jest ludzkim przeciwciałem monoklonalnym, które blokuje wspólny receptor dla IL-4 i IL-13, tym samym hamując szlak Th-2 zależny (96). Do badań włączono pacjentów z POChP i umiarkowanymi lub ciężkimi zaostrzeniami pomimo terapii wziewnej oraz udowodnionym zapaleniem typu 2 definiowanym jako eozynofilia obwodowa  $\geq 300/\mu\text{l}$ . Z badania wykluczano chorych ze współistnieniem astmy. W rocznej obserwacji zaobserwowano zmniejszenie częstości zaostrzeń i poprawę w zakresie FEV<sub>1</sub> w grupie stosującej dupilumab w porównaniu z placebo (94, 95), co potwierdza istotną rolę IL-4 i IL-13 w patofizjologii eozynofilowej POChP. Jednym z hipotetycznych mechanizmów działania dupilumabu jest zmniejszenie nadmiernego wydzielania śluzu, prowadzące do poprawy czynności płuc, złagodzenia objawów zapalenia oskrzeli i zmniejszenia częstości zaostrzeń (91).

Podjęmowane są również próby stosowania przeciwciał monoklonalnych przeciw alarminom, mając za cel działanie plejotropowe i hamowanie kaskady zapalenia Th2-zależnego już od poziomu nabłonka oskrzelowego. W badaniu drugiej fazy nad tezepelumabem, będącym przeciwciałem monoklonalnym anty-TSLP, nie stwierdzono istotnego statystycznie zmniejszenia częstości zaostrzeń u chorych na POChP w porównaniu z placebo. Obecnie trwają badania trzeciej fazy nad lekami celowanymi przeciw IL-33 (itepekimab) oraz jej receptorowi ST2 (astegolimab). W badaniach drugiej fazy itepekimab oraz astegolimab nie zmniejszyły częstości zaostrzeń w porównaniu z placebo u chorych na POChP (97, 98). Obiecujące są natomiast wyniki dodatkowych analiz. W analizie podgrup stwierdzono, że itepekimab zmniejszył częstość zaostrzeń i poprawił wartość FEV<sub>1</sub> u byłych palaczy z POChP (97), co w przyszłości może przełożyć się na poprawę skuteczności leczenia u tych chorych.

## 5. Założenia i cel pracy

Eozynofile są komórkami kluczowymi w patogenezie astmy, jednak w ostatnich latach podkreśla się wpływ eozynofiliów na przebieg POChP (55). Szacuje się, że około 30% chorych na POChP ma eozynofilowy typ zapalenia w drogach oddechowych (44). POChP i astma mają inną patogenezę i przebieg kliniczny, ale łączą je niektóre cechy kliniczne i biologiczne. Podwyższona liczba eozynofiliów we krwi obwodowej u chorych na astmę i POChP jest skorelowana z lepszą odpowiedzią na steroidy wziewne (99). Ma to swoje przełożenie na praktykę kliniczną – od kilku lat w międzynarodowych rekomendacjach GOLD wskazuje się na potrzebę dołączenia wGKS do leczenia chorym na POChP z zaostrzeniami w wywiadach i liczbą eozynofiliów we krwi obwodowej  $\geq 100/\mu\text{l}$  albo  $\geq 300/\mu\text{l}$  w zależności od wywiadu zaostrzeń (2). Należy jednak podkreślić, że odpowiedź na wGKS u chorych na POChP jest gorsza niż w astmie (100), a terapie biologiczne celowane przeciw eozynofiliom okazały się mniej skuteczne w POChP (101) w przeciwieństwie do astmy (102).

Jedną z hipotetycznych przyczyn odmiennej odpowiedzi na leczenie przeciwzapalne u chorych na astmę i POChP może być różnica w fenotypie lub aktywności eozynofiliów w obu jednostkach chorobowych. Wcześniejsze badania pozwoliły dobrze poznać rolę eozynofiliów u osób chorych na astmę. W badaniu Barnig i wsp. wykazano, że eozynofile we krwi mają inny profil transkrypcyjny w stanach przebiegających z eozynofilią (np. astmie) niż u osób zdrowych (72). Z kolei Rodrigo-Muñoz i wsp. zaobserwowali różnice w profilu miRNA eozynofiliów we krwi u chorych na astmę i zdrowych ochotników (103). W innych badaniach opisywano różnice ekspresji markerów powierzchniowych eozynofiliów (np. CD11b, CD62L, CD123, CD125, CD193) w drogach oddechowych i we krwi u astmatyków i osób zdrowych (21, 22, 26, 104). Jednak jak do tej pory nie przeprowadzono badania, które charakteryzowałyby eozynofile u chorych na POChP.

Podsumowując, eozynofile odgrywają istotną, ale nadal słabo poznaną rolę w patogenezie POChP. Poznanie różnic w fenotypie i aktywności eozynofiliów we krwi obwodowej oraz w drogach oddechowych mogłoby się przyczynić do lepszego zrozumienia patogenezы eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych chorych na POChP oraz poznania potencjalnych nowych celów terapeutycznych. Z racji na dość dobrze poznaną rolę i charakterystykę eozynofiliów w astmie, założenie pracy obejmuje badanie oceniające fenotyp tych komórek w POChP i jego porównanie z fenotypem eozynofiliów w astmie. Nasza hipoteza badawcza zakłada, że eozynofile w POChP we krwi obwodowej oraz w drogach

oddechowych różnią się od eozynofilów w astmie ekspresją markerów powierzchniowych i profilem transkrypcyjnym.

Uwzględniając powyższe obserwacje zdefiniowano cel główny i cele szczegółowe badań składających się na rozprawę doktorską.

### **5.1. Cel główny:**

1. Ocena fenotypu i profilu transkrypcyjnego eozynofilów u chorych na POChP oraz u chorych na astmę.

### **5.2. Cele szczegółowe:**

2. Przegląd światowej literatury dotyczącej roli eozynofilów w patofizjologii i leczeniu POChP.

3. Porównanie ekspresji CD125, CD193 CD14, CD11b, CD62L, CD66b na powierzchni eozynofilów krwi obwodowej a eozynofilów płwociny indukowanej.

4. Porównanie ekspresji CD125, CD193 CD14, CD11b, CD62L, CD66b na powierzchni eozynofilów krwi obwodowej oraz płwociny indukowanej między chorymi na POChP, astmę oraz grupą kontrolną.

5. Ocena związków między ekspresją CD125 i CD193 na powierzchni eozynofilów a mediatorami szlaku Th2.

6. Porównanie profilu transkrypcyjnego eozynofilów krwi obwodowej między chorymi na POChP a chorymi na astmę.

## Clinical Management Review

**Eosinophils in COPD—Current Concepts and Clinical Implications**Katarzyna Mycroft, MD, Rafal Krenke, MD, PhD, and Katarzyna Górńska, MD, PhD *Warsaw, Poland*

In recent years, heterogeneity in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) inflammatory patterns has been recognized as a basis for more precise treatment interventions because current therapies have limited effectiveness. Eosinophilic airway inflammation in COPD has become a subject of research interest as a potential treatment target for inhaled corticosteroid therapy. However, the role of eosinophils in COPD is still unclear, and it is unknown why only some patients with COPD develop eosinophilic airway inflammation. Induced sputum analysis is the most common method of assessing the type of airway inflammation. Accessibility to sputum induction, however, is limited in clinical practice, and blood eosinophils have been proposed to serve as a surrogate marker and treatment guide. Blood eosinophil count has been shown to poorly predict sputum eosinophilia, and, moreover, it seems to be fairly unstable and affected by various factors. Nevertheless, in several trials, blood eosinophil count appeared to predict good response to inhaled corticosteroids. However, biologics targeting eosinophils do not appear to be effective in COPD. In this review, we briefly summarize the current knowledge on eosinophils in COPD pathogenesis. Then, we discuss the use of blood eosinophil count in COPD in relation to the recent Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease recommendations, their ability to predict sputum eosinophilia, and their potential role in guiding treatment. © 2020 Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (*J Allergy Clin Immunol Pract* 2020;■:■-■)

**Key words:** COPD; inflammation; eosinophil; biomarker

Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

Conflicts of interest: K. Mycroft declares no relevant conflicts of interest. R. Krenke reports fees for lectures and travel expenses from Boehringer Ingelheim, Chiesi, AstraZeneca, and Polpharma, outside the submitted work. K. Górńska reports fees for lectures and travel expenses from Boehringer Ingelheim, Chiesi, AstraZeneca, Polpharma, and Roche, outside the submitted work.

Received for publication October 31, 2019; revised February 3, 2020; accepted for publication March 8, 2020.

Available online ■■

Corresponding author: Katarzyna Górńska, MD, PhD, Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland. E-mail: drkpgorska@gmail.com.  
2213-2198

© 2020 Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology  
<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.03.017>

**INTRODUCTION**

Heterogeneity in inflammatory patterns in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has recently gained considerable attention.<sup>1</sup> The growing interest in identifying the inflammatory patterns is closely related to the concept of treatable traits, that is, the features of the disease that could be a target of a tailored therapeutic intervention.<sup>2</sup> These targets can be similar in different diseases and their identification would allow specific treatment to those patients for whom it would be most beneficial and to avoid it in cases where the benefits would be insignificant and/or the risk of side effects high.

Eosinophilic airway inflammation, a typical feature of asthma, has also been proposed as a treatable trait in some patients with COPD. This inflammatory pattern can be found in patients with COPD either as a result of a coexisting asthma (asthma-COPD overlap) or poorly understood mechanisms that may lead to airway eosinophilia in patients with COPD without any features of asthma. Depending on the diagnostic criteria, asthma-COPD overlap is present in 3.8% (Spanish criteria) to 18.4% (clinician's diagnosis) of patients with obstructive lung diseases (both COPD and asthma),<sup>3</sup> whereas eosinophilic COPD constitutes 32% to 40% of the COPD population.<sup>4-7</sup> Over the past decade, a number of studies have investigated eosinophilic airway inflammation in COPD as a promising target for inhaled corticosteroid (ICS) therapy. It has been documented that in patients with COPD, ICS titration to normalize sputum eosinophil count resulted in a reduction of a severe exacerbation rate.<sup>8</sup> However, sputum analysis is not widely available and requires specific technical expertise. Therefore, blood eosinophil count has been extensively evaluated as a surrogate marker of eosinophilic airway inflammation because it is easily accessible. This review presents current concepts on eosinophilic COPD and the potential of blood eosinophils to serve as a biomarker and predictor of a favorable response to therapeutic intervention.

**EOSINOPHILIC AIRWAY INFLAMMATION IN COPD  
Eosinophil correlations between different respiratory samples**

Airway inflammation can be defined on the basis of evaluation of various airway samples, for example, induced sputum (IS), bronchial mucosa biopsy, or bronchoalveolar lavage fluid (BALF).<sup>9,10</sup> The eosinophil count and percentage vary among different respiratory compartments,<sup>11</sup> and therefore, different thresholds for elevated sputum levels have been established for each type of sample. Sputum eosinophilia is usually defined as 3% or more eosinophils of all nonepithelial sputum cells,<sup>12</sup> whereas the increased eosinophil percentage in the BALF is defined as more than 1%.<sup>13</sup>

The relationship between eosinophil counts in different compartments is poor. A study by Hartjes et al demonstrated a weak correlation between the eosinophil counts in the IS and bronchial biopsy.<sup>14</sup> This correlation could be related to the fact that IS and



**Abbreviations used**

BALF- Bronchoalveolar lavage fluid  
 COPD- Chronic obstructive pulmonary disease  
 GOLD- Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease  
 ICS- Inhaled corticosteroid  
 IS- Induced sputum  
 LABA- Long-acting  $\beta_2$ -agonist  
 LAMA- long-acting muscarinic antagonist  
 MMP-12- Matrix-metalloproteinase-12  
 SGRQ- St George's Respiratory Questionnaire

bronchial biopsy represent adjacent compartments. In turn, the eosinophil counts in BALF and bronchial biopsies do not seem to correlate.<sup>10,11,14</sup> Because the acquisition of IS, BALF, and bronchial biopsy requires expertise and is contraindicated in patients with a severe or unstable disease, peripheral blood sampling and assessment of blood eosinophil counts became a subject of considerable interest.

**Phenotypes of pulmonary eosinophils**

Heterogeneity of eosinophils in humans has been described as early as in the 1980s.<sup>15,16</sup> Two types of eosinophils were reported: normodense and hypodense. Hypodense eosinophils were found in increased numbers in blood in hypereosinophilic diseases. It was hypothesized that they derived from immature cells released from the bone marrow, presented a greater cytotoxic activity, and were metabolically more active compared with normodense eosinophils. However, the role of these 2 eosinophil types in eosinophilic COPD has not yet been established.<sup>15,16</sup> More recently, Mesnil et al<sup>17</sup> in a murine model of allergic inflammation characterized 2 distinct types of eosinophils in the lungs. Eosinophils located in the lung parenchyma, referred to as residual eosinophils, had a ring-shaped nucleus, were independent from IL-5, and manifested L-selectin expression. It has been suggested that residual eosinophils could be involved in maintaining immune homeostasis in the lungs by hindering  $T_H2$ -related responses. In contrast, eosinophils found in the peribronchial area and in BALF (inflammatory eosinophils) had a segmented nucleus, were IL-5-dependent and L-selectin negative, and had a high surface expression of CD101. It is possible that inflammatory eosinophils observed by Mesnil et al and activated hypodense eosinophils could represent the same eosinophil phenotype that is involved in inflammatory response. Mesnil et al also described differences in the eosinophil characteristics between residual eosinophils in lung parenchyma from those without asthma and inflammatory eosinophils found in the sputum of patients with asthma. The differences were similar to those found in the murine model.<sup>17</sup> However, it must be specified that the human material used to assess the eosinophils in the lung parenchyma was taken from the healthy margins of lung carcinoma of those without asthma<sup>17</sup> and, therefore, does not fully represent the molecular environment in healthy lungs.

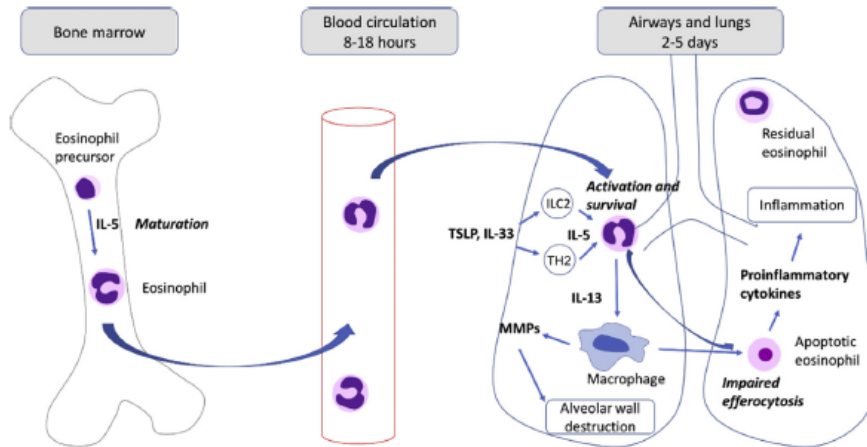
**Biological mechanisms involved in eosinophilic airway inflammation in COPD**

Eosinophilic airway inflammation is less common and less pronounced in patients with COPD than in patients with

asthma,<sup>4,5,18</sup> and its mechanism is still not well understood. It was reported that impaired function of macrophages to clear apoptotic eosinophils in COPD led to the release of intracellular proinflammatory cytokines and was associated with an increased severity and frequency of exacerbations.<sup>19</sup> Thymic stromal lymphopoietin and IL-33, secreted by epithelial cells, are involved in recruitment and activation of  $T_H2$  and type 2 innate lymphoid cells (Figure 1).<sup>22</sup> It was demonstrated that both patients with COPD and patients with asthma have an increased expression of IL-33 in bronchial mucosa compared with control subjects.<sup>18</sup> Moreover, higher IL-33 concentrations in sputum or blood were found in patients with COPD with sputum eosinophilia.<sup>23</sup>  $T_H2$  cells, together with type 2 innate lymphoid cells, produce numerous  $T_H2$  cytokines, particularly IL-4, IL-5, and IL-13. IL-5 stimulates recruitment and activation of eosinophils and leads to tissue eosinophilia. In a murine model, IL-33 was shown to induce IL-13 expression in airway eosinophils.<sup>24</sup> In turn, eosinophil-derived IL-13 was found to stimulate alveolar macrophages to produce matrix-metalloproteinase-12 (MMP-12).<sup>25,26</sup> Matrix-metalloproteinases are proteases that cause destruction of the alveolar septa and in consequence lead to emphysema.<sup>25</sup> A higher level of sputum MMP-12 was found in patients with eosinophilic COPD with coexisting emphysema compared with patients with noneosinophilic COPD without emphysema.<sup>25</sup> Taking into account the fact that both patients with COPD and patients with asthma have increased sputum MMP-12 levels and that the relationship between sputum MMP-12 level and the extent of emphysema was found only in patients with COPD,<sup>27</sup> it is likely that MMP-12 could act differently in both diseases.

**Clinical characteristics of patients with COPD with eosinophilic airway inflammation**

There are limited data on the potential differences in clinical characteristics of patients with COPD with eosinophilic and neutrophilic airway inflammation. Studies that characterized patients with high and low sputum eosinophil counts yielded conflicting results. Some authors reported higher postbronchodilator FEV<sub>1</sub> in noneosinophilic patients compared with patients with higher sputum eosinophils.<sup>5,28</sup> In contrast, in other studies there were no differences in the severity of airway obstruction between eosinophilic and non-eosinophilic patients.<sup>7,29</sup> However, Chou et al<sup>29</sup> found significantly higher sputum eosinophil percentages in patients with very positive bronchodilator reversibility (defined as FEV<sub>1</sub> increase >15% and >400 mL) (median, 6.11%) than in patients without very positive bronchodilator reversibility (median, 1.02%).<sup>29</sup> In contrast, differences in sputum eosinophil levels in relation to the presence of positive bronchodilator reversibility (FEV<sub>1</sub> increase >12% and >200 mL) were not found.<sup>29,30</sup> In a different study, in both patients with COPD and patients with asthma, the postbronchodilator change was lower with the increasing sputum eosinophil count.<sup>31</sup> In contrast to asthma,<sup>32</sup> the relationship between bronchial hyperresponsiveness and eosinophils in COPD is still equivocal.<sup>31,35</sup> However, a comprehensive discussion of this topic is beyond the scope of this review.



**FIGURE 1.** Eosinophil life cycle in the bone marrow, blood, airways, and lungs. Eosinophil maturation in the bone marrow is mediated by IL-3, IL-5, and GM-CSF. Then, mature eosinophils enter the blood circulation on the way to tissues. There is a significant difference between the duration of eosinophil stay in the circulation, which lasts between 8 and 18 hours, and their survival time in tissues, which may be up to several days.<sup>20</sup> Survival of eosinophils in the tissues can be enhanced by various cytokines (eg, IL-3 and IL-5), and this effect is mediated by NF- $\kappa$ B–induced upregulation of Bcl-xL.<sup>21</sup> It is worth noting that the number of eosinophils in the tissues is about 100-fold greater than in the blood, and blood circulation serves merely as a track from the bone marrow to the tissues.<sup>20</sup> Therefore, it is rather questionable whether blood eosinophil counts have the power to predict airway eosinophil levels. ILC2, Type 2 innate lymphoid cell; MMPs, matrix-metalloproteinases; TSLP, thymic stromal lymphopoietin.

## PERIPHERAL BLOOD EOSINOPHILS IN COPD

### Current Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease recommendations on the role of blood eosinophils in the treatment of COPD

The latest Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD) 2020 report recommends using blood eosinophil counts to guide treatment in patients with COPD, for both new diagnoses classified as GOLD D and for those who exacerbate despite bronchodilation (Figure 2).<sup>34</sup> It has been proposed that in patients with COPD GOLD D starting therapy, a cutoff of greater than or equal to 300 cells/ $\mu$ L should identify those who may benefit from ICS/long-acting  $\beta_2$ -agonist (LABA) combination. In patients in whom treatment with bronchodilators is not adequate to prevent exacerbations, an addition of ICSs should be considered depending on the number of exacerbations and the eosinophil count. Among patients with only 1 exacerbation per year, those with eosinophils greater than or equal to 300 cells/ $\mu$ L have the greatest likelihood to benefit from a treatment regimen that includes ICSs. In turn, when there are at least 2 moderate or 1 severe exacerbations per year observed, a cutoff of greater than or equal to 100 cells/ $\mu$ L may indicate a benefit from ICS treatment. A cutoff of less than 100 cells/ $\mu$ L however could select patients who are less likely to benefit from ICSs and therefore should have their treatment modified, for example, by considering roflumilast or azithromycin as an add-on therapy. Importantly, the cutoff of 100 cells/ $\mu$ L lies within the normal range for both general COPD population<sup>7,35,36</sup> and frequent exacerbators.<sup>37</sup> That means that according to GOLD 2020 recommendations, ICS treatment should be considered for most patients with exacerbations. In turn, this could lead to prescription of ICSs for patients who

might not profit from this treatment. The prevalence of frequent exacerbations in patients with blood eosinophil count greater than or equal to 100 cells/ $\mu$ L is unknown, but it is estimated that approximately 10% of patients with COPD with eosinophilia greater than or equal to 300 cells/ $\mu$ L have at least 2 exacerbations.<sup>37</sup>

### Prevalence and stability of elevated blood eosinophil count in COPD

The prevalence of high peripheral eosinophil levels in patients with COPD varies across the studies because of, for example, different thresholds (Table 1) or different inclusion criteria. Importantly, peripheral eosinophilia could be present in other nonpulmonary disorders, for instance, in helminth infections and in various allergic diseases.<sup>45</sup> It seems however that peripheral eosinophilia in COPD has a similar prevalence to that in the general population. For comparison, 24% and 65.5% of subjects older than 40 years with normal lung function had eosinophil levels greater than or equal to 300 cells/ $\mu$ L and greater than 2%, respectively.<sup>46</sup> These data may suggest that there is no increased eosinophil recruitment to the blood circulation in COPD.

If blood eosinophil counts are to be used as a guide for ICS therapy in COPD, the stability of blood eosinophil counts seems to be an important issue. It has been shown that blood eosinophil counts in asthma are variable over time.<sup>47</sup> In COPD, unstable eosinophilia was reported in as many as 40.5% (threshold  $\geq 300$  cells/ $\mu$ L)<sup>48</sup> to 49% (threshold  $\geq 2\%$ )<sup>49</sup> of patients. Consequently, a smaller proportion of patients remains with persistently elevated or lower eosinophil counts. Over a 4-year observation, 19% of patients with COPD with eosinophils less than or equal to 2% and only 4% of patients with eosinophils

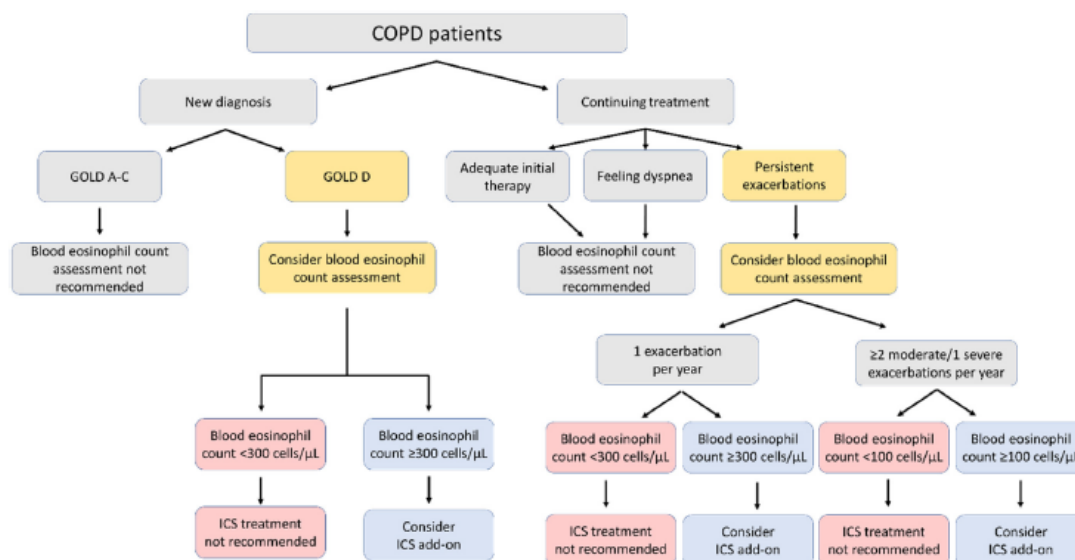


FIGURE 2. Current COPD GOLD recommendations on the blood eosinophil count assessment to guide treatment with ICSs.

TABLE I. Prevalence of high blood eosinophil counts for different thresholds in patients with COPD

	Threshold for high blood eosinophil count			
	150 cells/ $\mu$ L	300 cells/ $\mu$ L	2%	3%
Prevalence	52% <sup>38</sup>	22% <sup>40</sup>	32% <sup>43</sup>	37% <sup>40</sup>
	57% <sup>39</sup>	24% <sup>42</sup>	57% <sup>44</sup>	45% <sup>42</sup>
	61% <sup>40</sup>		61% <sup>40,44</sup>	
	67% <sup>41</sup>		66% <sup>41</sup>	
			68% <sup>4</sup>	
			74% <sup>42</sup>	
			75% <sup>44</sup>	

\*Persistent eosinophilia after prednisone.

greater than 2% stayed in their respective groups.<sup>50</sup> The stability of blood eosinophil levels in subsequent measurements appears to be better in patients with COPD with lower than with higher eosinophil counts<sup>48,51-53</sup> and it was shown to be affected by systemic corticosteroids and antibiotics, older age, and male sex but the impact of ICS use or smoking status was negligible.<sup>40,41,52-54</sup>

#### Can blood eosinophils predict sputum eosinophilia?

Blood eosinophil counts have been extensively investigated as a surrogate marker for eosinophilic airway inflammation. A positive correlation between sputum and peripheral eosinophils in asthma has been documented in several studies.<sup>43,44,55-59</sup> In COPD, however, the existing data on that correlation are equivocal. This might be partly explained by technical issues, for example, differences in sputum acquisition and analysis in multicenter studies or different inclusion criteria. Positive findings have been shown in several studies.<sup>6,28</sup> However, it must be noted that they included patients with coexisting asthma<sup>6,28</sup> or patients classified as GOLD 0, that is, patients having respiratory

symptoms but normal spirometry.<sup>28</sup> In studies that included patients with pure COPD, the presence and strength of correlation seem additionally dependent on the severity of the disease. In stable mild to moderate COPD, no such correlation was observed.<sup>7,55</sup> Moreover, although in moderate to severe disease a weak correlation was found, peripheral eosinophils could not predict sputum eosinophilia.<sup>14,35</sup> In contrast, during COPD exacerbations stronger correlations between sputum and blood eosinophil counts were reported and blood eosinophils were able to reliably predict sputum eosinophilia.<sup>35,58</sup> Despite these rather poor correlations in stable COPD, blood eosinophil counts have been proposed as a marker to guide ICS treatment.

#### WHAT IS THE EVIDENCE THAT BLOOD EOSINOPHILIA IN COPD CAN PREDICT GOOD RESPONSE TO ICS TREATMENT?

The first data on the relationship between blood eosinophil counts and the efficacy of ICS therapy in COPD came from post hoc and retrospective analyses.<sup>41,44,45,59</sup> Those studies compared the effectiveness of ICS therapy combined with LABA to ICS, LABA, or long-acting muscarinic antagonists (LAMAs) alone or placebo. The end points were exacerbation rate and improvement in FEV<sub>1</sub> and quality of life measured by the St George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) or Clinical COPD Questionnaire scores. Recently, the so-called triple therapy (ICS/LAMA/LABA combination) came into the spotlight as a potential treatment in patients with severe symptomatic COPD who are at increased risk of exacerbation despite the LAMA/LABA or LABA/ICS therapies. However, in most of the studies on the relationship between the effectiveness of triple therapy and blood eosinophil count published to date, the observation period does not exceed 1 year.<sup>38,60-62</sup> Differences in study designs, thresholds defining blood eosinophilia, and drugs used in the interventions, and the fact that most analyses were supported

**TABLE II. Efficacy of ICSs in reducing exacerbations in patients with COPD with higher and lower eosinophil levels**

Threshold for high blood eosinophil count	Efficacy of ICSs in reducing exacerbation rates	
	Elevated blood eosinophil count*	Lower blood eosinophil count†
150 cells/ $\mu$ L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduction of moderate to severe exacerbation rate with ICS/LABA vs LABA<sup>41</sup></li> <li>• No difference in exacerbation rate with LAMA/LABA vs ICS/LABA<sup>40</sup></li> <li>• LAMA/LABA more effective in prolonging the time to the first moderate to severe exacerbation compared with</li> <li>ICS/LABA (in the 150-300 cells/<math>\mu</math>L group)<sup>40</sup></li> <li>• Reduction of total moderate to severe exacerbation rates with ICS/LAMA/LABA vs LAMA/LABA or ICS/LABA<sup>62</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No reduction in moderate to severe exacerbation rate with ICS/LABA vs LABA<sup>41</sup></li> <li>• Greater reduction and effectiveness in prolonging the time to the first moderate to severe exacerbation with LAMA/LABA vs ICS/LABA<sup>40</sup></li> <li>• Reduction of total moderate to severe exacerbation rates with ICS/LAMA/LABA vs LAMA/LABA or ICS/LABA<sup>62</sup></li> </ul>
300 cells/ $\mu$ L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No difference in exacerbation rate with LAMA/LABA vs ICS/LABA groups<sup>40</sup></li> <li>• No difference in exacerbation rate with LAMA/LABA vs ICS/LABA<sup>40</sup></li> <li>• Increased moderate to severe exacerbation rate after ICS withdrawal<sup>61,66</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICS withdrawal has no impact on moderate to severe exacerbation rate<sup>57,67</sup></li> </ul>
2%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduction in moderate to severe exacerbation rate with ICS/LABA vs LAMA<sup>44</sup></li> <li>• LAMA/LABA therapy was more effective in reducing and prolonging the time to the first moderate to severe exacerbation compared with ICS/LABA<sup>40</sup></li> <li>• Reduction of moderate to severe exacerbation rate in ICS/LAMA/LABA vs LAMA/LABA groups<sup>60</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No reduction in moderate to severe exacerbation rate with ICS/LABA vs LAMA<sup>44</sup></li> <li>• LAMA/LABA therapy was more effective in reducing and prolonging the time to the first moderate to severe exacerbation compared with ICS/LABA<sup>40</sup></li> <li>• No reduction in moderate to severe exacerbation rate in ICS/LAMA/LABA vs LAMA/LABA groups<sup>60</sup></li> </ul>
3%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No difference in exacerbation rate and time to first exacerbation with LAMA/LABA vs ICS/LABA<sup>40</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Greater reduction in moderate to severe exacerbation rate in groups with LAMA/LABA vs ICS/LABA<sup>40</sup></li> <li>• LAMA/LABA more effective in prolonging the time to the first moderate to severe exacerbation compared with ICS/LABA<sup>40</sup></li> </ul>

\*At the level or above the threshold indicated in the first column.

†Below the threshold indicated in the first column.

by pharmaceutical companies make the interpretation of data challenging.

### The relationship between blood eosinophil count and effect of ICSs on moderate to severe COPD exacerbations

Three prospective studies have shown that patients with COPD with increased baseline blood eosinophil levels ( $\geq 300$  cells/ $\mu\text{L}$ ) were at a greater risk of disease exacerbations.<sup>42,50,63</sup> However, the baseline eosinophil count does not seem to impact exacerbation severity in hospitalized patients.<sup>64</sup> Surprisingly, patients with persistent peripheral eosinophilia seem to have a better survival rate in comparison to persistently non-eosinophilic patients.<sup>48,65</sup> The plausible explanation for a better prognosis in eosinophilic patients is that those patients benefit from ICSs that reduce the exacerbation rate.<sup>38,39,41,59</sup> Table II presents thresholds for elevated peripheral eosinophil counts that were used in several clinical trials and their ability to identify patients who could benefit from ICSs.

Recognition of eosinophilic inflammatory pattern in patients with COPD has led to the hypothesis that ICSs could be effective in suppressing airway inflammation in patients with COPD with peripheral eosinophilia. Consequently, several post hoc analyses of earlier studies on ICS efficacy in patients with COPD were performed. Pascoe et al<sup>41</sup> showed that only patients with baseline eosinophil count greater than or equal to 2% had a significant reduction in their annual moderate to severe exacerbation rate when treated with ICS/LABA versus LABA monotherapy. The effect was even more pronounced in the groups with blood eosinophils greater than or equal to 4% and greater than or equal to 6%. In a post hoc analysis of the FORWARD study by Siddiqui et al,<sup>59</sup> an increasingly greater reduction in the exacerbation rate was found in patients with higher blood eosinophil count classified into quartiles. The reduction was significant ( $P < .05$ ) in patients in the third and fourth quartiles (eosinophil count, 181.6–279.8 and  $>279.8/\mu\text{L}$ , respectively).<sup>59</sup> The more recent analyses have confirmed that the beneficial effect of ICS/LABA compared with LABA increases with higher eosinophil counts.<sup>39,67</sup>

Interestingly, the beneficial effect of ICSs on the exacerbation rate does not seem to be present in patients who remained eosinophilic after the course of oral prednisone.<sup>43</sup> During a 3-year observation, ICSs were shown to be ineffective in reducing moderate to severe exacerbations in patients with severe COPD and a relatively high eosinophil count ( $\geq 2\%$ ) after a 2-week oral prednisone treatment. In contrast, a significant reduction compared with placebo was observed when ICSs were applied to patients with lower eosinophil percentage ( $<2\%$ ). That could suggest that ICSs might be mainly effective in susceptible patients, in whom the eosinophil count decreased after the oral corticosteroids.

Only a few trials assessed the effect of ICSs added to LAMA/LABA on exacerbation rate in patients with COPD: Informing the Pathway of COPD Treatment (IMPACT, which did not exclude patients with a history of asthma),<sup>62</sup> TRIBUTE,<sup>60</sup> and KRONOS<sup>38</sup> (the latter 2 excluded patients with asthma). In the IMPACT study, the reduction in the exacerbation rate compared with that found in patients treated with LAMA/LABA was greater in the triple therapy group regardless of the eosinophil level.<sup>62</sup> The TRIBUTE trial, however, which enrolled patients with more severe COPD compared with the IMPACT study,

showed the reduction in moderate to severe exacerbation rate only in patients with blood eosinophils greater than or equal to 2%, whereas in patients with eosinophils greater than or equal to 200 cells/ $\mu\text{L}$  or those with lower eosinophil count ( $<2\%$  or  $<200$  cells/ $\mu\text{L}$ ) the difference was insignificant.<sup>60</sup> The moderate to severe exacerbation rate was a secondary outcome of another triple therapy trial—KRONOS.<sup>38</sup> Although the study included symptomatic patients with a low exacerbation rate in the preceding year (88% had  $\leq 1$  exacerbation), it showed that patients with blood eosinophils greater than 75 cells/ $\mu\text{L}$  treated with ICS/LAMA/LABA had lower exacerbation rates compared with those treated with LAMA/LABA.<sup>38</sup> Two different meta-analyses assessed the efficacy of triple therapy versus ICS/LABA<sup>68</sup> and single (LAMA or LABA) or dual (LAMA/LABA) bronchodilation.<sup>69</sup> Calzetta et al<sup>68</sup> found that the efficacy of ICS/LAMA/LABA therapy versus ICS/LABA was not affected by baseline eosinophil counts. In contrast, the meta-analysis by Cazzola et al<sup>69</sup> showed that the addition of ICSs to bronchodilators provided benefits in eosinophilic patients. ICSs as anti-inflammatory agents have a potential to suppress airway inflammation<sup>5</sup> and, therefore, might have an additional effect in patients with airway eosinophilia, contrary to LAMAs.

Importantly, it has been demonstrated that ICS withdrawal in patients with COPD with blood eosinophils greater than or equal to 300 cells/ $\mu\text{L}$  was associated with a higher exacerbation risk.<sup>61,66</sup> This was particularly pronounced in patients with a history of at least 2 exacerbations per year.<sup>70</sup> However, more data are needed to fully ascertain the safety of ICS cessation in selected patients with COPD.

### Impact on FEV<sub>1</sub>

There were several studies that compared lung function in patients with COPD with higher and lower number of blood eosinophils. In general, none of these studies showed significant differences between these 2 groups in terms of FEV<sub>1</sub>,<sup>7,48,71</sup> bronchial reversibility,<sup>40</sup> or hyperinflation.<sup>14</sup> Similar findings with regard to airway eosinophilia further support the hypothesis that there might be some dissociation between the lung function and eosinophils in COPD.

The impact of ICS therapy on FEV<sub>1</sub> is unclear. Post hoc analysis by Pavord et al<sup>44</sup> showed that ICSs did not improve FEV<sub>1</sub> in patients with blood eosinophil percentage greater than or equal to 2%. However, Barnes et al<sup>45</sup> reported that ICSs reduced the rate of FEV<sub>1</sub> decline in persistently eosinophilic patients ( $\geq 2\%$ ). A recent study by Bafadhel et al<sup>67</sup> showed that the treatment with higher doses of ICS/LABA was associated with a significant FEV<sub>1</sub> improvement in patients with COPD with blood eosinophil count greater than or equal to 270 cells/ $\mu\text{L}$  and no history of asthma and that the effect was more pronounced with increasing eosinophil levels. Similar results were found by other authors, who demonstrated that in patients with higher eosinophil blood levels ICS/LABA therapy was associated with a more significant FEV<sub>1</sub> improvement than that found in patients treated with LABA alone.<sup>39,59</sup> Of note, triple therapy significantly improved prebronchodilator FEV<sub>1</sub> in patients with COPD with peripheral eosinophils greater than or equal to 150 cells/ $\mu\text{L}$  and without a history of asthma.<sup>38</sup>

In the recent SUNSET trial, the effect of the treatment deescalation from the triple therapy to dual bronchodilation was assessed in terms of the lung function decline.<sup>61</sup> An important finding in this study was that nonfrequent exacerbators without a

history of asthma but with eosinophil count greater than or equal to 300 cells/ $\mu$ L or greater than or equal to 2% had a greater reduction in postbronchodilator FEV<sub>1</sub> after ICS cessation in comparison to patients who continued ICS therapy. In contrast, the study showed that patients with lower eosinophil counts had no decline in FEV<sub>1</sub> after ICS withdrawal.

#### Quality of life

Although the quality of life has been measured in several trials evaluating the efficacy of ICSs in patients with COPD, only a few of them aimed to relate the results to the blood eosinophil level.<sup>14,39,44,67</sup> Blood eosinophil percentages were not found to be associated with symptom level in the Clinical COPD Questionnaire score and neither higher nor lower eosinophil percentages (<2% and  $\geq$ 2%) were related to the change in the Clinical COPD Questionnaire or SGRQ scores during ICS treatment.<sup>14,44</sup> However, when absolute eosinophil counts were considered, the clinically important differences in the health status between patients treated with ICS/LABA versus LABA were found at higher eosinophil levels in favor of ICS/LABA.<sup>39,67</sup> In the analysis by Siddiqui et al<sup>39</sup> of the FORWARD study, the SGRQ score was modeled over a continuous range of eosinophils (0-1000 cells/ $\mu$ L). The authors demonstrated that a threshold for improvement in the SGRQ score in ICS/LABA versus LABA arms was 67 eosinophils/ $\mu$ L and patients using ICS/LABA had greater improvements with higher eosinophil counts.

#### ICS and the risk of pneumonia

Despite the apparent efficacy of ICSs in reduction of the exacerbation rate in patients with eosinophilic COPD, it has been shown that ICSs have a major drawback—an increased risk of pneumonia<sup>62,72,73</sup>—which seems to be present irrespective of the blood eosinophil level.<sup>74</sup> Thus, even in patients with COPD with blood eosinophilia, the positive effects of ICS therapy should be carefully weighed against the risk of pneumonia. In this context, the exacerbation rate and their severity play a major role. In an editorial by Suissa and Ernst,<sup>74</sup> the authors suggest that the exacerbation risk associated with not applying ICSs outweighs the ICS-related risk of pneumonia only in patients with blood eosinophils greater than 4%. Bearing that in mind, it is reasonable to consider other therapies not containing ICSs in the treatment of eosinophilic COPD. For example, LAMAs were shown to be equally effective as ICS/LABA, the latter being superior only in patients with high blood eosinophil count (>4% or >300 cells/ $\mu$ L).<sup>75</sup> Moreover, the FLAME study demonstrated that dual bronchodilation (LAMA/LABA) was superior to ICS/LABA in terms of reducing the annual exacerbation rate and prolongation of the interval to the first moderate to severe exacerbation in both patients with higher ( $\geq$ 2%) and lower (<2%) blood eosinophil count.<sup>40,76</sup>

However, it is unclear whether elevated blood eosinophil levels in patients with COPD are associated with pneumonia susceptibility independently of ICSs. In a study by Vedel-Krogh et al,<sup>77</sup> blood eosinophilia ( $\geq$ 340 cells/ $\mu$ L) in patients with COPD with predicted FEV<sub>1</sub> less than 50% was associated with a higher risk of pneumonia. The risk ceased to be significant after exclusion of patients using ICSs. Moreover, in patients with predicted FEV<sub>1</sub> greater than or equal to 50% and blood eosinophilia, there was a trend toward significance in diminishing the risk of pneumonia, suggesting that eosinophils might have, in fact, a protective

role.<sup>78</sup> Of note, ICS-related pneumonia in patients with COPD is not associated with increased mortality.<sup>79</sup>

#### COULD ASTHMA BIOLOGICS BE EFFECTIVE IN EOSINOPHILIC COPD?

Because eosinophils might play a role in COPD pathogenesis, it has been investigated whether asthma biologics targeting eosinophils could be effective in COPD. Clinical trials to date have studied the efficacy of several mAbs in COPD: anti-IL-5 (mepolizumab), anti-IL-5 receptor (benralizumab) and anti-IL-13 (lebrikizumab).

The analysis by Pavord et al<sup>80</sup> of 2 trials, METREX and METREO, aimed to evaluate the efficacy of mepolizumab as an add-on to triple therapy in patients with eosinophilic COPD with exacerbation history. Eosinophilic COPD was defined as having greater than or equal to 150 blood eosinophils/ $\mu$ L at baseline or greater than or equal to 300 blood eosinophils/ $\mu$ L in the previous year. Study participants were randomised to receive 100 mg mepolizumab or placebo in the METREX study and 100 mg mepolizumab, 300 mg mepolizumab, or placebo in the METREO study. The primary end point, that is, the reduction in the exacerbation rate, was met only in the METREX study (annual exacerbation rate was 1.40 in the mepolizumab group and 1.71 in the placebo group; rate ratio, 0.82; 95% CI, 0.68-0.98; adjusted  $P = .04$ ). In the METREO study, the reduction in exacerbation rate was not found to be significant (annual exacerbation rate was 1.19 in the 100 mg mepolizumab group, 1.27 in the 300 mg mepolizumab group, and 1.49 per year in the placebo group).

In a prospective study by Brightling et al,<sup>81</sup> benralizumab was shown to reduce eosinophil numbers in blood and sputum in patients with moderate to severe COPD with no history of asthma. The study population included patients who had sputum eosinophilia ( $\geq$ 3%) and had at least 1 moderate to severe exacerbation in the year preceding the study onset, regardless of the underlying inhaled therapy. Although the reduction in eosinophil levels did not lead to a reduction in the exacerbation rate, an improvement in both prebronchodilator and postbronchodilator FEV<sub>1</sub> was observed in the group treated with 100 mg benralizumab versus placebo. In more recent GALATHEA and TERRANOVA studies, benralizumab or placebo was administered to patients with COPD with moderate to severe airflow limitation and exacerbation history who were on dual or triple inhaled therapy.<sup>82</sup> In a pooled post hoc analysis of those studies, 30 mg and 100 mg benralizumab was shown to be ineffective in reducing the annual exacerbation rate in patients with elevated eosinophil count ( $\geq$ 220/ $\mu$ L). However, further exploration of possible cocharacteristics has identified subgroups that could benefit from treatment with benralizumab. It was observed that in patients with elevated eosinophil count who had 1 of the following: (1) at least 3 exacerbations in the previous year, (2) post-FEV<sub>1</sub> less than 40% predicted values, or (3) postbronchodilator response greater than or equal to 15%, 100 mg benralizumab significantly reduced the exacerbation rate versus placebo. In contrast, a lower dose of benralizumab (30 mg) showed no such treatment effect. However, the findings from GALATHEA and TERRANOVA studies need to be tested prospectively.

Lebrikizumab has been assessed in patients with COPD with exacerbations despite ICS treatment (NCT02546700).

However, preliminary data suggest that it does not have an effect on exacerbation rate versus placebo.<sup>83</sup> Studies that investigated other mAbs, that is, anti-IL-4 and anti-IL-13 (dupilumab) and anti-IL-33, are still at recruitment stage.

The results of the trials with biological therapies give us further insight into the potential role of eosinophils and show the complexity of the association between eosinophilic airway inflammation and a clinical course of COPD. The benefit of anti-IL-5(R) therapy in exacerbation reduction was not consistent between the studies and generally, blood eosinophil counts *per se* had poor predictability of good outcomes with biological therapies. It seems that some additional factors might impact the efficacy of those therapies in patients with eosinophilic COPD, for example, frequent ( $\geq 3$  per year) exacerbations or poor lung function. Moreover, it is possible that response to biologics could depend on eosinophil activation status.

### PERSPECTIVES AND SUMMARY

In recent years, eosinophils have gained a considerable interest as one of the important factors involved in COPD pathogenesis and as a potential biomarker. It is still largely unknown why only a certain proportion of patients with COPD have eosinophilic airway inflammation and how eosinophils impact the course of the disease. The subpopulations identified as potentially benefiting need to be prospectively studied.

It seems that the role of eosinophils in COPD pathogenesis is different from that in asthma. Further studies should not only consider eosinophil levels in different compartments when assessing airway inflammation but also address the activation status or phenotypes of pulmonary eosinophils, which might be the key to better understanding of the role of these cells in COPD. It seems important to compare the levels of different eosinophil phenotypes in the airways, as well as in the peripheral blood, in eosinophilic COPD and asthma. Moreover, it is unknown how ICSs impact eosinophils in patients with COPD. It was shown that ICSs have a small impact or none on the peripheral eosinophil counts. Blood eosinophils are variable over time and are affected by various factors, yet it appears that elevated eosinophils could reliably predict the profile of frequent COPD exacerbators who benefit from ICSs.

### REFERENCES

- Barnes PJ. Inflammatory endotypes in COPD. *Allergy* 2019;74:1249-56.
- McDonald VM, Fingleton J, Agustí A, Hiles SA, Clark VL, Holland AE, et al. Treatable traits: a new paradigm for 21<sup>st</sup> century management of chronic airway diseases: Treatable Traits Down Under International Workshop report. *Eur Respir J* 2019;53:1802058.
- Barczyk A, Maskey-Warzechowska M, Gorska K, Barczyk M, Kuziemski K, Sliwinski P, et al. Asthma-COPD overlap—a discordance between patient populations defined by different diagnostic criteria. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019;7:2326-2336.e5.
- Kim VL, Coombs NA, Staples KJ, Ostridge KK, Williams NP, Wootton SA, et al. Impact and associations of eosinophilic inflammation in COPD: analysis of the AERIS cohort. *Eur Respir J* 2017;50:1700853.
- Leigh R, Pizzichini MM, Morris MM, Maltais F, Hargreave FE, Pizzichini E. Stable COPD: predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment. *Eur Respir J* 2006;27:964-71.
- Negewo NA, McDonald VM, Baines KJ, Wark PA, Simpson JL, Jones PW, et al. Peripheral blood eosinophils: a surrogate marker for airway eosinophilia in stable COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016;11:1495-504.
- Proboszcz M, Mycroft K, Paplinska-Goryca M, Gorska K, Nejmian-Gryz P, Jankowski P, et al. Relationship between blood and induced sputum eosinophils, bronchial hyperresponsiveness and reversibility of airway obstruction in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. *COPD* 2019;16:354-61.
- Siva R, Green RH, Brightling CE, Shelley M, Hargadon B, McKenna S, et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. *Eur Respir J* 2007;29:906-13.
- George L, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Chronic Dis* 2016;7:34-51.
- Gorska K, Maskey-Warzechowska M, Nejmian-Gryz P, Korczynski P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative study of periostin expression in different respiratory samples in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pol Arch Med Wewn* 2016;126:124-37.
- Rutgers SR, Timens W, Kaufmann HF, van der Mark TW, Koeter GH, Postma DS. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2000;15:109-15.
- Weiszar Z, Horvath I. Induced sputum analysis: step by step. *Breathe* 2013;9:300-6.
- Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:1004-14.
- Hartjes F, Vonk JM, Faiz A, Hiemstra PS, Lappere TS, Kerstjens HAM, et al. Predictive value of eosinophils and neutrophils on clinical effects of ICS in COPD. *Respirology* 2018;23:1023-31.
- Fukuda T, Gleich GJ. Heterogeneity of human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:369-73.
- Shult PA, Lega M, Jadidi S, Vrtis R, Wamer T, Graziano FM, et al. The presence of hypodense eosinophils and diminished chemiluminescence response in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:429-37.
- Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirotton D, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest* 2016;126:3279-95.
- Gorska K, Nejmian-Gryz P, Paplinska-Goryca M, Korczynski P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative study of IL-33 and IL-6 levels in different respiratory samples in mild-to-moderate asthma and COPD. *COPD* 2018;15:36-45.
- Eltboli O, Bafadhel M, Hollins F, Wright A, Hargadon B, Kulkarni N, et al. COPD exacerbation severity and frequency is associated with impaired macrophage efferocytosis of eosinophils. *BMC Pulm Med* 2014;14:112.
- Park YM, Bochner BS. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010;2:87-101.
- Schwartz C, Willebrand R, Huber S, Rupec RA, Wu D, Locksley R, et al. Eosinophil-specific deletion of I $\kappa$ B $\alpha$  in mice reveals a critical role of NF- $\kappa$ B-induced Bcl-xL for inhibition of apoptosis. *Blood* 2015;125:3896-904.
- Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Fang C, Cousins D, et al. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2008;181:2790-8.
- Tworek D, Majewski S, Szewczyk K, Kiszalkiewicz J, Kurmanowska Z, Gorski P, et al. The association between airway eosinophilic inflammation and IL-33 in stable non-atopic COPD. *Respir Res* 2018;19:108.
- Jacobsen EA, Doyle AD, Colbert DC, Zellner KR, Protheroe CA, LeSuer WE, et al. Differential activation of airway eosinophils induces IL-13-mediated allergic Th2 pulmonary responses in mice. *Allergy* 2015;70:148-59.
- Doyle AD, Mukherjee M, LeSuer WE, Bittner TB, Pasha SM, Frere JJ, et al. Eosinophil-derived IL-13 promotes emphysema. *Eur Respir J* 2019;53:1801291.
- Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ Jr, et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 2000;106:1081-93.
- Chaudhuri R, McSharry C, Brady J, Donnelly I, Grierson C, McGuinness S, et al. Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relationship to disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:655-63. e8.
- Hastie AT, Martinez FJ, Curis JL, Doerschuk CM, Hansel NN, Christenson S, et al. Association of sputum and blood eosinophil concentrations with clinical measures of COPD severity: an analysis of the SPIROMICS cohort. *Lancet Respir Med* 2017;5:5956-67.
- Chou K-T, Su K-C, Hsiao Y-H, Huang S-F, Ko H-K, Tseng C-M, et al. Post-bronchodilator reversibility of FEV1 and eosinophilic airway inflammation in COPD. *Arch Bronconeumol* 2017;53:547-53.
- Reid DW, Wen Y, Johns DP, Williams TJ, Ward C, Walters EH. Bronchodilator reversibility, airway eosinophilia and anti-inflammatory effects of inhaled fluticasone in COPD are not related. *Respirology* 2008;13:799-809.
- Górska K, Krenke R, Korczyński P, Kościuch J, Domagała-Kulawik J, Chazan R. Eosinophilic airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *J Physiol Pharmacol* 2008;59:261-70.







32. Gao J, Zhou W, Chen B, Lin W, Wu S, Wu F. Sputum cell count: biomarkers in the differentiation of asthma, COPD and asthma-COPD overlap. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2017;12:2703-10.
33. Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Gosman MM, Stolk J, Sont JK, Jansen DF, et al. Dissociation of lung function and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:499-504.
34. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: updated 2020. Available from: <http://www.goldcopd.org>. Accessed January 31, 2020.
35. Kolsum U, Donaldson GC, Singh R, Barker BL, Gupta V, George L, et al. Blood and sputum eosinophils in COPD: relationship with bacterial load. *Respir Res* 2017;18:88.
36. Turato G, Semenzato U, Bazzan E, Biondini D, Tine M, Torrecilla N, et al. Blood eosinophilia neither reflects tissue eosinophils nor worsens clinical outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:1216-9.
37. Vogelmeier CF, Kostikas K, Fang J, Tian H, Jones B, Morgan CL, et al. Evaluation of exacerbations and blood eosinophils in UK and US COPD populations. *Respir Res* 2019;20:178.
38. Ferguson GT, Rabe KF, Martinez FJ, Fabbri LM, Wang C, Ichinose M, et al. Triple therapy with budesonide/glycopyrrolate/formoterol fumarate with co-suspension delivery technology versus dual therapies in chronic obstructive pulmonary disease (KRONOS): a double-blind, parallel-group, multicentre, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2018;6:747-58.
39. Siddiqui SH, Pavord ID, Barnes NC, Guasconi A, Lettis S, Pascoe S, et al. Blood eosinophils: a biomarker of COPD exacerbation reduction with inhaled corticosteroids. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2018;13:3669-76.
40. Roche N, Chapman KR, Vogelmeier CF, Herth FJF, Thach C, Fogel R, et al. Blood eosinophils and response to maintenance chronic obstructive pulmonary disease treatment: data from the FLAME trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:1189-97.
41. Pascoe S, Locantore N, Dransfield MT, Barnes NC, Pavord ID. Blood eosinophil counts, exacerbations, and response to the addition of inhaled fluticasone furoate to vilanterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a secondary analysis of data from two parallel randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2015;3:435-42.
42. Yun JH, Lamb A, Chase R, Singh D, Parker MM, Saferali A, et al. Blood eosinophil count thresholds and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:2037-2047.e10.
43. Barnes NC, Shama R, Lettis S, Calverley PM. Blood eosinophils as a marker of response to inhaled corticosteroids in COPD. *Eur Respir J* 2016;47:1374-82.
44. Pavord ID, Lettis S, Locantore N, Pascoe S, Jones PW, Wedzicha JA, et al. Blood eosinophils and inhaled corticosteroid/long-acting  $\beta$ -2 agonist efficacy in COPD. *Thorax* 2016;71:118-25.
45. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol* 2017;17:746-60.
46. DiSantostefano RL, Hinds D, Le HV, Barnes NC. Relationship between blood eosinophils and clinical characteristics in a cross-sectional study of a US population-based COPD cohort. *Respir Med* 2016;112:88-96.
47. Mathur SK, Fichtinger PS, Evans MD, Schwantes EA, Jarjour NN. Variability of blood eosinophil count as an asthma biomarker. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016;117:551-3.
48. Casanova C, Celli BR, de-Torres JP, Martinez-Gonzalez C, Cosio BG, Pinto-Plata V, et al. Prevalence of persistent blood eosinophilia: relation to outcomes in patients with COPD. *Eur Respir J* 2017;50:1701162.
49. Singh D, Kolsum U, Brightling CE, Locantore N, Agusti A, Tal-Singer R. Eosinophilic inflammation in COPD: prevalence and clinical characteristics. *Eur Respir J* 2014;44:1697-700.
50. Schumann DM, Tamm M, Kostikas K, Stolz D. Stability of the blood eosinophilic phenotype in stable and exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 2019;156:456-65.
51. Southworth T, Beech G, Foden P, Kolsum U, Singh D. The reproducibility of COPD blood eosinophil counts. *Eur Respir J* 2018;52:1800427.
52. Oshagbemi OA, Burden AM, Braeken DCW, Henskens Y, Wouters EFM, Driessen JHM, et al. Stability of blood eosinophils in patients with chronic obstructive pulmonary disease and in control subjects, and the impact of sex, age, smoking, and baseline counts. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:1402-4.
53. Landis SH, Suruki R, Hilton E, Compton C, Galwey NW. Stability of blood eosinophil count in patients with COPD in the UK Clinical Practice Research Datalink. *COPD* 2017;14:382-8.
54. Kreindler JL, Watkins ML, Lettis S, Tal-Singer R, Locantore N. Effect of inhaled corticosteroids on blood eosinophil count in steroid-naïve patients with COPD. *BMJ Open Respir Res* 2016;3:e000151.
55. Gorska K, Paplinska-Goryca M, Nejman-Gryz P, Goryca K, Krenke R. Eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in the phenotyping of mild-to-moderate asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *COPD* 2017;14:181-9.
56. Westerhof GA, Korevaar DA, Amelink M, de Nijs SB, de Groot JC, Wang J, et al. Biomarkers to identify sputum eosinophilia in different adult asthma phenotypes. *Eur Respir J* 2015;46:688-96.
57. Fowler SJ, Tavernier G, Niven R. High blood eosinophil counts predict sputum eosinophilia in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:822-824.e2.
58. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Panchohi M, Venge P, et al. Blood eosinophils to direct corticosteroid treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:48-55.
59. Siddiqui SH, Guasconi A, Vestbo J, Jones P, Agusti A, Paggiaro P, et al. Blood eosinophils: a biomarker of response to extrafine beclomethasone/formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:523-5.
60. Papi A, Vestbo J, Fabbri L, Corradi M, Prunier H, Cohuet G, et al. Extrafine inhaled triple therapy versus dual bronchodilator therapy in chronic obstructive pulmonary disease (TRIBUTE): a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *Lancet* 2018;391:1076-84.
61. Chapman KR, Hurst JR, Frent SM, Larbig M, Fogel R, Guerin T, et al. Long-term triple therapy de-escalation to indacaterol/glycopyrronium in patients with chronic obstructive pulmonary disease (SUNSET): a randomized, double-blind, triple-dummy clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:329-39.
62. Lipson DA, Bamhart F, Brealey N, Brooks J, Criner GJ, Day NC, et al. Once-daily single-inhaler triple versus dual therapy in patients with COPD. *N Engl J Med* 2018;378:1671-80.
63. Vedel-Krogh S, Nielsen SF, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Blood eosinophils and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. The Copenhagen General Population Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:965-74.
64. MacDonaki MI, Osadnik CR, Bulfin L, Hamza K, Leong P, Wong A, et al. Low and high blood eosinophil counts as biomarkers in hospitalised acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 2019;156:92-100.
65. Shin SH, Park HY, Kang D, Cho J, Kwon SO, Park JH, et al. Serial blood eosinophils and clinical outcome in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2018;19:134.
66. Watz H, Tetzlaff K, Wouters EFM, Kirsten A, Magnussen H, Rodriguez-Roisin R, et al. Blood eosinophil count and exacerbations in severe chronic obstructive pulmonary disease after withdrawal of inhaled corticosteroids: a post-hoc analysis of the WISDOM trial. *Lancet Respir Med* 2016;4:390-8.
67. Bafadhel M, Peterson S, De Blas MA, Calverley PM, Rennard SI, Richter K, et al. Predictors of exacerbation risk and response to budesonide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis of three randomised trials. *Lancet Respir Med* 2018;6:117-26.
68. Calzetta L, Cazzola M, Matera MG, Rogliani P. Adding a LAMA to ICS/LABA therapy: a meta-analysis of triple combination therapy in COPD. *Chest* 2019;155:758-70.
69. Cazzola M, Rogliani P, Calzetta L, Matera MG. Triple therapy versus single and dual long-acting bronchodilator therapy in COPD: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2018;52:1801586.
70. Calverley PMA, Tetzlaff K, Vogelmeier C, Fabbri LM, Magnussen H, Wouters EFM, et al. Eosinophilia, frequent exacerbations, and steroid response in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:1219-21.
71. Zysman M, Deslee G, Caillaud D, Chanez P, Escamilla R, Court-Fortune I, et al. Relationship between blood eosinophils, clinical characteristics, and mortality in patients with COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2017;12:1819-24.
72. Dransfield MT, Bourbeau J, Jones PW, Hanania NA, Mahler DA, Vestbo J, et al. Once-daily inhaled fluticasone furoate and vilanterol versus vilanterol only



- for prevention of exacerbations of COPD: two replicate double-blind, parallel-group, randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2013;1:210-23.
73. Suissa S, Patenaude V, Lapi F, Ernst P. Inhaled corticosteroids in COPD and the risk of serious pneumonia. *Thorax* 2013;68:1029-36.
74. Suissa S, Ernst P. Precision medicine urgency: the case of inhaled corticosteroids in COPD. *Chest* 2017;152:227-31.
75. Suissa S, Dell'Aniello S, Ernst P. Comparative effectiveness of LABA-ICS versus LAMA as initial treatment in COPD targeted by blood eosinophils: a population-based cohort study. *Lancet Respir Med* 2018;6:855-62.
76. Wedzicha JA, Banerji D, Chapman KR, Vestbo J, Roche N, Ayers RT, et al. Indacaterol-glycopyrronium versus salmeterol-fluticasone for COPD. *N Engl J Med* 2016;374:2222-34.
77. Vedel-Krogh S, Nordestgaard BG, Lange P, Vestbo J, Nielsen SF. Blood eosinophil count and risk of pneumonia hospitalisations in individuals with COPD. *Eur Respir J* 2018;51:1800120.
78. Ernst P. Blood eosinophils in COPD and the future risk of pneumonia. *Eur Respir J* 2018;52:1800981.
79. Festic E, Scanlon PD. Incident pneumonia and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double effect of inhaled corticosteroids? *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:141-8.
80. Pavord ID, Chané P, Criner GJ, Kerstjens HAM, Kom S, Lugogo N, et al. Mepolizumab for eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2017;377:1613-29.
81. Brightling CE, Bleecker ER, Panettieri RA, Bafadhel M, She D, Ward CK, et al. Benralizumab for chronic obstructive pulmonary disease and sputum eosinophilia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a study. *Lancet Respir Med* 2014;2:891-901.
82. Criner GJ, Celi BR, Singh D, Agusti A, Papi A, Jison M, et al. Predicting response to benralizumab in chronic obstructive pulmonary disease: analyses of GALATHEA and TERRANOVA studies. *Lancet Respir Med* 2020; 8:150-70.
83. Yousuf A, Ibrahim W, Greening NJ, Brightling CE. T2 Biologics for chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019;7:1405-16.

Article

# Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma

Katarzyna Mycroft , Magdalena Paplińska-Goryca \*, Małgorzata Proboszcz , Patrycja Nejman-Gryz , Rafał Krenke  and Katarzyna Górńska 

Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland; katarzyna.mycroft@wum.edu.pl (K.M.); malgorzata.proboszcz@wum.edu.pl (M.P.); patrycja.nejman-gryz@wum.edu.pl (P.N.-G.); rafal.krenke@wum.edu.pl (R.K.); katarzyna.gorska@wum.edu.pl (K.G.)

\* Correspondence: mpaplińska@wum.edu.pl; Tel.: +48225991241; Fax: +48225991561

**Abstract:** Different eosinophil subpopulations have been identified in asthma and other eosinophilic disorders. However, there is a paucity of data on eosinophil subpopulations in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The aim of this study was to compare eosinophil phenotypes in blood and induced sputum in patients with COPD, asthma and controls. Stable patients with mild-to-moderate COPD ( $n = 15$ ) and asthma ( $n = 14$ ) with documented blood eosinophilia  $\geq 100$  cells/ $\mu$ L in the year prior to the study and the control group ( $n = 11$ ) were included to the study. The blood and sputum eosinophil phenotypes were analyzed by flow cytometry. IL-5, IL-13, CCL5 and eotaxin-3 levels were measured in the induced sputum. The marker expression on blood eosinophils was similar among control, asthma and COPD groups. The expressions of CD125, CD193, CD14 and CD62L were higher on blood than on sputum eosinophils in all three groups. We found increased levels of CD193+ and CD66b+ sputum eosinophils from COPD patients, and an elevated level of CD11b+ sputum eosinophils in asthma compared to COPD patients. The results of our study suggest that the profile of marker expression on COPD sputum eosinophils differed from other groups, suggesting a distinct phenotype of eosinophils of COPD patients than in asthma or healthy subjects.

**Keywords:** asthma; COPD; eosinophils; inflammation; sputum



Citation: Mycroft, K.;

Paplińska-Goryca, M.; Proboszcz, M.; Nejman-Gryz, P.; Krenke, R.; Górńska, K. Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma. *Cells* 2023, 12, 1631. <https://doi.org/10.3390/cells12121631>

Academic Editor: Irene Heijink

Received: 28 April 2023

Revised: 7 June 2023

Accepted: 12 June 2023

Published: 15 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Eosinophils are crucial in the development of allergies and other inflammatory conditions, and in fighting parasitic infections. Eosinophils originate from the bone marrow and migrate through the bloodstream to different organs and tissues, e.g., lymph nodes, gastrointestinal tract, spleen and lung [1,2]. Eosinophil maturation, migration and recruitment are regulated by cytokines and chemokines produced locally at inflammation sites: eotaxin-1, -2, -3; interleukin (IL)-4, IL-5, IL-33; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES); and surface adhesion proteins (e.g., complement receptors CR3–CD11b/CD18 or L-selectin–CD62L) expressed on eosinophils [3,4]. Under certain conditions, e.g., in response to allergens or parasites, the production of mediators attracting eosinophils is enhanced by T helper type 2 (Th2 cells), leading to eosinophil infiltration of the tissue [3,5]. In some cases, the eosinophilic inflammation may become uncontrollable through the activity of factors promoting survival or inhibiting apoptosis (IL-3, -5, GM-CSF, alarmins) [6–8], and increased eosinophil recruitment. Eosinophilic inflammation is the cornerstone of the pathogenesis of asthma, chronic rhinosinusitis and eosinophilic esophagitis [3]. The prolonged eosinophil accumulation in the airways leads to uncontrolled eosinophil degranulation and the release of cytotoxic proteins (major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP),

eosinophil peroxidase (EPX), eosinophil-derived neurotoxin (EDN)) from granules and, consequently, airway epithelium damage and impairment.

Elevated eosinophil levels are found in around one-third of COPD patients [9]. The exact role of eosinophils in COPD remains unknown but it has been shown that increased eosinophil levels are associated with better treatment response to inhaled corticosteroids [10–12]. However, inhaled corticosteroid therapy in eosinophilic COPD patients is not as effective as in asthma [13].

Further discrepancies between COPD and asthma have been observed when evaluating treatment responses to therapies directed against IL-5, which have been shown to be effective in severe eosinophilic asthma [14]. However, the effectiveness of IL-5 biologics in eosinophilic COPD patients was found to be worse than in asthma [15]. On the other hand, the results of the recent BOREAS trial have shown that dupilumab, a monoclonal antibody blocking the shared receptor component for interleukin-4 and interleukin-13, is effective in both eosinophilic COPD and asthma patients [16]. We hypothesize that the molecular regulation of eosinophil function differs in these two obstructive lung diseases.

Some authors identified different eosinophil subpopulations in asthma and other pathological conditions [2]. Sputum eosinophils of asthma patients were CD62L<sup>low</sup>IL-3R<sup>high</sup>, while in non-asthmatic patient lungs, eosinophils were CD62L + IL-3R<sup>low</sup> [17]. Differences were also observed between circulating and airway eosinophils, suggesting distinct activation states. CD11b, CD18 and CD29 (Integrin beta 1) were upregulated while CD193 (CC-chemokine receptor 3, CCR3), CD125 (Interleukin-5 receptor alpha) and CD62L were downregulated in local airway eosinophils compared to systemic blood eosinophils [18]. However, there is a paucity of data on eosinophil subpopulations in COPD patients. We hypothesize that eosinophils in COPD and asthma differ in their surface marker expression. Therefore, the aim of this study was to assess eosinophil phenotype variants in the blood and in the induced sputum of COPD, asthma and control subjects.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. General Study Design and Participants

Stable patients with mild-to-moderate COPD or asthma, presenting to the outpatient clinic at the Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy of the Medical University of Warsaw from October 2020 to February 2022, were enrolled in the study. The study was approved by the ethics committee of the Medical University of Warsaw (KB/62/A/2020). All participants provided informed consent. This study was registered on ClinicalTrials.gov, number NCT05398133.

Inclusion criteria for the COPD group were as follows: (1) age 40 years and over; (2) diagnosis of COPD based on past medical history, history of smoking  $\geq 10$  packyears, typical signs and symptoms [19] and irreversible airway obstruction found in spirometry (z-score of the post-bronchodilator FEV1/FVC below  $-1.645$  [20]); (3) blood eosinophilia  $\geq 100$  cells/ $\mu$ L in the year prior to the study.

Inclusion criteria for asthma were as follows: (1) age 18 years and over; (2) diagnosis of asthma based on past medical history, typical signs and symptoms and demonstration of variable expiratory airflow limitation [21]; (3) a negative smoking history; (4) blood eosinophilia  $\geq 100$  cells/ $\mu$ L in the year prior to the study.

Patients were excluded if there was a documented current or previous history of asthma (for COPD patients) or COPD diagnosis (for asthma patients); history of any other chronic lung disease, autoimmune and hematological diseases, malignancies, severe cardiovascular diseases; COPD or asthma disease exacerbation requiring treatment with systemic corticosteroid and/or antibiotics in the past 3 months; biological treatment (e.g., mepolizumab); history of using immunosuppressives; or current helminth infection.

Control subjects were matched by age and gender to the study groups and were recruited among volunteers with normal spirometry who had no lung condition, hematological or malignant disease, and had no respiratory tract infection in the past 3 months.

Clinical and demographic data (including exacerbation history, comorbidities, medication) were collected during the visit. COPD patients performed the COPD Assessment Test (CAT) and modified Medical Research Council (mMRC) dyspnea scoring, while asthma patients completed the Asthma Control Test (ACT). Spirometry was performed according to the ATS/ERS guidelines [22]. Atopy was diagnosed when either at least one skin prick test for inhalant allergens was positive (a mean wheal diameter  $\geq 3$  mm) or the specific IgE level for inhalant allergens was over 0.35 kU/L.

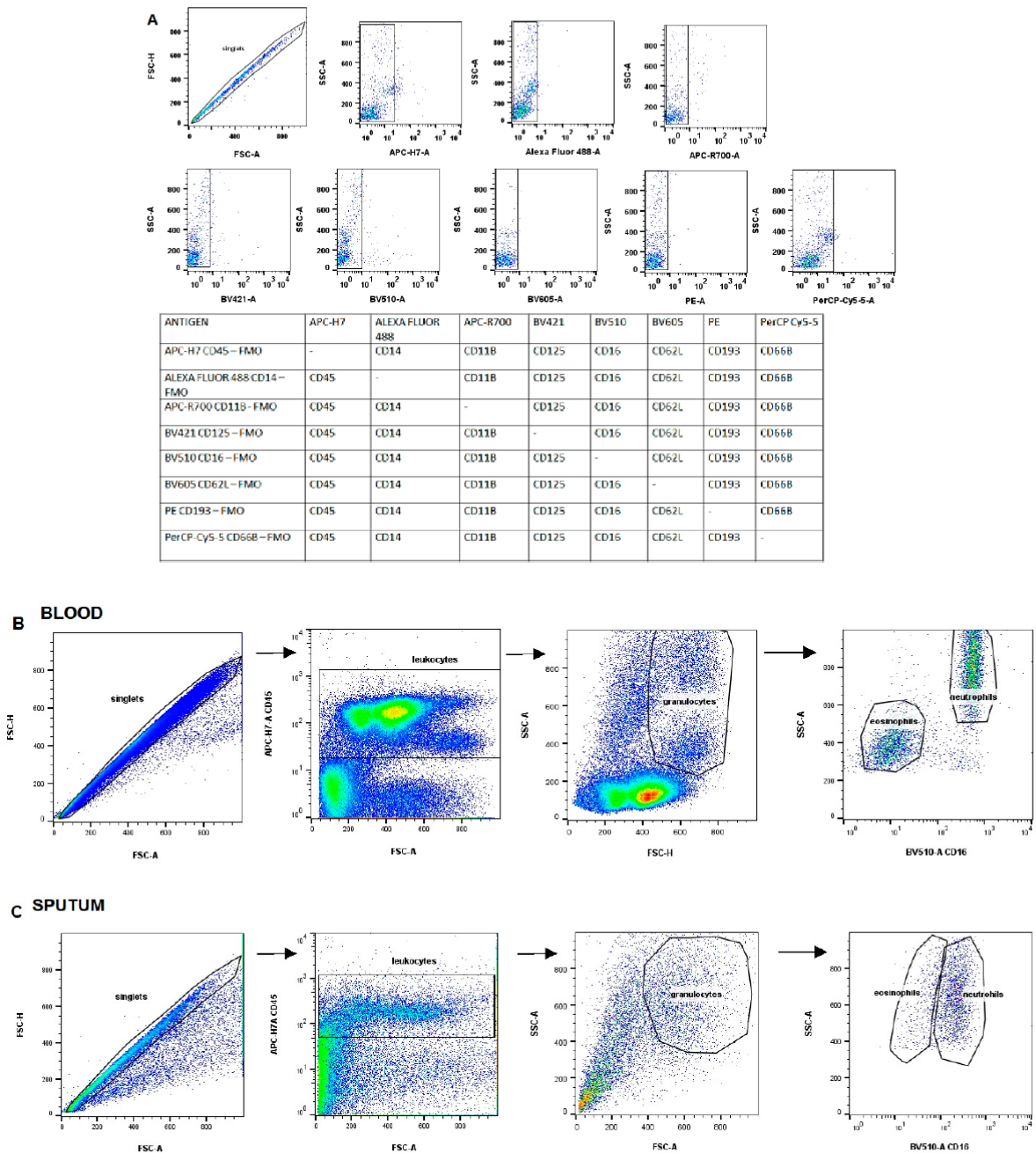
### 2.2. Blood and Sputum Sampling and Processing

Venous blood was taken for measurement of a full blood count, serum C reactive protein (CRP), total immunoglobulin E (IgE), inhalant allergen panel, cytokine measurements and flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and granulocytes were isolated from freshly drawn venous blood (9 mL collected in EDTA tube) by Lymphoprep (StemCell, Vancouver, BC, Canada) centrifugation according to manufacturer protocol.

Sputum induction was preceded by inhalation of 400  $\mu$ g of salbutamol. Then, inhalations of sterile hypertonic saline (NaCl) were applied at increasing concentrations (3, 4, and 5% solutions) via an ultrasonic nebulizer (ULTRA-NEBTM2000, DeVilbiss, Somerset, PA, USA) following ERS recommendations [23]. The induced sputum samples were processed as described previously [24].

### 2.3. Assessment of Surface Receptor Expression by Flow Cytometry

Cells were stained with antibodies against the surface binding molecules: CD45 (mouse anti-human APC-H7, cat. no. 641408), CD16 (mouse anti-human BV510, cat. no. 563830), CD125 (mouse anti-human BV421, cat. no. 743927), CD193 (mouse anti-human PE, cat. no. 558165), CD62L (mouse anti-human BV605, cat. no. 562719), CD66B (mouse anti-human PerCP-Cy5-5, cat. no. 562254), CD11B (rat anti-human APC, cat. no. 564985) and CD14 (mouse anti-human Alexa Fluor 488, cat. no. 557700) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in BD Horizon Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and incubated for 20 min in the dark at room temperature. Cells were analyzed on a FACS Celesta flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with blue (488 nm), violet (405 nm) and red (640 nm) lasers. Unstained cells and compensation beads (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were used to set voltages and create single-stain negative and positive controls. Compensation was set to account for spectral overlap between the seven fluorescent channels used in the study. The cut-off gating for negative populations was determined using fluorescence minus one (FMO) (a sample that has been stained with all fluorophores except one) controls (Figure 1A). Samples were examined by side scatter area (SSC-A) vs. forward scatter area (FSC-A), then using forward scatter height (FSC-H) vs. FSC-A to select single cells, eliminating debris and clumped cells from the analysis. At least 50,000 cells in the target gate were collected. The eosinophils were identified as SSChi, CD45+ and CD16− cells. In the first step, each marker (CD125, CD193, CD14, CD11b, CD62L, CD66b) was analyzed separately in each group. Next, the eosinophil subpopulations were characterized by the expression of the following pairs of markers: (1) CD125 and CD193, (2) CD14 and CD11b, (3) CD62L and CD66b. BD FACS Diva 8.0.1.1 software was used for data analysis. The scheme of the gating strategy for blood and sputum is presented in Figure 1B,C.



**Figure 1.** The gating strategy. (A) Fluorescent minus one (FMO) (B) blood, (C) sputum. Legend: Fluorescence minus one (FMO) controls for the experiment. FMO controls were prepared without adding a particular fluorophore-conjugated isotype control antibody, as shown in the table below. Gating strategy: Obtained events were gated in an FSC-A vs. FSC-H intensity dot plot to eliminate doublets. Leukocytes were gated on CD45+ vs. FSC. Granulocytes were selected as cells with high FSC and high SSC. The eosinophils were selected from granulocytes as CD16- cells. FSC: forward scatter, SSC: side scatter.

#### 2.4. Protein Analysis in Induced Sputum

Sputum cytokine and eotaxin levels were measured by using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The minimal detectable concentrations were as follows: IL-5 (0.29 pg/mL), IL-13 (13.2 pg/mL), RANTES (2.0 pg/mL), eotaxin-3 (0.215 pg/mL).

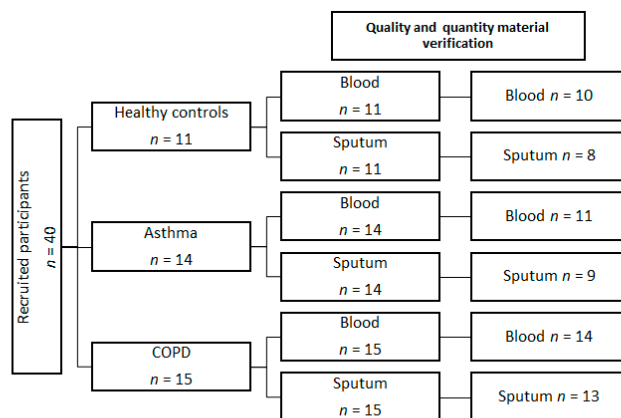
#### 2.5. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Statistica 13.3 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and GraphPad Prism software (version 9.3.1) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Data are presented as median and interquartile range (IQR) or number and percentage. Differences between continuous variables in 3 groups were tested using the Kruskal–Wallis test and between 2 groups using the nonparametric Mann–Whitney U test. For the comparison of surface marker expression between blood and sputum eosinophils, the Wilcoxon matched pairs test was used. Fisher's exact test was used to test the differences between nominal variables. Correlations between variables were analyzed with Spearman's rank test. A *p*-value of less than 0.05 was taken as the threshold of statistical significance.

### 3. Results

#### 3.1. Patient Characteristics

In total, 11 controls, 14 asthmatics and 15 COPD patients were recruited to the study; blood and induced sputum were collected from all study participants (Figure 2). Patients' characteristics are presented in Table 1. COPD patients were significantly older than asthma patients, but there were no differences in age between COPD patients and controls and between asthma and control subjects. Among COPD patients, 5 were ex-smokers and 10 were current smokers. In the control group, five patients were smokers. Both asthma and COPD patients were mildly to moderately symptomatic; the median ACT and CAT scores were 20 (14–23.5) and 14 (8–21) for asthma and COPD patients, respectively. At the time of the study, two patients with COPD and five patients with asthma received low-dose ICS.



**Figure 2.** The flowchart of patients' recruitment and study scheme. Forty patients were recruited; all patients had undergone blood sampling and sputum induction. Overall, 5 blood samples were not taken into FACS analysis because of low eosinophil levels and 10 sputum samples because of poor sputum quality (>20% of squamous cells, low number of cells) or low eosinophil levels. Blood samples were excluded if there were no eosinophils present in flow cytometry. The sputum was excluded if (1) the percentage of squamous cells was >20%, (2) there was a low number of cells isolated from sputum  $< 1 \times 10^6$  or (3) there were no eosinophils in flow cytometry.

Table 1. Patients' characteristics.

Variable	Control (n = 11)	Asthma (n = 14)	COPD (n = 15)	p-Value
Age (years)	58 (35–63)	46 (39–61)	64 (55–72)	0.046
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.3 (24.1–32.3)	26 (23–32.5)	27.5 (23–32)	0.832
Females, n (%)	6 (55%)	10 (71%)	6 (40%)	0.47
Atopy, n (%)	5 (45%)	10 (71%)	4 (27%)	0.049
FEV <sub>1</sub> (% pred.)	89 (86–102)	89 (84–95)	66 (59–84)	0.002
FEV <sub>1</sub> /FVC%	71 (70–78)	74 (64–76)	53 (41–62)	<0.001
COPD severity according to GOLD 2020				
GOLD A, n (%)	n/a	n/a	4 (27%)	
GOLD B, n (%)	n/a	n/a	10 (68%)	
GOLD C, n (%)	n/a	n/a	1 (7%)	
Asthma severity according to GINA 2019				
GINA 1, n (%)	n/a	9 (64%)	n/a	
GINA 2, n (%)	n/a	2 (14%)	n/a	
GINA 3, n (%)	n/a	3 (21%)	n/a	
Total IgE (IU/mL)	73.6 (11.3–270.1)	49.2 (33.6–150.1)	30.7 (8.8–79.5)	0.848
CRP (mg/L)	2.9 (2.5–3.2)	2.5 (0.4–4.7)	1.9 (0.85–3.8)	0.834
Blood eosinophil count (cells/ $\mu$ L)	171 (55–185)	219 (137–390)	175 (127–282)	0.554
Blood eosinophil (%)	2 (1–2)	3 (4–7)	2 (1–5)	0.019
Sputum eosinophil (%)	1 (0–1)	1 (0–1)	1 (0–1)	0.88

Data are presented as median (IQR) or number (percentage). Abbreviations: COPD—chronic obstructive pulmonary disease, CRP—C-reactive protein, FEV<sub>1</sub>—forced expiratory volume in one second, IgE—immunoglobulin E.

### 3.2. Expression of CD125, CD193, CD62L, CD66b, CD14, CD11b on Sputum and Blood Eosinophils

Data on the total percentage of sputum and blood eosinophils with surface CD125, CD193, CD62L, CD66b, CD14 and CD11b expression in COPD, asthma and control subjects are presented in Figure 3. The profiles of blood and sputum eosinophils differed significantly. We found that blood eosinophils were characterized by increased expression of CD125+, CD193+, CD62L and CD14+ compared to sputum cells in all evaluated groups, suggesting the changed phenotype of eosinophils after recruitment into the airway. Interestingly, the expression of CD11b was increased on sputum 99.4 (98.8–100.0)% compared to blood 96.9 (82.6–98.8)% eosinophils ( $p = 0.002$ ), but only in the asthma group. The expression of CD66b remained the same in systemic and airway eosinophils, implying the important role of CD66b as a unified eosinophil marker.

We found that the profile of marker expression on COPD sputum eosinophils differed from other groups. We showed an increased percentage of CD193+ sputum eosinophils from COPD patients compared to controls (48.1 [29.8–69.3]% vs. 18.7 [11.6–32.8]%, respectively,  $p = 0.028$ ), a higher proportion of CD66b+ sputum eosinophils in COPD subjects compared to controls (67.9 [59.9–75.7]% vs. 39.1 [25.6–58.4]% and in asthma compared to controls ( $p = 0.024$ ), respectively,  $p = 0.036$ ), and a decreased level of CD11b+ sputum eosinophils in COPD compared to asthma (97.9 [96.6–99.1]% vs. 99.4 [98.9–100]%, respectively,  $p = 0.009$ ).

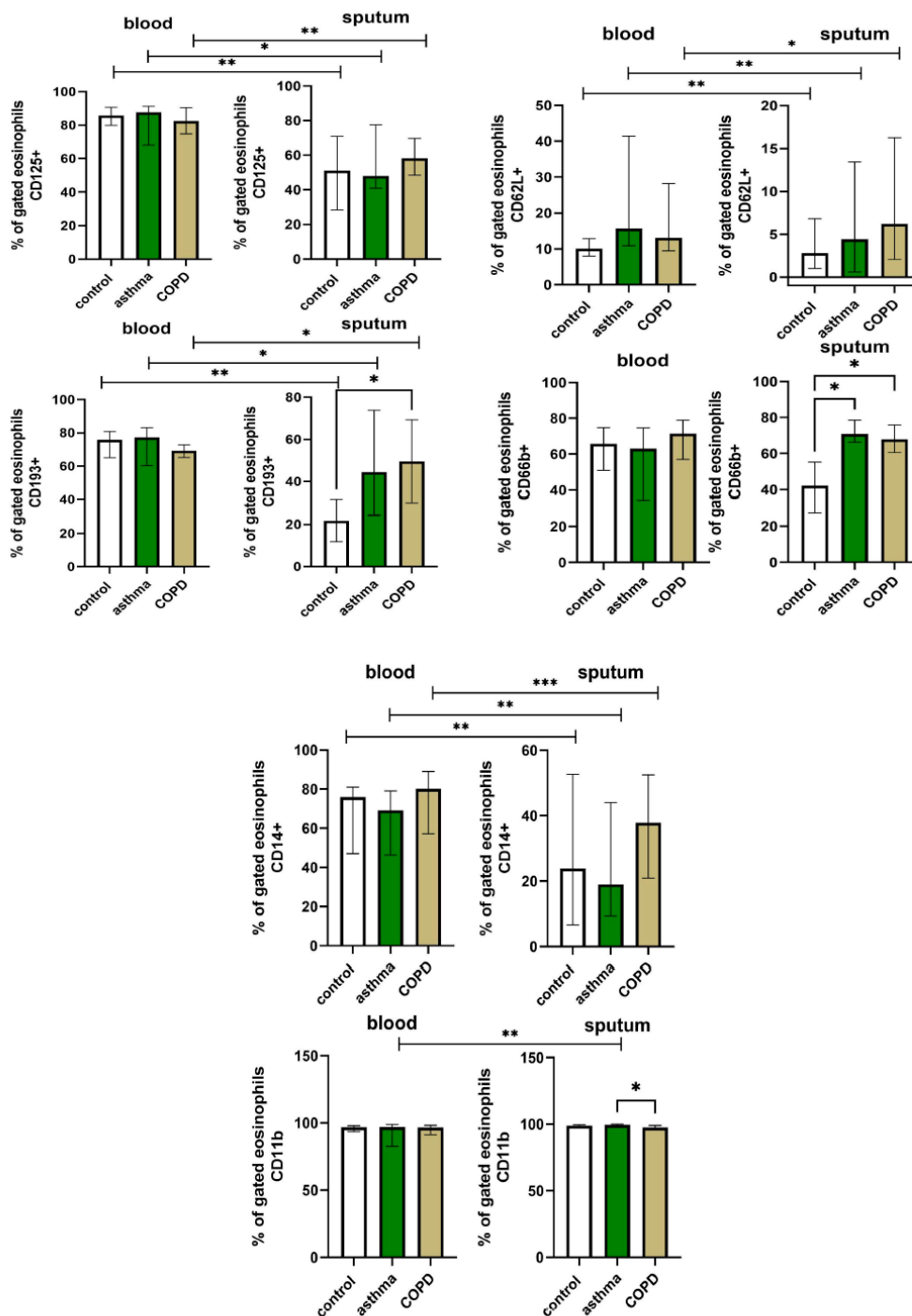
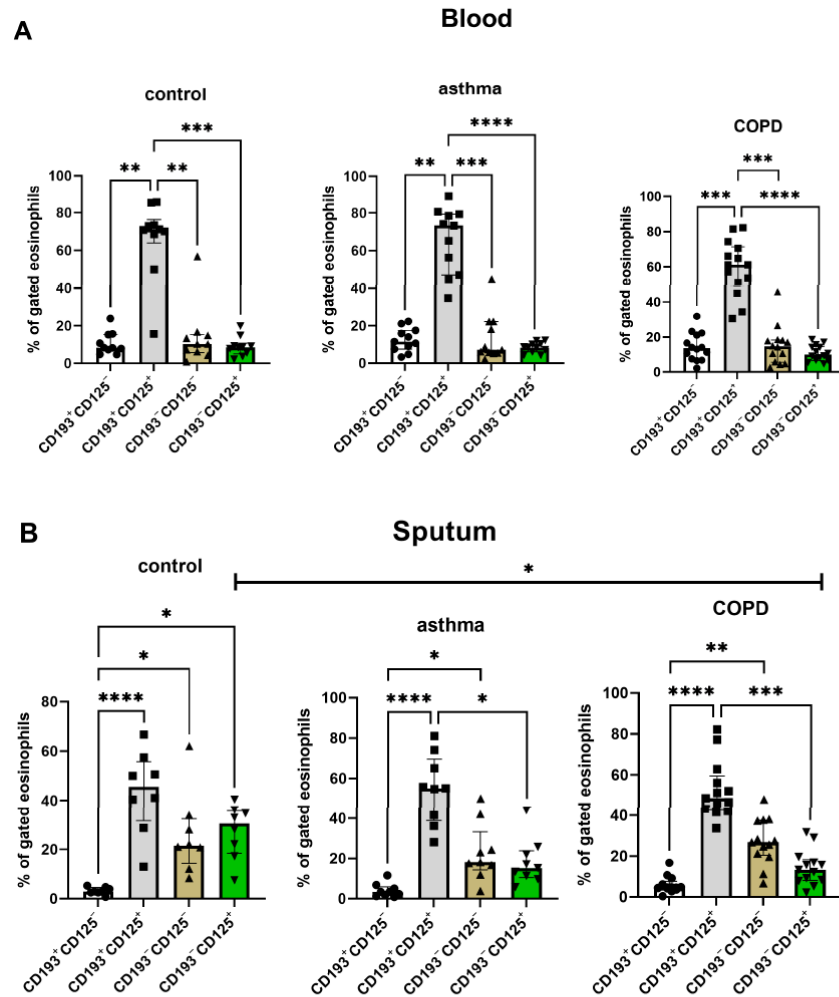


Figure 3. The comparison of CD125, CD193, CD62L, CD66b, CD14, CD11b expression on eosinophils in blood ( $n = 10, 11, 14$ ) and sputum ( $n = 8, 9, 13$ ) of control, asthma and COPD subjects. The data are presented as median (column) and individual data. Statistical significance between study groups was labeled as \* for  $p$ -value  $\leq 0.05$ ; \*\*  $p$ -value  $\leq 0.01$ ; \*\*\*  $p$ -value  $\leq 0.001$ .



**Eosinophil phenotype analysis based on the expression of CD193 and CD125.** Blood and sputum eosinophils in all three groups were characterized by the predominance of the CD193+CD125+ profile. Interestingly, we found a decreased level of CD193–CD125+ sputum eosinophils in COPD compared to controls (Figure 4).



**Figure 4.** The distribution of blood ( $n = 10, 11, 14$ ) (A) and sputum (B) ( $n = 8, 9, 13$ ) subpopulations of eosinophils defined by the expression of CD193 and CD125 in control, asthma and COPD groups. The data are presented as median (column), interquartile range (IQR) (whiskers) and individual data (points). Statistical significance between study groups was labeled as \* for  $p$ -value  $\leq 0.05$ ; \*\*  $p$ -value  $\leq 0.01$ ; \*\*\*  $p$ -value  $\leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p$ -value  $\leq 0.0001$ .

### 3.3. Cytokine and Eotaxin Concentrations in Sputum Samples

Protein sputum levels are presented in Table 2. There were no differences in concentrations of IL-5 and eotaxin-3 among the groups.

**Table 2.** Sputum cytokine concentrations in control, asthma and COPD subjects.

	Control ( <i>n</i> = 9)	Asthma ( <i>n</i> = 12)	COPD ( <i>n</i> = 14)	<i>p</i> -Value
IL-5 (pg/mL)	1.95 (1.61–2.27)	1.84 (1–1.99)	2.16 (0.91–2.91)	0.48
Eotaxin-3 (pg/mL)	0.22 (0–0.6)	0 (0–0.13)	0.26 (0–0.7)	0.17
IL-13 (pg/m)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.95
CCL5 (pg/mL)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.09

### 3.4. Correlations between Th2 Inflammation Biomarkers and Eosinophil Phenotype

There was no correlation between blood and sputum eosinophils and IL-5 and eotaxin-3 concentrations in any of the examined groups.

We found no correlations between sputum IL-5 concentration and CD125 expression on sputum or blood eosinophils and between sputum eotaxin-3 concentration and CD193 expression on sputum or blood eosinophils. Moreover, there was no correlation between either IL-5 or eotaxin-3 and CD125+CD193+ eosinophil subpopulation percentage in any of the examined groups.

Total IgE level correlated with sputum CD125–CD193+ eosinophil percentage in the whole group ( $r = 0.44$ ,  $p = 0.041$ ). There was a strong correlation between IgE level and sputum CD125 expression in the asthma group ( $r = 0.79$ ,  $p = 0.036$ ) which was not found in COPD or controls. IgE level did not correlate with IL-5 or eotaxin-3 concentrations or the expression of CD193 on sputum and blood eosinophils in asthma, COPD or control subjects.

## 4. Discussion

This study is, to our knowledge, the first that analyzed eosinophil subsets in the blood and sputum of COPD patients and compared them to asthma and control subjects. We found that the expressions of CD125, CD193, CD14 and CD62L were higher on blood than sputum eosinophils. We discovered a higher number of sputum CD193+ eosinophils and CD66b+ eosinophils in the COPD group compared to controls and CD11b+ eosinophils compared to the asthma group. The results of our study suggest different profiles of polarization of tissue and systemic eosinophils and a distinct phenotype of eosinophils in COPD patients compared to asthma or healthy subjects.

The eosinophil recruitment from systemic circulation to the local site of inflammation requires a series of biochemical and immunological changes in cells manifested by the expression of different surface receptors. The results of our study showed different profiles of surface markers between the blood and sputum eosinophils—we found an increased number of CD125+, CD193+, CD62L+ and CD14+ blood eosinophils compared to sputum eosinophils. Moreover, blood eosinophils' marker expressions were similar across all three groups, suggesting that circulating eosinophils exhibit a low a priori activity level, irrespective of the pathological or normal conditions. Eosinophil activity in the airways depends on the stimulation of cytokines, mediators and antigens located in the lung. However, we found that different eosinophil subpopulations are present already in the blood, which is consistent with findings from another study [17].

The changed expression of surface markers on sputum eosinophils might reflect their increased activity under both normal and pathological inflammatory conditions [25]. According to our observations, bronchial eosinophils of COPD patients are characterized by a higher CD193 and CD66b expression compared to controls and CD11b expression compared to asthma. We believe that the local airway environment modulates the degree of activation of these cells. Upon reaching the airways, the eosinophils come into contact with locally produced mediators and become activated. The primed eosinophils in the airways participate in keeping the lung immune homeostasis and host defense [18]. These tasks are performed by a rapid eosinophil degranulation and the release of cytotoxic proteins and the formation of extracellular eosinophil traps which have the ability to control extracellular pathogens [26].

We observed that both CD193 and CD125 were highly expressed on blood eosinophils compared to sputum eosinophils in controls, COPD and asthma patients. The lower CD193 expression on sputum eosinophils initiated eotaxin-induced CD193 internalization and eosinophil activation in the airways [7]. Interestingly, sputum eosinophils in COPD patients had a higher expression of CD193 compared to controls. This finding is consistent with other studies that showed significantly greater proportions of airway cells expressing CCR3 in COPD and exacerbated chronic bronchitis patients compared with non-smoking controls [27,28]. The exact role of CD193 and CD125 in the pathogenesis of COPD remains unclear. It has been suggested that oxidative stress related to prolonged tobacco smoke exposure stimulates the Th2-like response in COPD pathobiology [29]. In a murine model of asthma, cigarette smoke induced allergic inflammation and was associated with delayed tolerance to inhaled antigens [30]. Cigarette smoke exposure alters the balance between Th1 and Th2 CD4+ T cells in the lung, which is mediated by lipocortin 1 [31]. The Th1 to Th2 shift promotes allergic sensitization whereas Th1 augmentation induces the development of emphysema [31]. In our study, the known eosinophil chemoattractants IL-5 and eotaxin-3 were found at similar levels in COPD, asthma and control subjects and did not correlate with CD125 and CD193 expression, respectively, suggesting other than the classical Th2-related pattern of eosinophil activation in the airways of COPD patients. Although no correlation between IL-5 and sputum eosinophils in asthma was found in other studies [32,33], sputum eotaxin-3 levels significantly correlated with sputum eosinophil counts in severe asthmatic patients [34]. This discrepancy between our results and other studies may be due to the difference in disease severity (no severe asthma in our study), as well as different cut-off points for the definition of eosinophilia (100 cells/ $\mu$ L vs. 300 cells/ $\mu$ L).

CD62L and CD11b are both adhesion molecules that participate in the migration of blood granulocytes to the place of local inflammation in the tissue [35]. CD62L has been shown to be downregulated on sputum eosinophils in asthma and healthy subjects [25,36]. Low CD62L expression was found on activated ("inflammatory") eosinophils [17], which suggests that primed eosinophils lose their ability to migrate to other tissues. The CD62L is detached intravasally before granulocytes migrate from the blood to the airways [37]. Our results confirm that CD62L is shed from eosinophils migrating into the airways also in COPD. However, we did not find any differences in eosinophil CD62L surface expression between COPD, asthma and controls, indicating that altered expression of CD62L is not specific to airway inflammation in obstructive lung diseases. The downregulation of CD62L coincides with the upregulation of CD11b on activated granulocytes [25,35,37]. In our study, we only found increased expression in sputum eosinophils of asthma patients. Of note, the expression of CD11b on blood eosinophils was already high in all groups, which is a sign of eosinophil maturity [38] and suggests that circulating eosinophils are already primed.

The results of our study revealed that CD66b, a surface molecule involved in regulating the adhesion and activation of eosinophils [39], had a higher expression on sputum eosinophils of COPD and asthma patients compared to controls. The upregulation of CD66b in COPD and asthma might be caused by airway microbiome dysbiosis since a higher expression of CD66b on leukocytes has been linked to the homotypic clustering of cells during Gram-positive sepsis [40]. The cross-linking of CD66b by a natural ligand (galectin-3) causes tight cellular adhesion and clustering of CD11b and induces eosinophil effector functions [39]. Although we did not find any significant differences in the expression of CD66b between blood and sputum eosinophils, other authors found that CD66b was upregulated on sputum eosinophils in asthma [25]. In a recent study, CD66b<sup>high</sup>CD15<sup>high</sup> eosinophil levels correlated with blood eosinophil number and IL-5 levels in sputum in allergic asthma with airway eosinophilia [41]. The increased CD66b expression in asthma probably reflects the inflammatory state of eosinophils; however, the role of CD66b in COPD eosinophils needs further evaluation.

The results of our study do not explain the differences in the response to the therapy with anti-IL5 biologicals between COPD and asthma patients, as the CD125 (IL-5 receptor) level was similar in both diseases. However, the differences in phenotypes between sputum

eosinophils in the examined groups might indicate the future direction of personalized therapy in COPD and asthma, e.g., with CCR3 monoclonal antibody.

Our study has some limitations. The analysis of blood and sputum eosinophils in humans has many obstacles which have also been noted by other authors [42], e.g., small amounts of eosinophils compared to other cell types and eosinophil level variability. We included patients on the basis of blood eosinophilia, and all patients but one had low sputum eosinophils counts (<3%). Therefore, we could not characterize the phenotype of eosinophils in COPD patients with a marked sputum eosinophilia and compare it to those with low sputum eosinophil counts. This shortcoming could be limited by including patients based on sputum eosinophilia since blood and sputum eosinophil levels are not correlated [9]. It would also be interesting to study eosinophil phenotypes of severe COPD and asthma patients and to compare them with patients with mild-to-moderate disease. However, severe COPD and asthma patients are often treated with steroids which suppress inflammation. Moreover, we did not evaluate clinical features related to the Th2 pathway, such as bronchodilator responsiveness and fractional exhaled nitric oxide, which could have provided more insight into the study groups and the relationship between clinical and cellular data. Finally, we are aware that the study groups are relatively small. Despite the small study size, we found significant differences in eosinophil phenotypes between the study groups.

## 5. Conclusions

In conclusion, the results of our study suggest different profiles of polarization of airway and systemic eosinophils. The results of our study suggest distinct phenotypes of airway eosinophils in COPD compared to asthma and control patients.

**Author Contributions:** K.G., M.P.-G. and K.M. designed the study. K.G., K.M. and M.P. were responsible for patient recruitment. M.P., M.P.-G. and P.N.-G. performed the cytological and biochemical evaluations. M.P.-G. performed the flow cytometry analysis. K.M. and M.P.-G. performed the data analysis and wrote the first draft. R.K. revised the manuscript for important intellectual content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was partially funded by the National Science Centre, Poland (UMO-2019/35/B/NZ5/00694) and by an internal grant 1WU/1/M/MB/N/20/20 at the Medical University of Warsaw.

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved by the ethics committee of the Medical University of Warsaw (KB/62/A/2020).

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

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References



1. Mycroft, K.; Krenke, R.; Górska, K. Eosinophils in COPD—Current Concepts and Clinical Implications. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2020**, *8*, 2565–2574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Salvo-Romero, E.; Rodiño-Janeiro, B.K.; Albert-Bayo, M.; Lobo, B.; Santos, J.; Farré, R.; Martínez, C.; Vicario, M. Eosinophils in the Gastrointestinal Tract: Key Contributors to Neuro-Immune Crosstalk and Potential Implications in Disorders of Brain-Gut Interaction. *Cells* **2022**, *11*, 1644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lombardi, C.; Berti, A.; Cottini, M. The Emerging Roles of Eosinophils: Implications for the Targeted Treatment of Eosinophilic-Associated Inflammatory Conditions. *Curr. Res. Immunol.* **2022**, *3*, 42–53. [[CrossRef](#)]
4. McBrien, C.N.; Menzies-Gow, A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front. Med.* **2017**, *4*, 93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jackson, D.J.; Akuthota, P.; Roufosse, F. Eosinophils and Eosinophilic Immune Dysfunction in Health and Disease. *Eur. Respir. Rev.* **2022**, *31*, 210150. [[CrossRef](#)]

6. Schwartz, C.; Willebrand, R.; Huber, S.; Rupec, R.A.; Wu, D.; Locksley, R.; Voehringer, D. Eosinophil-Specific Deletion of I $\kappa$ B $\alpha$  in Mice Reveals a Critical Role of NF- $\kappa$ B-Induced Bcl-XL for Inhibition of Apoptosis. *Blood* **2015**, *125*, 3896–3904. [CrossRef]
7. Zimmermann, N.; Rothenberg, M.E. Receptor Internalization Is Required for Eotaxin-Induced Responses in Human Eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *111*, 97–105. [CrossRef]
8. Whetstone, C.E.; Ranjbar, M.; Omer, H.; Cusack, R.P.; Gauvreau, G.M. The Role of Airway Epithelial Cell Alarmins in Asthma. *Cells* **2022**, *11*, 1105. [CrossRef]
9. Proboszcz, M.; Mycroft, K.; Paplińska-Goryca, M.; Górska, K.; Nejman-Gryz, P.; Jankowski, P.; Zak, N.; Krenke, R. Relationship between Blood and Induced Sputum Eosinophils, Bronchial Hyperresponsiveness and Reversibility of Airway Obstruction in Mild-to-Moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD* **2019**, *16*, 354–361. [CrossRef]
10. Lipson, D.A.; Barnhart, F.; Brealey, N.; Brooks, J.; Criner, G.J.; Day, N.C.; Dransfield, M.T.; Halpin, D.M.G.; Han, M.K.; Jones, C.E.; et al. Once-Daily Single-Inhaler Triple versus Dual Therapy in Patients with COPD. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 1671–1680. [CrossRef]
11. Bafadhel, M.; Peterson, S.; De Blas, M.A.; Calverley, P.M.; Rennard, S.I.; Richter, K.; Fagerås, M. Predictors of Exacerbation Risk and Response to Budesonide in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Post-Hoc Analysis of Three Randomised Trials. *Lancet Respir. Med.* **2018**, *6*, 117–126. [CrossRef] [PubMed]
12. Siddiqui, S.H.; Guasconi, A.; Vestbo, J.; Jones, P.; Agusti, A.; Paggiaro, P.; Wedzicha, J.A.; Singh, D. Blood Eosinophils: A Biomarker of Response to Extrafine Beclomethasone/Formoterol in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *192*, 523–525. [CrossRef]
13. Adcock, I.M.; Bhatt, S.P.; Balkissoon, R.; Wise, R.A. The Use of Inhaled Corticosteroids for Patients with COPD Who Continue to Smoke Cigarettes: An Evaluation of Current Practice. *Am. J. Med.* **2022**, *135*, 302–312. [CrossRef] [PubMed]
14. Ortega, H.G.; Liu, M.C.; Pavord, I.D.; Brusselle, G.G.; FitzGerald, J.M.; Chetta, A.; Humbert, M.; Katz, L.E.; Keene, O.N.; Yancey, S.W.; et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1198–1207. [CrossRef]
15. Mkorombindo, T.; Dransfield, M.T. Mepolizumab in the Treatment of Eosinophilic Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* **2019**, *14*, 1779–1787. [CrossRef]
16. Bhatt, S.P.; Rabe, K.F.; Hanania, N.A.; Vogelmeier, C.F.; Cole, J.; Bafadhel, M.; Christenson, S.A.; Papi, A.; Singh, D.; Laws, E.; et al. Dupilumab for COPD with Type 2 Inflammation Indicated by Eosinophil Counts. *N. Engl. J. Med.* **2023**. [CrossRef] [PubMed]
17. Mesnil, C.; Raulier, S.; Paulissen, G.; Xiao, X.; Birrell, M.A.; Pirotton, D.; Janss, T.; Starkl, P.; Ramery, E.; Henket, M.; et al. Lung-Resident Eosinophils Represent a Distinct Regulatory Eosinophil Subset. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 3279–3295. [CrossRef] [PubMed]
18. Kanda, A.; Yun, Y.; Bui, D.V.; Nguyen, L.M.; Kobayashi, Y.; Suzuki, K.; Mitani, A.; Sawada, S.; Hamada, S.; Asako, M.; et al. The Multiple Functions and Subpopulations of Eosinophils in Tissues under Steady-State and Pathological Conditions. *Allergol. Int.* **2021**, *70*, 9–18. [CrossRef] [PubMed]
19. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). 2020. Available online: <http://goldcopd.org/> (accessed on 14 September 2020).
20. Quanjer, P.H.; Stanojevic, S.; Cole, T.J.; Baur, X.; Hall, G.L.; Culver, B.H.; Enright, P.L.; Hankinson, J.L.; Ip, M.S.M.; Zheng, J.; et al. Multi-Ethnic Reference Values for Spirometry for the 3–95-Yr Age Range: The Global Lung Function 2012 Equations. *Eur. Respir. J.* **2012**, *40*, 1324–1343. [CrossRef] [PubMed]
21. GINA. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma—Global Initiative for Asthma—GINA. 2020. Available online: [ginasthma.org](http://ginasthma.org) (accessed on 14 September 2020).
22. Graham, B.L.; Steenbruggen, I.; Miller, M.R.; Barjaktarevic, I.Z.; Cooper, B.G.; Hall, G.L.; Hallstrand, T.S.; Kaminsky, D.A.; McCarthy, K.; McCormack, M.C.; et al. Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2019**, *200*, e70–e88. [CrossRef]
23. Djukanović, R.; Sterk, P.J.; Fahy, J.V.; Hargreave, F.E. Standardised Methodology of Sputum Induction and Processing. *Eur. Respir. J.* **2002**, *20* (Suppl. 37), 1s–2s. [CrossRef]
24. Górska, K.; Paplińska-Goryca, M.; Nejman-Gryz, P.; Goryca, K.; Krenke, R. Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in the Phenotyping of Mild-to-Moderate Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* **2017**, *14*, 181–189. [CrossRef] [PubMed]
25. Tak, T.; Hilvering, B.; Tesselaar, K.; Koenderman, L. Similar Activation State of Neutrophils in Sputum of Asthma Patients Irrespective of Sputum Eosinophilia. *Clin. Exp. Immunol.* **2015**, *182*, 204–212. [CrossRef]
26. Mukherjee, M.; Lacy, P.; Ueki, S. Eosinophil Extracellular Traps and Inflammatory Pathologies—Untangling the Web! *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2763. [CrossRef]
27. Smyth, L.J.C.; Starkey, C.; Gordon, F.S.; Vestbo, J.; Singh, D. CD8 Chemokine Receptors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *154*, 56–63. [CrossRef] [PubMed]
28. Bocchino, V.; Bertorelli, G.; Bertrand, C.P.; Ponath, P.D.; Newman, W.; Franco, C.; Marruchella, A.; Merlini, S.; Del Donno, M.; Zhuo, X.; et al. Eotaxin and CCR3 Are up-Regulated in Exacerbations of Chronic Bronchitis. *Allergy* **2002**, *57*, 17–22.
29. Strzelak, A.; Ratajczak, A.; Adamiec, A.; Feleszko, W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 1033. [CrossRef]

30. Van Hove, C.L.; Moerloose, K.; Maes, T.; Joos, G.F.; Tournoy, K.G. Cigarette Smoke Enhances Th-2 Driven Airway Inflammation and Delays Inhalational Tolerance. *Respir. Res.* **2008**, *9*, 42. [[CrossRef](#)]
31. Bhalla, D.K.; Hirata, F.; Rishi, A.K.; Gairola, C.G. Cigarette Smoke, Inflammation, and Lung Injury: A Mechanistic Perspective. *J. Toxicol. Environ. Health Part B Crit. Rev.* **2009**, *12*, 45–64. [[CrossRef](#)]
32. Kelly, M.M.; Leigh, R.; Carruthers, S.; Horsewood, P.; Gleich, G.J.; Hargreave, F.E.; Cox, G. Increased Detection of Interleukin-5 in Sputum by Addition of Protease Inhibitors. *Eur. Respir. J.* **2001**, *18*, 685–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Marc-Malovrh, M.; Camlek, L.; Škrbat, S.; Kern, I.; Fležar, M.; Dežman, M.; Korošec, P. Elevated Eosinophils, IL5 and IL8 in Induced Sputum in Asthma Patients with Accelerated FEV1 Decline. *Respir. Med.* **2020**, *162*, 105875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Larose, M.-C.; Chakir, J.; Archambault, A.-S.; Joubert, P.; Provost, V.; Laviolette, M.; Flamand, N. Correlation between CCL26 Production by Human Bronchial Epithelial Cells and Airway Eosinophils: Involvement in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *136*, 904–913. [[CrossRef](#)]
35. Lokwani, R.; Wark, P.A.; Baines, K.J.; Fricker, M.; Barker, D.; Simpson, J.L. Blood Neutrophils in COPD but Not Asthma Exhibit a Primed Phenotype with Downregulated CD62L Expression. *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* **2019**, *14*, 2517–2525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Veen, J.C.I.; Grootendorst, D.C.; Bel, E.H.; Smits, H.H.; Van Der Keur, M.; Sterk, P.J.; Hiemstra, P.S. CD11b and L-Selectin Expression on Eosinophils and Neutrophils in Blood and Induced Sputum of Patients with Asthma Compared with Normal Subjects. *Clin. Exp. Allergy* **1998**, *28*, 606–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Stockfelt, M.; Christenson, K.; Andersson, A.; Björkman, L.; Padra, M.; Brundin, B.; Ganguly, K.; Asgeirsdottir, H.; Lindén, S.; Qvarfordt, I.; et al. Increased CD11b and Decreased CD62L in Blood and Airway Neutrophils from Long-Term Smokers with and without COPD. *J. Innate Immun.* **2020**, *12*, 480–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hassani, M.; van Staveren, S.; van Grinsven, E.; Bartels, M.; Tesselaar, K.; Leijte, G.; Kox, M.; Pickkers, P.; Vrisekoop, N.; Koenderman, L. Characterization of the Phenotype of Human Eosinophils and Their Progenitors in the Bone Marrow of Healthy Individuals. *Haematologica* **2020**, *105*, e52–e56. [[CrossRef](#)]
39. Yoon, J.; Terada, A.; Kita, H. CD66b Regulates Adhesion and Activation of Human Eosinophils. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 8454–8462. [[CrossRef](#)]
40. Schmidt, T.; Zündorf, J.; Grüger, T.; Brandenburg, K.; Reiners, A.-L.; Zinserling, J.; Schnitzler, N. CD66b Overexpression and Homotypic Aggregation of Human Peripheral Blood Neutrophils after Activation by a Gram-Positive Stimulus. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *91*, 791–802. [[CrossRef](#)]
41. Curto, E.; Mateus-Medina, É.F.; Crespo-Lessmann, A.; Osuna-Gómez, R.; Ujaldón-Miró, C.; García-Moral, A.; Galván-Blasco, P.; Soto-Retes, L.; Ramos-Barbón, D.; Plaza, V. Identification of Two Eosinophil Subsets in Induced Sputum from Patients with Allergic Asthma According to CD15 and CD66b Expression. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 13400. [[CrossRef](#)]
42. Barnig, C.; Alsaleh, G.; Jung, N.; Dembélé, D.; Paul, N.; Poirot, A.; Uring-Lambert, B.; Georgel, P.; de Blay, F.; Bahram, S. Circulating Human Eosinophils Share a Similar Transcriptional Profile in Asthma and Other Hypereosinophilic Disorders. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141740. [[CrossRef](#)]

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

# Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma—An exploratory study

Katarzyna Mycroft  | Małgorzata Proboszcz | Magdalena Papińska-Goryca  | Rafał Krenke | Katarzyna Górka

Department of Internal Medicine,  
Pulmonary Diseases and Allergy, Medical  
University of Warsaw, Warsaw, Poland

## Correspondence

Katarzyna Mycroft, Department of  
Internal Medicine, Pulmonary Diseases  
and Allergy, Medical University of  
Warsaw, Warsaw, Poland.  
Email: [katarzyna.mycroft@wum.edu.pl](mailto:katarzyna.mycroft@wum.edu.pl)

## Abstract

The role of eosinophilic inflammation in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) remains ambiguous and likely differs from its role in asthma. The molecular processes underlying the differences between eosinophils from asthma and COPD have not been sufficiently studied. The objective of this study was to compare the transcriptomic profiles of blood eosinophils in COPD and asthma. Eosinophils were isolated from peripheral blood drawn from stable mild-to-moderate COPD and asthma patients. RNA was isolated from eosinophils and sequenced using an NGSelect RNA. The prepared libraries were sequenced on an Illumina platform. The study group included five patients with asthma and four patients with COPD. The RNA-Seq data analysis identified 26 differentially expressed genes between COPD and asthma (according to adjusted *p*-value). In total, 6 genes were upregulated (e.g. *CCL3L1*, *CCL4L2*, *GPR82*) and 20 were downregulated (e.g. *JUN*, *IFITM3*, *DUSP1*, *GNG7*) in peripheral eosinophils of COPD patients compared to asthma. The genes associated with signalling of IL-4 and IL-13 pathways were downregulated in COPD eosinophils compared to asthma. In conclusion, blood eosinophils from COPD and asthma patients present different transcriptomic profiles suggesting their different function in pathobiology of both obstructive airway diseases. These differences might indicate the direction of the search of targeted therapy in COPD.

## KEYWORDS

asthma, blood, COPD, eosinophil, IL-13, RNA-Seq, transcriptomic analysis

## 1 | INTRODUCTION

Eosinophils have been traditionally attributed to asthma pathobiology, but growing evidence suggests their involvement in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as well.<sup>1</sup> COPD and asthma

differ in their pathogenesis and clinical course, but they share several clinical and biological features.<sup>2,3</sup> Elevated blood eosinophil counts in asthma and COPD patients are associated with better treatment response to inhaled corticosteroids.<sup>4</sup> However, the efficacy of inhaled corticosteroids ICS in COPD is poorer than in asthma.<sup>5</sup>

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2024 The Author(s). *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by Foundation for Cellular and Molecular Medicine and John Wiley & Sons Ltd.

Moreover, contrary to asthma,<sup>6</sup> therapies targeting eosinophils (e.g. anti-IL5(R)) have not been found effective in COPD.<sup>7</sup>

These differences in response to anti-inflammatory treatment between COPD and asthma patients might be caused by the complexity of immune pathways in the airways.<sup>8</sup> Recent work by our group revealed differences in eosinophil polarization between COPD and asthma patients.<sup>9</sup> However, the molecular processes underlying these differences remain largely unexplored. In recent years, next-generation sequencing (NGS) technologies have provided an in-depth understanding of the eosinophil function at a transcriptional level in various tissues, allowing for comparison of gene expression profiles between different conditions.<sup>10</sup> Since eosinophils constitute a low percentage of blood cells, analysis of their gene expression has been challenging. RNA sequencing (RNA-seq) data analysis has revealed differences between the transcriptional profiles of eosinophils located in different tissues such as blood,<sup>11</sup> adipose tissue,<sup>11</sup> lung or bone marrow.<sup>12</sup>

It has been shown that circulating eosinophils from asthmatics vary from those of healthy controls in their gene expression profile and eosinophils from patients with different hypereosinophilic conditions exhibit similar gene expression profile.<sup>13</sup> Yun et al. demonstrated that eosinophilic COPD and eosinophilic asthma share a similar blood transcriptomic profile with overlapping eosinophil-specific gene expression.<sup>14</sup> Conversely, George et al. reported that transcriptional profiles of bronchial brushes in eosinophilic COPD and asthma showed little overlap with *CST1* being the only gene associated with blood eosinophils count.<sup>15</sup> These contradictory results could be explained by the use of different biological samples, such as blood versus epithelial brush. Alternatively, they might indicate the complexity of molecular mechanisms of inflammation in COPD and asthma.

The transcriptional profiles of isolated peripheral eosinophils of COPD and asthma patients have not yet been compared. Therefore, the present study was aimed to compare the mRNA expression profiles of blood eosinophils in COPD and asthma to minimize the interference from other cell types.

## 2 | RESULTS AND DISCUSSION

### 2.1 | Patients

Initially, 25 patients were recruited, but 16 samples were excluded due to low RNA concentration and unsuccessful library generation. The final study group included five patients with asthma and four patients with COPD. All subjects were White. Among the assessed variables, only smoking status was significantly different between these two groups (Table S1). We found that among patients with inadequate RNA quality the majority (62.5%) were current smokers, whereas among patients with adequate RNA quality, current smokers constituted only 11%. This suggests that current smoking might have impacted eosinophil RNA quality and integrity. It is well known that smoking significantly impacts pattern of mRNA expression

TABLE 1 Subject characteristics.

	COPD (n=4)	Asthma (n=5)	p
Age (years)	68.5 (59–73)	66 (47–72)	0.62
Gender (f/m)	1/3	3/2	0.36
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.5 (27.2–35)	32.5 (28.4–32.7)	0.90
FEV <sub>1</sub> (L)	2.0 (1.77–2.5)	2.7 (2.4–3.5)	0.39
FEV <sub>1</sub> (% pred.)	69.5 (64–76.5)	88 (84–99)	0.027
Packyears	40 (30–80)	0	0.01
Atopy, n	0	2	0.22
Eosinophils, n	237.6 (129–354)	160 (141–311)	0.71
Eosinophils, %	3.5 (1.5–5.0)	2 (1.5–5.1)	0.80

Note: Data are presented as median (interquartile range) or number.

and induces cytotoxic, mutagenic and oxidative stress effects on cells.<sup>16</sup> Cigarette smoke contains over 7000 chemicals, including well-characterized ones such as acrolein, formaldehyde, acetaldehyde, which could impair RNA stability and integrity.<sup>16</sup> Data on RNA quality, concentration and eosinophil numbers in each subject are presented in Table S2. The subjects' characteristics are presented in Table 1. At the time of the study, none of the COPD patients were receiving ICS, three of the five asthma patients were on low-dose ICS, and none of the studied patients received biological treatment or oral steroids. The COPD patients were all but one ex-smokers, the median smoking load of 40 (IQR 30–80) pack-years (Table 1).

### 2.2 | RNA-seq analysis

The RNA-Seq data analysis identified 26 differentially expressed genes (DEGs) between COPD and asthma (according to adjusted *p*-value). In total, 6 genes were upregulated and 20 were downregulated in eosinophils of COPD patients compared to asthma (Table 2).

The most strongly upregulated genes in COPD (2.40-fold change and 2.35-fold change, respectively) were *CCL3L1* and *CCL4L2*, which encode chemokines. Dot plots showing the transcripts per million (TPM) values of *CCL3L1* and *CCL4L2* in COPD and asthma patients are presented in Figure 1. *CCL3L1* and *CCL4L2* expression is largely driven by copy number variation which is dependent on race.<sup>17</sup> However, in the present study we found that all COPD subjects had increased expression levels of both genes compared to asthma. Interestingly, we found that *CCL3L1*, but not *CCL3*, was upregulated in eosinophils of COPD patients. Both *CCL3L1* and *CCL3* are isoforms of macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), with the former exhibiting a sixfold greater affinity to the receptor CCR5.<sup>17</sup> MIP-1 $\alpha$ -CCR5 binding is linked to the processes associated with tight junction injury in the airway epithelium in COPD.<sup>18</sup> CCR5 also serves as a receptor for MIP-1 $\beta$  encoded by i.a. *CCL4L2* which in our study was found to be upregulated in COPD patients. Both MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  are monocyte and macrophage chemoattractants. It has been shown that MIP-1 $\alpha$  plays a negligible role as an eosinophil chemoattractant,<sup>19</sup> unlike



**TABLE 2** Genes significantly up- or downregulated in blood eosinophils of patients with COPD compared to asthma. Genes downregulated in COPD are at the same time upregulated in asthma and vice versa.

	Gene symbol	Gene name	Protein function	Fold change	Adjusted p-value
Genes significantly upregulated in COPD	<i>CCL3L1</i>	C-C motif chemokine ligand 3 like 1	Chemokine	2.40	0.0048
	<i>CCL4L2</i>	C-C motif chemokine ligand 4 like 2	Chemokine	2.35	0.0555
	<i>RSAD2</i>	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Antiviral response and innate immune signalling	2.23	0.0250
	<i>SERPINB2</i>	Plasminogen activator inhibitor 2	Protease inhibitor	2.21	0.0763
	<i>PRSS21</i>	Serine protease 21	Serine protease	2.21	0.0636
	<i>GPR82</i>	G protein-coupled receptor 82	G-protein coupled receptor	2.01	0.0930
Genes significantly upregulated in asthma	<i>SCARF1</i>	Scavenger receptor class F member 1	Membrane traffic protein	-2.02	0.0620
	<i>ENSG00000263244</i>			-2.03	0.0555
	<i>ZNF467</i>	Zinc finger protein 467	C2H2 zinc finger transcription factor	-2.04	0.0816
	<i>ENSG00000272916</i>		lncRNA	-2.04	0.0556
	<i>LINC02035</i>	Long intergenic non-protein coding RNA 2035	lncRNA	-2.07	0.0717
	<i>NOL4L</i>	Nucleolar protein 4 like	Nuclear protein, RNA binding	-2.16	0.0897
	<i>JUNB</i>	Transcription factor jun-B	Basic leucine zipper transcription factor	-2.17	0.0477
	<i>BCL6</i>	B-cell lymphoma 6 protein	C2H2 zinc finger transcription factor	-2.17	0.0897
	<i>PELATON</i>	Plaque enriched lncRNA in atherosclerotic and inflammatory bowel macrophage regulation	lncRNA	-2.20	0.0625
	<i>ENSG00000268903</i>		Pseudogene	-2.22	0.0897
	<i>CNTNAP3</i>	Contactin-associated protein-like 3	Cell adhesion molecule	-2.22	0.0897
	<i>LINC00963</i>		lncRNA	-2.30	0.0636
	<i>GNG7</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-7	Heterotrimeric G-protein	-2.34	0.0477
	<i>ENSG00000280138</i>		Uncategorized gene	-2.34	0.0048
	<i>ENSG00000228327</i>	General transcription factor Ili (GTF2I) pseudogene	Pseudogene	-2.35	0.0556
	<i>SLC25A37</i>	Mitoferrin-1	Mitochondrial iron transporter	-2.40	0.0556
	<i>ZNF107</i>	Zinc finger protein 107	C2H2 zinc finger transcription factor	-2.41	0.0556
	<i>DUSP1</i>	Dual specificity protein phosphatase 1	Protein phosphatase	-2.42	0.0477
	<i>IFITM3</i>	Interferon induced transmembrane protein 3	Defence/immunity protein	-3.26	0.0015
	<i>JUN</i>	Transcription factor AP-1	Basic leucine zipper transcription factor	-3.30	0.0015

Abbreviation: lncRNA, long non-coding RNA.

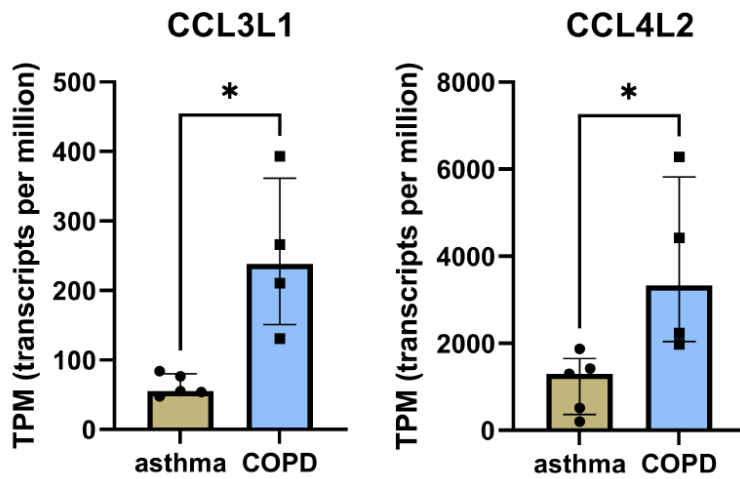


FIGURE 1 Dot plots showing the expression of *CCL3L1* and *CCL4L2* in COPD and asthma patients.

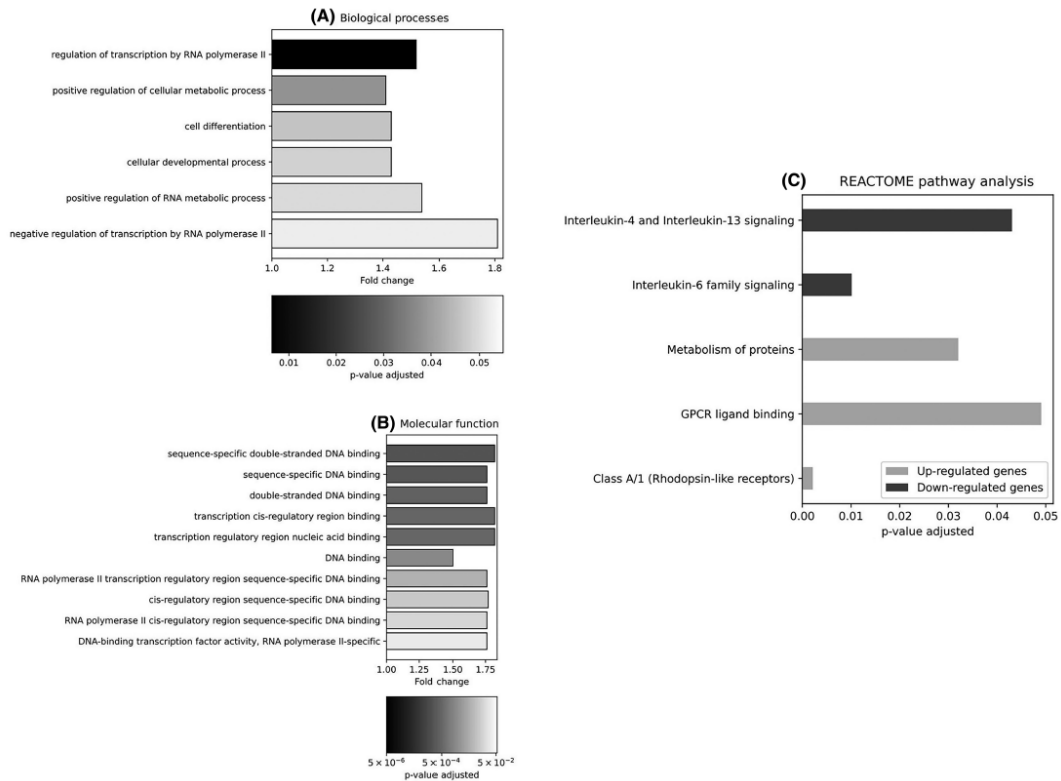


FIGURE 2 (A, B) Gene ontology analysis of the downregulated genes selected among 10% of genes with the lowest *p*-value. The bar chart showing the GO terms for biological processes (A) and molecular function. (B) The x-axis represents the fold change. (C) The REACTOME significantly enriched pathways among the top 10% of genes (up- and downregulated analysed separately). Analysis according to the adjusted *p*-value.

MIP-1 $\beta$ .<sup>20</sup> Increased expression of MIP-1 $\alpha$  in COPD patients has been linked to cigarette smoke exposure.<sup>18</sup> However, the MIP-1 $\beta$  isoform encoded by *CCL4L2* has an unknown affinity to CCR5

and its biological function has not been studied.<sup>21</sup> The upregulated mRNA expression of *CCL3L1* in COPD eosinophils found in our study may suggest that in COPD eosinophils attract macrophages

into the lungs rather than drive local eosinophilic inflammation. This finding underscores the different function of eosinophils in asthma and COPD pathobiology and might explain different ICS-sensitivity of patients with COPD and asthma. Keeping in mind a small sample size in this analysis, these results should be interpreted carefully and confirmed in larger cohorts.

Other genes upregulated in COPD eosinophils in our study include protease inhibitor (*SERPINB2*), serine protease (*PRSS21*) and G-protein coupled receptor (*GPR82*). Of these, *GPR82* has previously been identified as an eosinophil signature gene,<sup>22</sup> but in fact, its role in the pathogenesis of eosinophilic inflammation remains unknown. *SERPINB2* upregulation in COPD patients found in our study is surprising. *SERPINB2* is typically induced by IL-13 and elevated in eosinophilic asthma patients.<sup>23,24</sup> In COPD however, the *SERPINB2* expression was found not to be different between eosinophilic and non-eosinophilic COPD patients.<sup>25</sup> Although *SERPINB2* is known to be downregulated with corticosteroid treatment,<sup>24</sup> additional analysis did not reveal significant differences in expression level between asthmatics receiving ICS and those without ICS ( $p=0.39$ ). However, these results must be interpreted with caution due to the low sample size included in our study.

The two most strongly upregulated genes (over 3-fold) in asthmatic eosinophils revealed in our analysis, *JUN* and *IFITM3*, have already been reported to be involved in asthma pathogenesis. *IFITM3* belongs to the *IFITM* family which encodes homologous proteins localized in the plasma and endolysosomal membranes. It has been shown that *IFITM* deficiency reduces allergic inflammation in a murine model of asthma.<sup>26</sup> Moreover, increased expression of *JUN* in PBMC, the transcription factor known to upregulate other inflammatory genes has been previously observed in patients with severe asthma compared to mild-to-moderate asthma or healthy controls.<sup>27</sup> The protein encoded by *JUN* is involved in MAPK signalling cascades<sup>28</sup> and might contribute to severe asthma pathogenesis by causing corticosteroid resistance.<sup>29</sup> Interestingly, we found upregulation of *DUSP1* in asthma patients which might suggest an expectation of downregulated *JUN* expression, as *DUSP1* attenuates MAPK signalling cascade. Our study implies that MAPK signalling in eosinophils is complex and dependent on many signal inducers. Moreover, *DUSP1* upregulation is known to be induced by ICS treatment.<sup>28</sup> Although *DUSP1* expression trended higher in ICS-users ( $n=3$ ) compared to ICS-non-users ( $n=6$ ), it did not achieve statistical significance ( $p=0.09$ ), probably due to the small sample size. Other genes downregulated in eosinophils of COPD compared to asthma patients in our study encoded membrane proteins (*GNG7*, *CNTNAP3*, *SCARF1*) and transcription factors (*ZNF107*, *BCL6*, *JUNB*, *ZNF467*). A volcano plot was used to visually present the detailed analysis of differentially expressed genes between blood eosinophils from COPD and asthma patients (Figure S1).

### 2.3 | Enrichment and pathway analyses

The Gene Ontology (GO) enrichment analysis of the downregulated genes in COPD versus asthma eosinophils revealed

association with negative regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0000122), positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254) and cell differentiation (GO:0030154) (Figure 2A). The molecular function terms of the downregulated genes in COPD versus asthma eosinophils were associated with DNA binding (GO:0003677), including: DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific (GO:0000981), RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding (GO:0000978) and RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding (GO:0000977) (Figure 2B). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis did not reveal any significantly overrepresented pathways. However, REACTOME pathway analysis indicated five overrepresented pathways (three for the upregulated and two for the downregulated genes) in COPD compared to asthma eosinophils (Figure 2C). Significant associations were found with pathways involving Rhodopsin-like receptors, G protein-coupled receptors (GPCR) ligand binding and metabolism of proteins (for the upregulated genes) and signalling of IL-6 family, IL-4 and IL-13 (for the downregulated genes) in COPD eosinophils. IL-4 and IL-13, alongside IL-5 are the key cytokines in type 2 (Th2) inflammation. Our results confirm that Th2 inflammation is an important pathway in asthma pathophysiology but to a lesser extent in COPD. Similar conclusions were made by other authors suggesting that the differences in the transcriptional profiles in COPD and asthma patients might reflect different mechanisms driving eosinophilic inflammation in COPD.<sup>20</sup> On the other hand, the promising results of a recent dupilumab trial among severe eosinophilic COPD patients<sup>30</sup> suggests greater involvement of IL-4/IL-13 genes and therefore of the Th2 pathway in COPD pathobiology.

### 3 | LIMITATIONS

The analysis of transcriptomic profiles of peripheral eosinophils in humans is challenging due to their low number in the circulation and the difficulty to obtain high-quality RNA as reported by other authors.<sup>13</sup> Even though elevated blood eosinophil levels  $\geq 300$  cells/ $\mu$ L are found in up to 24% of COPD, significant eosinophilia is rare in COPD. Moreover, eosinophil levels can vary throughout the day and between stable and exacerbated state of the disease.<sup>1</sup> Some authors overcame these difficulties by analysing the whole blood and identifying eosinophilic gene signatures.<sup>14</sup> In our study, we attempted the single cell eosinophilic analysis as a more precise and detailed evaluation of eosinophil function in COPD versus asthma. However, we did not assess the associations between eosinophil gene expression and the microenvironment (e.g. cytokine levels) which could have impacted the transcriptional profiles of eosinophils. Eosinophil gene expression is also dependent on the activation status which was not evaluated in the present study. Moreover, corticosteroid treatment profoundly impacts has a huge impact on the gene

expression; it is estimated that between 1000 and 2000 genes are regulated by the glucocorticoid receptor.<sup>31</sup> Patients included to our study were treated with low-dose ICS, and it is known that only a small fraction of them enters the bloodstream. On the other hand, patients on ICS treatment are more symptomatic and have a higher level of inflammatory mediators. Bearing in mind the possible impact of ICS on mRNA expression further evaluation of the results in untreated patients is needed. Finally, we are aware that the results of the present study are hampered by the small sample size. Considering the exploratory character of this study, the evaluation of these results in larger group and verification with other methods (PCR) will be needed in the future.

## 4 | CONCLUSIONS

Peripheral eosinophils from COPD and asthma patients exhibit distinct transcriptomic profiles suggesting their different function in pathobiology of both obstructive airway diseases.

In COPD, eosinophils show upregulation of CCL3L1 and CCL4L2, potentially promoting macrophage-mediated inflammation with less involvement in Th2 inflammation. These differences might indicate the direction of the search of targeted therapy in COPD.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Katarzyna Mycroft:** Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (lead); methodology (supporting); visualization (lead); writing – original draft (lead). **Małgorzata Proboszcz:** Investigation (equal); methodology (equal); writing – review and editing (equal). **Magdalena Paplińska-Goryca:** Conceptualization (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); supervision (equal); writing – review and editing (equal). **Rafał Krenke:** Supervision (equal); validation (equal); writing – review and editing (equal). **Katarzyna Górka:** Conceptualization (equal); formal analysis (equal); supervision (equal); writing – review and editing (equal).

### FUNDING INFORMATION

This research was partly funded by the National Science Centre, Poland (UMO-2019/35/B/NZ5/00694).

### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The RNA-Seq data were uploaded to GEO Omnibus (reference no. GSE237284).

### ORCID

Katarzyna Mycroft  <https://orcid.org/0000-0002-3953-3715>

Magdalena Paplińska-Goryca  <https://orcid.org/0000-0003-0576-7289>

## REFERENCES

1. Mycroft K, Krenke R, Gorska K. Eosinophils in COPD-current concepts and clinical implications. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(8):2565-2574.
2. Proboszcz M, Mycroft K, Paplińska-Goryca M, et al. Relationship between blood and induced sputum eosinophils, bronchial Hyperresponsiveness and reversibility of airway obstruction in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. *COPD.* 2019;16(5-6):354-361.
3. Gorska K, Paplińska-Goryca M, Nejman-Gryz P, Goryca K, Krenke R. Eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in the phenotyping of mild-to-moderate asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *COPD.* 2017;14(2):181-189.
4. Bafadhel M, Peterson S, De Blas MA, et al. Predictors of exacerbation risk and response to budesonide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis of three randomised trials. *Lancet Respir Med.* 2018;6(2):117-126.
5. Quint JK, Ariel A, Barnes PJ. Rational use of inhaled corticosteroids for the treatment of COPD. *NPJ Prim Care Respir Med.* 2023;33(1):27.
6. 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.
7. Mkorombindo T, Dransfield MT. Mepolizumab in the treatment of eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2019;14:1779-1787.
8. Lea S, Higham A, Beech A, Singh D. How inhaled corticosteroids target inflammation in COPD. *Eur Respir Rev.* 2023;32(170):230084.
9. Mycroft K, Paplińska-Goryca M, Proboszcz M, Nejman-Gryz P, Krenke R, Górka K. Blood and sputum eosinophils of COPD patients are differently polarized than in asthma. *Cells.* 2023;12(12):1631.
10. Rabbani B, Nakaoka H, Akhondzadeh S, Tekin M, Mahdih N. Next generation sequencing: implications in personalized medicine and pharmacogenomics. *Mol BioSyst.* 2016;12(6):1818-1830.
11. Shah M, Knights AJ, Vohralik EJ, Psaila AM, Quinlan KGR. Blood and adipose-resident eosinophils are defined by distinct transcriptional profiles. *J Leukoc Biol.* 2023;113(2):191-202.
12. Grace JO, Malik A, Reichman H, Munitz A, Barski A, Fulkerson PC. Reuse of public, genome-wide, murine eosinophil expression data for hypotheses development. *J Leukoc Biol.* 2018;104(1):185-193.
13. Barnig C, Alsaleh G, Jung N, et al. Circulating human eosinophils share a similar transcriptional profile in asthma and other hypereosinophilic disorders. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141740.
14. Yun JH, Chase R, Parker MM, et al. Peripheral blood gene expression signatures of eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;61(3):398-401.
15. George L, Taylor AR, Esteve-Codina A, et al. Blood eosinophil count and airway epithelial transcriptome relationships in COPD versus asthma. *Allergy.* 2020;75(2):370-380.
16. Sołtysiak M, Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stępień P, et al.  $\beta$ -Escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death. *Biomed Pharmacother.* 2024;170:115924.
17. Adewoye AB, Shrine N, Odenthal-Hesse L, et al. Human CCL3L1 copy number variation, gene expression, and the role of the CCL3L1-CCR5 axis in lung function. *Wellcome Open Res.* 2018;3:13.
18. Yu W, Ye T, Ding J, et al. miR-4456/CCL3/CCR5 pathway in the pathogenesis of tight junction impairment in chronic obstructive pulmonary disease. *Front Pharmacol.* 2021;12:551839.
19. Larose M-C, Archambault A-S, Provost V, Laviolette M, Flamand N. Regulation of eosinophil and group 2 innate lymphoid cell trafficking in asthma. *Front Med.* 2017;4:136.
20. Kobayashi Y, Konno Y, Kanda A, et al. Critical role of CCL4 in eosinophil recruitment into the airway. *Clin Exp Allergy.* 2019;49(6):853-860.

21. Colobran R, Pedrosa E, Carretero-Iglesia L, Juan M. Copy number variation in chemokine superfamily: the complex scene of CCL3L-CCL4L genes in health and disease. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(1):41-52.
22. Choy DF, Jia G, Abbas AR, et al. Peripheral blood gene expression predicts clinical benefit from anti-IL-13 in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):1230-1233.
23. Southworth T, Van Geest M, Singh D. Type-2 airway inflammation in mild asthma patients with high blood eosinophils and high fractional exhaled nitric oxide. *Clin Transl Sci*. 2021;14(4):1259-1264.
24. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(40):15858-15863.
25. Higham A, Beech A, Wolosianka S, et al. Type 2 inflammation in eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *Allergy*. 2021;76(6):1861-1864.
26. Yáñez DC, Ross S, Crompton T. The IFITM protein family in adaptive immunity. *Immunology*. 2020;159(4):365-372.
27. Bi J, Min Z, Yuan H, et al. PI3K inhibitor treatment ameliorates the glucocorticoid insensitivity of PBMCs in severe asthma. *Clin Transl Med*. 2020;9(1):22.
28. Hoppstädter J, Ammit AJ. Role of dual-specificity phosphatase 1 in glucocorticoid-driven anti-inflammatory responses. *Front Immunol*. 2019;10:1446.
29. Mitani A, Azam A, Vuppusetty C, Ito K, Mercado N, Barnes PJ. Quercetin restores corticosteroid sensitivity in cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res*. 2017;43(9-10):417-425.
30. Bhatt SP, Rabe KF, Hanania NA, et al. Dupilumab for COPD with type 2 inflammation indicated by eosinophil counts. *N Engl J Med*. 2023;389:205-214.
31. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J*. 2002;16(1):61-71.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Mycroft K, Proboszcz M, Paplińska-Goryca M, Krenke R, Górska K. Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma—An exploratory study. *J Cell Mol Med*. 2024;28:e70110. doi:[10.1111/jcmm.70110](https://doi.org/10.1111/jcmm.70110)

## 7. Podsumowanie

Przedstawiony w rozprawie cykl publikacji zawiera omówienie dotychczasowego stanu wiedzy na temat roli eozynofilów w POChP oraz szczegółową analizę fenotypu oraz profilu transkrypcyjnego eozynofilów w chorobach obturacyjnych płuc. Do badań włączono chorych na POChP, astmę oraz grupę kontrolną bez chorób układu oddechowego.

W pracy pt. *Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications* (doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017) przedstawiono mechanizmy związane z rozwojem eozynofilowego zapalenia w drogach oddechowych w POChP oraz omówiono możliwy wpływ tego typu zapalenia na przebieg POChP. Następnie, przeanalizowano dostępną literaturę na temat liczby eozynofilów we krwi obwodowej jako biomarkera. Mimo, że istnienie zależności między liczbą eozynofilów we krwi obwodowej a liczbą eozynofilów w drogach oddechowych jest kwestią niejednoznaczną, a sama liczba eozynofilów we krwi nie jest parametrem stabilnym, to została udowodniona zależność między odpowiedzią na wGKS a liczbą eozynofilów we krwi u chorych z zaostrzeniami.

W badaniu pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma* (doi: 10.3390/cells12121631) wykazano, że eozynofile we krwi charakteryzowały się zwiększoną ekspresją CD125, CD193, CD62L i CD14 w porównaniu z eozynofilami w płwocinie indukowanej w grupie chorych na POChP, astmę oraz w grupie kontrolnej, co sugeruje zmianę fenotypu eozynofilów po rekrutacji do dróg oddechowych niezależnie od rozpoznania.

Stwierdzono, że eozynofile we krwi charakteryzowały się zwiększoną ekspresją CD125+, CD193+, CD62L i CD14+ w porównaniu z eozynofilami w płwocinie we wszystkich badanych grupach. Ekspresja CD11b była zwiększona na eozynofilach płwociny indukowanej w porównaniu do eozynofilów we krwi [99,4 (98,8–100,0)% vs 96,9 (82,6–98,8)%,  $p = 0,002$ ], ale tylko w grupie chorych na astmę. Ekspresja CD66b była taka sama na eozynofilach krążących i w drogach oddechowych. Stwierdzono, że profil ekspresji markerów na eozynofilach płwociny POChP różnił się od profilu w innych grupach. Wykazano zwiększony odsetek eozynofilów CD193+ w płwocinie u chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio 48,1 [29,8–69,3]% vs. 18,7 [11,6–32,8]%,  $p = 0,028$ ), wyższy odsetek eozynofilów CD66b+ w płwocinie u chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną (67,9 [59,9–75,7]% vs. 39,1 [25,6–58,4]% oraz w astmie w porównaniu do grupy

kontrolnej ( $p = 0,024$ ),  $p = 0,036$ ) oraz obniżony poziom eozynofilów CD11b+ w płwocinie w POChP w porównaniu z astmą (odpowiednio 97,9 [96,6–99,1]% vs. 99,4 [98,9–100]%,  $p = 0,009$ ).

Następnie subpopulacje eozynofilów scharakteryzowano poprzez ekspresję pary markerów: CD125 i CD193. We wszystkich trzech grupach eozynofile we krwi i płwocinie charakteryzowały się przewagą profilu CD193+CD125+. Co ciekawe, stwierdzono obniżony poziom eozynofilów CD193-CD125+ w płwocinie u chorych na POChP w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki naszego badania sugerują różną polaryzację eozynofilów tkankowych i ogólnoustrojowych oraz różnice w subpopulacjach eozynofilów u chorych na POChP w porównaniu z astmą lub osobami zdrowymi.

W żadnej z badanych grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy liczbą eozynofilów we krwi i płwocinie a stężeniem IL-5 i eotaksyny-3. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem IL-5 w płwocinie a ekspresją CD125 na eozynofilach w płwocinie lub krwi oraz pomiędzy stężeniem eotaksyny-3 w płwocinie a ekspresją CD193 na eozynofilach w płwocinie lub krwi. Co więcej, w żadnej z badanych grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy IL-5 lub eotaksyną-3 a odsetkiem subpopulacji eozynofilów CD125+CD193+. Poziom całkowitego IgE korelował z odsetkiem eozynofilów CD125-CD193+ w płwocinie w całej grupie ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,041$ ). W grupie chorych na astmę stwierdzono silną korelację pomiędzy poziomem IgE a ekspresją CD125 w płwocinie ( $r = 0,79$ ,  $p = 0,036$ ), której nie stwierdzono w grupie chorych na POChP ani w grupie kontrolnej. Poziom IgE nie korelował ze stężeniem IL-5, eotaksyny-3 ani ekspresją CD193 w płwocinie i eozynofilach we krwi u pacjentów z astmą, POChP i grupą kontrolną.

Analiza transkryptomu eozynofilów we krwi obwodowej w pracy pt. *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study* (doi: 10.1111/jcmm.70110) pozwoliła zidentyfikować 26 genów o zróżnicowanej ekspresji mRNA pomiędzy POChP a astmą, co może sugerować odmienną funkcję biologiczną eozynofilów w obu jednostkach chorobowych. mRNA genów o najsilniej zwiększonej ekspresji w POChP były *CCL3L1* i *CCL4L2* kodujące chemokiny. Ekspresja mRNA obu genów była wyższa u wszystkich chorych na POChP w porównaniu do chorych na astmę. Co więcej, stwierdzono, że ekspresja *CCL3L1*, ale nie *CCL3*, była podwyższona w eozynofilach pacjentów z POChP. Zarówno *CCL3L1*, jak i *CCL3* są izoformami białka

zapalnego makrofagów 1  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ), przy czym ta pierwsza ma 6-krotnie większe powinowactwo do receptora CCR5. Wiązanie MIP-1 $\alpha$  – CCR5 bierze udział w procesach związanych z uszkodzeniem połączeń ścisłych w nabłonku dróg oddechowych w POChP. CCR5 jest także receptorem dla MIP-1 $\beta$  kodowanym m.in. przez *CCL4L2*, którego ekspresja w naszym badaniu okazała się zwiększona u pacjentów z POChP. Zarówno MIP-1 $\alpha$ , jak i MIP-1 $\beta$  są chemoatraktantami monocytów i makrofagów. Stwierdzona w niniejszej pracy zwiększona ekspresja mRNA *CCL3L1* w eozynofilach u chorych na POChP może sugerować, że rolą eozynofilów w POChP jest przyciąganie makrofagów do płuc, a nie promowanie zapalenia eozynofilowego w drogach oddechowych. Może to wskazywać na odmienną funkcję eozynofilów w patobiologii astmy w porównaniu do POChP oraz może wyjaśniać różną wrażliwość na wGKS u pacjentów z POChP i astmą.

Analiza szlaków REACTOME dla genów o obniżonej ekspresji w POChP wskazała nadreprezentację szlaku związanego z IL-4 i IL-13. IL-4 i IL-13, obok IL-5, są kluczowymi cytokinami w zapaleniu typu 2 (Th2). Powyższe wyniki potwierdzają, że zapalenie Th2 jest ważnym szlakiem w patofizjologii astmy, a w mniejszym stopniu w POChP.



## 8. Wnioski

1. Przeprowadzone badania pozwoliły na wykazanie różnic między ekspresją wybranych cząsteczek na powierzchni eozynofilów u chorych na POChP i astmę oraz wskazanie genów różnicujących między POChP a astmą.
2. Przegląd literatury światowej szeroko opisuje funkcję biologiczną eozynofilów w warunkach fizjologicznych oraz w patofizjologii i leczeniu POChP. Szlaki immunologiczne związane z eozynofilami mogą prowadzić do rozwoju rozedmy, a eozynofilowy typ zapalenia w drogach oddechowych wiąże się z większym ryzykiem zaostrzeń. Podwyższona liczba eozynofilów, szczególnie  $\geq 300$  komórek/ $\mu\text{l}$ , związana jest z lepszą odpowiedzią na glikokortykosteroidy wziewne oraz niektóre leki biologiczne, np. na dupilumab u chorych z zaostrzeniami.
3. Wykazano, że we wszystkich badanych grupach eozynofile we krwi charakteryzowały się zwiększoną ekspresją CD125, CD193, CD62L i CD14 w porównaniu z eozynofilami w płwocinie indukowanej, co sugeruje zmianę fenotypu eozynofilów po rekrutacji do dróg oddechowych niezależnie od rozpoznania.
4. W grupie chorych na POChP zaobserwowano wyższy odsetek eozynofilów CD193+ i CD66b+ w płwocinie indukowanej w porównaniu z grupą kontrolną oraz wyższy odsetek eozynofilów CD11b+ w porównaniu z grupą chorych na astmę. Ekspresja CD125, CD62L, CD14 była podobna we wszystkich badanych grupach, zarówno we krwi obwodowej, jak i w płwocinie indukowanej.
5. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją CD125 na eozynofilach w płwocinie lub krwi a stężeniem IL-5 w płwocinie oraz pomiędzy ekspresją CD193 na eozynofilach w płwocinie lub krwi oraz pomiędzy stężeniem eotaksyny-3 w płwocinie. Co więcej, w żadnej z badanych grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy IL-5 lub eotaksyną-3 a odsetkiem subpopulacji eozynofilów CD125+CD193+.
6. Analiza mRNA eozynofilów we krwi obwodowej pozwoliła zidentyfikować różnice w profilu transkrypcyjnym pomiędzy POChP a astmą, co może sugerować odmienną funkcję biologiczną eozynofilów w obu jednostkach chorobowych.

## 9. Opinia Komisji Bioetycznej



### Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 6  
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/...../2020

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym  
w dniu 13 stycznia 2019 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

**Dr hab. n. med. Katarzyna Górską**  
**Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii**  
**ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa**

**dotyczącym:** wyrażenia opinii w sprawie badania pt.: „Ocena profilu molekularnego i fenotypu eozynofili w krwi i drogach oddechowych u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc.”

#### wyraża następującą o p i n i ę

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi\*.
- ~~stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.\*~~

#### Uwagi Komisji – *verte*

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.  
Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej

  
Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz


\*niepotrzebne skreślić

strona podpisowa do uchwały Komisji Bioetycznej przy Warszawskim  
Uniwersytecie Medycznym nr KB/.....<sup>4</sup>..... z dnia 13 stycznia 2019r.

1. Prof. dr hab. n.med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz



2. Dr hab. n. med. Tomasz Grzela



3. Dr hab. n. med. Andrea Horvath-Stolarczyk



4. Prof. dr hab. n. med. Paweł Piątkiewicz



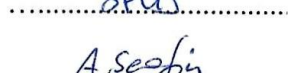
5. Dr hab. n. med. Marek Postuła



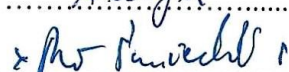
6. Prof. dr hab. n. med. Marcin Ufnal



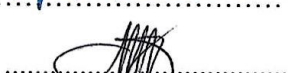
7. Dr hab. n. farm. Sylwia Flis



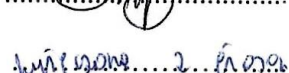
8. Dr n. med. Agnieszka Serafin



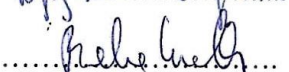
9. Ks. Paweł Śmierzchalski



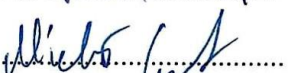
10. Prof. dr hab. Maria Boratyńska



11. Prof. Joanna Domagała-Kulawik



12. Dr hab. n.med. Barbara Grzechocińska



13. Dr hab. n. med. Michał Grąt



## 10. Oświadczenia współautorów publikacji

Lek. Katarzyna Mycroft-Rzeszotarska


Warszawa, 26.09.2024 r.

### OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications* (doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował opracowanie koncepcji i planu manuskryptu, pracę nad tekstem manuskryptu oraz merytoryczne poprawki. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 60%.

Jako współautorka pracy pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma* (doi: 10.3390/cells12121631) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował pozyskanie źródeł finansowania badania, opracowanie koncepcji badania, rekrutację chorych, oznaczenia laboratoryjne, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 50%.

Jako współautorka pracy pt. *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study* (doi: 10.1111/jcmm.70110) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował pozyskanie źródeł finansowania badania, opracowanie koncepcji badania, rekrutację chorych, oznaczenia laboratoryjne, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 55%.

  
(podpis oświadczającego)

**Dr hab. n. med. Katarzyna Górka**

Warszawa, 25.09.2024 r.

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications* (doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował opracowanie koncepcji i planu manuskryptu, pracę nad tekstem manuskryptu oraz merytoryczne poprawki. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 30%.

Jako współautorka pracy pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma* (doi: 10.3390/cells12121631) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował pozyskanie źródeł finansowania badania, opracowanie koncepcji badania, rekrutację chorych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 20%.

Jako współautorka pracy pt. *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study* (doi: 10.1111/jcmm.70110) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował pozyskanie źródeł finansowania badania, opracowanie koncepcji badania, rekrutację chorych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 20%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej.

dr hab. n. med. KATARZYNA GÓRSKA  
specjalista chorób wewnętrznych  
specjalista chorób płuc  
(podpis oświadczającego)

**Dr hab. n. med. Magdalena Paplińska-Goryca**

Warszawa, 27.09.2024 r.

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma* (doi: 10.3390/cells12121631) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował opracowanie koncepcji badania, oznaczenia laboratoryjne, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 20%.

Jako współautorka pracy pt. *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study* (doi: 10.1111/jcmm.70110) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował opracowanie koncepcji badania, oznaczenia laboratoryjne, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 20%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej.



(podpis oświadczającego)

**Prof. dr hab. n. med. Rafał Krenke**

Warszawa, 27.09.2024 r.

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications* (doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.017) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował pracę nad tekstem manuskryptu oraz merytoryczne poprawki. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 10%.

Jako współautor pracy pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma* (doi: 10.3390/cells12121631) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował analizę wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 2,5%.

Jako współautor pracy pt. *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study* (doi: 10.1111/jcmm.70110) oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował analizę wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 2%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej.



.....  
(podpis oświadczającego)

**Dr n. med. i n. o zdr. Małgorzata Proboszcz**

Warszawa, 18.09.2024 r.

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma (doi: 10.3390/cells12121631)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował wykonanie oznaczeń laboratoryjnych oraz merytoryczne poprawki. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 5%.

Jako współautorka pracy pt. *Transcriptional profiles of peripheral eosinophils in chronic obstructive pulmonary disease and asthma – an exploratory study (doi: 10.1111/jcmm.70110)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował wykonanie oznaczeń laboratoryjnych oraz merytoryczne poprawki. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 3%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej.

Małgorzata Proboszcz.....

(podpis oświadczającego)



**Dr hab. n. med. Patrycja Nejman-Gryz**

Warszawa, 27.09.2024 r.

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Blood and Sputum Eosinophils of COPD Patients Are Differently Polarized than in Asthma (doi: 10.3390/cells12121631)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowanie publikacji wynosił 2,5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako części rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Mycroft-Rzeszotarskiej.

.....*Nejman-Gryz*.....  
(podpis oświadczającego)

## 11. Piśmiennictwo do rozdziałów w języku polskim

Piśmiennictwo dotyczące opublikowanych prac stanowi integralną część odpowiednich publikacji.

1. Adeloye D, Song P, Zhu Y, Campbell H, Sheikh A, Rudan I. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Respir Med.* 2022;10(5):447-58.
2. Agustí A, Celli BR, Criner GJ, Halpin D, Anzueto A, Barnes P, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2023 Report: GOLD Executive Summary. *European Respiratory Journal.* 2023;61(4):2300239.
3. Quaderi SA, Hurst JR. The unmet global burden of COPD. *Glob Health Epidemiol Genom.* 2018;3:e4.
4. Śliwiński P, Górecka D, Jassem E, Pierzchała W. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc Dotyczące Rozpoznawania i Leczenia Przewlekłej Obturacyjnej Choroby Płuc. *Advances in Respiratory Medicine.* 2014;82(3):227-63.
5. Welte T, Vogelmeier C, Papi A. COPD: early diagnosis and treatment to slow disease progression. *Int J Clin Pract.* 2015;69(3):336-49.
6. Hurst JR, Skolnik N, Hansen GJ, Anzueto A, Donaldson GC, Dransfield MT, et al. Understanding the impact of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations on patient health and quality of life. *European Journal of Internal Medicine.* 2020;73:1-6.
7. Cazzola M, Rogliani P, Blasi F. Can Treatable Traits Be the Approach to Addressing the Complexity and Heterogeneity of COPD? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2023;18:1959-64.
8. Corlateanu A, Mendez Y, Wang Y, Garnica RJA, Botnaru V, Siafakas N. "Chronic obstructive pulmonary disease and phenotypes: a state-of-the-art.". *Pulmonology.* 2020;26(2):95-100.
9. Jackson DJ, Akuthota P, Roufousse F. Eosinophils and eosinophilic immune dysfunction in health and disease. *Eur Respir Rev.* 2022;31(163).
10. Yayan J, Rasche K. Asthma and COPD: Similarities and Differences in the Pathophysiology, Diagnosis and Therapy. *Advances in experimental medicine and biology.* 2016;910:31-8.
11. Mukherjee M, Lacy P, Ueki S. Eosinophil Extracellular Traps and Inflammatory Pathologies—Untangling the Web! *Frontiers in Immunology.* 2018;9.

12. Wen T, Rothenberg ME. The Regulatory Function of Eosinophils. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5).
13. Salvo-Romero E, Rodiño-Janeiro BK, Albert-Bayo M, Lobo B, Santos J, Farré R, et al. Eosinophils in the Gastrointestinal Tract: Key Contributors to Neuro-Immune Crosstalk and Potential Implications in Disorders of Brain-Gut Interaction. *Cells*. 2022;11(10).
14. Mycroft K, Krenke R, Gorska K. Eosinophils in COPD-Current Concepts and Clinical Implications. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(8):2565-74.
15. Park YM, Bochner BS. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010;2(2):87-101.
16. Lombardi C, Berti A, Cottini M. The emerging roles of eosinophils: Implications for the targeted treatment of eosinophilic-associated inflammatory conditions. *Curr Res Immunol*. 2022;3:42-53.
17. McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine*. 2017;4.
18. Schwartz C, Willebrand R, Huber S, Rupec RA, Wu D, Locksley R, et al. Eosinophil-specific deletion of  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  in mice reveals a critical role of NF- $\kappa$ B-induced Bcl-xL for inhibition of apoptosis. *Blood*. 2015;125(25):3896-904.
19. Zimmermann N, Rothenberg ME. Mechanism of enhanced eosinophil survival in inflammation. *Blood*. 2015;125(25):3831-2.
20. Whetstone CE, Ranjbar M, Omer H, Cusack RP, Gauvreau GM. The Role of Airway Epithelial Cell Alarmins in Asthma. *Cells*. 2022;11(7).
21. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirottin D, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3279-95.
22. Kanda A, Yun Y, Bui DV, Nguyen LM, Kobayashi Y, Suzuki K, et al. The multiple functions and subpopulations of eosinophils in tissues under steady-state and pathological conditions. *Allergy International*. 2021;70(1):9-18.
23. Wilson GE, Knight J, Liu Q, Shelar A, Stewart E, Wang X, et al. Activated sputum eosinophils associated with exacerbations in children on mepolizumab. *J Allergy Clin Immunol*. 2024.
24. Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(4):482-98.

25. Veen IT, Grootendorst, Bel, Smits, Keur VD, Sterk, et al. CD11b and L-selectin expression on eosinophils and neutrophils in blood and induced sputum of patients with asthma compared with normal subjects. *Clinical & Experimental Allergy*. 1998;28(5):606-15.
26. Tak T, Hilvering B, Tesselaar K, Koenderman L. Similar activation state of neutrophils in sputum of asthma patients irrespective of sputum eosinophilia. *Clin Exp Immunol*. 2015;182(2):204-12.
27. Komlósi ZI, van de Veen W, Kovács N, Szűcs G, Sokolowska M, O'Mahony L, et al. Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma. *Mol Aspects Med*. 2022;85:100995.
28. Vatrella A, Maglio A, Pelaia C, Ciampo L, Pelaia G, Vitale C. Eosinophilic inflammation: An Appealing Target for Pharmacologic Treatments in Severe Asthma. *Biomedicines*. 2022;10(9):2181.
29. Matucci A, Vultaggio A, Maggi E, Kasujee I. Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question? *Respiratory research*. 2018;19(1):113.
30. Levy ML, Bacharier LB, Bateman E, Boulet L-P, Brightling C, Buhl R, et al. Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. *npj Primary Care Respiratory Medicine*. 2023;33(1):7.
31. Kim VL, Coombs NA, Staples KJ, Ostridge KK, Williams NP, Wootton SA, et al. Impact and associations of eosinophilic inflammation in COPD: analysis of the AERIS cohort. *Eur Respir J*. 2017;50(4).
32. Leigh R, Pizzichini MM, Morris MM, Maltais F, Hargreave FE, Pizzichini E. Stable COPD: predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment. *Eur Respir J*. 2006;27(5):964-71.
33. Gorska K, Nejman-Gryz P, Paplinska-Goryca M, Korczynski P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative Study of IL-33 and IL-6 Levels in Different Respiratory Samples in Mild-to-Moderate Asthma and COPD. *COPD*. 2018;15(1):36-45.
34. Eltboli O, Bafadhel M, Hollins F, Wright A, Hargadon B, Kulkarni N, et al. COPD exacerbation severity and frequency is associated with impaired macrophage efferocytosis of eosinophils. *BMC pulmonary medicine*. 2014;14:112.
35. Barnes PJ. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(7):454-66.

36. Tworek D, Majewski S, Szewczyk K, Kiszalkiewicz J, Kurmanowska Z, Gorski P, et al. The association between airway eosinophilic inflammation and IL-33 in stable non-atopic COPD. *Respir Res.* 2018;19(1):108.
37. Li T, Gao L, Ma HX, Wei YY, Liu YH, Qin KR, et al. Clinical value of IL-13 and ECP in the serum and sputum of eosinophilic AECOPD patients. *Exp Biol Med (Maywood).* 2020;245(14):1290-8.
38. Lin Y, Sang L, Wang J, Chen Y, Lai J, Zhu X, et al. Analysis of Airway Thickening and Serum Cytokines in COPD Patients with Frequent Exacerbations: A Heart of the Matter. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2023;18:2353-64.
39. Jacobsen EA, Doyle AD, Colbert DC, Zellner KR, Protheroe CA, LeSuer WE, et al. Differential activation of airway eosinophils induces IL-13-mediated allergic Th2 pulmonary responses in mice. *Allergy.* 2015;70(9):1148-59.
40. Doyle AD, Mukherjee M, LeSuer WE, Bittner TB, Pasha SM, Frere JJ, et al. Eosinophil-derived IL-13 Promotes Emphysema. *Eur Respir J.* 2019.
41. Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ, Jr., et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest.* 2000;106(9):1081-93.
42. Chaudhuri R, McSharry C, Brady J, Donnelly I, Grierson C, McGuinness S, et al. Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relationship to disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(3):655-63 e8.
43. Weiszhar Z, Horvath I. Induced sputum analysis: step by step. *Breathe.* 2013;9(4):300-6.
44. Proboszcz M, Mycroft K, Paplinska-Goryca M, Gorska K, Nejman-Gryz P, Jankowski P, et al. Relationship between Blood and Induced Sputum Eosinophils, Bronchial Hyperresponsiveness and Reversibility of Airway Obstruction in Mild-to-Moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD.* 2019;16(5-6):354-61.
45. Hastie AT, Martinez FJ, Curtis JL, Doerschuk CM, Hansel NN, Christenson S, et al. Association of sputum and blood eosinophil concentrations with clinical measures of COPD severity: an analysis of the SPIROMICS cohort. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2017;5(12):956-67.

46. Siva R, Green RH, Brightling CE, Shelley M, Hargadon B, McKenna S, et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. *Eur Respir J*. 2007;29(5):906-13.
47. Chou K-T, Su K-C, Hsiao Y-H, Huang S-F, Ko H-K, Tseng C-M, et al. Post-bronchodilator Reversibility of FEV 1 and Eosinophilic Airway Inflammation in COPD. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*. 2017;53(10):547-53.
48. Reid DW, Wen Y, Johns DP, Williams TJ, Ward C, Walters EH. Bronchodilator reversibility, airway eosinophilia and anti-inflammatory effects of inhaled fluticasone in COPD are not related. *Respirology*. 2008;13(6):799-809.
49. Gao J, Zhou W, Chen B, Lin W, Wu S, Wu F. Sputum cell count: biomarkers in the differentiation of asthma, COPD and asthma-COPD overlap. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017;12:2703-10.
50. Górska K, Krenke R, Korczyński P, Kościuch J, Domagała-Kulawik J, Chazan R. Eosinophilic airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *J Physiol Pharmacol* 2008;59(suppl 6):261-70.
51. Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Gosman MM, Stolk J, Sont JK, Jansen DF, et al. Dissociation of lung function and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(5):499-504.
52. George L, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Chronic Dis*. 2016;7(1):34-51.
53. Gorska K, Maskey-Warzechowska M, Nejman-Gryz P, Korczynski P, Prochorec-Sobieszek M, Krenke R. Comparative study of periostin expression in different respiratory samples in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126(3):124-37.
54. Bachert C, Luong AU, Gevaert P, Mullol J, Smith SG, Silver J, et al. The Unified Airway Hypothesis: Evidence From Specific Intervention With Anti-IL-5 Biologic Therapy. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023;11(9):2630-41.
55. Gorska K, Paplinska-Goryca M, Nejman-Gryz P, Goryca K, Krenke R. Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in the Phenotyping of Mild-to-Moderate Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD*. 2017;14(2):181-9.

56. Westerhof GA, Korevaar DA, Amelink M, de Nijs SB, de Groot JC, Wang J, et al. Biomarkers to identify sputum eosinophilia in different adult asthma phenotypes. *Eur Respir J*. 2015;46(3):688-96.
57. Fowler SJ, Tavernier G, Niven R. High blood eosinophil counts predict sputum eosinophilia in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):822-4 e2.
58. Negewo NA, McDonald VM, Baines KJ, Wark PA, Simpson JL, Jones PW, et al. Peripheral blood eosinophils: a surrogate marker for airway eosinophilia in stable COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:1495-504.
59. Kolsum U, Donaldson GC, Singh R, Barker BL, Gupta V, George L, et al. Blood and sputum eosinophils in COPD; relationship with bacterial load. *Respir Res*. 2017;18(1):88.
60. Hartjes F, Vonk JM, Faiz A, Hiemstra PS, Lapperre TS, Kerstjens HAM, et al. Predictive value of eosinophils and neutrophils on clinical effects of ICS in COPD. *Respirology* 2018;23:1023-31.
61. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Pancholi M, Venge P, et al. Blood eosinophils to direct corticosteroid treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(1):48-55.
62. Yun JH, Lamb A, Chase R, Singh D, Parker MM, Saferali A, et al. Blood eosinophil count thresholds and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(6):2037-47 e10.
63. Schumann DM, Tamm M, Kostikas K, Stolz D. Stability of the Blood Eosinophilic Phenotype in Stable and Exacerbated COPD. *Chest*. 2019.
64. Vedel-Krogh S, Nielsen SF, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Blood Eosinophils and Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The Copenhagen General Population Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(9):965-74.
65. MacDonald MI, Osadnik CR, Bulfin L, Hamza K, Leong P, Wong A, et al. Low and high blood eosinophil counts as biomarkers in hospitalised acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *CHEST*.
66. Casanova C, Celli BR, de-Torres JP, Martinez-Gonzalez C, Cosio BG, Pinto-Plata V, et al. Prevalence of persistent blood eosinophilia: relation to outcomes in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2017;50(5).

67. Shin SH, Park HY, Kang D, Cho J, Kwon SO, Park JH, et al. Serial blood eosinophils and clinical outcome in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2018;19(1):134.
68. Ferguson GT, Rabe KF, Martinez FJ, Fabbri LM, Wang C, Ichinose M, et al. Triple therapy with budesonide/glycopyrrolate/formoterol fumarate with co-suspension delivery technology versus dual therapies in chronic obstructive pulmonary disease (KRONOS): a double-blind, parallel-group, multicentre, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2018;6(10):747-58.
69. Siddiqui SH, Pavord ID, Barnes NC, Guasconi A, Lettis S, Pascoe S, et al. Blood eosinophils: a biomarker of COPD exacerbation reduction with inhaled corticosteroids. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018;13:3669-76.
70. Pascoe S, Locantore N, Dransfield MT, Barnes NC, Pavord ID. Blood eosinophil counts, exacerbations, and response to the addition of inhaled fluticasone furoate to vilanterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a secondary analysis of data from two parallel randomised controlled trials. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2015;3(6):435-42.
71. Siddiqui SH, Guasconi A, Vestbo J, Jones P, Agusti A, Paggiaro P, et al. Blood Eosinophils: A Biomarker of Response to Extrafine Beclomethasone/Formoterol in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192:523-5.
72. Barnig C, Alsaleh G, Jung N, Dembele D, Paul N, Poirot A, et al. Circulating Human Eosinophils Share a Similar Transcriptional Profile in Asthma and Other Hypereosinophilic Disorders. *PloS one.* 2015;10(11):e0141740.
73. Yun JH, Chase R, Parker MM, Saferali A, Castaldi PJ, Silverman EK, et al. Peripheral Blood Gene Expression Signatures of Eosinophilic Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;61(3):398-401.
74. Higham A, Beech A, Wolosianka S, Jackson N, Long G, Kolsum U, et al. Type 2 inflammation in eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *Allergy.* 2021;76(6):1861-4.
75. George L, Taylor AR, Esteve-Codina A, Soler Artigas M, Thun GA, Bates S, et al. Blood eosinophil count and airway epithelial transcriptome relationships in COPD versus asthma. *Allergy.* 2020;75(2):370-80.
76. Venkatesan P. GOLD COPD report: 2024 update. *Lancet Respir Med.* 2024;12(1):15-6.



77. Lipson DA, Barnhart F, Brealey N, Brooks J, Criner GJ, Day NC, et al. Once-Daily Single-Inhaler Triple versus Dual Therapy in Patients with COPD. *N Engl J Med.* 2018;378(18):1671-80.
78. Papi A, Vestbo J, Fabbri L, Corradi M, Prunier H, Cohuet G, et al. Extrafine inhaled triple therapy versus dual bronchodilator therapy in chronic obstructive pulmonary disease (TRIBUTE): a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *The Lancet.* 2018;391(10125):1076-84.
79. Pavord ID, Lettis S, Locantore N, Pascoe S, Jones PW, Wedzicha JA, et al. Blood eosinophils and inhaled corticosteroid/longacting  $\beta$ -2 agonist efficacy in COPD. *Thorax.* 2016;71:118–25.
80. Barnes NC, Sharma R, Lettis S, Calverley PM. Blood eosinophils as a marker of response to inhaled corticosteroids in COPD. *Eur Respir J.* 2016;47(5):1374-82.
81. Bafadhel M, Peterson S, De Blas MA, Calverley PM, Rennard SI, Richter K, et al. Predictors of exacerbation risk and response to budesonide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis of three randomised trials. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2018;6(2):117-26.
82. Chapman KR, Hurst JR, Frent SM, Larbig M, Fogel R, Guerin T, et al. Long-Term Triple Therapy De-escalation to Indacaterol/Glycopyrronium in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (SUNSET): A Randomized, Double-Blind, Triple-Dummy Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(3):329-39.
83. Plumb J, Robinson L, Lea S, Banyard A, Blaikley J, Ray D, et al. Evaluation of glucocorticoid receptor function in COPD lung macrophages using beclomethasone-17-monopropionate. *PloS one.* 2013;8(5):e64257.
84. Southworth T, Metryka A, Lea S, Farrow S, Plumb J, Singh D. IFN- $\gamma$  synergistically enhances LPS signalling in alveolar macrophages from COPD patients and controls by corticosteroid-resistant STAT1 activation. *Br J Pharmacol.* 2012;166(7):2070-83.
85. Armstrong J, Sargent C, Singh D. Glucocorticoid sensitivity of lipopolysaccharide-stimulated chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2009;158(1):74-83.
86. Armstrong J, Harbron C, Lea S, Booth G, Cadden P, Wreggett KA, et al. Synergistic effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with a corticosteroid in alveolar

macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338(3):732-40.

87. Higham A, Booth G, Lea S, Southworth T, Plumb J, Singh D. The effects of corticosteroids on COPD lung macrophages: a pooled analysis. *Respir Res.* 2015;16(1):98.

88. Hoppstädter J, Ammit AJ. Role of Dual-Specificity Phosphatase 1 in Glucocorticoid-Driven Anti-inflammatory Responses. *Front Immunol.* 2019;10:1446.

89. Bi J, Min Z, Yuan H, Jiang Z, Mao R, Zhu T, et al. PI3K inhibitor treatment ameliorates the glucocorticoid insensitivity of PBMCs in severe asthma. *Clin Transl Med.* 2020;9(1):22.

90. Vestbo J, Papi A, Corradi M, Blazhko V, Montagna I, Francisco C, et al. Single inhaler extrafine triple therapy versus long-acting muscarinic antagonist therapy for chronic obstructive pulmonary disease (TRINITY): a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *The Lancet.* 2017;389(10082):1919-29.

91. Rabe KF, Rennard S, Martinez FJ, Celli BR, Singh D, Papi A, et al. Targeting Type 2 Inflammation and Epithelial Alarmins in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Biologics Outlook. *Am J Respir Crit Care Med.* 2023;208(4):395-405.

92. Pavord ID, Chanez P, Criner GJ, Kerstjens HAM, Korn S, Lugogo N, et al. Mepolizumab for Eosinophilic Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(17):1613-29.

93. Criner GJ, Celli BR, Singh D, Agusti A, Papi A, Jison M, et al. Predicting response to benralizumab in chronic obstructive pulmonary disease: analyses of GALATHEA and TERRANOVA studies. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2019.

94. Bhatt SP, Rabe KF, Hanania NA, Vogelmeier CF, Cole J, Bafadhel M, et al. Dupilumab for COPD with Type 2 Inflammation Indicated by Eosinophil Counts. *New England Journal of Medicine.* 2023.

95. Bhatt SP, Rabe KF, Hanania NA, Vogelmeier CF, Bafadhel M, Christenson SA, et al. Dupilumab for COPD with Blood Eosinophil Evidence of Type 2 Inflammation. *N Engl J Med.* 2024.

96. Harb H, Chatila TA. Mechanisms of Dupilumab. *Clin Exp Allergy.* 2020;50(1):5-14.

97. Rabe KF, Celli BR, Wechsler ME, Abdulai RM, Luo X, Boomsma MM, et al. Safety and efficacy of itepekimab in patients with moderate-to-severe COPD: a genetic association study and randomised, double-blind, phase 2a trial. *Lancet Respir Med.* 2021;9(11):1288-98.

98. Yousuf AJ, Mohammed S, Carr L, Yavari Ramsheh M, Micieli C, Mistry V, et al. Astegolimab, an anti-ST2, in chronic obstructive pulmonary disease (COPD-ST2OP): a phase 2a, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2022;10(5):469-77.
99. Lea S, Higham A, Beech A, Singh D. How inhaled corticosteroids target inflammation in COPD. *European Respiratory Review*. 2023;32(170):230084.
100. Quint JK, Ariel A, Barnes PJ. Rational use of inhaled corticosteroids for the treatment of COPD. *NPJ Prim Care Respir Med*. 2023;33(1):27.
101. Mkorombindo T, Dransfield MT. Mepolizumab in the treatment of eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2019;14:1779-87.
102. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(13):1198-207.
103. Rodrigo-Muñoz JM, Cañas JA, Sastre B, Rego N, Greif G, Rial M, et al. Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. *Allergy*. 2019;74(3):507-17.
104. Esnault S, Kelly EA, Johansson MW, Liu LY, Han ST, Akhtar M, et al. Semaphorin 7A is expressed on airway eosinophils and upregulated by IL-5 family cytokines. *Clin Immunol*. 2014;150(1):90-100.